



- 3** Prvi in drugi val koronavirusne bolezni 2019 v Sloveniji: epidemiologija, klinična slika, zapleti in zdravljenje na oddelku intenzivnega zdravljenja – *Domen Kulovec, Naneta Legan Kokol, Sara Maraž, Matjaž Jereb*
- 25** Uporaba melatonina v diagnostiki in zdravljenju demence – *Lara Malec, Anja Kokalj Palandačič*
- 37** *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* – porajajoč se patogen? – *Katja Strašek Smrdel*
- 49** Kronična nestabilnost zunanjega gležnja in načini zdravljenja – *Aljaž Belšak, Matjaž Merc*
- 61** Vloga radioloških preiskovalnih metod pri bolniku s poškodbo glave – *Jan Tehovnik, Jernej Avsenik*
- 71** Paraaortna in pelvična limfadenektomija pri začetnem epitelijemskem raku jajčnikov – *Tina Pavlin, Eva Drmota, Nina Kovačević, Sebastjan Merlo*
- 81** Zunajcelični vezikli v urinu kot vir novih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice – *Anžej Hladnik, Ivana Sedej, Vita Dolžan, Miha Arnol, Metka Lenassi*
- 105** Depresija in prehrana – *Amadea Zupan*
- 121** Virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo cetilpiridinijevega klorida in benzdaminijevega klorida na virus influence A – *Andrej Steyer, Tina Mikuletič, Tjaša Cerar Kišek, Tina Triglav*
- 131** Diagnostični izziv
- 135** Seznam diplomantov
- 137** Navodila avtorjem
- 143** Guidelines for Authors

MEDICINSKI RAZGLEDI

Biomedicinski raziskovalni, strokovni in pregledni članki

UREDNIŠTVO

Društvo Medicinski razgledi
Korytkova ulica 2
1000 Ljubljana
Slovenija

T (01) 524 23 56 **F** (01) 543 70 11

E info@medrazgl.si

S www.medrazgl.si

POR: 02014-0050652588

GLAVNI UREDNIK

Gašper Tonin

ODGOVORNA UREDNICA

Gaja Markovič

TEHNIČNI UREDNIKI

Anamarija Hribar, Jurij Martinčič,
Hana Rakuša, Živa Šubic

UREDNIŠKI ODBOR

Manca Bregar, Pina Držan, Lucia
Jankovski, Tamara Jarm, Julija Kalcher,
Lucija Kobal, Nina Kobal, Tilen
Kristanc, Naneta Legan Kokol,
Maja Osojnik, Zala Roš, Jera Aideen
Schiffrer, Uroš Tršan, David Vidmar,
Ines Žabkar, Larisa Žerovnik

LEKTORJA

Mateja Hočevar Gregorič, Gašper Tonin

LEKTORICA ZA ANGLEŠKI JEZIK

Lea Turner

PRELOM

SYNCOMP d. o. o.

TISK

Nonparel d. o. o.

FOTOGRAFIJA NA NASLOVNICI

Marko Šubic

PODPORNIKI

Medicinska fakulteta UL
Javna agencija za raziskovalno
dejavnost RS

Revija izhaja štirikrat letno v 1.650 izvodih.

Cena izvoda je **6 €**, za študente **4 €**, za ustanove **10 €**.

COPYRIGHT © MEDICINSKI RAZGLEDI 2022

Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje posameznih delov ali celotne publikacije s katerimkoli sredstvom brez pisnega privoljenja založbe je prepovedano.

- 3** Prvi in drugi val koronavirusne bolezni 2019 v Sloveniji: epidemiologija, klinična slika, zapleti in zdravljenje na oddelku intenzivnega zdravljenja – *Domen Kulovec, Naneta Legan Kokol, Sara Maraž, Matjaž Jereb*
- 25** Uporaba melatonina v diagnostiki in zdravljenju demence – *Lara Malec, Anja Kokalj Palandačič*
- 37** *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* – porajajoč se patogen? – *Katja Strašek Smrdel*
- 49** Kronična nestabilnost zunanega gležnja in načini zdravljenja – *Aljaž Belšak, Matjaž Merc*
- 61** Vloga radioloških preiskovalnih metod pri bolniku s poškodbo glave – *Jan Tehovnik, Jernej Avsenik*
- 71** Paraaortna in pelvična limfadenektomija pri začetnem epitelijskem raku jajčnikov – *Tina Pavlin, Eva Drmota, Nina Kovačević, Sebastjan Merlo*
- 81** Zunajcelični vezikli v urinu kot vir novih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice – *Anžej Hladnik, Ivana Sedej, Vita Dolžan, Miha Arnol, Metka Lenassi*
- 105** Depresija in prehrana – *Amadea Zupan*
- 121** Virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo cetilpiridinijevega klorida in benzidaminijevega klorida na virus influence A – *Andrej Steyer, Tina Mikuletič, Tjaša Cerar Kišek, Tina Triglav*
- 131** Diagnostični izziv
- 135** Seznam diplomantov
- 137** Navodila avtorjem
- 143** Guidelines for Authors

Domen Kulovec^{1*}, Naneta Legan Kokol^{2*}, Sara Maraž^{3*}, Matjaž Jereb^{4*}

Prvi in drugi val koronavirusne bolezni 2019 v Sloveniji: epidemiologija, klinična slika, zapleti in zdravljenje na oddelku intenzivnega zdravljenja

The First and Second Wave of Coronavirus Infectious Disease-19 in Slovenia: Epidemiology, Clinical Presentation, Complications and Treatment in the Intensive Care Unit

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: SARS-CoV-2, epidemiologija, patofiziologija, intenzivno zdravljenje, zapleti, OIZ

Koronavirusna bolezen 2019 (angl. *coronavirus disease-19*, COVID-19) je nalezljiva virusna okužba dihal, povzročena z novim koronavirusom tipa 2, in se najpogosteje kaže z vročino, kašljem in utrujenostjo. Ob težjem poteku lahko vidimo raznoliko klinično sliko. Pri večini bolnikov so prizadeta dihalna, kjer virus povzroči pljučnico ali sindrom akutne dihalne stiske, lahko pa vpliva tudi na delovanje srčno-žilnega sistema, na funkcijo strjevanja krvi, na živčevje ali ledvice. Nevarnost predstavlja tudi pojav t. i. tihe hipoksemije. Bolniki z najtežjim potekom so sprejeti na oddelk intenzivnega zdravljenja, kjer so zdravljeni simptomatsko. Poteka bolezni pri posameznem bolniku še ne moremo napovedati z zadostno zanesljivostjo, prav tako še vedno potrebujemo tudi uspešno vzročno zdravljenje. Avtorji podrobneje predstavljamo klinično sliko COVID-19, epidemiološko sliko v Sloveniji med prvim in drugim valom epidemije, zaplete bolezni in dejavnike, ki vplivajo na njen izid, ter zdravljenje COVID-19 na oddelku intenzivnega zdravljenja.

ABSTRACT

KEY WORDS: SARS-CoV-2, epidemiology, pathophysiology, intensive care, complications, ICU

The coronavirus disease-19 (COVID-19) is an infectious disease of the respiratory tract, caused by the novel coronavirus type 2, with fever, cough and fatigue as the most common symptoms. Severe forms of the disease can have a diverse clinical presentation. The

*Avtorji si delijo mesto prvega avtorja.

¹ Domen Kulovec, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; domen.kulovec@outlook.com

² Naneta Legan Kokol, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; naneta.legan@gmail.com

³ Sara Maraž, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; sara.maraz.11@gmail.com

⁴ Izr. prof. dr. Matjaž Jereb, dr. med., Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Japljeva 2, 1000 Ljubljana; Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; matjaz.jereb@kclj.si

respiratory tract is affected most commonly, where COVID-19 can present with pneumonia or acute respiratory distress syndrome, followed by complications of the cardiovascular, coagulation and nervous system, or the kidneys. The so called silent hypoxemia also poses a special danger. Patients with the most severe forms of COVID-19 are admitted to the intensive care unit, where they receive mostly supportive therapy. The need for a more reliable prognosis of the course of the disease and, especially, for an effective causative treatment still remains. The authors present the clinical manifestations of COVID-19, the epidemiological data in Slovenia, complications of the disease and factors that affect its outcome, as well as treatment in the intensive care unit.

UVOD

Koronavirusna bolezen 2019 (angl. *coronavirus disease-19*, COVID-19) je nalezljiva virusna okužba dihal, povzročena s koronavirusom hudega akutnega respiratornega sindroma tipa 2 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2).

Koronavirusi so pozitivno polarni RNA-virusi. Do danes je odkritih sedem koronavirusov, ki lahko okužijo ljudi. Povzročajo predvsem bolezn dihal in so odgovorni za 5–10 % vseh akutnih primerov tovrstnih obolenj (1). Okužbe ne puščajo dolgotrajne odpornosti, zato se lahko z istim virusom okužimo in zbolimo večkrat na sezono (2, 3). Večina koronavirusov povzroča prehlade ali druga obolenja zgornjih dihalnih poti, pri imunsko oslabilih ali starejših se bolezen lahko razširi tudi na spodnje dihalne poti. V družino koronavirusov spadata tudi koronavirus hudega akutnega respiratornega sindroma tipa 1 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 1*, SARS-CoV-1) in koronavirus bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (angl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus 1*, MERS-CoV), ki v nasprotju z ostalimi povzročata raznoliko klinično sliko s prizadetostjo dihalnega in drugih sistemov (1). SARS-CoV-1 se je prvič pojavil leta 2002, epidemija pa se je nadaljevala v leto 2003. Skupno je virus okužil okoli 8.100 ljudi v 29 različnih državah in povzročil 774 smrti – smrtnost je bila ocenjena na 10 % (1, 4). MERS-CoV je bil odkrit v Savdski Arabiji leta 2012 in je še

vedno prisoten med ljudmi – do maja 2021 je okužil 2.574 ljudi, 886 jih je umrlo. Smrtnost MERS-CoV je 35 % (1, 4, 5).

SARS-CoV-2 spada v družino β -koronavirusov. V premer meri 60–140 nm (1). Tako kot za SARS-CoV-1 in MERS-CoV so primarni gostitelji virusa med drugim netopirji, iz katerih se je bolezen domnevno prenesla na ljudi (4). SARS-CoV-2 se prenaša kapljično in z neposrednim stikom, ob daljši izpostavitvi aerosolu tudi preko zraka. Osnovno pomnoževalno število, ki nam pove, koliko zdravih oseb okuži en oboleli, je po ocenah 2,2, se pa z novimi različicami virusa to število viša (1). Virus lahko povzroča brezsimptomno okužbo, blago, zmerno, hudo ali kritično obliko bolezni, pod slednjo spada sindrom akutne dihalne stiske (angl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) s pridruženimi zapleti (6).

EPIDEMIOLOŠKA SLIKA

SARS-CoV-2 je do julija 2021 okužil nad 182 milijonov ljudi in povzročil nad 3,9 milijona smrti. Več kot 168 milijonov ljudi je po bolezni že okrevalo, cepljenih je bilo skoraj 3 milijarde ljudi (7, 8).

Bolezen se je začela v Wuhanu na Kitajskem, kjer so decembra 2019 zabeležili visok porast primerov pljučnic. Zdravstvena komisija občine Wuhan je o dogodkih 31. decembra obvestila kitajski Center za obvladovanje in preprečevanje bolezni (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) in Svetovno zdravstveno organizacijo (SZO).

7. januarja 2020 je bil kot povzročitelj prepoznani nov virus, takrat imenovan »novi koronavirus« in kasneje preimenovan v SARS-CoV-2 (9). Z genetskimi analizami so ugotovili, da so verjeten izvor virusa netopirji, z mutacijo pa je postal kužen tudi za ljudi (1).

Prvi primer okužbe izven Kitajske se je pojavil na Tajskem, in sicer 13. januarja 2020 (10). Virus se je kmalu razširil še na druge celine; ameriško celino je COVID-19 dosegel 20. januarja, prvi primer v Evropi je bil odkrit v Franciji 24. januarja (7, 11). 13. marca je SZO razglasila pandemijo (12). V tabeli 1 so zapisani pomembni datumi v širjenju COVID-19 s Kitajske po svetu in do Slovenije.

Prvi primer okužbe v Sloveniji smo zabeležili 4. marca 2020, na oddelek za intenzivno zdravljenje (OIZ) je bil prvi bolnik sprejet 10. marca 2020. Skupno se je od začetka razglasitve prve epidemije 12. marca 2020 do preklica druge epidemije 15. junija 2021 na OIZ zdravilo 2.628 bolnikov, smrtnost je bila okoli 28 % oz. po podatkih iz COVID-19 poročila OIZ Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKC LJ) 31 % v prvem in 25,9 % v drugem valu (13).

Prvi val epidemije je trajal od pojava bolezni v Sloveniji do 31. 5. 2020, drugi val od 1. 9. 2020 do 12. 3. 2021 in tretji val uradno od 12. 3. do 31. 8. 2021. Drugi in tretji val imata mnoge podobnosti. Pri obeh je že bilo skupinam z visokim tveganjem omogočeno cepljenje in delovanje vladnih ukrepov za zajezitev širjenja virusa je bilo v pol-

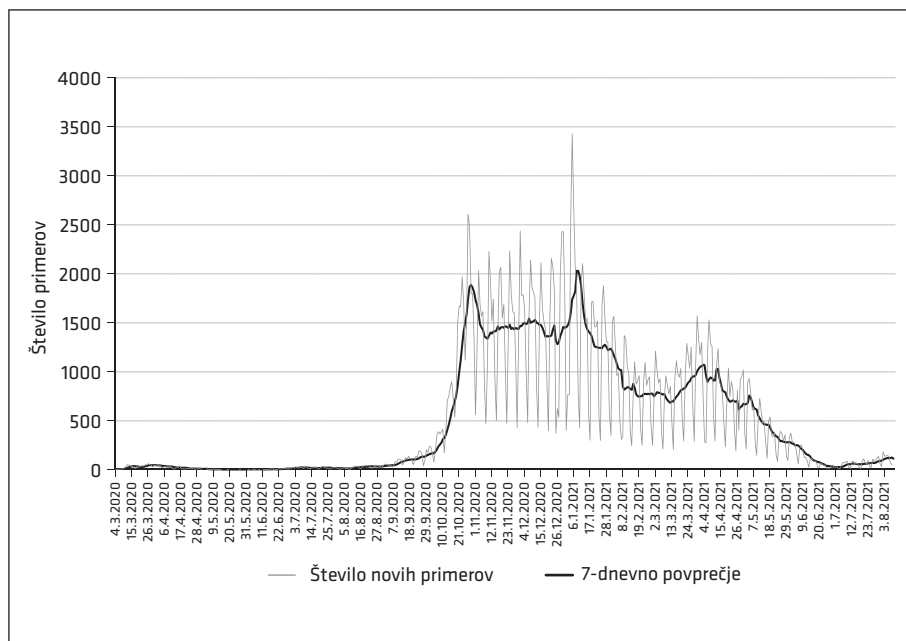
nem razmahu. Sledila sta si v kratkem času in število novih primerov se ni nikoli spustilo do ničle. Iz teh razlogov je težko ostro razmejiti oba valova med seboj. Zato bomo v tem članku pod pojmom »drugi val« pravzaprav zajeli tudi tretjega in ju obravnavali kot celoto.

Sliki 1 in 2 grafično prikazujeta epidemiološko sliko v Sloveniji. Na sliki 1 je prikazano število novih okužb od prvega zabeleženega primera v Sloveniji do konca drugega vala epidemije, na sliki 2 sedemdnevno povprečje števila sprejetih oseb v bolnišnice in na OIZ ter število smrti na OIZ zaradi COVID-19 (13). Poleti 2021, ob koncu tretjega vala, se je število novo okuženih zmanjševalo, kar lahko pripišemo predvsem vedno večjemu številu cepljenih ljudi, letnemu času in določenim ukrepom, ki so še vedno veljali v državi. Vse manj je bilo tudi sprejemov v bolnišnico in OIZ, zmanjševalo se je število smrti.

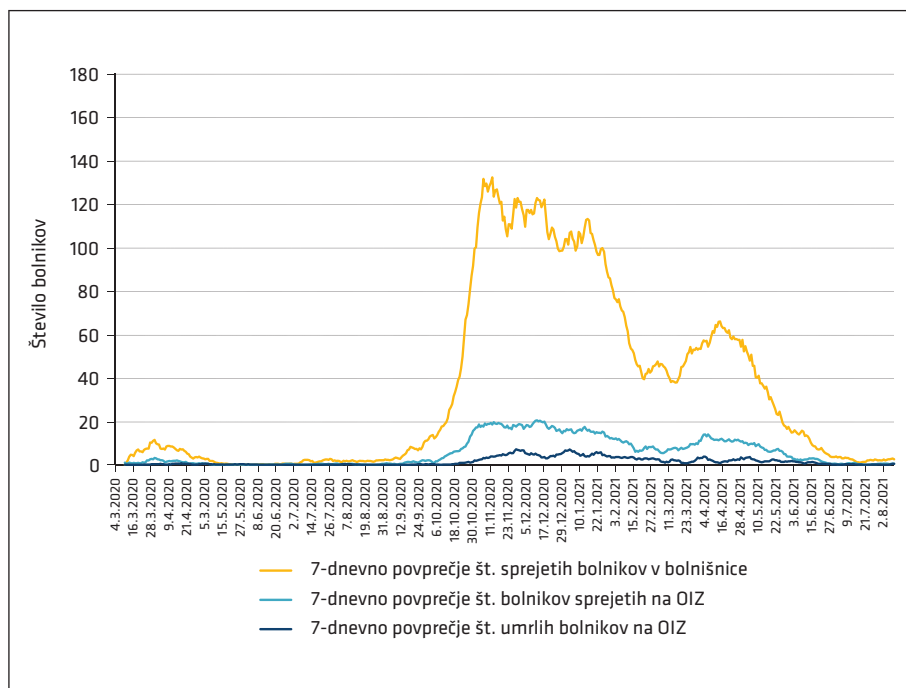
SARS-CoV-2 je nagnjen k spreminjanju svojega genoma, tako da se je med svojim širjenjem spremenil v več različic. Delijo se na različice, ki jim je smiselno slediti (angl. *variants of interest*, VOI), kjer večja nalezljivost, hujši potek ali/in večja odpornost na protitelesa in cepljenje še niso dokazani, ter na različice s tveganjem (angl. *variants of concern*, VOC), kjer dokazi za to že obstajajo. Med VOC spadajo naslednje različice: α (tudi B.1.1.7) se je pojavila v Združenem kraljestvu že septembra 2020. Je med 43 in 82 % bolj nalezljiva kot prvotna različica virusa, zato je bila poleti 2021 najpogostejša

Tabela 1. Datumi prvih primerov okužbe s koronavirusom hudega akutnega respiratornega sindroma tipa 2 (7, 11).

Kitajska, kasneje ugotovljen domnevni prvi primer	17. 11. 2019
Kitajska, prvi pozitivni primer, ugotovljen s hitrim testom	11. 1. 2020
Prvi primer izven Kitajske – Tajska	13. 1. 2020
Prvi primer izven Azije – ZDA	20. 1. 2020
Prvi primer v Evropi – Francija	24. 1. 2020
Slovenija	4. 3. 2020



Slika 1. Prikaz sedemdnednega povprečja števila novo okuženih (13).



Slika 2. Sedemdnedveno povprečje števila sprejemov v bolnišnico in na oddelek za intenzivno zdravljenje ter umrlih na oddelku za intenzivno zdravljenje zaradi koronavirusne bolezni 2019 (13). OIZ – oddelek za intenzivno zdravljenje.

različica v Združenem kraljestvu, razširila se je tudi drugod po svetu. Različica β (tudi B.1.351) se je oktobra 2020 pojavila v Južni Afriki in imela tudi zvečano nalezljivost. Različica γ (tudi P.1) se je pojavila v Braziliji decembra 2020, δ (tudi B.1.617.2) je bila v istem času najdena v Indiji. Različica Δ se je naprej razvila v tri različice – AY.1, AY.2 in AY.3, znane tudi kot δ plus. Med VOI spadajo še ζ , κ , ι , η , λ , θ in 20A (1, 14). V Sloveniji so prisotne že vse različice VOC, njihova pojavnost je povezana tudi z letnim časom; poleti, v času potovanja, je možnost vnosa novih različic virusa v državo višja.

KLINIČNA SLIKA

Simptomi in laboratorijske značilnosti

Inkubacijska doba je navadno med tremi in sedmimi dnevi, lahko do dva tedna (1). Najpogostejši klinični simptomi COVID-19 so vročina, kašelj in utrujenost. Med pogostimi simptomi so še bolečine v mišicah, nastajanje izmečka v dihalnih poteh, dispneja, bolečine v prsnem košu in mraženje (15, 16). Okvirno pogostost pojavljanja simpto-

mov in odstopanj v laboratorijskih kazalcih predstavljamo v tabeli 2 in 3 (15, 17).

Prevalenca posameznih simptomov se med raziskavami precej razlikuje, vendar velika večina kot najpogostejše simptome omenja kašelj, vročino in utrujenost.

Posebnost bolezni je, da ima mnogo bolnikov okvaro voha in/ali okusa, kar se lahko kaže celo s popolno odsotnostjo obojega, torej z anozmijo in agevzijo. Prevalenca tovrstnih simptomov se med raziskavami razlikuje. Okvaro voha ugotavljajo v 52–75 %, okvaro okusa v 43–82 %, popolno odsotnost voha in/ali okusa redkeje – približno v 15 % (18–22). Pogosteje se pojavljata pri ženskah. Lahko sta prva simptoma okužbe (18–21).

Vzrok za anozmijo in agevzijo še ni znan, a obstaja več hipotez. Vzrok za okvaro voha bi lahko bila poškodba vohalnega epitelija ali celo vohalnega bulbosa zaradi vdora in pomnoževanja SARS-CoV-2. Druga možnost je vezava virusa na encim angiotenzinske konvertaze 2 (angl. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) na površini podpornih epitelialnih celic in posledično njihova okvara oz. sprememba delovanja. Lahko bi šlo tudi za okvaro žilnih pericitov

Tabela 2. Prikaz pogostosti pojavljanja bolezenskih simptomov (15).

Simptomi	Pogostost pojavljanja (%)
Vročina	78
Suh kašelj	58
Utrujenost	31
Nastajanje izmečka	25
Dispneja	23
Mrzlica	18
Bolečine v mišicah	17
Glavobol	13
Bolečine v žrelu	12
Driska	10
Slabost in bruhanje	10 (6 in 4)
Izcedek iz nosu	8
Bolečine v prsnem košu	7

Tabela 3. Prikaz pogostosti pojavljanja bolezenskih laboratorijskih nenormalnosti (17). CRP – C-reaktivna beljakovina (angl. *C reactive protein*), LDH – laktatna dehidrogenaza, PCT – prokalcitonin (angl. *procalcitonin*).

Laboratorijski kazalci		Pogostost pojavljanja (%)
Levkociti	normalni	64,7
	znižani	23,5
	zvišani	9,9
Limfopenija		47,6
↑ CRP		65,9
↑ LDH		49,4
Nenormalni jetrni testi		26,4
↑ D-dimer		20,4
↑ PCT		16,7

v nosni sluznici, kar posredno spremeni delovanje vohalnih živčnih celic ali povzroči smrt določenega števila teh celic ob visokih koncentracijah interleukina (IL) 6. Kot možen vzrok anozmije raziskave prav tako navajajo z vnetjem povezane mehanizme, ki povzročajo lokalno otekanje sluznice in posledično motnjo v pretoku zraka v okolici čutnih celic.

Kot razlog za okvaro okusa se prav tako omenja vezava virusa na ACE2 v ustni sluznici, kar povzroči bodisi okvaro teh celic bodisi preko zavore teh receptorjev spremeni celično delovanje po za zdaj neznanem mehanizmu. Nekateri raziskovalci domnevajo, da okvara okusa nastane sekundarno kot posledica okvare voha, a to ne razloži, zakaj se pri nekaterih bolnikih pojavi okvara okusa samostojno in, po določenih virih, celo v večjem številu kot okvara voha. Kot možna tarča so bili omenjeni tudi receptorji za sialično kislino, ki se nahajajo v ustni sluznici. SARS-CoV-2 jih zasede in s tem zviša okušalni prag (22–24).

Slikovna diagnostika

Rentgenska slika prsnega koša pokaže spremembe, značilne za atipično pljučnico. Vidimo intersticijski infiltrat, kasneje v poteku bolezni lahko preide v alveolarni tip (25). Posebnost je, da se infiltrati pojavijo obod-

no, po navadi obojestransko in večžariščno, s trajanjem bolezni se lahko razširijo središčno in postanejo razpršeni po celotnih pljučih (26). Na CT pljuč najdemo obojestranske infiltrate z videzom mlečnega stekla, najpogosteje bazalno in obodno ob poprsnici (26, 27). Infiltrate videza mlečnega stekla ugotavljajo v okoli 80 % (16).

Težji potek bolezni in sprejem na oddelek intenzivnega zdravljenja

Po kitajskih kriterijih je potek bolezni označen kot hud, če ima bolnik frekvenco dihanja $\geq 30/\text{min}$, nasičenost krvi s kisikom $\leq 93\%$, razmerje $P_aO_2/P_iO_2 \leq 300$ ali obseg pljučnih infiltratov $> 50\%$ v 24–48 urah. Kot kritično potekajoč je označen vsak primer, kjer pride do dihalne odpovedi, septičnega šoka ali večorganske odpovedi (9, 28). Delež COVID-19 bolnikov s hudim ali kritičnim potekom bolezni, ki so potrebovali zdravljenje na OIZ, je bil v prvem valu med 20 in 35 % (25, 29–32). V drugem valu je bil delež teh bolnikov med 7,2 in 14 % (31, 32).

S slabšim izidom so povezani: višja starost, moški spol, debelost, prisotnost dispneje, zvišano število levkocitov (še posebej nevtrofilcev), zvišane vrednosti sečnine, kreatinina, kreatin kinaze, troponina I, C-reaktivne beljakovine (angl. *C reactive protein*, CRP), laktatne dehidrogenaze

(LDH), D-dimera in IL-6 ter znižane vrednosti albumina, trombocitov, limfocitov in razmerja P_aO_2/FiO_2 (33, 34). Prisotnost trombocitopenije ali limfocitopenije pomeni okoli trikrat večje tveganje za težji potek bolezni oz. smrtni izid (35, 36). Razmerje P_aO_2/FiO_2 je ob nastopu blagega ARDS < 300 in > 200 mmHg, ob srednje težkem ARDS < 200 in > 100 mmHg, ko pade pod 100 mmHg, gre za hud ARDS (37).

Na izid vpliva tudi prisotnost pridruženih bolezni, kot so povišan krvni tlak, sladkorna bolezen, kronične pljučne bolezni, srčno-žilne, možganskožilne, jetrne in ledvične bolezni (33, 38, 39). Pomembna je tudi zasedenost OIZ – ob večji zasedenosti je smrtnost višja. Bravata in sodelavci v raziskavi na OIZ ugotavljajo, da je bilo tveganje za smrtni izid zdravljenja 94 % višje ob zasedenosti OIZ med 75 in 100 % kot ob zasedenosti, nižji od 25 % (40).

Delež bolnikov, zdravljenih na OIZ, se med državami razlikuje. Pri nas je delež bolnikov, zdravljenih na OIZ, v prvem valu okoli 4,9 % vseh okuženih in 19,6 % v bolnišnico sprejetih bolnikov, v drugem valu pa se je na OIZ zdravilo okoli 1 % vseh okuženih in 14,5 % v bolnišnico sprejetih bolnikov. Delež smrtnih primerov med kritično bolniki na OIZ je v Sloveniji okoli 26–28 %, če gledamo obdobje od razglasitve prve do preklica druge epidemije (13). V razvitem svetu se te številke gibljejo med 14 in 50 %. Avtorji opozarjajo, da se je smrtnost na OIZ med epidemijo zaradi novih pristopov in zgodnjega začetka zdravljenja znižala (31, 41–45).

Celotna smrtnost zaradi COVID-19 je bila v Sloveniji približno 1,84 %, kar je primerljivo z evropskim povprečjem, ki je 2 % (7).

PATOFIZIOLOGIJA ODZIVA NA KORONAVIRUS HUDEGA AKUTNEGA RESPIRATORNEGA SINDROMA TIPA 2

Poškodbe, ki jih povzroča SARS-CoV-2, so posledica same okužbe in intenzivnega vnetnega odziva gostitelja na virus (46).

Virus se po cepitvi površinske beljakovine bodice (angl. *spike*, S) s transmembransko serinsko proteinazo 2 (zapisuje jo gen *TMPRSS2*) veže na ACE2, ki se nahaja na epitelijskih celicah dihal, epiteliju alveolov, endotelnih celicah in pljučnih makrofagih. To pojasni pljučno lokalizacijo okužbe. Za vstop v celico je torej ključna prisotnost delujočih encimov transmembranske serinske proteinaze 2 in ACE2 na membrani gostiteljske celice (47). S-beljakovina je sestavljena iz podenote S1 in S2. Prvo tvori domena z aaminsko končnico in domena za vezavo na receptor (angl. *receptor-binding domain*). Slednja se veže na ACE2 in povzroči endocitozo SARS-CoV-2 viriona. Podenoto S2 tvorijo fuzijska beljakovina ter heptadni ponavljajoči se (angl. *heptad repeat*, HR) področji 1 in 2. Fuzijska beljakovina se vgradi v membrano gostitelja in omogoči spremembo konformacije podenote S2. Pride do zlitja membran ter sprostitve virusne RNA v citoplazmo gostiteljske celice (48).

SARS-CoV-2 v svojem ciklu podvojevanja povzroči poškodbo ali smrt okužene gostiteljske celice s procesom piroptoze, ki je sicer programirana oblika celične smrti, a spodbudi obsežen vnetni odgovor. Med piroptozo se iz vnetnih celic sprošča velika količina IL-1 β ter IL-18 (48, 49). Iz odmrlih celic se v okolico sproščajo virusna RNA in s poškodbo povezani molekularni vzorci (angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), kot so ATP, DNA, oligomeri ASC (angl. *apoptosis-associated speck-like proteins containing a C-terminal caspase recruitment domain*). Te spojine povzročijo sproščanje provnetnih citokinov IL-6, interferona- γ , monocitne kemoatraktivne beljakovine 1 (angl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP1) in interferon- γ sprožilne beljakovine 10 (angl. *inducible protein-10*, IP-10), ki privabijo na mesto okužbe predvsem monocite in limfocite T (48, 50). Odziv navadno omeji in odstrani okužbo. V primerih prekomernega imunskega odziva pri bolnikih s kritičnim potekom COVID-19 pride do citokinske

nevihte, ki prizadene celotna pljuča ali druge organe, kar lahko pripelje do več organske odpovedi. Pri teh bolnikih so v plazmi izmerili višje koncentracije IL-2, IL-7, IL-10, granulocitne kolonije spodbujajočega dejavnika, IP-10, MCP1, makrofagne vnetne beljakovine 1 α ter dejavnika tumorske nekroze (49, 51). Te beljakovine privabljajo monocite, makrofage in limfocite T, ki še dodatno poslabšajo vnetje. Ustvari se provnetna pozitivna povratna zanka, ki vodi do poškodb tkiv. Vnetni dejavniki povečajo prepustnost kapilar, kar povzroči pljučni edem. Citokinska nevihta lahko vodi v večorgansko odpoved (48).

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA RAZPLET BOLEZNI

Kljub temu da starost ne vpliva na nastanek okužbe, je najpomembnejši dejavnik tveganja za težji potek bolezni. Epidemiološki podatki kažejo, da so osebe, starejše od 60 let, pogostejše sprejete na OIZ in pogostejše potrebujejo mehansko dihalno podporo. Bolezen ima večjo smrtnost pri starostnikih (46).

Verity in sodelavci so v raziskavi kitajskih podatkov prikazali, da je smrtnost v prvem valu epidemije v starostni skupini pod 60 let zaradi virusa 0,63 %, v starostni skupini vključno z in nad 60 let 5,96 %. V starostni skupini nad 80 let je smrtnost zaradi COVID-19 14,8 % in predstavlja 7,8 % vseh smrti zaradi okužbe (52).

Debelost, ki je opredeljena kot indeks telesne mase (ITM) ≥ 30 kg/m², je znan dejavnik tveganja za težji potek in zaplete bolezni. Kompaniyets in sodelavci v poročilu iz ZDA ugotavljajo, da je debelost dejavnik tveganja za sprejem v bolnišnico in smrt. Bolniki s povišano telesno maso imajo v primerjavi z bolniki s primerno telesno maso povišano relativno tveganje za sprejem v bolnišnico, sprejem na OIZ, smrt, potrebo po invazivnem mehanskem predihavanju (IMP) in smrt. Tveganje narašča z naraščanjem ITM (53).

Elliott in sodelavci ocenjujejo, da sta dejavnika, ki najbolj vplivata na smrtnost bolnikov s COVID-19, starost (razmerje obovetov (angl. *odds ratio*, OR) 2,76 na standardno deviacijo [8,1 let]) in moški spol (OR 1,47) (54). Cho in sodelavci so poleg teh dognanj ugotovili še, da so pomembni dejavniki, ki vplivajo na smrtnost, povišan krvni tlak (OR 1,89), sladkorna bolezen (OR 2,2), kongestivno srčno popuščanje (OR 1,88), demenca (OR 1,91), kronična pljučna bolezen (OR 1,88), bolezen jeter (OR 1,55), ledvične bolezni (OR 4,95) in rakava obolenja (OR 1,88) (55).

Guzik in sodelavci v metaanalizi sedmih neodvisnih raziskav navajajo, da so moški bolj podvrženi zapletom in so v prvem valu predstavljali med 50 in 82 % vseh sprejetih v bolnišnico (56). Skoraj po vsem svetu je smrtnost med ženskami manjša v vseh starostnih skupinah, razen med bolniki, ki so starejši kot 80 let. Ahrenfeldt in sodelavci ugotavljajo, da relativno tveganje za smrt pri moških v Evropi znaša med 1,11 (Portugalska) in 1,54 (Francija). Razliko med spoloma pojasnjujejo s tem, da imajo moški drugačne družbene vloge ter življenjski slog (tvegani poklici, izpostavljenost škodljivim snovem, kajenje, uživanje alkohola ...) in več pridruženih bolezni, ki vplivajo na razplet bolezni, kot ženske (srčno-žilne bolezni, povišan krvni tlak, sladkorna bolezen, kronična pljučna bolezen). Vrednosti smrtnosti žensk in moških se zblížata po 80. letu starosti, saj do te starosti živijo le bolj zdravi moški (učinek preživetja) (57).

Karagiannidis in sodelavci ugotavljajo, da je slab napovedni dejavnik izida zdravljenja na OIZ tudi potreba po IMP, saj je smrtnost teh bolnikov okoli 50 %. Bolniki, ki se zdravijo na OIZ in ne potrebujejo IMP, imajo boljšo napoved izida bolezni, saj je njihova smrtnost med 10 in 38 % (31).

V tabeli 4 predstavljamo podatke o smrtnosti bolnikov s pridruženimi boleznimi, kot so jih zabeležili Elliott in sode-

Tabela 4. Pridružene bolezni umrlih bolnikov (54, 58–60).

	Kronična obolenja dihal (%)	Srčno-žilne bolezni (%)	Hipertenzija (%)	Sladkorna bolezen (%)	Maligna obolenja (%)	Debelost (%)
Elliott	32,68	47,06	61,66	24,84	23,53	38,70
Li	15	24	44	30	7	/
Ramos-Rincon	20,1	37,1	74,6	26,6	14,3	17,6
Estiri	21,6	41,8	81,0	35,3	17,8	/

lavci, Li in sodelavci, Ramos-Rincon in sodelavci ter Estiri in sodelavci (54, 58–60). Ugotovitve se med avtorji na mestih razlikujejo, a lahko opazimo, da je imelo veliko umrlih tudi srčno-žilne bolezni, povišan krvni tlak in/ali sladkorno bolezen.

Prizadetost pljuč in sindrom akutne dihalne stiske

ARDS je posledica akutnega vnetnega odziva na sistemski ravni, ki lahko prizadene pljuča posredno ali neposredno. Zgodnja eksudativna faza se kaže kot alveolarna poškodba s poškodbami epitelnih in endotelih celic. Kljub temu da COVID-19 prizadene tudi druge organe, najpogosteje poškoduje dihalna. Li in Ma ugotavljata, da ARDS nastopi pri 15,6–31 % vseh kritično bolnih (61).

Berlinski kriteriji opredeljujejo ARDS kot stanje, pri katerem je pljučna podajnost zmanjšana, bolnik pa je v hudi hipoksemiji. ARDS glede na Berlinske kriterije nastopi v enem tednu po znanem kliničnem dogodku ali poslabšanju kliničnega stanja (62). Normalna podajnost dihalnega sistema je 50–60 ml/cmH₂O. Bolniki z višjo ali nižjo stopnjo podajnosti doživijo hipoksemijo (63). V primeru COVID-19 je nastop ARDS glede na Berlinske kriterije zakasnen, saj nastopi po 8–12 dneh. Prav tako se ta bolezen razlikuje od navadne slike po tem, da je pljučna podajnost lahko rahlo znižana oz. normalna. To se odraža tudi s stanjem hipoksemije (61).

Gattinoni in sodelavci delijo bolnike ob sprejemu na dva tipa: ne-ARDS – tip 1 in

ARDS – tip 2. Pri prvem tipu imajo bolniki normalno pljučno podajnost z izolirano virusno pljučnico. Podajnost dihalnega sistema je nad 50 ml/cmH₂O in pljučni volumni so visoki. Hipoksemija nastane zaradi motenega uravnavanja pljučnega krvnega obtoka. Huda hipoksemija je torej posledica neujemanja predihavanja in prekrvavitve pljuč. V tip 2 se uvršča 20–30 % bolnikov na OIZ. Pri njih najdemo hudo hipoksemijo in podajnost dihalnega sistema pod 40 ml/cmH₂O, kar kaže na hud ARDS (63).

Srčno-žilni sistem

Virusne okužbe so povezane z motenim presnovnim delovanjem, vnetjem srčne mišice in aktivacijo simpatičnega vegetativnega živčevja. Vsi ti dejavniki lahko vodijo v motnje srčnega ritma. Liu in sodelavci navajajo, da je prisotna pri 16,7 % vseh bolnikov in pri 44 % vseh bolnikov, zdravljenih na OIZ. Motnje se izražajo kot atrijska fibrilacija, motnja prevajanja, prekatna tahikardija in prekatna fibrilacija (56, 64).

COVID-19 prizadene tudi srčno mišico in lahko povzroča srčno popuščanje. Dokaz poškodbe srčne mišice, kot je zvišana serumska koncentracija visoko specifičnega srčnega troponina I (angl. *cardiac troponin-I*, cTnI), so prve kitajske raziskave našle pri do osmini kritično bolnih. Guzik in sodelavci poročajo o 7,2 do 17 % akutni prizadetosti srčne mišice pri bolnikih v bolnišnici – bodisi v obliki akutnega vnetja srčne mišice ali poškodbe, ki je bila ishemične narave. Povišane ravni cTnI povezujejo

s povečano smrtnostjo (56). Labbé in sodelavci so v raziskavi bolnikov na OIZ odkrili znake poškodbe srčne mišice pri 57,6 % bolnikov (65). Nascimento in sodelavci so v brazilski raziskavi kritičnih bolnikov, sprejetih na OIZ, poškodbo srčne mišice dokazali v 36 % primerov (66).

Točnega vzroka nastanka vnetja srčne mišice pri COVID-19 ne poznamo, a obstaja več možnih razlag. Prav tako še ni znano, zakaj se lahko klinično kaže le kot blago nelagodje za prsnico in palpitacije ali kot fulminantna oblika bolezni. Opisane so prehodne spremembe na EKG, ki nakazujejo na poškodbo srčne mišice (56, 67). Vzroki za nastanek vnetja srčne mišice bi lahko bili: neposredna poškodba zaradi virusa SARS-CoV-2, saj celice srčne mišice v manjši količini izražajo ACE2; poškodbe zaradi citokinske nevihte; avtoimunska reakcija zaradi molekularne mimikrije ob predhodni izpostavitvi težkih verig miozina ob poškodbi srčnomišičnih celic in mikrotromboze, ki povzročajo ishemijo srčne mišice (56, 68, 69). Trenutno ni neposrednih dokazov, ki bi potrjevali, da virus SARS-CoV-2 okuži srčnomišične celice in povzroči njihovo poškodbo ter nekrozo (68). V prid avtoimunske teorije govori dejstvo, da se vnetje srčne mišice pojavi z zakasnitvijo (10–15 dni) po nastopu ostalih simptomov (70).

COVID-19 predstavlja tveganje za isemične zaplete, saj lahko sistemski vnetni odziv prispeva k destabilizaciji žilnih aterosklerotičnih plakov (56). Vzrok za hudo okvaro srčne mišice bi lahko bilo lokalno vnetje drobnih žil s prizadetostjo pericitov zaradi okužbe. To naj bi prispevalo k infarktu srčne mišice brez zapor koronarnih arterij (71).

Okužba s SARS-CoV-2 pogosto povzroči motnje strjevanja krvi, ki so posledica vnetnega odziva in motene endotelijske funkcije (72, 73). Connors in Levy ugotavljata, da je 46,4 % bolnikov s klinično sliko COVID-19 in potrjeno okužbo imelo povi-

šano serumsko raven D-dimera, pri čemer je bila raven pogosteje močno povišana pri kritično obolelih. Začetne motnje strjevanja krvi se poleg povišane ravni D-dimera kažejo še s povišanimi ravnmi razpadnih produktov fibrina/fibrinogena. Nenormalne vrednosti protrombinskega časa, delnega tromboplastinskega časa in znižane koncentracije trombocitov se na začetku bolezni pojavljajo redko (72).

Virus SARS-CoV-2 lahko okuži endotelijske celice in povzroči neposredne poškodbe endotelija. Vnetje endotelija se kaže kot povečanje endotelijskih celic, odstop celic od bazalne membrane in subendotelijska limfocitna infiltracija. Znaki vnetja endotelija, vnetnih celic, endotelijske apoptoze in nekroze so bili dokazani v pljučih, srcu, ledvicah, jetrih in tankem črevesju. Poškodbe žilne stene povzročijo izpostavljenost faktorja VIII in von Willenbrandovega faktorja, kar spodbuja nastanek motnje strjevanja krvi. Drobnost žilje poškoduje tudi aktivacija komplementa. Mikrotrombotični zapleti vodijo v globoke venske tromboze, pljučne embolije in kapi (74).

SARS-CoV-2 povzroča različne tromboembolične dogodke (TD) (75). Ackermann in sodelavci so izvedli obdukcije na umrlih zaradi COVID-19 in najdbe primerjali z ugotovitvami obdukcij na bolnikih, ki so umrli zaradi zapletov gripe (ARDS). Pri obojih so odkrili obširne alveolarne poškodbe in limfocitno infiltracijo ob žilah. Bolniki, ki so umrli zaradi COVID-19, so imeli hude endotelijske poškodbe, ki so bile posledica vdora virusa v celice ter poškodb endotelijskih membran. Prav tako so pri njih našli obširne žilne tromboze z mikroangiopatijo in zaprtjem svetlin alveolarnih kapilar (76). Lou in sodelavci so poleg teh dognanj z biopsijami in obdukcijami ugotovili še intersticijsko pljučno fibrozo, pljučne hemoragične infarkte in prekomerno nastajanje novih drobnih žil (77).

Malas in sodelavci v preglednem članku, ki vključuje 42 raziskav, ugotavljajo, da

je do venske trombembolije prišlo pri 21 % vseh bolnikov, sprejetih v bolnišnico, in 31 % bolnikov, sprejetih na OIZ. Globoko vensko trombozo so zabeležili pri 20 % vseh sprejetih v bolnišnico in 28 % bolnikov na OIZ. Pljučno embolijo je doživelo 13 % vseh sprejetih v bolnišnico in 19 % bolnikov na OIZ. Arterijska trombembolija je bila mnogo redkejša, saj sta jo doživela 2 % vseh sprejetih v bolnišnico in 5 % bolnikov na OIZ. Smrtnost med bolniki s trombembolijami je bila 23 %, med bolniki brez trombembolije 13 %. Avtorji zaključujejo, da so trombembolije pomemben dejavnik smrti pri bolnikih s COVID-19 (78).

Diseminirana intravaskularna koagulacija ni pogosta pri bolnikih s COVID-19, saj se, kot ugotavljajo Zhou in sodelavci, pojavlja pri 3 % bolnikov (79).

Al-Ani in sodelavci so v metaanalizi šestih raziskav s skupno 973 bolniki ugotovili, da je do ishemične možganske kapi zaradi arterijske tromboze prišlo v 3,5 % primerov (95-% interval zaupanja (angl. *confidence interval*, CI): 2,4–4,8) (75).

Navadni dejavniki, ki povečujejo možnost nastanka TD, so starost, rakava obolenja, imobilizacija, debelost, poškodbe, pretekli TD, nedavne operacije, kap in nosečnost. Dodatni dejavniki tveganja za nastanek TD, ki ogrožajo bolnike, zdravljene na OIZ, so odpoved dihal, ledvic ali srca, farmakološka sedacija, mehansko predihavanje, centralni venski kateter, uporaba vazopresornih zdravil in sepsa (80).

Ledvice

Prizadetost ledvic je pogosta pri bolnikih s COVID-19. Ob sprejemu v bolnišnico imajo bolniki navadno proteinurijo, v kasnejših fazah pri kritično bolnih pride do akutne ledvične odpovedi, ki kaže na težko potekajočo bolezen.

Na etiologijo nastanka ledvične bolezni pri obolelih s COVID-19 verjetno vpliva več dejavnikov. Hipovolemija pri sprejemu v bolnišnico je pogost sprožilec akutne odpovedi

ledvic (81). SARS-CoV-2 ima morda neposredni citopatski učinek na tkivo ledvice, kar podpira prisotnost dednine virusa v krvi in urinu bolnikov s COVID-19. SARS-CoV-2 se pri vstopu v celice veže na ACE2-receptorje, ki se v ledvicah izražajo v 100-krat večji količini kot v pljučih (81). Okužba ledvičnega tubulnega epitelija in podocitov preko ACE2-poti vodi v moteno delovanje mitohondrijev, akutno tubulno nekrozo, tvorbo beljakovin reabsorpcijskih vakuol, kolapsirajočo glomerulopatijo in prestopanje beljakovin v Bowmanovo ovojnico (82). Ledvično bolezen bi lahko povzročile tudi odlage imunskih kompleksov virusnih antigenov in specifičnih imunoloških efektorskih mehanizmov. Mikroskopski pregled vzorcev ledvic bolnikov, okuženih z virusom SARS-CoV-2, je sicer pokazal normalne glomerule in odsotnost elektronsko gostih odlag, kar ne podpira hipoteze o nastanku imunske posredovanega glomerulonefritisa. Za poškodbo ledvic so morda odgovorni tudi virusno sproženi citokini in ostali posredniki, ki povzročijo citokinsko nevihto, ter limfopenija (81, 82). K nastanku akutne ledvične odpovedi prispevajo tudi rabdomioliza, sindrom aktivacije makrofagov ter nastanek mikroembolov in mikrotromboz zaradi prekomernega strjevanja krvi in vnetja endotelija. K patogenezi nastanka ledvične bolezni lahko prispeva tudi kardioresenalni sindrom, tj. značilna odpoved desnega prekata zaradi COVID-19 pljučnice, ki vodi v kongestijo in posledično akutno odpoved ledvic. Podobno moteno delovanje levega prekata zmanjša minutni volumen srca, kar vodi do padca srednjega arterijskega tlaka in zmanjšane prekrvavitve ledvic ter ostalih tkiv (82).

Tiha hipoksemija

Zaplet bolezni COVID-19 je lahko tudi t. i. tiha hipoksemija, pri kateri je nasičenost krvi s kisikom kritično znižana, bolnik pa kljub temu ne občuti dispneje. Razen pospešenega dihanja bolniki ne opazijo posebnosti. To

pogosto prikrije resnost bolnikovega stanja, ki zahteva nujno bolnišnično oskrbo, in ovira zgodnjo prepoznavo ogroženosti bolnikov v domači oskrbi (83, 84).

Dispneja je subjektiven občutek otežene dihanja ali dušenja, do katerega pride na več načinov. Na dihalni center močno vpliva sprememba delnega tlaka CO_2 , saj že majhno zvišanje koncentracije CO_2 povzroči veliko povečanje minutnega dihalnega volumna. Znižano zasičenost krvi s kisikom zaznavajo karotidna telesa. Informacija se preko podaljšane hrbtenjače prenese v dihalni center in možgansko skorjo, kjer pride do doživljanja dispneje. Okvara na katerem koli mestu na tej poti povzroči izpad zaznave občutka težkega dihanja ali dušenja (85).

Mehanizem nastanka tihe hipoksemije še ni znan, a obstaja več možnih vzrokov, ki se najverjetneje prepletajo (83). Virus SARS-CoV-2 povzroči mitohondrijske poškodbe v karotidnih telescih in v steni pljučnih arterij. To povzroči zmanjšano zaznavanje hipoksemije in okvaro mehanizma hipoksične vazokonstrikcije (86). Ker virus poškoduje tudi pnevmocite tipa 2, prihaja do zmanjšane tvorbe surfaktanta v alveolih, kar privede do sesedanja alveolov in atelektaz. Ob zmanjšani hipoksični vazokonstrikciji pride do desno-levih spojev, zaradi katerih se deoksigenirana kri ne nasiči s kisikom (83). Možen vzrok za tiho hipoksemijo bi lahko bila tudi prevelika prekrvljenost predela pljuč, ki je bil poškodovan med COVID-19 (87).

Hipoksemija povzroči povišanje minutnega predihavanja, zaradi katerega se iz krvi izplavlja večja količina CO_2 . Ker je koncentracija tega ključni dražljaj za doživljanje dispneje, te v stanju hipokapnije ni (83).

KRITERIJI ZA SPREJEM NA ODDELEK INTENZIVNEGA ZDRAVLJENJA

Liao in sodelavci so pripravili zgodnji opozorilni točkovnik za okužene z virusom

SARS-CoV-2 (Early Warning Score for 2019-nCoV Infected Patients), v katerem za oceno stanja bolnika, možnih zapletov in potrebo po zdravljenju na OIZ upoštevajo starost, frekvenco dihanja, nasičenost krvi s kisikom, dodajanje kisika, sistolični krvni tlak, srčno frekvenco, stanje zavesti in telesno temperaturo (tabela 5) (88). Ta točkovnik je povzelo tudi Švicarsko združenje intenzivne medicine in določilo, da bolniki s seštevkom 0–4 točke potrebujejo bolnišnično zdravljenje brez dodatnega nadzora, bolniki s seštevkom 5–6 (ali 3 točke pri posameznem parametru) bolnišnično zdravljenje s spremljanjem vitalnih funkcij. Zdravljenje na OIZ priporočajo za bolnike s seštevkom nad 6 (89). Pri sprejemu bolnikov je treba upoštevati tudi razpoložljiva sredstva in zmožnosti posameznih OIZ.

Kljub temu da je potek bolezni manj ugoden pri starejšem prebivalstvu, Grasselli s sodelavci ugotavlja, da višja starost sama po sebi ni dejavnik tveganja za sprejem na OIZ, saj je srednja starost bolnikov, sprejetih na OIZ, enaka srednji starosti vseh bolnikov s COVID-19 v Italiji (63 let) (90).

Jain in Yuan v pregledni raziskavi s 1.813 bolniki s COVID-19 ugotavljata, da je pri bolnikih, sprejetih na OIZ, dispneja najpogostejši simptom z OR 6,55 (CI: 4,28–10,0) $p < 0,001$. Prevalenca dispneje je bila pri teh bolnikih 67,2 %, pri bolnikih, ki niso bili zdravljeni na OIZ, le 10,2 % (90, 91). Avtorja ugotavljata, da so napovedne pridružene bolezni pri bolnikih na OIZ kronična obstruktivna pljučna bolezen OR 17,8 (95 % CI: 6,56–48,2) $p < 0,001$, srčno-žilna bolezen OR 4,44 (95 % CI: 2,64–7,47) $p < 0,001$ in povišan krvni tlak OR 3,65 (95 % CI: 2,22–5,99) $p < 0,001$ (91).

CDC poroča, da je srednja vrednost sprejema bolnika s kritičnim potekom COVID-19 na OIZ od začetka bolezni oz. simptomov med 8 in 10 dnevi. Ta časovni okvir približno sovпада z nastopom ARDS (8–12 dni od nastopa prvih simptomov) (92).

Tabela 5. Zgodnji opozorilni točkovnik za okužene s koronavirusom hudega akutnega respiratornega sindroma tipa 2 (88).

Parameter	3	2	1	0	1	2	3
Starost (leta)	/	/	7	< 65	7	7	≥ 65
Frekvenca dihanja (/min)	≤ 8	/	9–11	12–20	/	21–24	≥ 25
Nasičenost s kisikom (%)	≤ 91	92–93	94–95	≥ 96	/	/	/
Dodajanje kisika	/	da	/	ne	/	/	/
Sistolični krvni tlak (mmHg)	≤ 90	91–100	101–110	111–219	/	/	≥ 220
Srčna frekvenca (/min)	≤ 40	/	41–50	51–90	91–110	111–130	≥ 131
Stanje zavesti	/	/	/	normalna odzivnost	/	/	somnolenca, letargija, koma, zmedenost
Temperatura (°C)	≤ 35,0		35,1–36,0	36,1–38,0	38,1–39,0	≥ 39,1	

NAPOVED POTEKA IN IZIDA BOLEZNI ZDRAVLJENIH NA ODELKU INTENZIVNEGA ZDRAVLJENJA

Napoved izida bolezni na OIZ se med raziskavami razlikuje. Smrtnost bolnikov na OIZ se je med epidemijo zaradi novih pristopov nižala, kar so nekateri avtorji opazili že med svojimi raziskavami. Trenutno je smrtnost bolnikov s COVID-19, zdravljenih na OIZ, v razvitem svetu 20–40 %. V tabeli 6 predstavljamo zbrane podatke Schmida in sodelavcev (kohortna raziskava 138 bolnišnic v Franciji, Belgiji in Švici), Oliveire in sodelavcev (raziskava 1.283 bolnikov, sprejetih na OIZ na Floridi), Changa in sodelavcev (metaanaliza 28 raziskav s skupno 12.437 bolniki), Haaseja in sodelavcev (raziskava 323 kritično bolnih danskih bolnikov), Larssna in sodelavcev (raziskava 260 kritično bolnih švedskih bolnikov), podatke za prvi in drugi val epidemije za Slovenijo z OIZ UKC LJ ter skupne slovenske podatke, pridobljene iz COVID-19 sledilnika za obdobje prvega in drugega vala epidemije (13, 93–97). V tabe-

li 6 so zaradi preglednosti zapisani le primki prvih avtorjev.

Izid zdravljenja z neinvazivnim in invazivnim predihavanjem ter zunajtelesno membransko oksigenacijo

Kljub spremembam v zdravljenju še vedno veliko kritično bolnih potrebuje mehansko predihavanje. Roedl in sodelavci v raziskavi, ki je vključila 223 kritično bolnih oseb v Nemčiji, ugotavljajo, da 75 % bolnikov na OIZ potrebuje IMP, neinvazivno predihavanje 14 % in 12 % visokopretočno kisikovo nosno kanilo. Pri slednjih dveh skupinah se je stanje bolnikov v 81 % poslabšalo do stopnje, ko so bolniki potrebovali IMP. Smrtnost bolnikov na IMP je bila 44 % (splošna smrtnost bolnikov s COVID-19 na OIZ je bila 35 %) (98). Več avtorjev navaja, da se je med epidemijo nižal delež bolnikov na OIZ, ki so potrebovali IMP. Karagiannidis in sodelavci ugotavljajo, da se je delež teh bolnikov s 64 % v prvem valu znižal na 54 % v drugem. To pripisujejo boljšim algoritmom za zdravljenje s kisikom pred potrebo

Tabela 6. Število bolnikov, sprejetih na oddelke intenzivnega zdravljenja, smrtnost teh bolnikov in dejavniki, ki so vplivali na smrtnost (13, 93–97). OIZ – oddelek za intenzivno zdravljenje, ARDS – sindrom akutne dihalne stiske (angl. *acute respiratory distress syndrome*), UKC LJ – Univerzitetni klinični center Ljubljana.

	Število bolnikov v raziskavi	Število bolnikov, sprejetih na OIZ	Delež umrlih na OIZ (%)	Dejavniki, ki so vplivali na smrtnost
Schmidt ^a	4.643	4.244	31	starost, sladkorna bolezen, debelost, hud potek ARDS
Oliveira	1.283	131	19,8	/
Chang	12.437	12.437	28,3	invazivno mehansko predihavanje, akutna poškodba ledvic, ARDS, starost > 60 let, moški spol, hipertenzija, sladkorna bolezen, srčno-žilne bolezni, debelost
Haase	323	323	37	moški spol, starost, kronične pljučne bolezni, trenutno rakavo obolenje, več pridruženih bolezni
Larsson	260	260	30,3	starost, sprejem iz urgentnega centra
UKC LJ 1. val	/	36	31	/
UKC LJ 2. in 3. val ^b	/	652	19,3	/
Slovenija 1. val	/	73	26	/
Slovenija 2. in 3. val ^b	/	2.769	25,9	/

^a Med trajanjem raziskave se je smrtnost znižala z 42 na 25 %.

^b Podatki iz poročila na OIZ UKC LJ 16. 6. 2021 ob 8.00.

po IMP in zgodnjem zdravljenju z deksametazonom. Smrtnost na OIZ se ni spremenila in je ostala nad 50 % (31). Tudi Contou in sodelavci so prišli do podobnih zaključkov, saj se je potreba po IMP z 88 znižala na 64 % ob statistično neznačilni spremembi smrtnosti (okoli 50 %). Ta opažanja razlagajo z zgodnjim zdravljenjem z glukokortikoidi (GK) (99).

Zunajtelesna membranska oksigenacija (angl. *extracorporeal membrane oxygenation*, ECMO) se v primerjavi z mehanskim predihavanjem uporablja razmeroma redko. Primerna je le za skrbno izbrane bolnike, sicer je ta oblika zdravljenja povezana z visoko smrtnostjo (100). Na začetku epidemije so kitajske raziskave poročale o nizkem preživetju bolnikov, zdravljenih z ECMO, saj je bila smrtnost 94,1 % (101). Savarimuthu in sodelavci so tedaj predvidevali, da je viso-

ka smrtnost lahko posledica nepravilne izbire bolnikov, nepravočasnega začetka zdravljenja ter navadnih zapletov bolezni in zdravljenja s to metodo (100).

Lorusso in sodelavci med epidemijo zbirajo podatke o bolnikih, zdravljenih z ECMO v Evropi in Izraelu. Do 14. septembra 2020 so v raziskavo vključili 1.531 bolnikov, pri katerih ugotavljajo vedno manjšo smrtnost. Ocenjujejo, da bolniki, ki so zdravljeni z ECMO zaradi dihalne ali srčne odpovedi, ki je nastopila kot posledica COVID-19, preživijo v 55 % primerov (102).

ZDRAVLJENJE BOLNIKOV S TEŽKIM POTEKOM

Med spoznavanjem bolezni COVID-19 se je že več pristopov in zdravilnih učinkovin izkazalo za neučinkovite. Trenutne smernice predvidevajo predvsem souporabo proti-

virusnih in protivnetnih zdravil. Na OIZ UKC Ljubljana v skladu s priporočili, objavljenimi raziskavami in izkušnjami za zdravljenje bolnikov s hudo ali kritično obliko COVID-19 uporabljajo remdesvir, tocilizumab, deksametazon in metilprednizolon.

Tocilizumab

Tocilizumab je rekombinantno monoklonsko protitelo, ki zavira membranske in proste receptorje za IL-6 ter tako zavira provnetno signalno pot. Navadno se ga uporablja za zdravljenje vnetnih bolezni, kot je revmatoidni artritis. Pri zdravljenju bolnikov s COVID-19, sploh pri sočasnem zdravljenju s kortikosteroidi, se je tocilizumab izkazal za učinkovito zdravilo, ki pomembno vpliva na razplet bolezni (103, 104).

To potrjujejo tudi podatki Abanija in sodelavcev v raziskavi RECOVERY s 4.116 odraslimi hipoksičnimi bolniki, sprejetimi v bolnišnico s COVID-19 in povišanimi vnetnimi parametri ($\text{CRP} \geq 75 \text{ mg/L}$). Raziskava je vključevala bolnike, zdravljene s kisikom (z neinvazivnim zdravljenjem ali brez), ter bolnike na IMP. Bolniki, ki so bili zdravljeni tudi s tocilizumabom, so 7 % pogostejše zapustili bolnišnico v prvih 28 dneh zdravljenja in njihovo 28-dnevno preživetje je bilo 4 % boljše kot pri bolnikih z navadnim zdravljenjem. Bolnikom, ki niso bili na IMP in niso prejeli tocilizumaba, se je stanje 7 % pogostejše poslabšalo do te mere, da je bila uvedba IMP nujna (103).

Gordon in sodelavci so v raziskavi REMAP-CAP spremljali 865 odraslih kritično bolnih pacientov, zdravljenih na OIZ s kliničnim sumom na COVID-19 ali s potrjeno boleznijo, od katerih jih je 401 prejelo tudi tocilizumab ali sarilumab v prvih 24 urah po sprejemu na OIZ. V nadzorni skupini sta bila 402 bolnika. Bolnišnična smrtnost bolnikov, ki so poleg standardnega zdravljenja prejeli tudi zaviralec receptorjev IL-6, je bila 9 % nižja kot pri nadzorni skupini. Boljše je bilo tudi 90-dnevno preživetje ter čas do odpusta iz OIZ oz. bol-

nišnice. Učinki tocilizumaba in sarilumaba so bili med seboj primerljivi (104).

Zdravljenje s tocilizumabom je na OIZ UKC LJ indicirano pri bolnikih s pljučnico COVID-19, ki so bili sprejeti na OIZ zaradi poslabšanja COVID-19 in se njihova klinična slika hitro slabša, imajo povišane označevalce vnetja ($\text{CRP} \geq 75 \text{ mg/L}$) in prejemajo sočasno kortikosteroide zaradi COVID-19 pljučnice s hipoksemijo. Pomembno je tudi, da bolezen traja najmanj od sedem do deset dni.

Zdravljenje s plazmo prebolewnikov

Zdravljenje s plazmo prebolewnikov je pasivna oblika imunizacije, pri kateri odvezamo kri osebe, ki je prebolela okužbo s SARS-CoV-2. Določimo titer virus nevtralizirajočih protiteles in uporabimo serum, ki imajo dovolj visoke titre za potrebe zdravljenja. Tovrstno zdravljenje je že bilo uspešno uporabljeno pri sorodnih virusnih okužbah, leta 2003 med epidemijo SARS-CoV-1 in leta 2012 med epidemijo MERS-CoV (105).

Abani in sodelavci so v raziskavi, ki je vključevala 16.287 bolnikov, ugotovili, da zdravljenje s plazmo prebolewnikov nima pomembnega vpliva na 28-dnevno preživetje bolnikov ali na odpust iz bolnišnice v prvih 28 dneh zdravljenja. Žal se tovrstno zdravljenje ni izkazalo za učinkovito pri preprečevanju napredovanja bolezni do stopnje, ko bolniki potrebujejo mehansko predihavanje, ali smrti (106).

Na UKC LJ se zdravljenje s plazmo prebolewnikov uporablja le pri bolnikih, ki imajo oslabljen imunski odziv in nimajo protiteles proti SARS-CoV-2.

Deksametazon

Deksametazon je sintetični GK, ki ima protivnetne lastnosti in zavira imunski sistem. Ker je prekomeren vnetni odziv organizma na okužbo s SARS-CoV-2 med najpomembnejšimi patološkimi lastnostmi COVID-19,

je več raziskav preučevalo zaviralne učinke GK na imunski sistem (107).

Mehanizem delovanja GK pri zaviranju imunskega odziva lahko delimo na genski in negenski mehanizem. Genski mehanizem je odgovoren za večino učinkov in je posredovan s citoplazemskim glukokortikoidnim receptorjem (GKR). Po prenosu GK v celico in vezavi na GKR pride do vstopa v jedro, kjer kompleks zavre prepis genov, ki so vključeni v aktivacijo levkocitov in uravnavanje funkcije epitelnih, stromalnih in endotel-nih celic. To se izraža kot zmanjšanje pro-vnetnih citokinov, kemokinov, adhezijskih molekul ter encimov, ki sodelujejo pri vne-tju. Negenski učinek GK je hitrejši in posre-dovan s citoplazemskim ali membranskim GKR, ki zavira fosfolipazo A2 in posledično zmanjša sproščanje arahidonske kisline – prekursorske molekule za prostaglandine, levkotriene in trombocite aktivirajočega dejavnika (108).

Horby in sodelavci so v raziskavo RECO-VERY zajeli 6.425 v bolnišnico sprejetih bol-nikov s COVID-19, od katerih so 2.104 poleg navadnega zdravljenja prejeli še deksa-metazon. Bolnike so opazovali 28 dni. Smrt-nost bolnikov, ki so bili na IMP in so prejeli deksametazon, je bila 12,1 % nižja kot pri nadzorni skupini. Prav tako je bila smrtnost nižja za 2,9 % pri bolnikih, ki so prejeli kisi-kovo zdravljenje brez IMP. Deksametazon ni vplival na preživetje bolnikov, ki niso potrebovali dihalne podpore. Bolniki, ki so prejeli deksametazon, so imeli krajši čas bivanja v bolnišnici, saj je bila srednja vred-nost njihovega bivanja tam 12 dni, bolnikov z navadnim zdravljenjem pa 13 dni. Slednji bolniki so tudi pogosteje potrebovali stop-njevanje zdravljenja do IMP (razmerje tve-ganja 1,27) (109).

Tomazini in sodelavci so na skupini 299 bolnikov z srednjim ali težkim potekom ARDS opazovali vpliv zdravljenja z deksa-metazonom na 28-dnevno preživetje in potrebo po zdravljenju s pomočjo mehan-skega predihavanja. Bolniki, ki so bili dodat-

no zdravljeni z deksametazonom, so potrebovali mehansko predihavanje 2,6 dni poz-neje kot bolniki, ki so prejeli le navadno zdravljenje. Tomazini in sodelavci v svoji raziskavi niso opazili vpliva deksametazo-na na preživetje v prvih 28 dneh zdravlje-nja (110).

Na UKC LJ so lahko z deksametazonom zdravljeni bolniki s COVID-19 pljučnico s hipoksemijo in bolniki po zdravljenju s kisikom ali drugimi oblikami podpore pri dihanju. Poleg preobčutljivosti na zdravil-no učinkovino ali katero koli sestavino zdravila je kontraindikacija za zdravljenje z deksametazonom še neobvladana bakte-rijska ali glivna okužba.

Metilprednizolon

Metilprednizolon, tako kot deksametazon, spada med GK, zato ima podoben mehani-zem delovanja.

Nelson in sodelavci so opravili razi-skavo, ki je vključevala 117 bolnikov, ki so potrebovali mehansko predihavanje. 48 izmed njih jih je prejelo poleg navadnega zdravljenja tudi metilprednizolon. Bolniki, ki so prejeli metilprednizolon, so v pri-merjavi z nadzorno skupino med trajanjem raziskave potrebovali mehansko prediha-vanje manj časa, prav tako so imeli večjo možnost za ekstubacijo znotraj 28 dni zdrav-ljenja. Metilprednizolon ni statistično zna-čilno vplival na preživetje bolnikov (111).

Priporočila za zdravljenje COVID-19 na OIZ UKC LJ svetujejo pričetek uporabe metilprednizolona po sedmem dnevu od začetka bolezni pri bolnikih s kritično obli-ko bolezni. Zdravljenje z metilprednizolonom je kontraindicirano za bolnike z neobvlada-no glivno ali bakterijsko okužbo.

Remdesivir

Remdesivir je širokospektralno protiviru-sno zdravilo, ki zavira od RNA odvisno RNA-polimerazo in tako prepreči virusno podvojevanje. Učinkovina je bila razvita za zdravljenje okužb z virusom ebole, a se je

izkazalo, da *in vitro* učinkuje tudi proti več virusom družine koronavirusov (SARS-CoV-1, MERS-CoV, SARS-CoV-2 in koronavirusi netopirjev) (112, 113). Remdesivir se je v praksi izkazal kot zdravilo, ki nima statistično značilnega vpliva na zmanjšanje smrtnosti bolnikov s COVID-19, zato se je med epidemijo pojavil dvom o njegovi učinkovitosti (114, 115).

Pan in sodelavci so v raziskavi, ki je bila izvedena pod pokroviteljstvom SZO in je vključevala 11.330 bolnikov, od katerih jih je 2.750 prejelo tudi remdesivir, ugotovili, da remdesivir ne vpliva na preživetje bolnikov s COVID-19. Na podlagi teh rezultatov je SZO odsvetovala uporabo tega zdravila za zdravljenje COVID-19 (116).

Tudi Garibaldi in sodelavci niso opazili statistično značilnega vpliva na smrtnost, vendar opozarjajo, da imajo bolniki, ki prejemo tudi remdesivir, v povprečju en dan krajši čas do kliničnega izboljšanja in krajši čas bivanja v bolnišnici. Ugotavljajo, da sočasno zdravljenje s kortikosteroidi prav tako ne vpliva na preživetje bolnikov (117).

Campbell in sodelavci ugotavljajo, da so za zdravljenje z remdesivirjem najprimernejši bolniki z velikim tveganjem za prekomerni vnetni odziv in tisti, ki so bili dia-

gnosticirani v zgodnjem obdobju bolezni (prvih desetih dneh) in potrebujejo zdravljenje s kisikom. Remdesivir skrajša čas do okrevanja in zmanjša tveganje za napredovanje bolezni (118).

Po priporočilih za zdravljenje COVID-19 na OIZ UKC LJ se bolniku uvede zdravljenje z remdesivirjem v prvih desetih dneh od pričetka bolezni in traja od pet do deset dni. Zdravljenje se ukine, če je ocena hitrosti glomerulne filtracije (oGF) < 30 ali če alanin aminotransferaza (ALT) poraste za več kot petkratnik začetne vrednosti oz. v primeru porasta ALT s pridruženimi znaki hepatitisa.

ZAKLJUČEK

Okužba z virusom SARS-CoV-2, ki povzroča COVID-19, predstavlja veliko tveganje za bolnike in zdravstvene sisteme po vsem svetu. Okužbe in zapleti se pojavljajo v vseh starostnih skupinah. Potek bolezni med posameznimi bolniki se razlikuje, saj je lahko popolnoma brezsimptomen ali izjemno huren z usodnim izidom. Najbolj so ogroženi starejši in ljudje s pridruženimi boleznimi. Z odvijanjem pandemije odkrivamo nove patološke mehanizme bolezni in metode zdravljenja, a še vedno obstaja veliko neznank.

LITERATURA

1. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, et al. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19) [internet]. Treasure Island: StatPearls; c2020 [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150360>
2. Cao WC, Liu W, Zhang PH, et al. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med*. 2007; 357 (11): 1162–3.
3. Sariol A, Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*. 2020; 53 (2): 248–63.
4. Lee PI, Hsueh PR. Emerging threats from zoonotic coronaviruses—from SARS and MERS to 2019-nCoV. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020; 53 (3): 365–7.
5. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [internet]. Ženeva: World Health Organization; c2019 [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
6. Wang Y, Liu Y, Liu L, et al. Clinical outcomes in 55 patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 who were asymptomatic at hospital admission in Shenzhen, China. *J Infect Dis*. 2020; 221 (11): 1770–4.
7. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard [internet]. Ženeva: World Health Organization; [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://covid19.who.int/>
8. COVID live – coronavirus statistics [internet]. Worldometers; [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
9. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) – China, 2020. *China CDC Wkly*. 2020; 2 (8): 113–22.
10. Archived: WHO timeline – COVID-19 [internet]. Ženeva: World Health Organization; c2020 [citirano 2021 Aug 5]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline--covid-19>
11. Stoecklin SB, Rolland P, Silue Y, et al. First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in France: Surveillance, investigations and control measures, January 2020. *Euro surveill*. 2020; 25 (6): 2000094.
12. Lai S, Ruktanonchai NW, Zhou L, et al. Effect of non-pharmaceutical interventions to contain COVID-19 in China. *Nature*. 2020; 585 (7825): 410–3.
13. COVID-19 sledilnik [internet]. Ljubljana: COVID-19 sledilnik; c2020–2021 [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://covid-19.sledilnik.org/sl/stats>
14. SARS-CoV-2 variant classifications and definitions [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; [citirano 2021 Aug 5]. Dosegljivo na: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html#Interest>
15. Grant MC, Geoghegan L, Arbyn M, et al. The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. *PLoS One* [internet]. 2020 [citirano 2021 Aug 5]; 15 (6): e0234765. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32574165/>
16. COVID-19: Clinical features – UpToDate [internet]. Waltham: UpToDate; c2021 [citirano 2021 Aug 5]. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-clinical-features#H1225108097>
17. Zhu J, Zhong Z, Ji P, et al. Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: A meta-analysis. *Fam Med Community Heal* [internet]. 2020 [citirano 2021 Aug 5]; 8 (2): e000406. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32371463/>
18. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): A multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [internet]. 2020 [citirano 2021 Jun 13]; 277 (8): 2251–61. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32253535/>
19. Passarelli PC, Lopez MA, Bonaviri GNM, et al. Taste and smell as chemosensory dysfunctions in COVID-19 infection. *Am J Dent* [internet]. 2020 [citirano 2021 Aug 5]; 33 (3): 135–7. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32470238>
20. Tong JY, Wong A, Zhu D, et al. The prevalence of olfactory and gustatory dysfunction in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020; 163 (1): 3–11.
21. da Costa KVT, Carnaúba ATL, Rocha KW, et al. Olfactory and taste disorders in COVID-19: A systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020. 86 (6): 781–92.
22. Lee Y, Min P, Lee S, et al. Prevalence and duration of acute loss of smell or taste in COVID-19 patients. *J Korean Med Sci*. 2020; 35 (18): e174.

23. Vaira LA, Salzano G, Fois AG, et al. Potential pathogenesis of ageusia and anosmia in COVID-19 patients. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020; 10 (9): 1103–4.
24. Mastrangelo A, Bonato M, Cinque P. Smell and taste disorders in COVID-19: From pathogenesis to clinical features and outcomes. *Neurosci Lett.* 2021; 748: 135694.
25. Covid-19: Kaj je dobro, da ve vsak zdravnik. [internet]. Ljubljana: NIJZ; [citirano 2021 Aug 5]. Dosegljivo na: https://www.mf.uni-lj.si/application/files/3815/8714/7642/Covid-19_Tomazic_1.pdf
26. Jacobi A, Chung M, Bernheim A, et al. Portable chest X-ray in coronavirus disease-19 (COVID-19): A pictorial review. *Clin Imaging.* 2020; 64: 35–42.
27. Revel MP, Parkar AP, Prosch H, et al. COVID-19 patients and the radiology department – advice from the European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). *Eur Radiol.* 2020; 30 (9): 4903–9.
28. Bi Q, Wu Y, Mei S, et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: A retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (8): 911–9.
29. COVID-19: Management of the intubated adult [internet]. Waltham: UpToDate; c2021 [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-critical-care-and-airway-management-issues>
30. Fried MW, Crawford JM, Mospan AR, et al. Patient characteristics and outcomes of 11 721 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) hospitalized across the United States. *Clin Infect Dis.* 2021; 72 (10): e558–65.
31. Karagiannidis C, Windisch W, McAuley DF, et al. Major differences in ICU admissions during the first and second COVID-19 wave in Germany. *Lancet Respir Med.* 2021; 9 (5): e47.
32. Iftimie S, López-Azcona AF, Vallverdú I, et al. First and second waves of coronavirus disease-19: A comparative study in hospitalized patients in Reus, Spain. *PLoS One.* 2021; 16 (3): e0248029.
33. Martins-Filho PR, Santos Souza Tavares C, Santana Santos V. Factors associated with mortality in patients with COVID-19. A quantitative evidence synthesis of clinical and laboratory data. *Eur J Intern Med.* 2020; 76: 97–9.
34. Kermali M, Kaur Khalsa R, Pillai K, et al. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 – a systematic review. *Life Sci.* 2020; 254: 117788.
35. Zong X, Gu Y, Yu H, et al. Thrombocytopenia is associated with COVID-19 severity and outcome: An updated meta-analysis of 5637 patients with multiple outcomes. *Lab Med.* 2021; 52 (1): 10–5.
36. Zhao Q, Meng M, Kumar R, et al. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020; 96: 131–5.
37. WHO's categorisation of clinical syndroms associated with COVID-19 in adults [internet]. Ženeva: World Health Organization [citirano 2021 Aug 5]. Dosegljivo na: https://www.amomed.com/wp-content/uploads/2017/10/VAS059_0320INT_Clinical-Symptoms-of-COVID_A3_2.pdf
38. Yang J, Zheng Y, Gou X, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020; 94: 91–5.
39. Hu Y, Sun J, Dai Z, et al. Prevalence and severity of corona virus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2020; 127: 104371.
40. Bravata DM, Perkins AJ, Myers LJ, et al. Association of intensive care unit patient load and demand with mortality rates in US department of veterans affairs hospitals during the COVID-19 pandemic. *J Am Med Assoc Netw Open.* 2021; 4 (1): e2034266.
41. Auld SC, Caridi-Scheible M, Blum JM, et al. ICU and ventilator mortality among critically ill adults with coronavirus disease 2019. *Crit Care Med.* 2020; 48 (9): e799–804.
42. Quah P, Li A, Phua J, et al. Mortality rates of patients with COVID-19 in the intensive care unit: A systematic review of the emerging literature. *Crit Care.* 2020; 24: 285.
43. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *J Am Med Assoc.* 2020; 323 (20): 2052–9.
44. ICNARC – Reports [internet]. London: Intensive care national audit & research centre (ICNARC) [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://www.icnarc.org/our-audit/audits/cmp/reports>
45. Ludwig M, Jacob J, Basedow F, et al. Clinical outcomes and characteristics of patients hospitalized for Influenza or COVID-19 in Germany. *Int J Infect Dis.* 2021; 103: 316–22.
46. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382 (18): 1708–20.
47. Jia HP, Look DC, Shi L, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol.* 2005; 79 (23): 14614–21.
48. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20: 363–74.

49. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 2015; 265 (1): 130–42.
50. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020; 8 (4): 420–2.
51. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395 (10223): 497–506.
52. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: A model-based analysis. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (6): 669–77.
53. Kompaniyets L, Goodman AB, Belay B, et al. Body mass index and risk for COVID-19–related hospitalization, intensive care unit admission, invasive mechanical ventilation, and death – United States, March–December 2020. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2021; 70 (10): 355–61.
54. Elliott J, Bodinier B, Whitaker M, et al. COVID-19 mortality in the UK Biobank cohort: Revisiting and evaluating risk factors. *Eur J Epidemiol.* 2021; 36 (3): 299–309.
55. Cho SI, Yoon S, Lee HJ. Impact of comorbidity burden on mortality in patients with COVID-19 using the Korean health insurance database. *Sci Reports.* 2021; 11 (1): 6375.
56. Guzik TJ, Mohiddin SA, Dimarco A, et al. COVID-19 and the cardiovascular system: Implications for risk assessment, diagnosis, and treatment options. *Cardiovasc Res.* 2020; 116 (10): 1666–87.
57. Ahrenfeldt LJ, Otavova M, Christensen K, et al. Sex and age differences in COVID-19 mortality in Europe. *Wiener Klin Wochenschr.* 2020; 133 (7–8): 393–8.
58. Li G, Liu Y, Jing X, et al. Mortality risk of COVID-19 in elderly males with comorbidities: A multi-country study. *Aging.* 2021; 13 (1): 27–60.
59. Ramos-Rincon JM, Buonaiuti V, Ricci M, et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in very old patients hospitalized with COVID-19 in Spain. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021; 76 (3): e28–37.
60. Estiri H, Strasser ZH, Klann JG, et al. Predicting COVID-19 mortality with electronic medical records. *NPJ Digit Med.* 2021; 4 (1): 15.
61. Li X, Ma X. Acute respiratory failure in COVID-19: Is it »typical« ARDS?. *Crit Care.* 2020; 24: 198.
62. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *J Am Med Assoc.* 2012; 307 (23): 2526–33.
63. Gattinoni L, Chiumello D, Rossi S. COVID-19 pneumonia: ARDS or not?. *Crit Care.* 2020; 24: 154.
64. Liu K, Fang YY, Deng Y, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J.* 2020; 133 (9): 1025–31.
65. Labbé V, Ederhy S, Lapidus N, et al. Characterization and outcomes of acute myocardial injury in COVID-19 intensive care patients. *Infect.* 2021; 49 (3): 563–6.
66. Paiter Nascimento JH, Lassa da Costa R, Nogueira Simvoulidis LF, et al. COVID-19 and myocardial injury in a Brazilian ICU: High incidence and higher risk of in-hospital mortality. *Arq Bras Cardiol.* 2021; 116 (2): 275–82.
67. Gallagher S, Jones DA, Anand V, et al. Diagnosis and management of patients with acute cardiac symptoms, troponin elevation and culprit-free angiograms. *Heart.* 2012; 98 (13): 974–81.
68. Kawakami R, Sakamoto A, Kawai K, et al. Pathological Evidence for SARS-CoV-2 as a cause of myocarditis: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol.* 2021; 77 (3): 314–25.
69. Gangaplara A, Massilamany C, Brown DM, et al. Coxsackievirus B3 infection leads to the generation of cardiac myosin heavy chain- α -reactive CD4 T cells in A/J mice. *Clin Immunol.* 2012; 144 (3): 237–49.
70. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395 (10229): 1054–62.
71. Wilk G, Osmenda G, Matusik P, et al. Endothelial function assessment in atherosclerosis: Comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation and peripheral arterial tonometry. *Pol Arch Med Wewn.* 2013; 123 (9): 443–52.
72. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood.* 2020; 135 (23): 2033–40.
73. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol.* 2020; 95 (7): 834–47.
74. Giordo R, Paliogiannis P, Mangoni AA, et al. SARS-CoV-2 and endothelial cell interaction in COVID-19: Molecular perspectives. *Vasc Biol.* 2021; 3 (1): R15–23.
75. Al-Ani F, Chehade S, Lazo-Langner A. Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thromb Res.* 2020; 192: 152–60.

76. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 383 (2): 120–82.
77. Luo WR, Yu H, Gou JZ, et al. Histopathologic findings in the explant lungs of a patient with COVID-19 treated with bilateral orthotopic lung transplant. *Transplantation*. 2020; 104 (11): e329–31.
78. Malas MB, Naazie IN, Elsayed N, et al. Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2020; 29.
79. Zhou X, Cheng Z, Luo L, et al. Incidence and impact of disseminated intravascular coagulation in COVID-19 a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2021; 201: 23–9.
80. Minet C, Potton L, Bonadona A, et al. Venous thromboembolism in the ICU: Main characteristics, diagnosis and thromboprophylaxis. *Crit Care*. 2015; 19 (1): 287.
81. Cheng Y, Luo R, Wang K, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020; 97 (5): 829–38.
82. Ronco C, Reis T, Husain-Syed F. Management of acute kidney injury in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med*. 2020; 8 (7): 738–42.
83. Harlander M, Tomažič J, Turel M, et al. Covid-19: A killer with »silent hypoxemia«. *Zdr Vestn*. 2020; 89 (11–12): 640–7.
84. Ottestad W, Seim M, Mæhlen JO. COVID-19 med stille hypoksemi. *Tidsskr Nor Lægeforening*. 2020; 140 (7).
85. Tobin MJ, Laghi F, Jubran A. Why COVID-19 silent hypoxemia is baffling to physicians. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 202 (3): 356–60.
86. Archer SL, Sharp WW, Weir EK. Differentiating COVID-19 pneumonia from acute respiratory distress syndrome and high altitude pulmonary edema: Therapeutic implications. *Circulation*. 2020; 142 (2): 101–4.
87. Rahman A, Tabassum T, Araf Y, et al. Silent hypoxia in COVID-19: Pathomechanism and possible management strategy. *Mol Biol Rep*. 2021; 48 (4): 3863–9.
88. Liao X, Wang B, Kang Y. Novel coronavirus infection during the 2019–2020 epidemic: Preparing intensive care units—the experience in Sichuan Province, China. *Intensive Care Med*. 2020; 46 (2): 357–60.
89. Swiss Society Of Intensive Care Medicine. Recommendations for the admission of patients with COVID-19 to intensive care and intermediate care units (ICUs and IMCUs). *Swiss Med Wkly*. 2020; 150: w20227.
90. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *J Am Med Assoc*. 2020; 323 (16): 1574–81.
91. Jain V, Yuan JM. Predictive symptoms and comorbidities for severe COVID-19 and intensive care unit admission: A systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health*. 2020; 65 (5): 533–46.
92. Management of patients with confirmed 2019-nCoV [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention [citirano 2021 Jun 13]. Dosegljivo na: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>
93. Schmidt M, Hajage D, Demoule A, et al. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: A prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020; 47 (1): 60–73.
94. Oliveira E, Parikh A, Lopez-Ruiz A, et al. ICU outcomes and survival in patients with severe COVID-19 in the largest health care system in central Florida. *PLoS One*. 2021; 16 (3): e0249038.
95. Chang R, Elhusseiny KM, Yeh YC, et al. COVID-19 ICU and mechanical ventilation patient characteristics and outcomes—a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021; 16 (2): e0246318.
96. Haase N, Plovsing R, Christensen S, et al. Characteristics, interventions, and longer term outcomes of COVID-19 ICU patients in Denmark—a nationwide, observational study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2021; 65 (1): 68–75.
97. Larsson E, Brattström O, Agvald-Öhman C, et al. Characteristics and outcomes of patients with COVID-19 admitted to ICU in a tertiary hospital in Stockholm, Sweden. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2021; 65 (1): 76–81.
98. Roedl K, Jarczak D, Thasler L, et al. Mechanical ventilation and mortality among 223 critically ill patients with coronavirus disease 2019: A multicentric study in Germany. *Aust Crit Care*. 2021; 34 (2): 167–75.
99. Contou D, Fraissé M, Pajot O, et al. Comparison between first and second wave among critically ill COVID-19 patients admitted to a French ICU: No prognostic improvement during the second wave? *Crit Care*. 2021; 25 (1): 3.
100. Savarimuthu S, BinSaeid J, Harky A. The role of ECMO in COVID-19: Can it provide rescue therapy in those who are critically ill?. *J Cardiac Surg*. 2020; 35 (6): 1298–301.
101. Henry BM, Lippi G. Poor survival with extracorporeal membrane oxygenation in acute respiratory distress syndrome (ARDS) due to coronavirus disease 2019 (COVID-19): Pooled analysis of early reports. *J Crit Care*. 2020; 58: 27–8.

102. Lorusso R, Combes A, Lo Coco V, et al. ECMO for COVID-19 patients in Europe and Israel. *Intensive Care Med.* 2021; 47 (3): 344–8.
103. Abani O, Abbas A, Abbas F, et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet.* 2021; 397 (10285): 1637–45.
104. Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, et al. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with COVID-19. *N Engl J Med.* 2021; 384 (16): 1491–502.
105. Casadevall A, Pirofski LA. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J Clin Invest.* 2020; 130 (4): 1545–8.
106. Abani O, Abbas A, Abbas F, et al. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet.* 2021; 397 (10289): 2049–59.
107. Selvaraj V, Dapaah-Afriyie K, Finn A, et al. Short-term dexamethasone in Sars-CoV-2 patients. *R I Med J.* 2020; 103 (6): 39–43.
108. Solinas C, Perra L, Aiello M, et al. A critical evaluation of glucocorticoids in the management of severe COVID-19. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020; 54: 8–23.
109. Horby P, Lim WS, Emberson JR, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19. *N Engl J Med.* 2021; 384 (8): 693–704.
110. Tomazini BM, Maia IS, Cavalcanti AB, et al. Effect of dexamethasone on days alive and ventilator-free in patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome and COVID-19: The CoDEX randomized clinical trial. *J Am Med Assoc.* 2020; 324 (13): 1307–16.
111. Nelson BC, Laracy J, Shoucri S, et al. Clinical outcomes associated with methylprednisolone in mechanically ventilated patients with COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2021; 72 (9): e367–72.
112. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, et al. Remdesivir: A review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci.* 2020; 6 (5): 672–83.
113. Singh AK, Singh A, Singh R, et al. Remdesivir in COVID-19: A critical review of pharmacology, pre-clinical and clinical studies. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2020; 14 (4): 641–8.
114. Jiang Y, Chen D, Cai D, et al. Effectiveness of remdesivir for the treatment of hospitalized COVID-19 persons: A network meta-analysis. *J Med Virol.* 2021; 93 (2): 1171–4.
115. Young B, Tan TT, Leo YS. The place for remdesivir in COVID-19 treatment. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21 (1): 20–1.
116. Pan H, Peto R, Henao-Restrepo AM, et al. Repurposed antiviral drugs for COVID-19 – interim WHO solidarity trial results. *N Engl J Med.* 2021; 384 (6): 497–511.
117. Garibaldi BT, Wang K, Robinson ML, et al. Comparison of time to clinical improvement with vs without remdesivir treatment in hospitalized patients with COVID-19. *J Am Med Assoc Netw Open.* 2021; 4 (3): e213071.
118. Campbell JD, Whittington MD, Rind DM, et al. Alternative pricing models for remdesivir and other potential treatments for COVID-19. *Inst Clin Econ Rev.* 2020.

Lara Malec¹, Anja Kokalj Palandačič²

Uporaba melatonina v diagnostiki in zdravljenju demence

The Use of Melatonin in the Diagnostics and Treatment of Dementia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: melatonin, ramelteon, demenca, motnja faze spanja REM

Melatonin je človeku lasten hormon, ki nastaja v češariki in ima neposreden hipnotični ter cirkadiani učinek na spanje, poleg tega pa deluje imunomodulatorno, protivnetno, antioksidativno, antiexcitatorno in verjetno tudi uravnava žilni tonus. Njegovo izločanje je cirkadiano in najvišje med drugo ter tretjo uro ponoči, s starostjo pa razpon nihanja upada. Bolniki z Alzheimerjevo demenco imajo že v predkliničnem stadiju znižano koncentracijo melatonina v serumu in možgansko-hrbtenjačni tekočini, vendar ni povsem jasno, ali gre za vzrok ali posledico degenerativnih procesov. Nekatere raziskave so potrdile pozitiven učinek melatonina na motnje spanja in spoznavne sposobnosti teh bolnikov. Nevroprotektivno deluje tako, da zavira začetno fazo nastajanja za Alzheimerjevo bolezen značilnih zunajceličnih plakov iz amiloida β , na že nastale plake pa nima učinka. Poleg klonazepama je melatonin zdravilo izbora za zdravljenje motnje faze spanja s hitrimi gibi zrkel (angl. *rapid eye movement*, REM) pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo in demenco z Lewyjevim telesci. V Sloveniji je za zdravljenje nespečnosti pri starejših od 55. leta registriran melatonin s podaljšanim sproščanjem (Circadin®), v ZDA pa tudi njegov sintetični analog ramelteon, ki ima daljšo razpolovno dobo. Večina raziskav je ugotovila le blage stranske učinke, med katerimi je najpogostejša dnevna zaspanost. Zdravili se presnavljata skozi jetra. β -blokatorji zavirajo izločanje melatonina, fluvoksamin in 5-metoksiporsoralen pa povzročata dvig njegove plazemske koncentracije.

ABSTRACT

KEY WORDS: melatonin, ramelteon, dementia, rapid eye movement behavior disorder

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland and has a direct hypnotic and circadian effect. It also has immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-excitative properties, as well as most likely acting as a vascular tone modulator. It is secreted with circadian rhythm, reaching the peak concentration between two and three a.m. The amplitude is lower in older individuals. In Alzheimer's disease, the concentration of melatonin in the serum and cerebrospinal fluid is lower compared to the healthy counterparts even in the preclinical phase of the disease. It is not clear whether that is the cause or

¹ Lara Malec, dr. med., Univerzitetna psihiatrična klinika Ljubljana, Chengdujska cesta 45, 1260 Ljubljana; lara.malec@psih-klinika.si

² Anja Kokalj Palandačič, dr. med., Univerzitetna psihiatrična klinika Ljubljana, Chengdujska cesta 45, 1260 Ljubljana; anja.kokalj@psih-klinika.si

effect of the neurodegenerative process. Several studies have confirmed the positive effect of melatonin on disturbed sleep and cognitive functions in Alzheimer's disease. It exerts neuroprotective effects by inhibiting the initial phase of formation of the deposits of amyloid β , but it has no effect once the plaques are formed. Melatonin is the first line of treatment for rapid eye movement sleep behavior disorder in people with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. In Slovenia, melatonin with extended release (Circadin®) is registered for the treatment of insomnia in patients over 55 years of age. Ramelteon, melatonin's longer-acting synthetic agonist, is registered for use in the United States of America. Most studies have found only mild side effects of melatonin, among which daily sleepiness is the most common. It is metabolized by the liver. β -blockers inhibit its secretion, while fluvoxamine and 5-methoxypsoralen elevate its plasma concentration.

UVOD

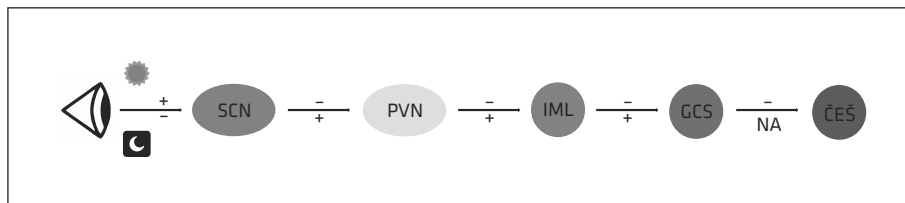
Vedenje in številni fiziološki ter celični procesi večine živih bitij se prilagajajo na okoljske razmere s pomočjo notranje cirkadiane ure, ki vzdržuje približno 24-urni periodični ritem (1). Glavni cirkadiani spodbujevalnik je suprakiazmatično jedro (angl. *suprachiasmatic nucleus*, SCN) v anteriornem hipotalamusu, na cirkadiano fazo pa vplivajo okoljski dejavniki (nem. *Zeitgeber*s), med katerimi je najpomembnejša (sončna) svetloba (2).

Informacija o svetlobi, ki jo zaznajo ganglijske celice mrežnice, potuje po mrežnično-hipotalamičnem traktu do SCN. Od tam gre nitje do paraventrikularnega jedra (angl. *paraventricular nucleus*, PVN) in nato v intermediolateralni steber zgornjega prsnega dela hrbtenjače, kjer se preklopi v zgornji vratni ganglij, od koder izvirajo postganglijska simpatična vlakna, ki oživčujejo češariko oz. epifizo (slika 1) (3, 4).

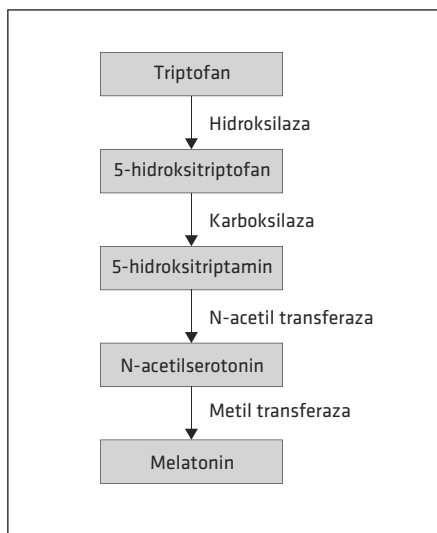
V češariki iz triptofana nastaja hormon melatonin, katerega tvorbo uravnava encim serotonininska N-acetil transferaza (angl. *aralkylamine N-acetyltransferase*, AANAT) (slika 2) (4).

SCN zavira aktivnost PVN. Ponoči, ko je svetlobe malo in je frekvenca proženja živčnih celic SCN nizka, se iz aksonov simpatičnega nitja, ki oživčuje češariko, sprošča noradrenalin (NA). NA preko β -adrenergičnih receptorjev zviša koncentracijo znotrajceličnega cAMP (6). Pinealociti neprestano sintetizirajo AANAT, ki se v odsotnosti NA takoj razgradi, ko pa je raven cAMP povišana, ga od cAMP odvisna protein kinaza A fosforilira in s tem zaščiti pred razgradnjo (7).

Aktivnost AANAT se ponoči poveča od 30- do 70-krat. Melatonin se začne sproščati približno dve uri pred časom, ko smo navajeni iti spat, njegova plazemska kon-



Slika 1. Pot informacije o svetlobi (3). SCN – suprakiazmatično jedro (angl. *suprachiasmatic nucleus*), PVN – paraventrikularno jedro (angl. *paraventricular nucleus*), IML – intermediolateralni steber zgornjega prsnega dela hrbtenjače (angl. *intermediolateral nucleus of spinal cord*), GCS – zgornji vratni ganglij (lat. *ganglion cervicale superius*), NA – noradrenalin, ČEŠ – češarika.



Slika 2. Biosinteza melatonina, ki nastaja v češariki iz prekursorja triptofana (5).

centracija pa je najvišja med drugo in tretjo uro ponoči (4). Melatonin je filogenetsko ohranjena molekula, ki jo izločajo vsi vretenčarji. Večina živali ga izloča ponoči, ne glede na to, ali so aktivne podnevi, ponoči ali ob mraku – tolmačenje signala, ki ga posreduje melatonin, torej ne poteka na ravni SCN, ampak naprej v signalni poti (8).

Melatonin se ne shranjuje v češariki, temveč se izloči v krvni obtok in tretji ventrikel, nato pa se hitro presnovi v jetrih. Njegov presnovek 6-sulfatoksimeletatonin (aMT6s) se izloča z urinom. Ima kratko razpolovno dobo, približno 20 do 30 minut (2, 3).

Melatonin ima neposredni (hipnotični) in cirkadiani učinek na spanje (2). Spanec spodbuja prek zaviranja budnosti (8). V SCN se veže na dva membranska receptorja, melatoninski receptor tipa 1 (MT1) in melatoninski receptor tipa 2 (MT2). Preko vezave na receptorje MT1 akutno zavira proženje živčnih celic SCN z aktivacijo mehanizmov, povezanih z receptorji za γ -aminomasleno kislino (angl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA). Preko delovanja na receptor MT2 pa spremeni fazo cirkadiane

ure. Jutranje dodajanje melatonina povzroči zapoznel nastop večerne zaspanosti, večerno dodajanje pa zgodnejši nastop spanja (8). Gre torej za povratno regulacijo med SCN in melatoninom.

Melatonin nastaja tudi v mrežnici, prebavilih, koži, kostnem mozgu in levkocitih, dobimo pa ga lahko tudi iz hrane (3). V prebavilih je koncentracija melatonina od 10- do 100-krat višja kot v krvi in vsaj 400-krat višja kot v češariki (9).

Poleg učinka na cirkadiani ritem deluje imunomodulatorno, protivnetno, antioksidativno in antiokscitatorno (3). Povezuje se z različnimi znotrajceličnimi beljakovinami (npr. s kalmodulinom), odstranjuje proste radikale in spodbudi antioksidativne encime (2). Protivnetno deluje preko zaviranja vezave jedrskega dejavnika κB (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*, NF- κB) na DNA, zaviranja ciklooksigenaze-2 (angl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) ter izražanja sprožljive sintaze dušikovega oksida (angl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS). Preko utrditve mitohondrijske membrane naj bi ščitil celice pred ishemičnimi spremembami (10).

Pri ženskah v menopavzi motnje spanja so močno pozitivno povezane z vazomotoričnimi simptomi. V žilnem tkivu (predvsem v možganskem krvnem obtoku) se nahajajo značilni melatoninski receptorji, kar morda pomeni, da melatonin tudi uravnava žilni tonus (2).

SPREMEMBE RAVNI MELATONINA PRI STARANJU IN DEMENCI

V vseh starostnih skupinah je sproščanje melatonina cirkadiano, vendar se po 60. letu (po nekaterih raziskavah pa že po 40. letu) razpon nihanja začne zmanjševati. Pri starejših naj bi bila osnovna raven melatonina zvišana (11).

Možni vzroki za spremembe ravni melatonina pri starejših so (2, 11):

- manjša izpostavljenost okoljski svetlobi (izpostavljenost dnevni svetlobi poveča nočno izločanje melatonina),

- starostne spremembe mrežnice in leče (skozi jo prehaja manj svetlobe),
- starostne degenerativne spremembe SCN (nekateri raziskave so ugotovile tudi zmanjšanje razpona nihanja drugih cirkadianih ritmov – osnovne temperature in kortizola, vazopresina, krvnega tlaka, izločanja luteinizirajočega hormona in testosterona itd.),
- zmanjšano število β -adrenergičnih receptorjev v pinealocitih,
- manjša aktivnost encima AANAT (glavni encim, udeležen v sintezi melatonina) in
- večji plazemski očistek melatonina.

Alzheimerjeva bolezen

Motnje spanja naj bi se pojavljale pri do 70 % bolnikov z Alzheimerjevo demenco (angl. *Alzheimer's disease*, AD). Skrajšana je tako faza globokega spanja s počasnimi valovi kot faza spanja s hitrimi gibi zrkel (angl. *rapid eye movement*, REM). Nočni spanec je razdrobljen, podnevi bolniki večkrat dremajo in lahko pride celo do zamenjave dneva in noči. Značilen je tudi pojav zaha-jajočega sonca (angl. *sundowning*), pri katerem se pojavijo popoldanska oz. večerna razdražljivost, tavanje, motnje pozornosti, mišljenja in čustvovanja (10, 12, 13).

Izločanje melatonina pri teh bolnikih je zmanjšano, obdobje najvišjega izločanja pa je spremenljivo (14). Manni in sodelavci so ugotovili, da naj bi se že pri blagi do zmerni obliki bolezni začel izločati v povprečju eno uro kasneje kot pri zdravih sovrstnikih (15). Že v predkliničnem stadiju AD (stopnja Braak I-II) imajo preiskovanci nižjo koncentracijo melatonina v serumu in možgansko-hrbtenjačni tekočini glede na primerjalne skupine, z napredovanjem bolezni pa se raven melatonina še znižuje. Ying-Hui in sodelavci so pri obdukciji teh bolnikov ugotovili, da imajo glede na primerjalne skupine le eno petino koncentracije melatonina v možgansko-hrbtenjačni tekočini, nosilci apolipoproteina E z genotipom $\epsilon 4/4$, ki je dejavnik tveganja

za razvoj AD, pa še manj (11). Ni jasno, ali je pomanjkanje melatonina vzrok ali posledica nevrodegeneracije, vendar bi se ne glede na to raven melatonina lahko uporabljala kot biološki označevalec začetne AD (10, 11).

Nekatere raziskave so pri bolnikih z AD ugotovile zmanjšano prostornino češarike in kalcifikacijo žleze (16). Druge so v češariki teh bolnikov ugotovile izgubo $\beta 1$ -adrenergične receptorske informacijske RNA (angl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) in spodbujanje izražanja genov za monoamin oksidazo (encim, ki razgrajuje serotonin). Znižana raven melatonina je bila torej posledica motenega noradrenergičnega oživčenja in pomanjkanja serotonina (17).

V hipokampusu bolnikov z AD so ugotovili znižano koncentracijo receptorjev MT2. Več predkliničnih raziskav je ugotovilo, da naj bi melatonin vplival na strukturno plastičnost aksonov hipokampusa (16).

MELATONERGIČNA ZDRAVILA

V Sloveniji sta registrirana melatonin s podaljšanim sproščanjem in agomelatin. Melatonin s podaljšanim sproščanjem (Circadin®) je registriran za kratkotrajno zdravljenje primarne nespečnosti, za katero je značilna slaba kakovost spanca pri bolnikih, starih 55 let ali več. Priporočen dnevni odmerek je 2 mg, eno do dve uri pred spanjem in po hrani.

Agomelatin je agonist melatonina z visoko vezavno sposobnostjo za receptorje MT1. Ima podoben, a dolgotrajnejši učinek na živčne celice SCN kot Circadin®. Deluje tako, da ponovno vzpostavi cirkadiani ritem pri neurejenem vzorcu budnosti in spanja, dodatno pa učinkuje tudi na receptorje 2C za 5-hidroksitriptamin (5-HT_{2C}), zato se uporablja za zdravljenje tesnobno-depresivnih motenj (2, 8). V Sloveniji je registriran za zdravljenje velikih depresivnih epizod pri odraslih (18).

Za zdravljenje nespečnosti je v ZDA registriran ramelteon v odmerku 8 mg.

Ramelteon je triciklični sintetični analog melatoninina, ki se značilno veže na receptorje MT1 in MT2 ter ima zmerno vezavno sposobnost za receptorje 1A za 5-hidroksitriptamin (5-HT_{1A}), ne veže pa se na melatonin vezavne beljakovine, kot sta kalmodulin ali kinon reduktaza 2. Razpolovni čas ramelteona je od ena do dve uri, razpolovni čas njegovega glavnega presnovka, tj. presnovka II (angl. *metabolite II*, M-II), pa od dve do pet ur (3). V primerjavi z melatoninom se bolje vsrka v tkiva in ima visoko vezavno sposobnost za receptorje MT1 in MT2, zaradi česar naj bi bil učinkovitejši pri podaljševanju spanja brez hitrih gibov zrkel (angl. *non-rapid eye movement*, NREM) in zmanjševanju budnosti (8). Je edini hipnotik, pri katerem naj ne bi bilo možnosti za zlorabo in razvoj odvisnosti (2). Nima vezavne sposobnosti za benzodiazepinske receptorje, ne povzroča odtegnitve ali učinka povratne (angl. *rebound*) nespečnosti. Za razliko od benzodiazepinov višanje odmerka ne povzroči nenadzorovane zaspanosti ali splošne anestezije (8).

Po podatkih nekaterih raziskav (Roth in sodelavci, 2006, ter Erman in sodelavci, 2006) njegova učinkovitost ni odvisna od odmerka (primerjava 4, 8, 16 in 32 mg). V raziskavi Yukuhiro in sodelavcev (2004) je imel ramelteon močnejši učinek na sprožitev spanja kot melatonin in zolpidem, ki je nebenzodiazepinski hipnotik, indiciran za kratkotrajno zdravljenje nespečnosti (8, 19).

Melatonin kot zdravilo za nespečnost pri Alzheimerjevi bolezni

Pregledna raziskava Cochrane iz leta 2016 ni ugotovila koristnih ali škodljivih učinkov melatoninina na spanje pri bolnikih z zmerno do hudo AD, pri čemer so preverjali celotno trajanje nočnega spanja, učinkovitost spanja, obdobje budnosti ponoči po nastopu spanja, število nočnih prebujanj in razmerje med spanjem podnevi ter ponoči. Prav tako niso ugotovili koristnih ali škod-

ljivih učinkov ramelteona na spanje pri bolnikih z blago do zmerno AD. Dokazi so sicer zaradi nizkega števila sodelujočih in širokih intervalov zaupanja manj zanesljivi (20).

Rezultati raziskav o učinku melatoninina na spanec so si pogosto nasprotujoči. Kombinacija melatoninina in izpostavljenosti dnevni svetlobi v raziskavi Dowling in sodelavcev ni imela učinka na nočni spanec, ugotovili pa so manj dnevnega spanja, več dnevne aktivnosti in izboljšanje razmerja med spanjem podnevi ter ponoči (21). Nasprotno so Riemersma-van der Lek in sodelavci pri bolnikih, ki so jim dodajali melatonin, ugotavljali hitrejši nastop večernega uspanja, podaljšanje nočnega spanja, daljša obdobja neprekinjenega nočnega spanja in manj razdražljivosti. Izboljšala se je učinkovitost spanja in skrajšalo se je trajanje nočnih prebujanj, učinka pa sta se med raziskavo še povečevala (22).

Singer in sodelavci so pri bolnikih, ki so prejeli melatonin, opazili trend, ki ni bil statistično značilen za daljše trajanje nočnega spanja in manj prebujanja po nastopu spanja. Pri melatoninu s podaljšanim sproščanjem so ugotovili tudi trend za zmanjšanje razmerja spanja podnevi in ponoči, negovalci preiskovancev pa so poročali o subjektivnem izboljšanju kakovosti spanja (23). Zhang in sodelavci so v pregledni raziskavi ugotovili, da je imel melatonin pri bolnikih z AD pozitiven subjektivni, ne pa tudi objektivni učinek na kakovost spanja, ki je bil ocenjen s Pittsburškim vprašalnikom kakovosti spanja (angl. *Pittsburgh Sleep Quality Index*, PSQI) (13). Nasprotno so Wade in sodelavci pri bolnikih z blago do zmerno AD, ki so 24 tednov prejeli melatonin s podaljšanim sproščanjem v odmerku 2 mg, ugotovili izrazito učinkovitejši spanec, merjen s PSQI. Razlike so naraščale s trajanjem raziskave in bile opaznejše pri bolnikih, ki so prejeli poročali o nespečnosti (24).

Gehrman in sodelavci so ugotovili, da melatonin v odmerku 8,5 mg ali 1,5 mg

s podaljšanim sproščanjem, ki so ga bolniki prejeli deset dni ob desetih zvečer, v primerjavi s placebom ni izboljšal spanja ali ni omilil razdražljivosti. Kot možen razlog so navedli, da imajo bolniki z napredovalo AD uničen del možganov, ki je prijemališče melatonina, verjetno pa je bilo tudi trajanje raziskave prekratko, da bi se lahko učinek sploh pokazal (25).

Na zdravljenje z melatoninom naj bi se dobro odzvali predvsem tisti bolniki, ki imajo pomanjkanje telesu lastnega hormona (2).

Nevroprotektivni učinek melatonina pri Alzheimerjevi bolezni

Za AD so značilni zunajcelični senilni plaki iz amiloida β ($A\beta$) in znotrajcelične neurofibrilarne pentlje iz hiperfosforilirane beljakovine tau. $A\beta$ aktivira mikroglijo in sproži vnetni odziv, tako da se v češariki povezuje s toličnimi receptorji (angl. *toll-like receptors*, TLR) (16, 17).

Melatonin deluje nevroprotektivno preko zaviranja z $A\beta$ povzročenih poškodb, kot so maščobna peroksidacija, zvišana raven znotrajceličnega kalcija in apoptotične spremembe, poleg tega pa v začetni stopnji zavira nastajanje samih plakov $A\beta$ (26). Zgodnje in dolgotrajno preprečevalno (preventivno) dodajanje melatonina ima antiamiloidni in antioksidativni učinek, ni pa učinkovito, ko se plaki $A\beta$ že nakopičijo (17). Zmanjšana škodljivost $A\beta$ naj bi bila posledica alosteričnega uravnavanja in aktivacije receptorjev GABA-A (10).

Nakopičen $A\beta$ v možganih odstranjuje glimfatični sistem, sestavljen iz obžilnih astrocitov z akvaporinskimi kanalčki (10). Odstranjevanje je najučinkovitejše med spanjem, predvsem v fazi globokega spanja s počasnimi valovi. Očistek je pri motenem spancu zmanjšan, kar lahko vpliva na razvoj in napredovanje AD. Dodajanje melatonina poveča očistek glimfatičnega sistema (12).

Izboljšanje spoznavnih sposobnosti pri Alzheimerjevi bolezni

Pregledna raziskava Cochrane iz leta 2006 ni našla dokazov, da bi melatonin izboljšal upad spoznavnih sposobnosti pri demenci, morebitno učinkovit pa je bil pri blaženju vedenjskih in psihičnih simptomov demence, kot so depresija, tesnoba, apatija, halucinacije, blodnje, razdražljivost, nemir in motnje teka. V omenjenih raziskavah so uporabili melatonin v odmerku 3 mg v obdobju štirih tednov, odmerek 2,5 mg v obdobju šestih tednov in melatonin s podaljšanim sproščanjem v odmerku 2,5 mg v obdobju sedmih tednov, spoznavne sposobnosti pa so preverjali s Kratkim preizkusom spoznavnih sposobnosti (KPSS) (27).

Wade in sodelavci so sicer v zgoraj omenjeni raziskavi pri bolnikih, ki so prejeli melatonin, ugotovili tudi boljše rezultate na KPSS in Lawtonovi lestvici za oceno vsakodnevnih opravil (angl. *Instrumental Activities of Daily Living*, IADL), pri lestvici za oceno spoznavnih sposobnosti bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (angl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive Subscale*, ADAS-Cog) pa niso opazili razlike s placebom (24).

Furio in sodelavci, ki so v 9–18 mesecev trajajočo raziskavo vključili 50 bolnikov z blagim upadom spoznavnih sposobnosti, so pri tistih, ki so pred spanjem prejeli melatonin v odmerku 3–9 mg, ugotavljali boljši rezultat na KPSS, ADAS-Cog in testu Mattis (angl. *Dementia Rating Scale*), presegalnem testu za demenco, ki zajema pet področij: pozornost, iniciacija-perseveracija, konstrukcija, konceptualizacija in spomin (28). Imeli so tudi manj razpoloženjskih simptomov na Beckovem vprašalniku depresivnosti (angl. *Beck Depression Inventory*) in subjektivno boljše urejen vzorec spanja ter budnosti (29).

Delirij

Demenca je glavni dejavnik tveganja za delirij (30). Več raziskav je potrdilo, da pride pri

deliriju do izgube spremenljivosti v ravni melatoninu v plazmi, ki naj bi ostala nespremenjena že tri dni pred postavitvijo diagnoze. Raven presnovka aMT6s v urinu je pri hipoaktivni obliki delirija zvišana, pri hiperaktivni obliki pa znižana. Angeles-Castellanos in sodelavci so v raziskavi 13 bolnikov, starejših od 65 let, ugotovili, da naj bi imelo dodajanje nizkega odmerka melatoninu varovalen učinek. Ko se že razvije klinična slika delirija, pa ne olajša poteka delirija in ne zmanjša smrtnosti (31). Za zdravljenje delirija naj bi bil učinkovit tudi ramelteon (12).

Motnja faze spanja s hitrimi gibi zrkel

Motnja faze spanja s hitrimi gibi zrkel (angl. *rapid eye movement sleep behavior disorder*, RBD) je stanje, pri katerem pride do izgube atonije in posledično premikanja, brcanja itd. med fazo spanja REM. RBD je sindrom začetnega obdobja Parkinsonove bolezni in demence z Lewyjevim telesci. Zdravili prvega izbora za RBD sta melatonin in klonazepam, ki je benzodiazepin, indiciran tudi za zdravljenje epilepsije (19, 32). Starejši posamezniki melatonin bolj prenašajo in poročajo o manj padcih ter poškodbah v primerjavi s klonazepamom. Možni stranski učinki so prebavne težave, glavobol, zaspanost, utrujenost, motnje ravnotežja in motnje spoznavnih sposobnosti. Začetni odmerek je 3 mg zvečer pred spanjem, ki se ga nato zvišuje po 3 mg do končnega odmerka, 6–18 mg. Pri večini bolnikov je potrebno vseživljenjsko zdravljenje (32).

Mehanizem, po katerem melatonin zmanjša tonično aktivnost med fazo REM, ni čisto jasen. Prva hipoteza pravi, da melatonin povečuje učinek GABA na receptorjih GABA-A na motoričnih živčnih celicah hrbtenjače, druga hipoteza pa temelji na učinku melatoninu na zmanjšanje delovanja kalmodulina in tako posredno vpliva na citoskelet ter nikotinske receptorje celic skeletnih mišic (33).

Jun in sodelavci (2019) v štiritedenski raziskavi, kjer so bolnikom dajali melatonin s podaljšanim sproščanjem v odmerku 2 mg, sicer niso ugotovili razlike s placebom (34).

NEŽELENI UČINKI

V različnih raziskavah so ugotovili naslednje možne neželene učinke melatoninu (17, 23, 27):

- dnevna zaspanost,
- poslabšanje depresije,
- sprožitev maničnih epizod pri dovzetnih posameznikih,
- zmanjšana prekrvavitve možganov,
- zmanjšana toleranca za glukozo in zmanjšana občutljivost za inzulin,
- prebavne motnje,
- tromboza,
- menoragija,
- glavobol,
- ototoksičnost,
- večja dovzetnost mrežnice za svetlobo povzročene poškodbe,
- poslabšanje artritisa,
- hiperkinezija,
- občutek nemirnih nog in
- obarvanost okončin.

Raziskav o dolgoročnih posledicah je malo. Dva primera, v katerih je en bolnik več kot deset let s občasnimi tedenskimi premori prejemal melatonin v odmerku 5 mg, drugi pa 14 let dnevno 2–10 mg, nista poročala o stranskih učinkih (35).

Dve raziskavi, v katerih so udeleženci prejemali melatonin šest mesecev oz. 13–24 tednov, nista ugotovili stranskih učinkov. V velikih odmerkih pa naj bi ob dolgotrajnem jemanju povzročal zavoro izločanja spolnih hormonov (36).

V 52 tednov trajajoči dvojno slepi raziskavi, kjer so otroci s motnjami avtističnega spektra in nevrogenetskimi motnjami za lajšanje nespečnosti prejemali melatonin s podaljšanim sproščanjem v odmerku 2, 5 ali 10 mg, niso ugotavljali resnejših neželenih

učinkov, od manj resnih pa so se pojavljali utrujenost in motnje razpoloženja (37).

Vpliv na jetra

Agomelatin morda povzroča hepatitis in jetrno odpoved, zaradi česar je v prvih 24 tednih zdravljenja in ob dvigovanju odmerka potreben reden nadzor jetrnih encimov (37). Za razliko v literaturi ni navedenih podatkov, da bi melatonin lahko imel škodljiv vpliv na jetra – več raziskav navaja celo varovalni učinek. Večina omenjenih raziskav sicer ni prešla v klinično fazo in je bil preučevan učinek melatonina na miših in podganah (38–45).

Gonciarz in sodelavci so v dvojno slepo raziskavo vključili 42 bolnikov z nealkoholnim maščobnim vnetjem jeter, ki so za 12 tednov morali spremeniti svoj življenjski slog, prav tako pa so prejeli melatonin v odmerku 10 mg ali pa placebo. Ugotovili so statistično značilno znižanje alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST) in gamaglutamil transferaze (GGT) pri tistih, ki so prejeli melatonin. 12 tednov po prenehanju zdravljenja je ostal znižan le GGT, vrednosti ALT in AST pa so se vrnile na izhodiščne (46).

Chojnacki in sodelavci so pri bolnikih s hiperlipidemijo, ki so imeli po zdravljenju z atorvastatinom ali rosuvastatinom zvišano raven jetrnih encimov, ugotovili, da melatonin v odmerku dvakrat po 5 mg dnevno v obdobju štirih tednov statistično značilno zniža ALT, AST, GGT in holesterol v primerjavi s placebom (47).

MEDSEBOJNO DELOVANJE MELATONINA IN DRUGIH ZDRAVIL

Sproščanje NA vpliva na biosintezo melatonina, zato β -blokatorji (npr. propranolol) zavirajo izločanje melatonina (3). Učinek je odvisen od odmerka β -blokatorja (11).

Melatonin se večinoma presnavlja s hidroksilacijo, ki jo katalizira jetrni encim citokrom P450 (angl. *cytochrome P450*, CYP)

1A2, v manjši meri pa pri presnovi sodelujejo tudi encimi CYP2C19, CYP1A1 in CYP1B1. Presnovek 6-hidroksimelatonin se po konjugaciji s sulfatom ali glukuronidom izloči z urinom (48).

Tobak naj bi pospešil presnovo melatonina, kofein pa presnovo zavira. Zaviralca ponovnega privzema serotonina, fluvoksamin in 5-metoksiporsoralen, ki se uporabljata za zdravljenje luskavice, močno zavirata delovanje CYP1A2 in povzročata dvig plazemske koncentracije melatonina (48). Fluvoksamin je antidepresiv, ki je v ZDA registriran za zdravljenje obsesivno-kompulzivne motnje in socialne tesnobe motnje (19). Ugotovljeno je bilo, da 17α -etiniloestradiol *in vitro* zavira sulfatacijo melatonina, pri terapevtskih odmerkih pa naj ne bi dosegel zadostne plazemske koncentracije, da bi bil učinek opazen tudi *in vivo* (48). Nasprotno pa so v kohortni raziskavi 29 prostovoljcev ugotavljali pomembno zvišanje najvišje plazemske koncentracije melatonina ob sočasnem jemanju oralnih kontraceptivov (49).

Pri diazepamu, tamoksifenu in paracetamolu klinično pomembnih součinkovanj niso ugotovili (48). Melatonin naj bi povečal antiepileptični učinek karbamazepina, vendar nima učinka na njegovo plazemsko koncentracijo (50).

ZAKLJUČEK

Številne raziskave so bile narejene o morebitnem vplivu melatonina na izboljšanje spanja in spoznavnih sposobnosti pri bolnikih z demenco. Raziskave se razlikujejo po številu udeležencev, trajanju ter rezultatih. Glavna težava večine raziskav je premajhno število udeležencev in/ali prekratko trajanje, da bi lahko dovolj zanesljivo sklepali o uporabnosti melatonina, saj obstaja možnost, da uporaba melatonina doseže polni kronobiotski učinek šele po nekaj mesecih. Poleg tega veliko raziskav ni slepih.

Glede na ugotovitve dosedanjih raziskav sklepamo, da je melatonin morda uporaben

za blaženje motenj spanja pri bolnikih z demenco in predstavlja varnejšo izbiro v primerjavi z drugimi hipnotiki, uporabljal pa bi se lahko tudi pri odkrivanju začetne stopnje AD in upočasnitvi napredovanja

blažjega upada spoznavnih sposobnosti. Menimo, da bi bilo morebitno uporabnost treba dodatno ovrednotiti z ustreznimi raziskavami in melatonin uvrstiti v smernice za navedena stanja.

LITERATURA

1. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (2): 67–84.
2. Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, et al. Melatonin and sleep in aging population. *Exp Gerontol.* 2005; 40 (12): 911–25.
3. Hardeland R, Poeggeler B, Srinivasan V, et al. Melatonergic drugs in clinical practice. *Arzneimittelforschung.* 2008; 58 (1): 1–10.
4. Pregelj P, Kores-Plesničar B, Tomori M, et al. Psihijatrija. 1. izd. Ljubljana: Psihijatrična klinika; 2013. p. 448.
5. Hossain MF, Uddin MS, Uddin GMS, et al. Melatonin in Alzheimer's disease: A latent endogenous regulator of neurogenesis to mitigate Alzheimer's neuropathology. *Mol Neurobiol.* 2019; 56 (12): 8255–76.
6. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res.* 1996; 73 (1–2): 125–30.
7. Shomerus C, Korf HW. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1057: 372–83.
8. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trahkt I, et al. Melatonin and melatonergic drugs on sleep: Possible mechanisms of action. *Int J Neurosci.* 2009; 119 (6): 821–46.
9. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 2002; 47 (10): 2336–48.
10. Cardinali DP. Melatonin: Clinical perspectives in neurodegeneration. *Front Endocrinol.* 2019; 10: 480.
11. Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 2005; 38 (3): 145–52.
12. Spinedi E, Cardinali DP. Neuroendocrine-metabolic dysfunction and sleep disturbances in neurodegenerative disorders: Focus on Alzheimer's disease and melatonin. *neuroendocrinology.* 2019; 108 (4): 354–64.
13. Zhang W, Chen XY, Su SW, et al. Exogenous melatonin for sleep disorders in neurodegenerative diseases: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Neurol Sci.* 2016; 37 (1): 57–65.
14. Cardinali DP, Furio AM, Brusco LI. Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8 (3): 218–27.
15. Manni R, Cremascoli R, Perretti C, et al. Evening melatonin timing secretion in real life conditions in patients with Alzheimer disease of mild to moderate severity. *Sleep Med.* 2019; 63: 122–6.
16. Song J. Pineal gland dysfunction in Alzheimer's disease: Relationship with the immune-pineal axis, sleep disturbance, and neurogenesis. *Mol Neurodegener.* 2019; 14 (1): 28.
17. Lin L, Huang Q-X, Yang S-S, et al. Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (7): 14575–93.
18. Centralna baza zdravil [internet]. Ministrstvo za zdravje, Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke, Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije, Nacionalni inštitut za javno zdravje. c2021 [citirano 2022 Feb 13]. Dosegljivo na: <http://www.cbz.si/>
19. Stahl SM. Stahl's essential psychopharmacology: Prescriber's guide. 6th ed. Cambridge University Press; 2017.
20. McCleery J, Cohen DA, Sharpley AL. Pharmacotherapies for sleep disturbances in dementia. *Cochrane Database Syst Rev [internet].* c2016 [citirano 2021 Mar 25]; (11). Dosegljivo na: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009178.pub3/full>

21. Dowling GA, Burr RL, Van Someren EJW, et al. Melatonin and bright-light treatment for rest-activity disruption in institutionalized patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 2008; 56 (2): 239–46.
22. Riemersma-van der Lek RF, Swaab DF, Twisk J, et al. Effect of bright light and melatonin on cognitive and noncognitive function in elderly residents of group care facilities: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 2008; 299 (22): 2642–55.
23. Singer C, Tractenberg RE, Kaye J, et al. A multicenter, placebo-controlled trial of melatonin for sleep disturbance in Alzheimer's disease. *Sleep.* 2003; 26 (7): 893–901.
24. Wade AG, Farmer M, Harari G, et al. Add-on prolonged-release melatonin for cognitive function and sleep in mild to moderate Alzheimer's disease: A 6-month, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Clin Interv Aging.* 2014; 9: 947–61.
25. Gehrman PR, Connor DJ, Martin JL, et al. Melatonin fails to improve sleep or agitation in a double-blind randomized placebo-controlled trial of institutionalized patients with Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2009; 17 (2): 166–9.
26. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, et al. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Pineal Res.* 2002; 32 (1): 59–62.
27. Jansen SL, Forbes D, Duncan V, et al. Melatonin for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* [internet]. 2006 [citirano 2021 Mar 24]; (1). Dosegljivo na: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD003802.pub3/abstract>
28. Marson DC, Dymek MP, Duke LW, et al. Subscale validity of the Mattis Dementia Rating Scale. *Arch Clin Neuropsychol.* 1997; 12 (3): 269–75.
29. Furio AM, Brusco LI, Cardinali DP. Possible therapeutic value of melatonin in mild cognitive impairment: A retrospective study. *J Pineal Res.* 2007; 43 (4): 404–9.
30. de Jonghe A, Korevaar JC, van Munster BC, et al. Effectiveness of melatonin treatment on circadian rhythm disturbances in dementia. Are there implications for delirium? A systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2010; 25 (12): 1201–8.
31. Ángeles-Castellanos M, Ramírez-Gonzalez F, Ubaldo-Reyes L, et al. Loss of melatonin daily rhythmicity is associated with delirium development in hospitalized older adults. *Sleep Sci.* 2016; 9 (4): 285–8.
32. Howell M, Schenck CH. Rapid eye movement sleep behavior disorder. Up To Date [internet]. [citirano 2021 Mar 28]. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com/contents/rapid-eye-movement-sleep-behavior-disorder>
33. Dauvilliers Y, Schenck CH, Postuma RB, et al. REM sleep behaviour disorder. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4 (1): 19.
34. Jun JS, Kim R, Byun JI, et al. Prolonged-release melatonin in patients with idiopathic REM sleep behavior disorder. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019; 6 (4): 716–22.
35. Arendt J. Safety of melatonin in long-term use (?). *J Biol Rhythms.* 1997; 12 (6): 673–81.
36. Riha RL. The use and misuse of exogenous melatonin in the treatment of sleep disorders. *Curr Opin Pulm Med.* 2018; 24 (6): 543–8.
37. Maras A, Schroder CM, Malow BA, et al. Long-term efficacy and safety of pediatric prolonged-release melatonin for insomnia in children with autism spectrum disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2018; 28 (10): 699–710.
38. Wang H, Wei W, Shen Y-X, et al. Protective effect of melatonin against liver injury in mice induced by *Bacillus Calmette-Guerin* plus lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (18): 2690–6.
39. Guven A, Yavuz O, Cam M, et al. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochem.* 2006; 108 (2): 85–93.
40. Vardi N, Iraz M, Öztürk F, et al. Improving effects of melatonin against on the histologic alterations of rat liver in diabetes. *Türk Klin J Med Sci.* 2007; 27 (5): 641–8.
41. Subramanian P, Babu Dakshayani K, Pandi-Perumal SR, et al. 24-hour rhythms in oxidative stress during hepatocarcinogenesis in rats: Effect of melatonin or α -ketoglutarate. *Redox Rep.* 2008; 13 (2): 78–86.
42. Cheshchevik VT, Dremza IK, Lapshina EA, et al. Corrections by melatonin of liver mitochondrial disorders under diabetes and acute intoxication in rats. *Cell Biochem Funct.* 2011; 29 (6): 481–8.
43. Zavodnik IB, Lapshina EA, Cheshchevik VT, et al. Melatonin and succinate reduce rat liver mitochondrial dysfunction in diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2011; 62 (4): 421–7.
44. Shokrzadeh M, Ahmadi A, Naghshvar F, et al. Prophylactic efficacy of melatonin on cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Biomed Res Int* [internet]. 2014 [citirano 2021 Nov 14]; 2014: 470425. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25101283/>
45. Moreira AJ, Ordoñez R, Cerski CT, et al. Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0144517.

46. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, et al. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2012; 63 (1): 35–40.
47. Chojnacki C, Błońska A, Chojnacki J. The effects of melatonin on elevated liver enzymes during statin treatment. *Biomed Res Int [internet].* 2017 [citirano 2021 Jun 6]; 2017: 3204504. Dosegljivo na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28630863/>
48. Papagiannidou E, Skene DJ, Ioannides C. Potential drug interactions with melatonin. *Physiol Behav.* 2014; 131: 17–24.
49. Hilli J, Korhonen T, Turpeinen M, et al. The effect of oral contraceptives on the pharmacokinetics of melatonin in healthy subjects with CYP1A2 g.-163C>A polymorphism. *J Clin Pharmacol.* 2008; 48 (8): 986–94.
50. Yui Kao Fong S, Gao Q, Zuo Z. Interaction of carbamazepine with herbs, dietary supplements, and food: A systematic review. *Evid Based Complement Altern Med ECAM [internet].* 2013 [citirano 2021 Apr 20]; 898261. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760091/>

Prispelo 10. 7. 2021

Katja Strašek Smrdel¹

***Candidatus* Neoehrlichia mikurensis – porajajoč se patogen?**

Candidatus Neoehrlichia Mikurensis – An Emerging Pathogen?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, porajajoč se patogen, s klopi prenosljiva bakterija, imunsko oslabiljene osebe

Znotrajcelična bakterija *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* je porajajoča se bakterija, ki je do sedaj zelo slabo poznana. Predvsem pri imunsko oslabiljenih ljudeh povzroča sistemski vnetni sindrom. Okužbo pri ljudeh, ki imajo drugo osnovno bolezen (hematološke ali avtoimunske bolezni), se pogosto napačno diagnosticira kot poslabšanje osnovne bolezni ali kot nepovezan pojav žilnega obolenja. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* se prenaša s trdoščitastimi klopi rodu *Ixodes* spp., mali sesalci so njen naravni gostitelj. Razširjena je po vsej Evropi in Aziji, zato predstavlja za imunsko oslabiljene ljudi resno težavo. Okužba je ozdravljiva, v kolikor se antibiotik doksiciklin pravočasno uporabi.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, emerging pathogen, tick-borne disease, immunocompromised persons

The intracellular bacterium *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* is an emerging pathogen. It causes system inflammatory syndrome, mostly in immunocompromised patients. It is not a well-known pathogen, therefore, it might be misdiagnosed in patients with underlying disease (hematologic or autoimmune disease) as a recurrence of the underlying disease, or as an unrelated arteriosclerotic vascular event. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* is transmitted by hard ticks *Ixodes* spp.; small mammals are its natural host. It is widespread in Europe and Asia, therefore, it represents a threat to immunocompromised people. The infection is treatable if the administration of the antibiotic doxycycline is timely.

¹ Asist. dr. Katja Strašek Smrdel, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; katja.strasek@mf.uni-lj.si

UVOD

Bakterijo *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM) so kot človeški patogen prepoznali šele leta 2010 (1). Od takrat je objavljenih že nekaj primerov okužb v Evropi in tudi na Kitajskem (2, 3). Povzročja sistemsko vnetno okužbo pri imunsko oslabljenih osebah, ki se jo pogosto zamenja s poslabšanjem osnovne bolezni ali z nepovezanimi aterosklerotičnimi žilnimi zapleti. To zakasni postavitev diagnoze in dodatno ogroža življenje bolnika. Ob prejemu ustreznega antibiotika je okužba ozdravljiva.

OPIS PATOGENA

CNM je majhen (0,5–1,2 µm), po Gramu negativen, večinoma pleomorfen kok (4). Je znotrajcelična bakterija, ki jo prenašajo klopi. Filogenetsko so jo z analizo genov 16S ribosomalne RNA (angl. *ribosomal ribonucleic acid*, rRNA) in *groEL* uvrstili v družino *Anaplasmataceae*, poleg rodov *Ehrlichia* in *Anaplasma* (4). Raziskovalci so s transmisijsko elektronsko mikroskopijo v endotelijskih celicah žil v tkivu vranice eksperimentalno okuženih podgan odkrili z membrano obdane bakterijske vključke, ki so značilni za predstavnike družine *Anaplasmataceae* (4, 5). Pred opisom japonskih raziskovalcev je bila CNM poznana z imeni *Ehrlichia-like organism*, *Ehrlichia-like Schottii variant*, *Ehrlichia-like sp. Rattus variant* in *Candidatus Ehrlichia walikerii* (4, 6–8). Ime je dobila po japonskem otoku Mikura (južna Japonska), kjer so bakterijo odkrili (4). Šele leta 2019 so švedski raziskovalci prvič uspeli namnožiti bakterijo v človeških primarnih endotelijskih celicah in tako potrdili, da so endotelijske celice žil tarčne celice CNM. Predlagali so, da se bakterijo CNM preimenuje v *Neoehrlichia mikurensis* (5).

EPIDEMIOLOGIJA, PRENAŠALCI, NARAVNI GOSTITELJI

CNM se prenaša s trdoščitastimi klopi rodu *Ixodes* spp., njeni naravni gostitelji pa so mali sesalci. Našli so jo v večini evropskih držav in tudi v Aziji (9).

V Evropi je glavni prenašalec CNM gozdni klop *Ixodes ricinus*, ki je najpogostejši klop tudi v Sloveniji. Je pogost prenašalec številnih klopno prenosljivih patogenov, kot so *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, virus klopnega meningoencefalitisa (KME), *Rickettsia* spp. in drugi (2). Pregledali so klope nabrane z rastlinja, z divjih živali (divjih prašičev, muflonov, jelenov) domačih živali (ovc, krav), malih sesalcev, psov, ptičev, ježev in prav tako klope na ljudeh (10–52). CNM so ugotovili še v drugih vrstah klopov (od manj kot 1 % do več kot 20 %), a je prevalenca najvišja ravno pri gozdnem klop (19, 20, 32, 45, 49, 53–55). V Sloveniji so pregledali klope v več regijah (gorenjska, jugovzhodna slovenska ter osrednjeslovenska). Prisotnost CNM so ugotovili tako pri odraslih klopih kot tudi pri nimfah (56). Okužbo ljudi predstavlja vbod okuženega kropa, čeprav se številni bolniki vboda ne spominjajo (57).

Mali sesalci so naravni gostitelji CNM. Bakterijo so našli pri številnih rodovih in vrstah malih sesalcev (voluharice, poljske miši, gozdne miši, podgane, celo čipmunki) (9). V Sloveniji so testirali rumenogrle miši, navadne belonoge miši, dimaste miši, gozdne voluharice ter travniške voluharice. Vse imenovane vrste so bile okužene s CNM v vseh slovenskih regijah (56). V evropskem prostoru je prevalenca okuženih malih sesalcev tudi do 65 % (19, 20, 22, 30, 39, 43, 53, 58–62). O okuženih malih sesalcih poročajo tudi Kitajska, Japonska in Rusija (3, 4, 7, 63–65). Mali sesalci ne kažejo kliničnih znakov okužbe, poleg tega naj ne bi bili vseživljenjsko okuženi (9, 62).

CNM ni patogena le za ljudi, ampak tudi za pse (66). Opisan je primer osemletnega psa, ki je po težji operaciji zbolel s kliničnimi znaki neoerlihioze. Predvidevajo, da je bil pes brezsimptomni nosilec bakterije. Klinične znake okužbe naj bi sprožilo znižanje imunske obrambe zaradi težje kirurške operacije (66). V nemški raziskavi psov, ki so prišli na pregled in odvzem krvi k vete-

rinarju zaradi drugih razlogov, so ugotovili 0,3 % okuženost s CNM. Žal podatka o zdravstvenem stanju okuženih psov ni bilo (67). Nedavno so na Hrvaškem opravili retrospektivno raziskavo, v kateri so pregledali 19 psov, ki so poginili zaradi hemolitične anemije. Pri enem psu, tri in pol meseca starem mladiču, so ugotovili okužbo s CNM (68).

OKUŽBE LJUDI

Prve primere okužb s CNM so opisali leta 2010 (1, 69, 70). Do sedaj je bilo opisanih 18 potrjenih primerov okužb s CNM v Evropi, najpogostejše pri imunsko oslabljenih osebah (2). S številnimi raziskavami na različnih skupinah ljudi pa odkrivajo nove primere okužb, ki so bili predhodno napačno diagnosticirani, neprepoznani ali brezsimptomni (tabela 1) (2, 3, 52, 71, 72). Večinoma se objavljajo zapisi o okužbah bolnikov, ki imajo oslavljen imunski sistem zaradi presaditve tkiv ali organov, malignega obolenja, splenektomije, avtoimunskega obolenja, revmatoidnega artritisa ali zaradi zdravljenja s kortikosteroidnimi zdravili ali kemoterapijami (tabela 1). Prav tako je verjetnost pojava simptomatske okužbe večja pri starejših osebah (9). Pri teh bolnikih se okužba lahko kaže z neznačilnimi znaki, zato jo zelo pogosto zamenjajo za poslabšanje osnovnega obolenja. Najpogostejši znaki so vročina neznanega izvora, mrizenje, nočno potenje, bolečine v sklepih in mišicah, žilna obolenja, pri nekaterih tudi izpuščaj, kašelj in izguba telesne teže. Manj kot polovica se jih spomni vboda klopa (57). Ker se simptomi pojavijo več mesecev ali let po vbodu klopa, redkokateri zdravnik pomisli na okužbo s klopno prenosljivim patogenom. Pri nezdravljeni ali prepozno odkriti okužbi lahko bolnik tudi umre (69). Imunsko zdravi ljudje so v večini primerov brez simptomov okužbe, lahko pa imajo kožni izpuščaj, podoben borelijskemu eritemu, v redkih primerih bolečine v sklepih, glavobol ali druge neznačilne simptome (52, 71–73).

V kitajski raziskavi imunsko zdravih oseb z vročinsko boleznijo po vbodu klopa (622 oseb) iz leta 2010 so našli sedem okuženih bolnikov (1,1 %), katerih znaki okužbe so bili vročina, glavobol, slabo počutje, bolečine v mišicah, eritem, tudi bruhanje, trd vrat, driska in kašelj (tabela 1). Pri osebah, vključenih v raziskavo, so ugotavljali tudi prisotnost protiteles (angl. *immunoglobulin*, Ig) razreda G proti *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *B. burgdorferi*, *Rickettsia heilongjiangensis* in virusu KME v času akutne okužbe in obdobju okrevanja. Posredni imunofluorescenčni testi proti omenjenim patogenom so bili negativni. Vseh sedem bolnikov je živelo v vaseh province Mudanjiang in so bili kmetje. Okužbo s CNM pri teh osebah so potrdili tudi s sekvenciranjem. Prav tako so v tej provinci potrdili prisotnost CNM pri klopah in glodavcih (3).

Na Poljskem so leta 2012 opravili raziskavo pri gozdarskih delavcih, ki so močno izpostavljeni vbodom klopov in posledično klopno prenosljivim okužbam. Pregledali so 316 gozdarjev, od katerih jih je bilo pet okuženih s CNM (1,6 %), a brez kliničnih simptomov okužbe (tabela 1). Okužbo so potrdili tudi s sekvenciranjem (72).

Sledila je objava raziskave na Nizozemskem (med letoma 2007 in 2008), kjer so pregledali 626 vzorcev krvi oseb, ki so prišle na pregled k zdravniku zaradi vboda klopa in/ali eritema. Najpogostejši patogen, ki so ga ugotovili, je bila CNM; pri sedmih bolnikih (1,1 %) so potrdili okužbo tudi s sekvenciranjem (tabela 1). Poleg CNM so v krvi drugih bolnikov ugotovili prisotnost še *A. phagocytophilum*, *Babesia divergens*, *Borrelia miyamotoi* in *B. burgdorferi sensu lato* (52).

Raziskovalci z Norveške so leta 2017 objavili raziskavo oseb, ki so imele simptome okužbe po vbodu klopa. Kriterije raziskave je izpolnjevalo 70 bolnikov. Najpogostejši patogen, ki so ga ugotovili v krvi oseb, je bila CNM (10 %), poleg *B. burgdorferi sensu lato*.

Tabela 1. Potrjeni primeri okužb s *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v Evropi in Aziji ter klinične značilnosti pri potrjenih primerih (1, 3, 36, 52, 57, 69, 70–78).

Država	Leto	Starost (leta)	Zdravstveno stanje	Klinični znaki	Terapija
Češka	2008	55	limfom plasičnih celic v napredovalem stadiju, odsotnost vranice	vročina, bolečine v sklepih, gležnji in kolena otekli, občutljivi in eritematozni – <i>erythema nodosum</i> , vboj klopa nekaj tednov prej	doksiciklin 2 × 200 mg/dan 2 tedna doksiciklin 2 × 100 mg/dan 2 tedna
	2009	58	presaditev jeter, odsotnost vranice, popresaditvena limfoproliferativna bolezen	zvečer povišana vročina, mrazenje, izrazita utrujenost, bolečine v sklepih, otekli gležnji, eritem, vboj klopa nekaj tednov prej	doksiciklin 200 mg/dan 3 tedne
Nemčija	2007	69	sum na kronično vnetno demielinizirajočo polinevropatijo	vročina neznanega izvora, nočno potenje, kašelj, driska, globoka venska tromboza roke	doksiciklin 200 mg/dan 3 tedne
	2008	57	zdrav	glavoboli, izguba zavesti, intracerebralna in subarahnoidalna krvavitev z anevrizmo, vročina, smrt zaradi večorganske odpovedi ob sepsi	brez terapije
Švedska	2009	77	kronična limfocitna anemija, odsotnost vranice	vročina, mrazenje, driska, šen, globoka venska tromboza noge, pljučna embolija, anemija, sum na sepsa	doksiciklin 2 × 200 mg/dan 2 tedna
	2011	75	kronična limfocitna levkemija, odsotnost vranice	vročina, mrazenje, nočno potenje itd.	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 3–6 tednov
	2011	67	sistemski eritematozni lupus, folikularni limfom, odsotnost vranice	vročina, mrazenje, nočno potenje itd.	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 3–6 tednov
	2013	71	rak dojke, revmatoidni artritis	slabost, izguba teže, vročina, dispneja, anemija, tahikardija, več vbodov klopotov	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 2 tedna
	2013	67	psoriatični artritis, levkemija velikih granuliranih limfocitov T, odsotnost vranice	vročina, mrazenje, nočno potenje itd.	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 3–6 tednov
	2013	54	luskavica	vročina, mrazenje, nočno potenje itd.	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 3–6 tednov
	2013	59	revmatoidni artritis, difuzni velikocelični limfom B, odsotnost vranice	vročina, mrazenje, nočno potenje itd.	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 3–6 tednov

2015	68	zdrav	izpuščaj na dojki (diagnoza <i>erythema migrans</i>), vbod klopa dva meseca prej	ni podatka
2015	57	alergije, lymska borelioza pred osmimi leti	izpuščaj na dojki (<i>erythema migrans</i>), vbod klopa en mesec in pol prej (diagnoza <i>erythema migrans</i>)	ni podatka
2017	57	multipla skleroza	vročina	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 2–3 tedne
2018	69	kronična limfocitna levkemija, odsotnost vranice	vročina	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 2–3 tedne
Švica	2009	61	kirurška revaskularizacija srčne mišice z obvodni, rekonstrukcija mitralne zaklopke	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 6 tednov + rifampin 2 × 450 mg/dan 6 tednov
2011	68	kronična limfocitna levkemija, odsotnost vranice	slabo počutje, vročina, mrzazenje, dispneja	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 6 tednov
2012	58	limfom	ponavljajoča se vročina z mrzazenjem, nočno potenje, izguba teže, bolečine v sklepih	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 6 tednov
			vročina, mrzazenje, nočno potenje, ponavljajoča se globoka venska tromboza	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 6 tednov
Slovenija	2020	66	vročina, mrzazenje, nočno potenje, slabo počutje	doksiciklin 2 × 100 mg/dan 4 tedne
Poljska	2012	povprečno 44 (5 oseb)	zdravi (gozdarij)	ni podatka
Norveška	2014–2015	>18 (7 oseb)	ni podatka	2 × doksiciklin 5 × penicilin
Nizozemska	2007–2008	40–79 (7 oseb)	zdravi	4 × doksiciklin 100 mg/dan 10–14 dni
Kitajska	2010	29–67 (7 oseb)	zdravi	ni podatka

Vsi bolniki, okuženi s CNM, so imeli eritem, ena oseba je poročala tudi o izčrpanosti (tabela 1). Ostalih klopno prenosljivih patogenih mikroorganizmov (*A. phagocytophilum*, *B. miyamotoi*, skupina rikecijskih pegavic ali mrzlic, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp.) v krvi bolnikov niso ugotovili (71).

DIAGNOSTIKA

Zaradi pogosto neznačilnih znakov je diagnostika okužbe s CNM močno otežena. Zelo pomemben je podatek o vbodu klopa, ki pa se ga večina bolnikov ne spomni, saj lahko preteče več mesecev od vboda do klinično izražene okužbe. Pomembno je tudi imunsko stanje bolnika in osnovna bolezen, zaradi katere se zdravi.

Pomembni laboratorijski kazalci pri imunsko oslabljenih osebah so povečano število belih krvnih celic, nevtrofilija, povišana koncentracija vnetnih markerjev (C-reaktivna beljakovina (angl. *C reactive protein*, CRP)), prokalcitonin, stopnja sedimentacije eritrocitov, anemija. Pri nekaterih bolnikih se pojavi tudi rahla trombocitopenija, limfopenija in hiponatriemija, rahlo povišane jetrne transaminaze in laktatna dehidrogenaza (9). Zgolj dve poročili pri imunsko zdravih osebah sta poročali podobno: levkocitoza, nevtrofilija ter povišan CRP (9).

Kljub pripadnosti CNM družini *Anaplasmataceae*, kamor sodijo tudi predstavniki rodov *Anaplasma* in *Ehrlichia*, ni jasno dokazane navzkrižne reaktivnosti protiteles med pripadniki te družine. Odsotnost specifičnih ali navzkrižnih protiteles pri bolniku je lahko tudi posledica njegovega imunosupresivnega stanja. Testiranje humoralnega imunskega odziva dveh imunsko zdravih oseb z neoeerlihiozo, kjer so kot antigen uporabili sorodno bakterijo *A. phagocytophilum*, ni dalo zanesljivih rezultatov okužbe (73). V raziskavi na Kitajskem so imunsko zdravim bolnikom poleg prisotnosti genoma CNM ugotavljali tudi proti-

tesa razreda IgG proti sorodnim bakterijam *A. phagocytophilum* in *E. chaffeensis* v serumu v času akutne okužbe in v obdobju okrevanja (3). Specifičnih ali navzkrižno reaktivnih protiteles proti temu patogenomu niso dokazali (3). Posredna diagnostika okužbe z dokazovanjem specifičnih protiteles proti CNM za zdaj ni mogoča, saj serološki testi z antigenom CNM (encimski imunski test (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) ali posredna imuno fluorescenca) še niso razviti, kajti bakterije se trenutno še ne da gojiti v celični kulturi (2). A tudi tu se kaže napredek (5).

Mikrobiološka diagnostika neoeerlihioze temelji torej na molekularnih tehnikah. Navadno je vsebakterijska verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) prvi izbor za tovrstno diagnostiko, ki mu sledi sekvenčna analiza gena za 16S rRNA (57). Za nadaljnje sledenje bakteriemije in uspešnosti zdravljenja pa je bolj uporaben kvantitativen PCR v realnem času za gen *groEL*, predvsem zaradi večje občutljivosti in možnosti kvantifikacije genoma CNM v krvi/plazmi (2). Najbolj primerni vzorci za molekularno diagnostiko okužbe so kri z dodanim antikoagulantom etilendiamintetraocetna kislina (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), plazma, serum, redko kostni mozeg. V možgansko-hrbtenjačni tekočini genoma CNM še niso dokazali kljub simptomom okužbe osrednjega živčevja (57).

ZDRAVLJENJE

CNM spada med znotrajcelične bakterije, katerih okužbe zdravimo z antibiotikom doksiciklinom. Za zdravljenje neoeerlihioze učinkovito deluje že oralna uporaba 100 mg doksiciklina dvakrat dnevno. Rifampin (300 mg dvakrat dnevno) so uspešno uporabili pri bolniku z domnevno preobčutljivostjo na doksiciklin, učinkovita je tudi kombinacija rifampina (450 mg dvakrat dnevno) in doksiciklina (100 mg dvakrat dnevno) (9). Najustreznejši čas zdravljenja

neorlihioze ni znan, večinoma traja dva do tri tedne. Pomembno je, da so imunsko oslajbljeni bolniki pravočasno zdravljeni, kajti pri njih lahko različni hematološki zapleti vodijo v smrt ali poslabšanje osnovne bolezni. Klinični simptomi okužbe izzvenijo povprečno že v nekaj dneh po pričetku zdravljenja (9). Sočasno z zdravljenjem priporočajo ugotavljanje prisotnosti genoma CNM s PCR v realnem času za kvantifikacijo (2). Po uspešnem zdravljenju s sledenjem z molekularnimi metodami ne poročajo o ponovitvi bolezni.

ZAKLJUČEK

CNM je klopno prenosljiv porajajoč se patogen tako v Evropi kot tudi v Aziji. Številna poročila o okuženosti malih sesalcev in klopih, med drugim tudi v okolici potrjenih primerov okužb, govorijo o izpostavljenosti ljudi in živali temu patogenu (2). Še posebej so v nevarnosti osebe z raznolikimi imunskimi oslajbljostmi, katerih število raste zaradi vse boljše zdravstvene oskrbe in medicinskega napredka. Neznajčilne simptome okužbe in vročino neznanega izvora pogosto zamenjajo za zaplete osnovne bolezni ali tudi poslabšanja stanja bolezni, kar vodi do nepotrebnega zdravljenja zapletov in morebitno nevarne uporabe imunosupresivnih zdravil, kortikosteroidov (57). S pravočasno diagnozo in uvedbo antibiotika simptomi in zapleti v nekaj dneh izzvenijo (2). Diagnostika temelji na molekularnih metodah, saj bakterije še ne znamo gojiti na celični kulturi. Zato tudi ni možno raziskovati medse-

bojnega učinkovanja bakterije z gostiteljevimi celicami, kot tudi ne njenih virulenčnih dejavnikov in imunopatoloških mehanizmov. Trenutno na trgu ni zanesljivih seroloških testov, s katerimi bi lahko na posreden način dokazovali okužbo ali ugotovili izpostavljenost ljudi (in živali) novemu patogenu (73). Zanimiv bi bil tudi podatek, ali so možne prikrite okužbe, ki se izrazijo ob pojavu imunske oslajbljosti okužene osebe. Tako bi se s testiranjem lahko izognili številnim zapletom, ki se lahko pojavijo zaradi osnovne bolezni ob uvedbi imunosupresije in hkratne nediagnosticirane okužbe s CNM. V slovenskem prostoru je dokazana prisotnost CNM, tako pri malih sesalcih kot pri klopih. Tako so številne osebe izpostavljene možnosti okužbe. Hkrati tudi narašča število imunsko oslajbljenih oseb, tako zaradi napredka medicine kot tudi zaradi številnih možnosti terapevtskega zdravljenja osnovnih bolezni. Narašča tudi ogroženost teh bolnikov v Sloveniji.

S preglednim člankom želimo povečati osveščenost osebnih zdravnikov in specialistov onkologije, revmatologije, infektologije, hematologije o tem novo porajajočem se mikroorganizmu. Najbolj ogrožene so imunsko oslajbljene osebe, pri katerih ta patogen povzroči okužbo z zapleti, ki se odrazijo kot poslabšanje ali zaplet osnovne bolezni. S pravočasno diagnozo se lahko izognemo zapletom, ki niso prepoznani kot del infekcijskega poteka popolnoma ozdravljive bolezni.

LITERATURA

1. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, et al. First case of human »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (5): 1956–9.
2. Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, et al. 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in Europe. *New Microbes New Infect.* 2018; 22: 30–6.
3. Li H, Jiang JF, Liu W, et al. Human infection with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, China. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (10): 1636–9.
4. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, et al. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54 (5): 1837–43.
5. Wass L, Grankvist A, Bell-Sakyi L, et al. Cultivation of the causative agent of human neoehrlichiosis from clinical isolates identifies vascular endothelium as a target of infection. *Emerg Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 413–25.
6. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (7): 2215–22.
7. Pan H, Liu S, Ma Y, et al. *Ehrlichia*-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990 (1): 107–11.
8. Brouqui P, Sanogo YO, Caruso G, et al. *Candidatus Ehrlichia walkerii*: A new *Ehrlichia* detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in northern Italy. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990: 134–40.
9. Wennerås C. Infections with the tick-borne bacterium *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (7): 621–30.
10. Glatz M, Müllegger RR, Maurer F, et al. Detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies and *Anaplasma phagocytophilum* in a tick population from Austria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5 (2): 139–44.
11. Derdákóvá M, Václav R, Pangráčova-Blaňárová L, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of Central Europe. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 160.
12. Schötta AM, Wijnveld M, Stockinger H, et al. Approaches for reverse line blot-based detection of microbial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria and impact of the chosen method. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 83 (13): e00489–17.
13. Richter D, Matuschka FR. »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*,« *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (3): 943–7.
14. Vencliková K, Mendel J, Betášová L, et al. Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7: 107–12.
15. Vencliková K, Rudolf I, Mendel J, et al. *Rickettsiae* in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5 (2): 135–8.
16. Fertner ME, Molbak LM, Boye Pihl TP, et al. First detection of tick-borne »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« in Denmark 2011. *Euro Surveill.* 2012; 17 (8): 20096.
17. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 103.
18. Ivanova A, Geller J, Katargina O, et al. Detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Ehrlichia muris* in Estonian ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 8 (1): 13–7.
19. Silaghi C, Woll D, Mahling M, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 285.
20. Obiegala A, Pfeffer M, Pfister K, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: Prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 563.
21. Hornok S, Meli ML, Gönczi E, et al. First evidence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Hungary. *Parasit Vectors.* 2013; 6: 267.
22. Szekeres S, Coipan CE, Rigó K, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in natural rodent and tick communities in Southern Hungary. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6 (2): 111–6.
23. Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, et al. Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: A cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 61.

24. Movila A, Toderas I, Uspenskaia I, et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* from Moldova collected in 1960. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4 (4): 359–61.
25. Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (10): 3666–71.
26. Welc-Faleńczyk R, Kowalec M, Karbowski G, et al. *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 121.
27. Kalmár Z, Sprong H, Mihalca AD, et al. *Borrelia miyamotoi* and *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in *Ixodes ricinus* ticks, Romania. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22 (3): 550–1.
28. Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, et al. *Borrelia* diversity and co-infection with other tick borne pathogens in ticks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 36.
29. Potkonjak A, Gutiérrez R, Savić S, et al. Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7 (1): 199–203.
30. Spitalská E, Boldis V, Kostanová Z, et al. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52 (3): 175–9.
31. Pangráčová L, Derdákova M, Pekárik L, et al. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of eastern Slovakia. *Parasit Vectors.* 2013; 6 (1): 238.
32. Blaňarová L, Stanko M, Miklišová D, et al. Presence of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7 (2): 319–26.
33. Hamšíková Svitáľková Z, Haruštiaková D, Mahriková L, et al. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in ticks and rodents from urban and natural habitats of South-Western Slovakia. *Parasit Vectors.* 2016; 9 (1): 2.
34. Andersson M, Bartkova S, Lindestad O, et al. Co-infection with '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13 (7): 438–42.
35. Lommano E, Bertaiola L, Dupasquier C, et al. Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78 (13): 4606–12.
36. Maurer FP, Keller PM, Beuret C, et al. Close geographic association of human neoehrlichiosis and tick populations carrying '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' in eastern Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (1): 169–76.
37. Van Overbeek L, Gassner F, Van Der Plas CL, et al. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 66 (1): 72–84.
38. Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, et al. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 36.
39. Jahfari S, Fonville M, Hengeveld P, et al. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors.* 2012; 5 (1): 74.
40. Silaghi C, Pfister K, Overzier E. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14 (5): 371–3.
41. Palomar AM, García-Álvarez L, Santibáñez S, et al. Detection of tick-borne '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013. *Parasit Vectors.* 2014; 7 (1): 57.
42. Baráková I, Derdákova M, Selyemová D, et al. Tick-borne pathogens and their reservoir hosts in northern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9 (2): 164–70.
43. Burri C, Schumann O, Schumann C, et al. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5 (3): 245–51.
44. Schreiber C, Krücken J, Beck S, et al. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 535.
45. Król N, Obiegala A, Pfeffer M, et al. Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. *Parasit Vectors.* 2016; 9 (1): 351.
46. Labbé Sandelin L, Tolf C, Larsson S, et al. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in ticks from migrating birds in Sweden. *PloS one.* 2015; 10 (7): e0133250.
47. Lommano E, Dvořák C, Vallotton L, et al. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5 (6): 871–82.
48. Heylen D, Fonville M, Docters van Leeuwen A, et al. Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasit Vectors.* 2017; 10 (1): 497.
49. Jahfari S, Ruyts SC, Frazer-Mendelewska E, et al. Melting pot of tick-borne zoonoses: The European hedgehog contributes to the maintenance of various tick-borne diseases in natural cycles urban and suburban areas. *Parasit Vectors.* 2017; 10 (1): 134.

50. Otranto D, Dantas-Torres F, Giannelli A, et al. Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 328.
51. Andersson M, Zaghdoudi-Allan N, Tamba P, et al. Co-infection with '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' and *Borrelia afzelii* in an *Ixodes ricinus* tick that has bitten a human in Romania. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5 (6): 706–8.
52. Jahfari S, Hofhuis A, Fonville M, et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in humans with tick bites and *erythema migrans*, in the Netherlands. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10 (10): e0005042.
53. Krücken J, Schreiber C, Maaz D, et al. A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*«. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (6): 1958–61.
54. Movila A, Alekseev AN, Dubinina HV, et al. Detection of tick-borne pathogens in ticks from migratory birds in the Baltic region of Russia. *Med Vet Entomol*. 2013; 27 (1): 113–7.
55. Silaghi C, Beck R, Oteo JA, et al. Neoehrlichiosis: An emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol*. 2016; 68 (3): 279–97.
56. Strašek Smrdel K, Ravnik Verbič U, Tozon N, et al. Filling the gap on the knowledge of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Europe, Slovenia. In: Fournier PE, eds. International congress on Rickettsiae and other intracellular bacteria. Marseille; 2017. p. 152.
57. Grankvist A, Andersson PO, Mattsson M, et al. Infections with the tick-borne bacterium »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis*. 2014; 58 (12): 1716–22.
58. Víchová B, Majláthová V, Nováková M, et al. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infect Genet Evol*. 2014; 22: 265–72.
59. Vayssier Taussat M., Le Rhun D, Buffet JP, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in bank voles, France. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (12): 2063–5.
60. Beninati T, Piccolo G, Rizzoli A, et al. *Anaplasmataceae* in wild rodents and roe deer from Trento Province (northern Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25 (10): 677–8.
61. Andersson M, Raberg L. Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, southern Sweden. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (9): 1716–8.
62. Andersson M, Scherman K, Råberg L. Infection dynamics of the tick-borne pathogen »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« and coinfections with *Borrelia afzelii* in bank voles in southern Sweden. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80 (5): 1645–9.
63. Li H, Jiang J, Tang F, et al. Wide distribution and genetic diversity of »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« in rodents from China. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79 (3): 1024–7.
64. Tabara K, Arai S, Kawabuchi T, et al. Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in wild rodents from Shimane Prefecture, Japan. *Microbiol Immunol*. 2007; 51 (4): 359–67.
65. Rar VA, Livanova NN, Panov VV, et al. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010; 1 (1): 57–65.
66. Diniz PPVP, Schulz BS, Hartmann K, et al. »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (5): 2059–62.
67. Liesner JM, Krücken J, Schaper R, et al. Vector-borne pathogens in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg, Germany. *Vet Parasitol* 2016; 224: 44–51.
68. Beck R, Čurik Čubrić V, Ivana R, et al. Identification of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' and *Anaplasma* species in wildlife from Croatia. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 028.
69. Von Loewenich FD, Geißdorfer W, Disqué C, et al. Detection of »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« in two patients with severe febrile illnesses: Evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (7): 2630–5.
70. Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16 (7): 1127–9.
71. Quarsten H, Grankvist A, Høyvoll L, et al. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* detected in the blood of Norwegian patients with erythema migrans. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8 (5): 715–20.
72. Welc-Faleciak R, Siński E, Kowalec M, et al. Asymptomatic »*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*« infections in immunocompetent humans. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (8): 3072–4.
73. Grankvist A, Sandelin LL, Andersson J, et al. Infections with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and cytokine responses in 2 persons bitten by ticks, Sweden. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21 (8): 1462–5.

74. Pekova S, Vydra J, Kabickova H, et al. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematooncologic patients: Benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 69 (3): 266–70.
75. Andréasson K, Jönsson G, Lindell P, et al. Recurrent fever caused by *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in a rheumatoid arthritis patient treated with rituximab. *Rheumatology*. 2014; 54 (2): 369–71.
76. Dadgar A, Grankvist A, Wernbro L, et al. Fever of unknown origin in a multiple sclerosis patient on immunomodulatory therapy was due to neoehrlichiosis. *Lakartidningen*. 2017; 114: EM6L.
77. Wass L, Grankvist A, Mattsson M, et al. Serological reactivity to *Anaplasma phagocytophilum* in neoehrlichiosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018; 37 (9): 1673–8.
78. Lenart M, Simoniti M, Strašek Smrdel K, et al. Case report: First symptomatic *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis infection in Slovenia. *BMC Infect Dis*. 2021; 21 (1): 579.

Prispelo 16. 8. 2021

Aljaž Belšak¹, Matjaž Merc²

Kronična nestabilnost zunanega gležnja in načini zdravljenja

Chronic Lateral Ankle Instability and Concepts of Treatment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: ponavljajoči se zvini gležnja, Broström-Gould, stabilizacija gležnja, poprava vezi, rekonstrukcija vezi, artroskopska poprava vezi, anatomija zunanjega gležnja

Kronična nestabilnost zunanega gležnja je občutek nestabilnosti gležnja pri hoji s pogostimi zvini med vsakodnevno aktivnostjo. Kadar se pojavi kot posledica težjega zvina gležnja s poškodbo zunanega veznega kompleksa, govorimo o anatomske nestabilnosti, pri ponavljajočih se zvinih brez jasne poškodbe vezi pa gre za funkcionalno nestabilnost. Kronično nestabilnost zunanega gležnja diagnosticiramo s kliničnim pregledom, značilnimi testi in radiološkimi preiskavami, v primeru nejasnosti pa potrdimo z artroskopijo gležnja. Zdravljenje ni enolično in zahteva različne konzervativne ter operativne pristope glede na klinično sliko in pridružene bolezni gležnja. Pri večini bolnikov je uspešno konzervativno zdravljenje s poudarkom na vajah za propriorepcijo. Pri 20–40 % primerov težave kljub temu vztrajajo, zaradi česar je potrebno operativno zdravljenje. Uveljavljene so tri odprte operativne tehnike: poprava vezi po Broström-Gouldu, neanatomska rekonstrukcija in rekonstrukcija vezi s presadkom. Poprava vezi je največkrat uporabljena tehnika s predvidljivimi rezultati, pri čemer je rekonstrukcija primernejša, ko gre za ponovne posege ali pri prekomerni elastičnosti vezivnega tkiva. V zadnjem obdobju je vse večkrat uporabljena artroskopska stabilizacija zunanega gležnja, kjer se prednja skočnično-mečnična vez popravi skozi tri portale. Če je kakovost poškodovane vezi dobra, je artroskopska tehnika uspešna pri stabilizaciji in predvsem omogoča hitrejše pooperativno okrevanje.

ABSTRACT

KEY WORDS: chronic ankle sprain, Broström-Gould, ankle stabilization, ligament reparation, ligament reconstruction, arthroscopic ligament reparation, lateral ankle anatomy

Chronic lateral ankle instability is characterized as a feeling of instability while walking, with frequent ankle sprains in everyday activities. When it occurs as a result of severe ankle sprain with damage to the lateral ligament complex, we speak of anatomical instability; in recurrent sprains without clear damage to the ligaments, it is called functional instability. Chronic lateral ankle instability is diagnosed by clinical examination, specific tests, radiological examinations and in case of uncertainty confirmed by ankle arthroscopy.

¹ Aljaž Belšak, dr. med., Kirurški oddelek, Splošna bolnišnica dr. Jožeta Potrča Ptuj, Potrčeva cesta 23, 2250 Ptuj; belsak.aljaz1@gmail.com

² doc. dr. Matjaž Merc, dr. med., Oddelek za ortopedijo, Klinika za kirurgijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor; matjaz.merc.md@gmail.com

Treatment is not uniform and requires different conservative and operative approaches, depending on the clinical presentation and associated ankle diseases. In most patients, conservative treatment with an emphasis on proprioception exercises is successful. In 20–40% of cases, the problems persist, which is an indication for surgical treatment. Three open operative techniques have been established: Broström-Gould ligament repair, non-anatomical reconstruction, and ligament reconstruction with graft. Ligament repair is the most commonly used method with predictable results, with reconstruction being more appropriate when it comes to revision procedures or when the connective tissue is hyperelastic. Recently, arthroscopic stabilization of the external ankle has been applied increasingly often, where the anterior talofibular ligament is repaired through three portals. If the quality of the damaged ligament is good, the arthroscopic technique is a successful method for stabilization and enables faster postoperative rehabilitation.

UVOD

Zvin gležnja je ena najpogostejših ponavljajočih se poškodb (1, 2). Opredeljen je kot poškodba vezi na zunanji (lateralni) strani gležnja in se razlikuje po stopnji od mikroskopskih raztrganin v strukturi vezi, kar se kaže kot nateg, do popolnega raztrganja več vezi z jasnim razmikom med obema poškodovanima koncema. Poškodba zunanega veznega kompleksa predstavlja 85 % vseh vezivnih poškodb gležnja, pri čemer je največkrat prizadeta prednja skočnično-mečnična vez (angl. *anterior talo-fibular ligament*, ATFL) (3, 4).

Zvine gležnja pogosto obravnavamo kot enostavno poškodbo, ki ne zahteva kirurške obravnave. Kljub temu lahko pri tveganih športih pojavnost ponavljajočih se zvinov in podaljšane okrevanja doseže 70 % (5). Kronična nestabilnost gležnja je v takih primerih ugotovljena v 20 %. Po težjem zvinu lahko 34 % bolnikov pričakuje ponovitev poškodbe znotraj treh let po prvotni poškodbi (6). Kronična nestabilnost zunanega gležnja (KNZG) je opisana kot občutek nestabilnosti pri hoji, ki se kaže z občutkom »klecanja« gležnja in pogostimi zvini tudi med normalno aktivnostjo. Vzrok za to je mehanična popustljivost vezi (7). KNZG značilno vpliva na čas odsotnosti od dela, zmanjšuje kakovost življenja in je pomemben dejavnik tveganja za zgodnjo artrozo (8, 9). Do 93 % bolnikov s KNZG ima

pridružene znotrajsklepne bolezenske spremembe, saj varusna nestabilnost gležnja prerazporedi sile v sklepu na notranjo stran, kar povzroča kostno-hrstančne spremembe, predvsem v osrednjem notranjem področju skočnice in vodi v zgodnjo obrabo sklepne hrustanca (10, 11).

Vzrok in točna patofiziologija KNZG še nista popolnoma razumljena. Najbrž gre za nepravilno kinematično delovanje okvarjene vezi skupaj z zmanjšano mišično močjo sekundarnih stabilizatorjev gležnja (obeh mečničnih (peronealnih) tetiv), kar oslabi propriocepcijo in položajnim nadzorom v okolici sklepa. S tem se pojavi razlika med aktivno in pasivno prepoznavo položaja sklepa, hkrati pa se podaljša peronealni reakcijski čas (12).

Zdravljenje KNZG ni enolično in glede na trenutno klinično sliko zahteva različne konzervativne in operativne pristope (13). Pomemben dejavnik za postavitve pravilne odločitve je razlikovanje med funkcionalno in anatomsko (mehanično) nestabilnostjo gležnja (14). Pri funkcionalni nestabilnosti ne gre za stanje po neposredni poškodbi z raztrganjem vezi. Kljub temu pa sta moč in propriocepcija zmanjšani, kar se kaže z nestabilnostjo. Po neposredni poškodbi zunanega veznega kompleksa, kjer je prišlo do raztrganja vezi in posledične nefunkcionalnosti, pa govorimo o anatomski nestabilnosti (13).

ANATOMIJA

Zunanji vezni kompleks gležnja sestavljajo tri vezi. Najpogostejše je poškodovana ATFL, sledita ji petnično-mečnična vez (angl. *calcaneo-fibular ligament*, CFL) in zadnja skočnično-mečnična vez (angl. *posterior talo-fibular ligament*, PTFL) (slika 1). Pri KNZG igrata pomembno vlogo tudi spodnji ekstenzijski retinakulum in podskočnični vezni kompleks.

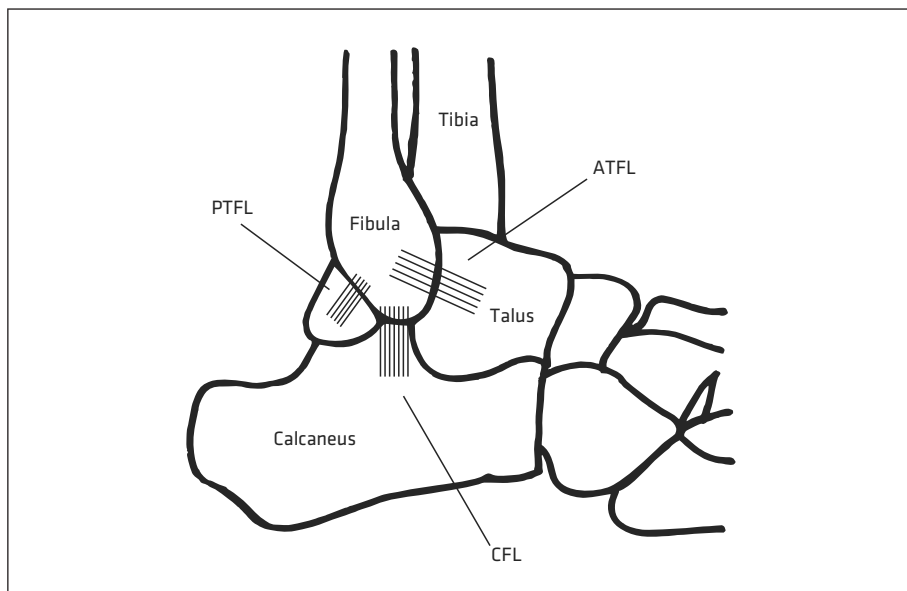
ATFL, ki je v tesnem odnosu s sklepno ovojnico, je 15–20 mm dolga, 6–8 mm široka in 2 mm debela. Sestavljena je iz zgornjega snopa, ki je znotrajsklepna struktura in nima sposobnosti obnove po poškodbi. Spodnji snop je zunajsklepna struktura in ima sposobnost obnove po poškodbi oz. obnove z brazgotinjenjem. Sicer izrašča iz sprednjega vrha distalne mečnice in se prirašča na zunanji del telesa skočnice. CFL je 20–30 mm dolga, 4–8 mm široka in 3–5 mm debela. Izvira iz zadajšnjega notranjega vrha mečnice in se prirašča na zunanjo steno petnice. Smer je blago usmerjena nazaj in

poteka pod peronealnimi tetivami. Kot med ATFL in CFL je 100–105°. PTFL ima široko narastišče po skoraj celotnem zadajšnjem robu skočnice. Dolg je 30 mm, 5 mm širok in 5–8 mm debel. V plantarni fleksiji je ATFL napet, medtem ko je CFL sproščen, obratno pa se zgodi pri dorzifleksiji. Glavna vloga obeh vezi je nadzor inverzije gležnja in varusnih sil, ki delujejo na gleženj in stopalo.

Med podskočnične vezi vključujemo zunanjo skočnično-petnično vez, ki poteka pod in nekoliko pred CFL, cervikalno vez in medkostno skočnično-petnično vez. Medkostna skočnično-petnična vez in CFL sta najpomembnejši vezi za podskočnično stabilnost (15–17).

KLASIFIKACIJA, ETIOLOGIJA IN PATOFIZIOLOGIJA

KNZG največkrat nastane zaradi ponavljajočih se poškodb in nepovratne okvare vezi ali ob prirojeni prekomerni gibljivosti vezivnega tkiva kot posledica genetske motnje



Slika 1. Shematski prikaz anatomije kosti gležnja z zunanjim veznim kompleksom. PTFL – zadnja skočnično-mečnična vez (angl. *posterior talo-fibular ligament*), ATFL – prednja skočnično-mečnična vez (angl. *anterior talo-fibular ligament*), CFL – petnično-mečnična vez (angl. *calcaneo-fibular ligament*).

v delovanju kolagena. KNZG lahko povzroči tudi spremenjena os zadnjega stopala, in sicer zaradi varusa petnice ali *cavovarus* stopala.

Med poškodbo se lahko vezi nategnejo ali popolnoma pretrgajo. Za določitev stopnje poškodbe vezi uporabljamo tri-stopenjsko klasifikacijo. Prva stopnja predstavlja najblažjo obliko; opisuje nateg vezi, druga predstavlja delno raztrganje vezi in tretja popolno raztrganje (18).

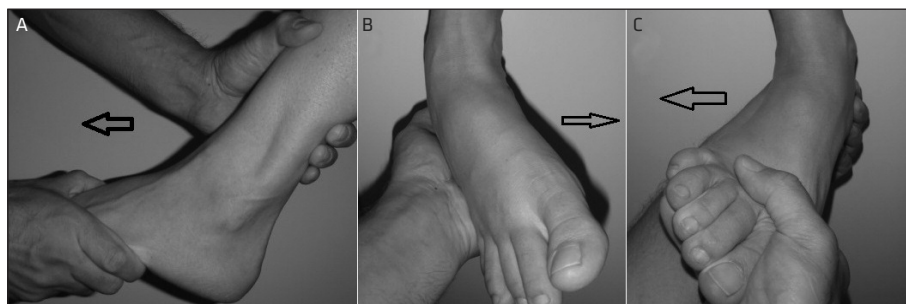
Glede na vrsto nestabilnosti govorimo o mehanični in funkcionalni nestabilnosti. Mehanično nestabilnost povzroči kronična vezna okvara zaradi poškodbe, ki vodi do patološkega odprtja zunanega sklepne prostora med skočnico in golenico. KNZG je v primeru subjektivnega občutka nestabilnosti gležnja brez patološkega odprtja sklepne prostora opredeljena kot funkcionalna (19). Funkcionalna nestabilnost je tesno povezana z živčno-mišično in položajno sklepno stabilnostjo, ki sicer zagotavljata ustrezno propriorepcijo, mišično moč, oživčenje stabilizatorjev gležnja in delovanje peronealnih tetiv, kot odziv na inverzijski stres. Funkcionalna stabilnost se pomembno zmanjša pri daljših športnih aktivnostih in utrujenosti, mogoče pa jo je izboljšati s stabilizacijskimi vajami, ki so usmerjene v izboljšanje funkcionalnega živčno-mišičnega zaznavanja. Ni popolnoma razumljeno, kako sta funkcionalna in mehanična nestabilnost medsebojno pove-

zani, vendar je dokazano, da je funkcionalna nestabilnost brez očitne mehanične nestabilnosti pomemben dejavnik tveganja za ponavljajoče se zvine gležnja. Ob tem je opisano, da sta oba tipa nestabilnosti do neke mere v soodvisnosti ter da pri funkcionalni nestabilnosti prihaja do večjega stranskega premika, ki je sicer prisoten tudi pri mehanični nestabilnosti (20–22).

DIAGNOZA IN KLINIČNE ZNAČILNOSTI

KNZG lahko diagnosticiramo na različne načine. Zlati standard predstavlja artroskopija gležnja, kjer se osredotočimo na stanje narastišča ATFL in CFL na mečnico. Hkrati ocenimo kakovost strukture obeh vezi, morebitno bolezensko odpiranje sklepa na zunanji strani in prisotnost drugih sklepnih sprememb. Druge diagnostične možnosti so klinične in radiološke preiskave, ki so praviloma manj zanesljive. Kljub temu so izrednega pomena pri analizi nestabilnosti, saj predstavljajo steber neinvazivnega pristopa k postavitvi diagnoze (23, 24).

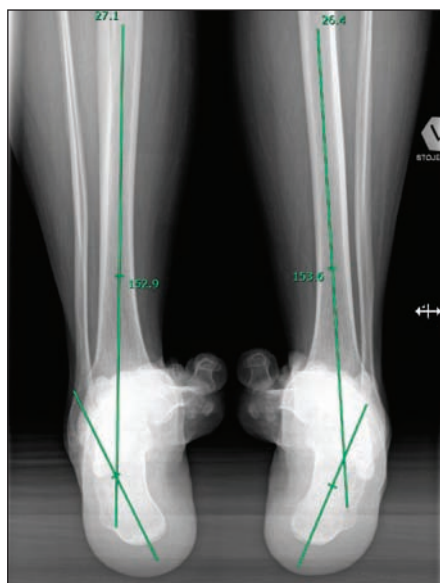
V okviru klinične preiskave smo pozorni na podatke o bolečini v območju ob prednje-zunanji strani gležnja pred mečnico, pomemben je mehanizem poškodbe, občutek subjektivne nestabilnosti in pogostost zvinov. Med pregledom najprej opravimo inspekcijo in palpacijo. Pomembno je, da otipamo vezi, točke njihovih narastišč in



Slika 2. Klinični testi za oceno nestabilnosti gležnja. A) Sprednji predalčni test. B) Notranji test nagiba skočnice. C) Zunanji test nagiba skočnice. Puščice prikazujejo smer premikanja.

celotno sklepno površino. Po opravljeni oceni gibljivosti sklepa sledi izvedba značilnih kliničnih testov (slika 2). Sprednji predalčni test opravimo tako, da z eno roko učvrstimo distalno golenico in z drugo roko pritiskamo stopalo naprej v 15° plantarni fleksiji ter ob tem spremljamo premik navzpred. Če je premik povečan, še posebej v primerjavi z nasprotno stranjo, je test pozitiven in nakazuje prekinitve ATFL. Zunanji in notranji test nagiba skočnice (angl. *talar tilt test*) se izvedeta podobno kot sprednji predalčni test, vendar v tem primeru zadnji del stopala premikamo v inverzijo in everzijo. Pri zunanjem testu preverimo CFL, pri notranjem pa deltoidno vez (13, 25). Občutljivost teh testov je med 74 in 96 % (26, 27).

Druga pomembna točka pri kliničnem pregledu je ocena poravnave zadnjega dela petnice v odnosu na golenico. Pri KNZG je namreč petnica pogosto nagnjena v varus.



Slika 3. RTG-prikaz za določitev osi zadnjega stopala (prikaz po Saltzmanu). Na prikazu je mogoče določiti golenično-skočnični kot, ki v prikazanem primeru kaže 27° varusa in posledično izrazito spremembo *cavovarus*. Tveganje za ponavljajoče se zvine gležnja je v teh primerih značilno povečano.

Kot med osjo golenice in petnice (tibio-kalkanearni kot) je v najboljših pogojih 2° ($\pm 3^\circ$) valgusa. Za objektivno določitev osi zadnjega dela stopala potrebujemo prednje-zadnji in stranski RTG-posnetek gležnja stoje in posebnim prikazom, ki prikazuje os zadnjega stopala (npr. Saltzmanov prikaz) (slika 3) (28). Dodatno je mogoče opraviti tudi stresne RTG-posnetke obeh gležnjev primerjalno, kjer ocenjujemo patološko odpiranje golenično-skočnične sklepne špranje. O patološki nestabilnosti govorimo, ko kot presega 10° varusa ali opažamo premik navzpred, ki je večji od 10 mm. Pri primerjavi obeh strani, mora razlika znašati več kot 5° varusa, nesorazmerje premika navzpred pa 5 mm (29). Slabost stresne obremenitve sklepa med RTG-slikanjem predstavlja možnost dodatnih poškodb vezi, povzročenih po zdravniku, še posebej, če se preiskava izvaja med anestezijo (30).

MRI ima omejeno vrednost pri oceni stabilnosti gležnja, saj gre za statično preiskavo, kjer sta gleženj in stopalo v nevtralnem položaju. Ob tem ATFL tudi pri prebivalstvu brez simptomov v 60 % oddaja patološki signal, ki nakazuje oslajeno ali raztrgano vez. Na MRI se namreč ATFL redko prikaže kot zdrava struktura, če je bolnik kadar koli v preteklosti utrpel zvin, tudi če gre za klinično popolnoma stabilen gleženj. MRI je posledično uporaben kadar ugotavljamo prisotnost dodatnih bolezenskih sprememb v sklepu, kot so kostno-hrstančne spremembe, prisotnost prostih teles ali artroze (31–33).

Pri oceni funkcionalne nestabilnosti gležnja se pogosto zanašamo zgolj na anamnestične podatke o občutku nestabilnosti pri hoji, saj ob pregledu praviloma ne najdemo očitnih odstopanj od fizioloških okvirov, natančnejša diagnostika pa je zahtevna in pogosto nedostopna. Za objektivnejšo prepoznavo funkcionalne nestabilnosti je namreč potrebna značilna oprema za analizo hoje in dinamična pedobarografija. Pri takšni analizi največkrat ugotavljamo povečan

reakcijski čas peronalnih tetiv, razlike v reakcijskem času aktivacije vezi gležnja in spremenjen obseg gibljivosti sklepa (34–36).

ZDRAVLJENJE

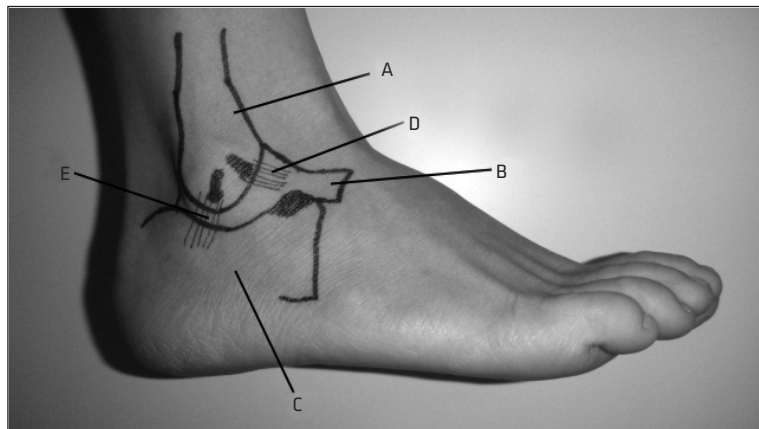
Konzervativno zdravljenje

Najboljši ukrep za preprečitev ponavljajočih se zvinov gležnja in razvoja KNZG je zgodnja popoškodbena aktivacija gležnja s poudarkom na vajah za propriorepcijo in aktivnostmi za krepitev obklesnih vezi ter izboljšanje živčno-mišične stabilizacije (37–42). Takoj po poškodbi sicer pristopimo k zdravljenju po protokolu RICE (angl. *rest, immobilisation, compression, elevation*), ki temelji na počitku, uporabi povoja, hlajenju in dvigu gležnja, ter s tem zmanjšanju otekline gležnja. Nato pa že naslednji dan, najkasneje od dva do tri dni po poškodbi, pričnemo s postopnim obremenjevanjem gležnja. Nezadostno zdravljenje akutnih zvinov gležnja namreč predstavlja glavni dejavnik tveganja za kasnejšo KNZG. Posledično je tudi pri KNZG prvi korak zdravljenja zgoraj opisani konzervativni pristop. Kljub intenzivnemu konzervativnemu zdravljenju pri 20–40% primerov z neinvazivnimi ukrepi nismo uspešni, v tem primeru

predstavlja operativno zdravljenje naslednjo stopnjo (41, 42).

Operativno zdravljenje

Uveljavile so se tri odprte operativne tehnike. Neposredna poprava ATFL in CFL (Broström-Gouldova tehnika), neanatomska rekonstrukcija vezi s tetivo kratke peronealne mišice in rekonstrukcija vezi z avtoali alograftom. Nekatere odprte tehnike, predvsem poprava ATFL in CFL, so bile v zadnjih letih nadgrajene z artroskopskimi različicami. Mnenja o dejanskih prednostih artroskopske poprave vezi pri KNZG so še zmeraj deljena, vendar vse pomembnejše vloge takšnega manj invazivnega pristopa ni mogoče prezreti, saj omogoča hitrejše okrevanje in manj poškodb mehkostrukturnih struktur ob gležnju, čeprav je povezana z večjo verjetnostjo po zdravniku povzročenih poškodb veje povrhnjega peronealnega živca. Številni zagovorniki odprtih pristopov poprave vezi predlagajo standardni protokol kirurškega zdravljenja KNZG, ki zajema artroskopsko inspekcijo gležnja in vezi z izvedbo dodatnih posegov med samo artroskopijo (oskrba poškodovanega hrustanca, odstranitev prostih teles,



Slika 4. Pomembne anatomske strukture zunanega dela gležnja in mesta vstavitve sider pri popravilu vezi s prilagojeno Broström-Gouldovo tehniko. A – mečnica, B – skočnica, C – petnica, D – prednja skočnično-mečnična vez z najboljšim mestom vstavitve sidra v mečnico pri popravi vezi, E – petnično-mečnična vez z najboljšim mestom vstavitve sidra v mečnico pri popravi vezi.

toaleta mehko tkivnih struktur itd.) ter odprto popravilo vezi po Broström-Gouldovi tehniki (slika 4). Podatki namreč kažejo, da ima do 92 % bolnikov znotraj sklepne bolezenske spremembe, ki se pogosto ugotovijo šele med artroskopijo in se lahko takrat tudi ustrezno oskrbijo (43). V primeru neuspešne poprave vezi, slabe kakovosti ATFL in CFL ali ob prekomerni gibljivosti vezi ter posledični nezadostni funkciji zunanega veznega kompleksa predstavlja drugo možnost anatomska rekonstrukcija vezi z avtoali alograftom (44–64).

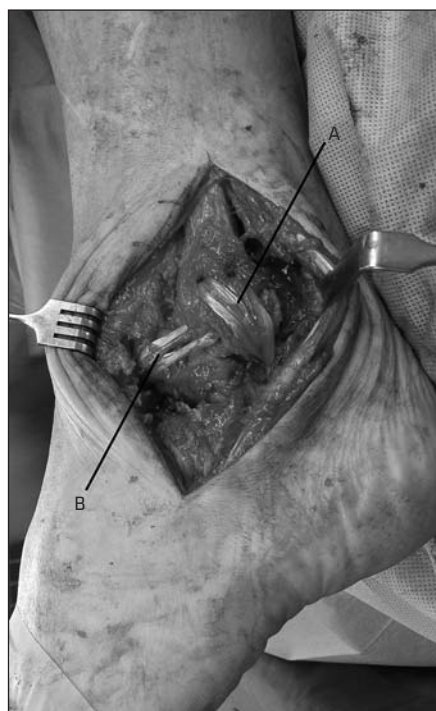
Neanatomska rekonstrukcija zunanjega veznega kompleksa

Opisane so različne vrste neanatomske rekonstrukcije ATFL in CFL, in sicer z uporabo tetive kratke peronealne mišice. Pri vseh se izvede tenotomija začetnega dela tetive, nato pa se začetni konec napelje skozi glavico mečnice in pričvrsti na način, da je tetiva s svojo napetostjo, ki je prisotna med bazo pete stopalnice (narastiščem kratke peronealne mišice) in mečnico, stabilizator zunanjega gležnja. Tehnika je kljub svoji preprosti izvedbi povezana z znatnimi pomanjkljivostmi in se izvaja samo v specifičnih primerih (npr. dodatna stabilizacija zunanjega gležnja po vstavitvi gleženjske proteze). Glavne težave predstavljajo spremenjena kinematika gležnja in podskočničnega sklepa, zmanjšana gibljivost (predvsem inverzije) in nastanek kasnejše podskočnične artroze. Posledično imajo bolniki pogosto težave z bolečinami in togostjo gležnja (45).

Poprava zunanjega veznega kompleksa

Odprta poprava ATFL in CFL je še vedno splošno sprejeta tehnika, ki predstavlja zlati standard in se največkrat uporablja v vsakdanu (slika 5). Prvič jo je opisal Broström leta 1966 in temelji na prilagoditvi in okrepitvi nategnjenih ali raztrganih ATFL ter CFL z uporabo neresorptivnega šiva. Leta 1980 jo je Gould nadgradil z dodatno prič-

vrstitvijo spodnjega ekstenzornega retakuluma na mečnico z uporabo znotrajkostnega šiva, s čimer je biomehanično moč izboljšal za 60 %. Z leti se je Broström-Gouldova tehnika nekoliko preoblikovala, tako da se pričvrstitve v mečnico praviloma izvede z enim ali dvema sidroma, ki sta nadomestili znotrajkostne šive. Na voljo so tudi drugi pričvrstitveni načini, s katerimi ob sidrih dodatno okrepimo operirani predel, kar predvsem v prvih pooperativnih mesecih, ko poteka izrazita pregradnja, večja čvrstost brazgotine. Broström-Gouldova tehnika je uspešna v 87–95 % in je pogosto kirurško zdravljenje prvega izbora. Ne priporoča se za primere ponovnih posegov, kjer neposredna poprava vezi ni bila učinkovita



Slika 5. Prikaz izvedbe rekonstrukcije zunanjega veznega kompleksa s tetivo polopnaste mišice (lat. *musculus semimembranosus*). Del presadka tetive nadomešča petnično-mečnično vez (A) in del prednje skočnično-mečnične vezi (B), pri tem je tetiva speljana skozi zunanji rob petnice, mečnico in vrat skočnice.

oz. je prišlo do ponovnega raztrganja okrepjenih vezi (46–49). Odsvetuje se tudi pri sistemski vezni ohlapnosti, npr. pri bolnikih z Marfanovim ali Ehlers-Danlosovim sindromom (50).

Anatomska rekonstrukcija zunanega veznega kompleksa

Z rekonstrukcijo zunanega veznega kompleksa gležnja nadomestimo vezi ATFL in CFL s presadkom tetiv dolge podplatne (lat. *musculus plantaris longus*), polkitaste (lat. *musculus semitendinosus*) ali sloke (lat. *musculus gracilis*) mišice. Cilj rekonstrukcije je povrniti anatomsko smer in točke narastišč obeh vezi. Presadek pri tej kirurški tehniki speljemo od zunanega roba petnice skozi vrh mečnice na zunanji rob vratu skočnice. Presadek nato na vseh točkah pričvrstimo s sidri ter ga glede na tehniko dodatno obšijemo. Zaradi anatomske rekonstrukcije vezi je kinematika spremenjena v najmanjši možni meri, okvarjena vez pa se nadomesti v celoti, kar praviloma zagotavlja dobro dolgoročno stabilnost gležnja (46, 51–53). Slabost tehnike je večja zahtevnost v primerjavi s popravo in možnost zapletov na odzemnem mestu avtografta (54).

Artroskopska stabilizacija zunanega veznega kompleksa

V zadnjem obdobju postaja vse bolj aktualna artroskopska stabilizacija zunanega gležnja, ki temelji na minimalno invazivni popravi ATFL, kar lahko vključuje tudi ojačitev spodnjega ekstenzornega retinakuluma. V osnovi gre za prilagojeno Broström-Gouldovo tehniko, kjer ATFL pričvrstimo s sidrom, vstavljenim v sprednji rob mečnice (55, 56). Prednost tehnike je hkratna razrešitev morebitnih znotraj sklepnih bolezenskih sprememb. Indikacija za poseg je vztrajajoča KNZG z delnim ali popolnim raztrganjem ATFL, pri čemer je struktura vezi ohranjena in med posegom ne ugotovimo izrazito slabe kakovosti vezi. Sočasno raztrganje CFL ni kontraindikacija za poseg, saj

s popravo samo ATFL praviloma dosežemo zadovoljivo stabilizacijo in funkcionalnost. Tehnika se sicer lahko uporabi tudi za zdravljenje akutnega raztrganja ATFL, vendar veljavne smernice bolj zagovarjajo konzervativni pristop kot prvo izbiro zdravljenja akutnih zvinov.

Artroskopski operativni poseg stabilizacije se opravi skozi tri portale: prednje-notranji in dva prednje-zunanja. Po toaleti gležnja sledi priprava mesta za vstavev sidra v mečnico in namestitev kirurške niti okrog ATFL, ki jo nato med postopkom pričvrstitve sidra napnemo na način, da je tudi ATFL spet napet in posledično funkcionalen. Po operaciji namestimo za štiri tedne dokolenski hodilni škorenj (angl. *walker boot*) v 90° fleksiji gležnja, čemur sledi fizikalno zdravljenje. Bolniki se lahko po dveh mesecih vrnejo k nekontaktnim športom, po treh mesecih pa so dovoljene vse aktivnosti brez omejitev (57, 58). Razpoložljivi podatki kažejo, da je artroskopska stabilizacija boljša v primerjavi z odprto Broström-Gouldovo tehniko v zmanjšani obolevnosti, krajšem času okrevanja in večji sposobnosti, da lahko hkrati obravnavamo tudi znotraj sklepne bolezenske spremembe gležnja (55, 56, 59). Slabosti so dokaj visoka incidenca poškodbe veje povrhnjega peronealnega živca, ki lahko doseže 14 %, možnost poprave samo ATFL in ne CFL, ter kontraindikacija za poseg pri slabši kakovosti ATFL (13, 42, 58, 60).

V zadnjem času je bila opisana še triportalna artroskopska tehnika stabilizacije zunanega gležnja z avtolognim tkivom, ki omogoča rekonstrukcijo ATFL in CFL, vendar dolgoročna učinkovitost tehnike in morebitna večja uspešnost v primerjavi z artroskopsko stabilizacijo, kjer učvrstimo samo ATFL, še nista poznani (58).

Poravnava osi zadnjega stopala

Analiza osi zadnjega stopala in določitev tibio-kalkanearega kota sta izjemnega pomena za določitev pravilnega izbora zdravlje-

nja KNZG. Če je petnica v varus položaju glede na golenico, se tveganje za zvine namreč značilno poveča. Izolirana oskrba vezi v takšnih okoliščinah, brez posega na petnici, ne zadostuje za preprečitev ponovnih zvinov. Podobno je tudi pri podskočnični nestabilnosti, katere vzrok je nezadostnost podskočničnih vezi. V teh primerih je pred popravo ali rekonstrukcijo ATFL in CFL treba izvesti osteotomijo petnice, s čimer premaknemo os in s tem apofizo petnice v zunanjo smer. Stopalo se pri hoji tako bolj nagiba v valgus in ne obremenjuje več zunanjega veznega kompleksa (61).

Pooperativna oskrba in okrevanje

Klasični protokol za okrevanje sestavlja šest tednov razbremenjevanja z uporabo dokolenskega hodilnega škornja iz blaga, sledi postopna vrnitev k dnevnim aktivnostim. Najprej dovoljujemo hojo in nadzorovane vaje za propriorepcijo, nato pa po 12 tednih polno obremenitev brez omejitev. V zgodnjem pooperativnem obdobju do šestega pooperativnega tedna je predvsem pomembno izvajanje vaj za ohranjanje polnega obsega gibljivosti gležnja z namenom preprečitve nastanka kontraktur (62–64).

ZAKLJUČEK

KNZG je dokaj pogosta bolezen, ki ovira tako aktivne ljudi pri vsakodnevnih obremenitvah kot profesionalne športnike pri doseganju vrhunskih rezultatov. Natančna klinična preiskava, slikovna diagnostika in diagnostična artroskopija so ključne za določitev mehanične nestabilnosti, medtem ko funkcionalna nestabilnost ostaja diagnostični izziv. K sreči s primernim konzervativnim pristopom, ki temelji na izboljšanju propriorepcije in živčno-mišične odzivnosti, pogosto uspešno obvladamo nestabilnost. Če to ne zadostuje, lahko s kirurškim posegom, ki je pravilno indiciran, dosežemo visoko stopnjo uspešnosti. V prvi vrsti se priporoča popravilo vezi, lahko samo ATFL ali ATFL in CFL skupaj. Pri hujši nestabilnosti in ob ponovitvi pa priporočamo anatomsko rekonstrukcijo vezi ter po potrebi osteotomijo petnice. Artroskopska stabilizacija zunanjega gležnja postaja vse bolj uveljavljena tehnika stabilizacije gležnja s primerljivimi rezultati, kot jih ponuja odprta poprava vezi po Broström-Gouldovi tehniki, pri čemer omogoča hitrejšo in manj boleče okrevanje.

LITERATURA

1. Tik-Pui Fong D, Hong Y, Chan LK, et al. A systematic review on ankle injury and ankle sprain in sports. *Sports Med.* 2007; 37 (1): 73–94.
2. Fernandez WC, Yard EE, Dawn Comstock R. Epidemiology of lower extremity injuries among U.S. high school athletes. *Acad Emerg Med.* 2007; 14 (7): 641–5.
3. Cooke MW, Marsh JL, Clark M, et al. Treatment of severe ankle sprain: A pragmatic randomised controlled trial comparing the clinical effectiveness and cost-effectiveness of three types of mechanical ankle support with tubular bandage. The CAST trial. *Health Technol Assess.* 2009; 13 (13): iii, ix–x, 1–121.
4. Polzer H, Kanz KG, Prall WC, et al. Diagnosis and treatment of acute ankle injuries: Development of an evidence-based algorithm. *Orthop Rev.* 2012; 4 (1): e5.
5. Yeung MS, Chan KM, So CH, et al. An epidemiological survey on ankle sprain. *Br J Sports Med.* 1994; 28 (2): 112–6.
6. van Rijn RM, van Os AG, Bernsen RMD, et al. What is the clinical course of acute ankle sprains? A systematic literature review. *Am J Med.* 2008; 121 (4): 324–31.e6.
7. Gribble PA, Delahunt E, Bleakley CM, et al. Selection criteria for patients with chronic ankle instability in controlled research: A position statement of the International Ankle Consortium. *J Athl Train.* 2014; 49 (1): 121–7.
8. Anandacoomarasamy A, Barnsley L. Long term outcomes of inversion ankle injuries. *Br J Sports Med.* 2005; 39 (3): e14.
9. Bischof JE, Spritzer CE, Caputo AM, et al. In vivo cartilage contact strains in patients with lateral ankle instability. *J Biomech.* 2010; 43 (13): 2561–6.
10. Komenda GA, Ferkel RD. Arthroscopic findings associated with the unstable ankle. *Foot Ankle Int.* 1999; 20 (11): 708–13.
11. Elias I, Raikin SM, Schweitzer ME, et al. Osteochondral lesions of the distal tibial plafond: Localization and morphologic characteristics with an anatomical grid. *Foot Ankle Int.* 2009; 30 (6): 524–9.
12. Thompson C, Schabrun S, Romero R, et al. Factors contributing to chronic ankle instability: A protocol for a systematic review of systematic reviews. *Syst Rev.* 2016; 5: 94.
13. Shakked RJ, Karnovsky S, Drakos MC. Operative treatment of lateral ligament instability. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2017; 10 (1): 113–21.
14. Al-Mohrej OA, Al-Kenani NS. Chronic ankle instability: Current perspectives. *Avicenna J Med.* 2016; 6 (4): 103–8.
15. Ray RG. Arthroscopic anatomy of the ankle joint. *Clin Podiatr Med Surg.* 2016; 33 (4): 467–80.
16. Matsui K, Takao M, Tochigi Y, et al. Anatomy of anterior talofibular ligament and calcaneofibular ligament for minimally invasive surgery: A systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017; 25 (6): 1892–902.
17. Maceira E, Monteagudo M. Subtalar anatomy and mechanics. *Foot Ankle Clin.* 2015; 20 (2): 195–221.
18. Karlsson J, Andreasson GO. The effect of external ankle support in chronic lateral ankle joint instability. An electromyographic study. *Am J Sports Med.* 1992; 20 (3): 257–61.
19. Halasi T, Kynsburg A, Tállay A, et al. Development of a new activity score for the evaluation of ankle instability. *Am J Sports Med.* 2004; 32 (4): 899–908.
20. Hubbard TJ, Kaminski TW, Vander Griend RA, et al. Quantitative assessment of mechanical laxity in the functionally unstable ankle. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36 (5): 760–6.
21. Hertel J. Functional anatomy, pathomechanics, and pathophysiology of lateral ankle instability. *J Athl Train.* 2002; 37 (4): 364–75.
22. Hertel J. Functional instability following lateral ankle sprain. *Sports Med.* 2000; 29 (5): 361–71.
23. Staats K, Sabeti-Aschraf M, Apprich S, et al. Preoperative MRI is helpful but not sufficient to detect associated lesions in patients with chronic ankle instability. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2018; 26 (7): 2103–9.
24. Chang SH, Morris BL, Saengsin J, et al. Diagnosis and treatment of chronic lateral ankle instability: Review of our biomechanical evidence. *J Am Acad Orthop Surg.* 2021; 29 (1): 3–16.
25. Chan KW, Ding BC, Mroczek KJ. Acute and chronic lateral ankle instability in the athlete. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2011; 69 (1): 17–26.
26. Croy T, Koppenhaver S, Saliba S, et al. Anterior talocrural joint laxity: Diagnostic accuracy of the anterior drawer test of the ankle. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2013; 43 (12): 911–9.
27. van Dijk CN, Lim LS, Bossuyt PM, et al. Physical examination is sufficient for the diagnosis of sprained ankles. *J Bone Joint Surg Br.* 1996; 78 (6): 958–62.
28. Saltzman CL, el-Khoury GY. The hindfoot alignment view. *Foot Ankle Int.* 1995; 16 (9): 572–6.

29. Hoffman E, Paller D, Koruprolu S, et al. Accuracy of plain radiographs versus 3D analysis of ankle stress test. *Foot Ankle Int.* 2011; 32 (10): 994–9.
30. Frost SC, Amendola A. Is stress radiography necessary in the diagnosis of acute or chronic ankle instability? *Clin J Sport Med.* 1999; 9 (1): 40–5.
31. Galli MM, Protzman NM, Mandelker EM, et al. Examining the relation of osteochondral lesions of the talus to ligamentous and lateral ankle tendinous pathologic features: A comprehensive MRI review in an asymptomatic lateral ankle population. *J Foot Ankle Surg.* 2014; 53 (4): 429–33.
32. Joshy S, Abdulkadir U, Chaganti S, et al. Accuracy of MRI scan in the diagnosis of ligamentous and chondral pathology in the ankle. *Foot Ankle Surg.* 2010; 16 (2): 78–80.
33. Jung HG, Kim NR, Kim TH, et al. Magnetic resonance imaging and stress radiography in chronic lateral ankle instability. *Foot Ankle Int.* 2017; 38 (6): 621–6.
34. Nunes GS, de Noronha M, Wageck B, et al. Movement adjustments in preparation for single-leg jumps in individuals with functional ankle instability. *Hum Mov Sci.* 2016; 49: 301–7.
35. Kim C-Y, Choi J-D. Comparison between ankle proprioception measurements and postural sway test for evaluating ankle instability in subjects with functional ankle instability. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2016; 29 (1): 97–107.
36. Löfvenberg R, Kärrholm J, Sundelin G, et al. Prolonged reaction time in patients with chronic lateral instability of the ankle. *Am J Sports Med.* 1995; 23 (4): 414–7.
37. Hall EA, Docherty CL, Simon J, et al. Strength-training protocols to improve deficits in participants with chronic ankle instability: A randomized controlled trial. *J Athl Train.* 2015; 50 (1): 36–44.
38. Hall EA, Chomistek AK, Kingma JJ, et al. Balance-and strength-training protocols to improve chronic ankle instability deficits, part I: Assessing clinical outcome measures. *J Athl Train.* 2018; 53 (6): 568–77.
39. Hall EA, Chomistek AK, Kingma JJ, et al. Balance-and strength-training protocols to improve chronic ankle instability deficits, part II: Assessing patient-reported outcome measures. *J Athl Train.* 2018; 53 (6): 578–83.
40. Cain MS, Ban RJ, Chen YP, et al. Four-week ankle-rehabilitation programs in adolescent athletes with chronic ankle instability. *J Athl Train.* 2020; 55 (8): 801–10.
41. Doherty C, Bleakley C, Delahunt E, et al. Treatment and prevention of acute and recurrent ankle sprain: An overview of systematic reviews with meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2017; 51 (2): 113–25.
42. Galla M. Treatment of lateral ankle joint instability. Open or arthroscopic? *Unfallchirurg.* 2016; 119 (2): 109–14.
43. Sugimoto K, Takakura Y, Okahashi K, et al. Chondral injuries of the ankle with recurrent lateral instability: An arthroscopic study. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91 (1): 99–106.
44. Ziaei Ziabari E, Lubberts B, Chiou D, et al. Biomechanics following anatomic lateral ligament repair of chronic ankle instability: A systematic review. *J Foot Ankle Surg.* 2021; 60 (4): 762–9.
45. Krips R, van Dijk CN, Halasi PT, et al. Long-term outcome of anatomical reconstruction versus tenodesis for the treatment of chronic anterolateral instability of the ankle joint: A multicenter study. *Foot Ankle Int.* 2001; 22 (5): 415–21.
46. Hamilton WG, Thompson FM, Snow SW. The modified Broström procedure for lateral ankle instability. *Foot Ankle.* 1993; 14 (1): 1–7.
47. Broström L. Sprained ankles. VI. Surgical treatment of «chronic» ligament ruptures. *Acta Chir Scand.* 1966; 132 (5): 551–65.
48. Aydogan U, Glisson RR, Nunley JA. Extensor retinaculum augmentation reinforces anterior talofibular ligament repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 442: 210–5.
49. Li H, Zhao Y, Chen W, et al. No differences in clinical outcomes of suture tape augmented repair versus Broström repair surgery for chronic lateral ankle instability. *Orthop J Sports Med.* 2020; 8 (9): 2325967120948491.
50. Messer TM, Cummins CA, Ahn J, et al. Outcome of the modified Broström procedure for chronic lateral ankle instability using suture anchors. *Foot Ankle Int.* 2000; 21 (12): 996–1003.
51. Allen T, Kelly M. Modern open and minimally invasive stabilization of chronic lateral ankle instability. *Foot Ankle Clin.* 2021; 26 (1): 87–101.
52. Ferkel E, Nguyen S, Kwong C. Chronic lateral ankle instability: Surgical management. *Clin Sports Med.* 2020; 39 (4): 829–43.
53. Matheny LM, Johnson NS, Liechti DJ, et al. Activity level and function after lateral ankle ligament repair versus reconstruction. *Am J Sports Med.* 2016; 44 (5): 1301–8.
54. Schenck RC, Coughlin MJ. Lateral ankle instability and revision surgery alternatives in the athlete. *Foot Ankle Clin.* 2009; 14 (2): 205–14.

55. Drakos MC Jr, Behrens SB, Paller D, et al. Biomechanical comparison of an open vs arthroscopic approach for lateral ankle instability. *Foot Ankle Int.* 2014; 35 (8): 809–15.
56. Giza E, Shin EC, Wong SE, et al. Arthroscopic suture anchor repair of the lateral ligament ankle complex: A cadaveric study. *Am J Sports Med.* 2013; 41 (11): 2567–72.
57. Vega J, Guelfi M, Malagelada F, et al. Arthroscopic all-inside anterior talofibular ligament repair through a three-portal and no-ankle-distraction technique. *J Bone Jt Surg Essent Surg Tech.* 2018; 8 (3): e25.
58. Aicale R, Maffulli N. Chronic lateral ankle instability: Topical review. *Foot Ankle Int.* 2020; 41 (12): 1571–81.
59. Attia AK, Taha T, Mahmoud K, et al. Outcomes of open versus arthroscopic Broström surgery for chronic lateral ankle instability: A systemic review and meta-analysis of comparative studies. *Orthop J Sports Med.* 2021; 9 (7): 23259671211015207.
60. Acevedo JI, Ortiz C, Golano P, et al. ArthroBroström lateral ankle stabilization technique: An anatomic study. *Am J Sports Med.* 2015; 43 (10): 2564–71.
61. Tourné Y, Besse J-L, Mabit C, et al. Chronic ankle instability. Which tests to assess the lesions? Which therapeutic options? *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010; 96 (4): 433–46.
62. Petrerá M, Dwyer T, Theodoropoulos JS, et al. Short- to medium-term outcomes after a modified Broström repair for lateral ankle instability with immediate postoperative weightbearing. *Am J Sports Med.* 2014; 42 (7): 1542–8.
63. Karlsson J, Rudholm O, Bergsten T, et al. Early range of motion training after ligament reconstruction of the ankle joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1995; 3 (3): 173–7.
64. Clements A, Belilos E, Keeling L, et al. Postoperative rehabilitation of chronic lateral ankle instability: A systematic review. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2021; 29 (2): 146–52.

Jan Tehovnik¹, Jernej Avsenik²

Vloga radioloških preiskovalnih metod pri bolniku s poškodbo glave

The Role of Imaging in a Head Injury Patient

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: poškodba glave, računalniška tomografija z angiografijo, zlom lobanje, možganske krvavitve, možganski edem, herniacija možganovine, difuzna aksonska okvara

Poškodbe glave so redke, vendar pogosto ogrožajo življenje. Največkrat so posledica prometnih nesreč, zato je bolj prizadeto tudi mlajše, aktivno prebivalstvo. Glede na stopnjo motnje zavesti lahko poškodbe glave delimo na blage, zmerne in hude. V večini primerov jih ugotovimo s pomočjo anamneze (tudi heteroanamneze) in kliničnega pregleda, radiološka preiskava izbora v urgentni obravnavi bolnikov s poškodbo glave pa je CT glave brez uporabe kontrastnega sredstva. Ob sumu na travmatsko poškodbo žilja je treba dodatno opraviti tudi CT-angiografijo. MRI se v urgentni obravnavi bolnikov s poškodbo glave redko uporablja, opravimo ga predvsem pri bolnikih, pri katerih sumimo na travmatsko aksonsko poškodbo.

ABSTRACT

KEY WORDS: head injury, computed tomography angiography, skull fracture, cerebral hemorrhage, brain edema, brain herniation, diffuse axonal injury

Head injuries are rare but often fatal. Many head injuries occur in traffic accidents, therefore, the active population is commonly affected. Based on consciousness impairment, head injuries are commonly classified into mild, moderate and severe forms. The diagnosis of a head injury is usually evident from history and examination. Non-contrast CT is the imaging modality of choice in the acute setting. When suspected, vessel injury should be excluded through CT angiography. Magnetic resonance imaging is rarely employed in the acute stage, but is commonly employed in patients with suspected traumatic axonal injury.

¹ Jan Tehovnik, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Asist. dr. Jernej Avsenik, dr. med., Klinični inštitut za radiologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; jernej.avsenik@gmail.com

UVOD

V Sloveniji vsako leto okoli 320/100.000 prebivalcev doživi tako hudo poškodbo glave, da ta zahteva bolnišnično zdravljenje, izmed teh pa jih v povprečju letno umre 22 (1, 2). Kljub majhnemu številu umrlih poškodbe glave predstavljajo veliko javno-zdravstveno težavo, saj večkrat prizadenejo delovno aktivno prebivalstvo. Poškodbe glave se največkrat zgodijo v prometnih nesrečah (prizadeti predvsem mlajši) in pri padcih (prizadeti starejši). Glavni dejavniki tveganja, ki vplivajo na incidenco, so alkohol, ekonomski status in starost (1).

Med zunanje poškodbe glave štejemo poškodbe lasišča in lobanje, med znotrajlobanjske pa epiduralni hematoma (EDH), subduralni hematoma (SDH), travmatsko subarahnoidno krvavitev (SAK) ter obtolčenine in zmečkanine možganskega parenhima (3). Poškodbe lasišča navadno ne ogrožajo življenja, poškodbe lobanje pa so lahko usodne. Med poškodbami obraznih kosti je največkrat poškodovana nosna kost, sledi pa ji poškodba spodnje čeljustnice (lat. *mandibula*) (3). Zlome lobanje delimo na zlome lobanjskega svoda in zlome lobanjske baze. Klinična slika pri poškodbah lobanje je odvisna od mesta poškodbe. Poleg znakov poškodb pomembnih znotrajlobanjskih struktur nam tako lahko npr. sum na zlom senčnice vzbudi prizadet sluh, medtem ko ob očalnem hematomu oz. periorbitalni ekhimozi (t. i. »rakunjih oče«) pomislimo na zlom lobanjske baze. Pri EDH pride do krvavitve v prostor med trdo opno (duro) in kostjo lobanje. Zanj je značilen lucidni interval – bolnik sprva ni videti prizadet, kasneje pa se pri njem pojavijo napredujoče motnje zavesti s pridruženimi nevrološkimi izpadi, ki so posledica herniacije možganovine. Pri SDH pride do krvavitve med duro in pajčevnico (arahnoida). Klinična slika SDH je za razliko od EDH mnogo bolj raznolika, saj je krvavitev večinoma venskega izvora. Pri SDH ne zasledimo lucidnega intervala, pogostejša

je postopna motnja zavesti ob zmerno naraščajočem znotrajlobanjskem tlaku. Travmatska SAK je redkejša, nastane pri hujših poškodbah zaradi delovanja strižnih sil in navadno spremlja EDH ali SDH. Ob delovanju večjih sil lahko pride tudi do poškodb možganskega parenhima – pri bolniku takrat lahko opazimo različne stopnje motenj zavesti v kombinaciji z žariščnimi nevrološkimi izpadi (2, 3).

Poškodbe glave delimo na primarne in sekundarne (3). Primarne nastanejo zaradi neposrednega delovanja sile na lobanjo v trenutku poškodbe. Mednje sodijo predvsem zlomi, epiduralne, subduralne in subarahnoidne krvavitve ter udarnine. Med sekundarne poškodbe, ki kot posledica sosledja različnih patofizioloških mehanizmov nastanejo kasneje, pa štejemo zlasti nastanek edema, ekscitotoksično poškodbo, vnetne procese in spremembe na ravni možganske prekrvitve, celične presnove ter oksigenacije tkiv (2).

Sum na poškodbo glave postavimo predvsem na podlagi anamneze in hitro napredujoče klinične slike. Pri bolniku so lahko prisotni znaki, kot so motnja zavesti, glavobol in bruhanje, ali pa je klinična slika neznčilna (npr. žariščni nevrološki izpadi) (4). Poškodovanca ocenimo s pomočjo glasgowske lestvice kome (angl. *Glasgow coma scale*, GCS), pri kateri ocenjujemo odpiranje oči, govor in motorični odziv poškodovanca. Glede na GCS poškodbo glave delimo na blago (GCS = 13–15), zmerno (GCS 9–12) in hudo (GCS < 9) (3, 5). Pri bolnikih s poškodbo glave nam ocena po GCS-lestvici pomaga pri odločitvah o urgentni radiološki diagnostiki. Preiskovalna metoda izbora v urgentni obravnavi bolnika s poškodbo glave je nativni CT glave.

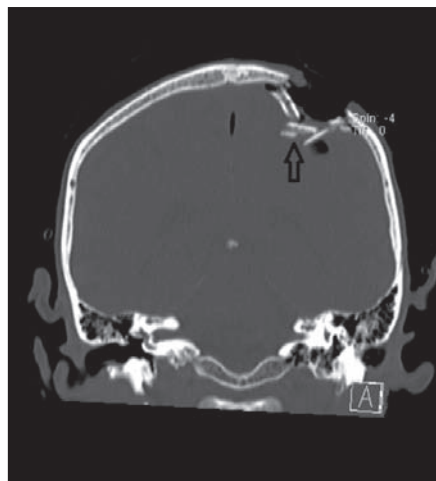
LASIŠČE

Krvavitve v predelu lasišča delimo na kefalhematome in subgalealne hematome (SGH). Kefalhematom predstavlja zbir krvi pod pokostnico na zunanji strani lobanje, značilno

je enostranski in ne prehaja lobanjskih šivov, največkrat pa ga srečamo pri novorojenčkih. Pri novorojenčkih se pojavlja tudi *caput succedaneum*, torej hematoma ali edem nad galealno aponevrozo. Po drugi strani SGH predstavlja zbir krvi pod aponevrozo (galea) in ga pogosto vidimo pri poškodovancih vseh starosti. SGH za razliko od kefalhematoma ni omejen z lobanjskimi šivi in lahko doseže večji obseg – pri otrocih in dojenčkih lahko predstavlja pomembno izgubo krvi in tako resno ogrozi bolnika. Čeprav lahko diagnozo SGH postavimo tudi z UZ, se zaradi možnih pridruženih poškodb navadno opravi CT. Svež SGH se na CT pokaže kot pretežno hiperdenzen in pogosto heterogen mesečasto oblikovan zbir (3, 6).

OKOSTJE

Zlomi kosti so prisotni pri kar dveh tretjinah vseh bolnikov z zmerno ali hudo poškodbo glave. Po drugi strani pa kar četrtina umrlih poškodovancev nima prisotnih zlomov kosti na slikovnih preiskavah (3). Zlome najbolje opredelimo z nativnim CT, ki ima za ta namen visoko specifičnost in občutljivost, če ga opravimo v spiralni tehniki z dovolj tankimi rezi, ki omogočajo visoko ločljivost in rekonstrukcije v poljubnih ravninah (7). Na manjši zlom, ki bi ga sicer lahko spregledali, moramo pomisliti tudi ob prisotnosti zračnih vključkov v znotrajlobanjskem prostoru, ki kaže na povezavo z zunajlobanjskim prostorom, najpogostejše z obnosnimi votlinami ali otomastoidom. Pozorni moramo biti na zlome, ki potekajo v neposredni bližini pomembnih struktur, kot so npr. srednja meningealna arterija, duralni venski sinusi, optični in karotidni kanal ter druga prestopišča na lobanjski bazi. Razlikujemo linearne, diastatične, utorne in mozaične zlome. Diastatični zlomi se kažejo kot razširjeni lobanjski šivi ali sinohondroze (najpogostejše je prizadeta sfenookcipitalna sinohondroza). Pri utornih in mozaičnih zlomih pride do vbočenja kosti, lahko pa tudi do odmaknjenih kostnih odlomkov (slika 1) (3).

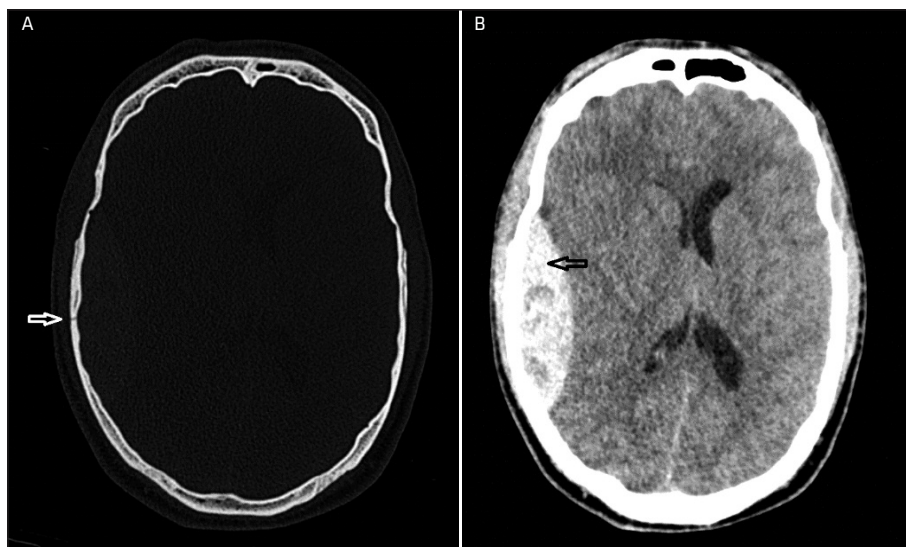


Slika 1. CT-posnetek utornega zloma leve temenice z vbočenjem kostnih odlomkov (puščica).

Posebna entiteta so obrazne kosti. Poškodbe teh največkrat nastanejo pri pretepih. Večina zlomov je zaprtih, kar pomeni, da so sluznice in koža nad zlomom nepoškodovane. Obrazno okostje je zapletena struktura, polna votlin. Tu se nahajajo ustna votlina, nosna votlina, obe očesni votlini in obnosne votline. Pri diagnostiki zlomov obraznih kosti se poslužujemo rentgenskega slikanja, vendar ga je v današnjem času v večini primerov nadomestil CT. Pri diagnostiki zlomov obraza moramo CT-posnetke obvezno narediti v dveh ravninah, aksialni in koronarni, saj le na ta način dobimo informacije o kostnih dislokacijah v vseh treh pogledih. V primeru zapletenih zlomov očesnih votlin so uporabni tudi posnetki CT v sagitalni ravnini, ki lepo prikažejo dno očesne votline v celotni dolžini – tako lahko izključimo *blow out* zlom dna očesne votline (3).

EKSTRAAKSIALNE KRVAVITVE

Ekstraaksialne krvavitve so krvavitve v znotrajlobanjskem prostoru izven možganovine. Pri poškodbi glave najpogostejše nastaneta EDH in SDH. Najpogostejša lokacija EDH je temporalni del lobanje (v 75 %),



Slika 2. Bolnik s poškodbo glave. Na levi sliki je prikazan CT-posnetek, ki z uporabo kostnega okna (način prikaza CT-posnetkov z najboljšim kontrastom med kostnino in okolnimi tkivi) prikaže tanek linearni zlom lobanje na desni strani (bela puščica). Na desni sliki je prikazan isti CT-posnetek, ki pa z uporabo mehko tkivnega okna na mestu zloma pokaže lečast hiperdenzni zbir (črna puščica) z iztisnjenimi priležnimi sulkusi, začetno utesnjenim desnim stranskim (lateralnim) ventrikulom in blagim pomikom možganovine pod falksom v levo. Gre za značilen videz svežega epiduralnega hematoma.

kjer pride do krvavitve iz srednje možganske arterije (8). Svež EDH na posnetku s CT vidimo kot dobro omejeno hiperdenzno strukturo lečaste oblike, ki pri odraslih ne prehaja lobanjskih šivov (slika 2). Prisotnost hipodenzne komponente (znak vrtnica, angl. *swirl sign*) kaže na še nestrjeno kri (aktivno krvavitev) in slabšo prognozo (3). EDH lahko prehaja preko falksa in tentorija. Po drugi strani SDH predstavlja zbir krvi med duro in arahnoido. Na CT se kaže kot polmesečast zbir, ki je v akutni stopnji hiperdenzen, v subakutni stopnji pa je lahko izodenzen z možganovino in ga zato lahko tudi spregledamo. Kronična subduralna krvavitev je starejša od treh tednov in je na CT hipodenzna (slika 3), znotraj zbira pa lahko najdemo trakove, ki so znak ponavljajočih se krvavitev. Kasneje lahko pride tudi do kalcifikacije kroničnega SDH (videz oklepa, angl. *armored brain*) (3). Za razliko od EDH gre pri SDH večinoma za venso krvavitev, ki lahko prehaja preko šivov, ne



Slika 3. CT-posnetek glave, na katerem lahko opazimo manjša hipodenzna subduralna zbira nad konveksitetama obeh možganskih polobel (črni puščici), ki lahko predstavljata kronični subduralni krvavitvi ali higroma (prisotnost možgansko-hrbtenjačne tekočine v subduralnem prostoru). Trakasta hiperdenzna področja v sulkusih obojestransko (beli puščici) imajo značilen videz sveže subarahnoidne krvavitve.

prehaja pa preko duralnih venskih sinusov in falksa. SDH je obojestranski v kar 25 %, zato je treba natančno pregledati tudi področje, ki je na nasprotni strani udarca (fr. *contrecoup*) (9). Posledica EDH in SDH so lahko tako zvišan znotrajlobanjski tlak kot tudi različni pomiki možganovine.

Poškodba je lahko tudi vzrok za nastanek SAK, pri kateri za razliko od spontane (večinoma po raztrganju anevrizme) SAK navadno pride do venske krvavitve med arahnoido in žilnico (pia). Na CT lahko opazimo več trakastih hiperdenznih področij vzdolž sulkusov (najpogosteje frontalnih in parietalnih režnjev), lahko pa tudi v bazalnih cisternah – manjše količine pri dalj časa ležečem bolniku najlažje opazimo v interdunkularni cisterni (3, 10).

PARENHIM

Med poškodbe možganskega parenhima spadajo udarnine možganske skorje, difuzna možganska poškodba ter večje intraparenhimske krvavitve. Udarne možganov so redke, vendar pogosto smrtno. Najpogosteje sta prizadeta temporalni in frontobazalni predel možganov, pri čemer je prvi CT ob sprejemu lahko brez vidnih sprememb (8). Hemoragične udarnine možganov se kažejo kot hiperdenzne spremembe – sveže krvavitve, okoli katerih lahko zasledimo hipodenzni rob, ki predstavlja vazogeni edem (slika 4). Sčasoma spremembe v možganovini postanejo bolj očitne. Pogosto ob poškodbi parenhima najdemo pridruženo travmatsko SAK. Diferencialno diagnostično jih moramo ločiti od difuzne aksonske poškodbe (angl. *diffuse axonal injury*, DAI), ki se na CT lahko kaže zgolj kot difuzni edem možganov, lahko pa tudi z drobnimi krvavitvami na meji med skorjo in subkortikalno belo možganovino, v kaloznem korpusu ali v možganskem deblu. Za diagnozo nehemoragične DAI si pomagamo z MRI. DAI v možganskem deblu lahko spominja tudi na sekundarno (Duretovo) krvitev, ki nastane zaradi izrazite trans-



Slika 4. Levo frontalno so vidne drobne udarninske krvavitve z okolnim edemom (obkroženo črno). Desno temporooccipitalno je vidna nekoliko večja krvavitev v parenhim (puščica) s tankim hipodenznim pasom okolnega edema.

tentorialne herniacije in se kaže kot znotrajparenhimska krvitev v možganskem deblu, največkrat v ponsu oz. na prehodu ponsa v mezencefalon. Podobno se kažejo tudi večje intraparenhimske poškodbe, ki jih lahko srečamo v možganskem deblu, talamusu ali bazalnih ganglijah. Pri poškodbi glave lahko pride tudi do krvavitve v ventrikle, in sicer zaradi raztrganja subependimalnih ali horoidnih ven, kri pa lahko prodre v ventrikle tudi neposredno iz parenhima ali pa retrogradno preko izstopnih odprtin četrtega ventrikla.

EDEM

Travmatski edem lahko pomembno prispeva k povečani smrtnosti po poškodbi glave (3). Na možganski edem kažejo predvsem iztisnjeni sulkusi na konveksiteti možganov, zabrisana meja med sivo in belo možganovino ter utesnjeni ventrikli. Na prisotnost izrazitega difuznega edema možganovine kaže tudi znak belih malih možganov (nižja denziteta) supratentorialnih

možganskih struktur glede na dokaj ohra-njen videz malih možganov), ki pogosto pomeni nepovratno hipoksično okvaro oz. slabo prognozo (11). Bolnik je še posebej ogrožen, kadar gre za kombinacijo izrazi-tejšega edema možganovine in večjih krva-vitev v znotrajlobanjskem prostoru (3). Posledica možganskega edema in večjih znotrajlobanjskih zbirov je povišan zno-trajlobanjski tlak in nastanek herniacij. Anatomsko jih delimo na subfalcino, ascen-dentno/descendentno transtentorialno, ton-zilarno, transalarno in transkranialno. Pri vseh tipih herniacij moramo biti pozorni tudi na znake ishemijske, ki lahko nastane kot posledica večjih pomikov možganovine.

Subfalcina herniacija se kaže kot asi-metrija možganskih struktur v prečni rav-nini: premik girusa cinguli in septum peluciduma preko srednje črte na nasprot-no stran in utesnjen lateralni ventrikel, lahko z razširjenim lateralnim ventrikлом



Slika 5. Subfalcina herniacija. CT-preiskava pri bol-niku s poškodbo glave pokaže večji subduralni zbir na konveksiteti desne možganske polovice, ki je srednje denzitete in jo zato težko ločimo od prile-žne možganovine (črne puščice) – subakutni sub-duralni hematoma. Okolnji sulkusi in desni lateralni ventrikel so iztisnjeni, prisotna je herniacija osred-njih struktur pod falksom na levo stran.

na nasprotni strani zaradi ovire v obtoku možgansko-hrbtenjačne tekočine skozi odprtino Monroe (slika 5) (3, 8).

Pri descendentni transtentorialni her-niaciji opazimo pomik unkusa sredinsko (medialno) proti supraselarni cisterni, ob napredovanju pa se medialno pomakne tudi hipokampus, ki zoži cisterno ambiens in cisterno kvadrigemino ter lahko potisne mezencefalon na nasprotno stran (nasprotni cerebralni pedunkel lahko pritisne ob rob tentorija in povzroči hemiparezo na isti strani, kot je poškodba – ker navadno pri-čakujemo okvaro motorike na nasprotni strani od poškodbe možganov, v tem pri-meru govorimo o lažnem lokalizacijskem znaku oz. Kernohanovem pojavu) (12, 13). Ob obojestranski descendentni transtento-rialni herniaciji se oba temporalna režnja pomakneta proti tentorialni incizuri, v izra-zitejših primerih lahko optična kiazma in hipotalamus celo pritisneta ob turško sedlo. Mezencefalon je utesnjen in potisnjen navzdol, zmanjša se tudi kot med mezen-cefalonom in ponsom (3, 8).

Pri ascendentni transtentorialni hernia-ciji gre za pomik vermisa in polovic malih možganov skozi tentorialno incizuro nav-zgor. Prvi znak je utesnitev kvadrigemi-nalne in supracerebelarne cisterne, kasneje lahko pride do utesnitve četrtega ventrikla in posledično obstruktivnega hidrocefalu-sa, v zelo izrazitih primerih pa lahko ver-mis pritisne tudi na možgansko deblo (3).

Pri tonzilarni herniaciji gre za pomik tonzil malih možganov skozi veliko zatil-nično odprtino (lat. *foramen magnum*), kar se na prečnih rezih pokaže kot iztisnjen pro-stor možgansko-hrbtenjačne tekočine v viši-ni odprtine. Ocena je lažja na rekonstruk-cijah v sagitalni ravnini, kjer pri zdravem preiskovancu tonzili malih možganov ne segata več kot 5 mm izpod ravni odprtine.

Pri transalarni herniaciji pride do pre-hajanja možganovine čez veliko krilo zagozd-nice. Poznamo ascendentno, ki je pogostej-ša, in descendentno. Ascendentno povzroči

masa v srednji lobanjski kotanji, ki odrija temporalni režen navzgor in naprej ter lahko povzroči utesnitev notranje karotidne arterije ob sprednji klinoidni odrastek in posledično ishemijo v povirju sprednje in srednje možganske arterije. Descendentno transalarno herniacijo pa povzroči masa v sprednji lobanjski kotanji, ki odrija orbitalni girus in girus rektus čez kostni greben in lahko povzroči utesnitev srednje možganske arterije (3, 14).

MAGNETNA REZONANCA

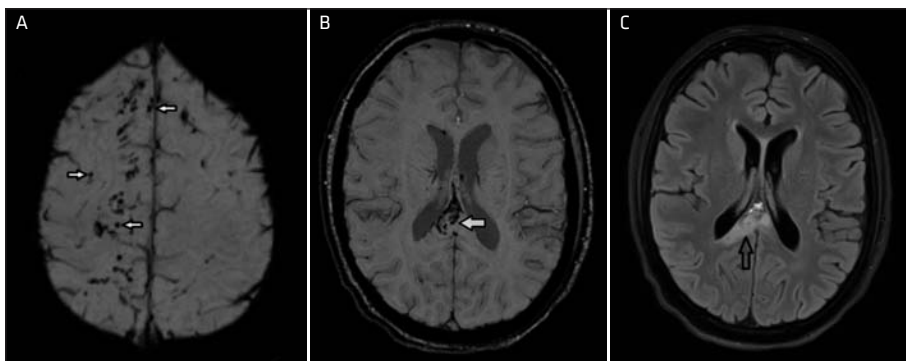
MRI ima pri bolniku s poškodbo glave dopolnilno vlogo. Uporablja se predvsem v subakutni in kronični stopnji poškodbe glave ob neznčilnih spremembah na CT in slabšanju simptomatike bolnika. MRI ima v primerjavi s CT večjo občutljivost za zaznavanje krvavitv (SAH, EDH, SDH, krvavitve v parenhim), nehemoragičnih udarnin možganovine, poškodbe aksonov in poškodb globokih možganskih struktur (15).

Ekstraaksialne krvavitve niso indikacije za MRI. Kadar diagnoza EDH na CT ni dokončna, jo lahko potrdimo z MRI, pri čemer ima sveža krvavitev na T2-poudarjenem slikanju najpogostejše signal nizke intenzitete, na T1 srednje do visoke inten-

zitetete, na T2-poudarjenem slikanju z izbrisom signala vode (angl. *fluid attenuated inversion recovery*, FLAIR) pa je hiperintenzivna. Signal krvavitve na MRI se sicer s časom precej spreminja in je odvisen tako od stanja hemoglobina (oksi-, deoksi- ali methemoglobin) kot od integritete eritrocitov ter značilnosti MRI-sekvenc. MRI natančno prikaže tudi duro. Na MRI lažje najdemo manjše SDH, ki jih na CT ne vidimo, vendar so tako majhni SDH redko klinično pomembni.

MRI je v primerjavi s CT pri odkrivanju udarnin možganov občutljivejši, vendar je v akutni stopnji za ta namen le redko potreben. Pri urgentni obravnavi bolnika se redko poslužujemo MR zaradi daljšega časa zajemanja slik, nujnega sodelovanja (oz. anestezije) preiskovanca ter strogih kriterijev delovanja v magnetnem polju (3, 16).

DAI nastane zaradi rotacijsko akcelerijske/decelerijske sile (npr. pri prometni nesreči), ki privede do poškodb aksonov (slika 6). Lokacije okvar pri DAI so najpogostejše na stiku možganske skorje in subkortikalne bele možganovine, v kaloznem korpusu ter v možganskem deblu. Na MRI lahko pri DAI razlikujemo hemoragične in nehemoragične okvare, pri čemer so



Slika 6. Dovzetnostno poudarjeno magnetoresonančno slikanje pri bolniku s hudo poškodbo glave (ocena po glasgowski koma lestvici ob sprejemu 3) pokaže drobna pikčasta področja izpada signala (bele puščice) na značilnih mestih kortikosubkortikalno frontoparietalno (A) ter v spleniumu kaloznega korpusa (B). Opisane hipointenzivne spremembe so posledica prisotnosti razpadnih produktov hemoglobina po mikrokrvavitvah. Slikanje s T2-poudarjenim slikanjem z izbrisom signala vode (angl. *fluid attenuated inversion recovery*, FLAIR) pri istem bolniku pokaže zvišan signal v predelu spleniuma (črna puščica) – edem (C).

hemoragične povezane s slabšo prognozo bolnika (17, 18). Majhne hemoragične spremembe si najbolje prikažemo z uporabo dovzetnostno poudarjenega slikanja (angl. *susceptibility weighted imaging*, SWI) (3, 11). Poleg DAI lahko z MRI natančneje prikažemo tudi preostale poškodbe globokih možganskih struktur – največkrat gre za krvavitve v talamus ali bazalna jedra (19).

POŠKODBE ŽILJA

Travmatske poškodbe žilja spadajo med nevarne zaplete, ki se pogosto končajo s smrtjo. Čeprav so travmatske poškodbe žilja redke, predstavljajo vodilni vzrok kapi pri bolnikih, mlajših od 45 let (12). Poškodbe žilja največkrat spremljajo zlome lobanjske baze. Med poškodbe žilja štejemo arterijsko disekcijo, anevrizmo in psevdanevrizmo, travmatsko karotidno-kavernozno fistulo (KKF), zaporo arterije in trombozo duralnih venskih sinusov. Najpogostejše poškodovana je notranja karotidna arterija, predvsem na mestih pritrditve – ob vstopu v karotidni kanal ob bazi piramide ter ob izstopišču iz kavernoznega sinusa pod sprednjim klino-idnim odrastkom. Ob hudi poškodbi vratu in pridruženem zlomu transversnih odrastkov vretenc moramo posumiti tudi na poškodbo vertebralne arterije. Za prikaz žilja so v preteklosti uporabljali predvsem digitalno subtrakcijsko angiografijo, danes pa jo je večinoma nadomestila CT-angiografija, redkeje magnetnoresonančna angiografija. CT-venografija (pri poškodovancih redkeje MR-venografija) se uporablja za potrditev tromboze venskega sistema.

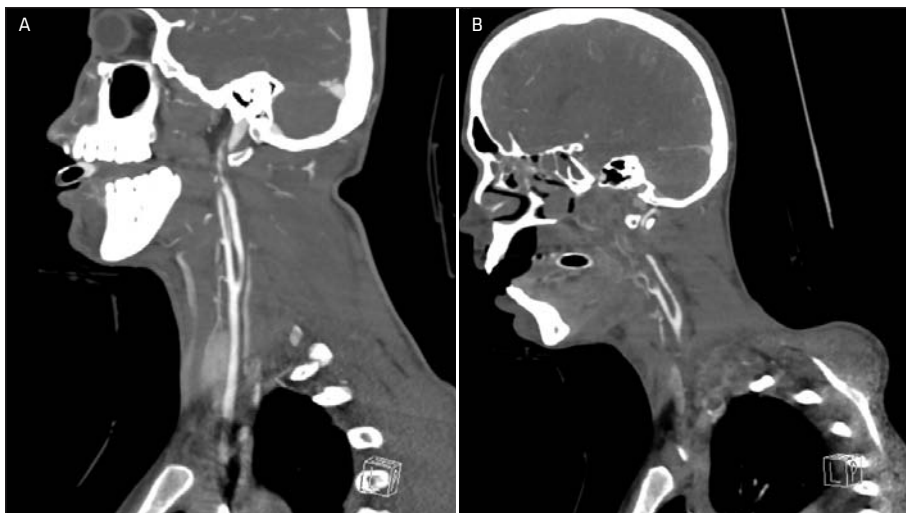
Travmatska disekcija pomeni razslojitev žilne stene zaradi krvavitve med intimo in medijo prizadete arterije (intramuralna krvavitev), ki nastane zaradi rotacijske ali tope sile pri poškodbi glave ali vratu (slika 7). Je redka poškodba, ki nastane pri manj kot 1 % poškodovancev (8). Disekcija se največkrat pojavi na vertebralni arteriji, in sicer med lobanjsko bazo in prvim vratnim vretencem (3). Angiografsko ob disek-

ciji največkrat prikažemo nepravilno zožitve ali zaporo žilne svetline, lahko pa tudi dvojno svetlino. Intramuralno krvavitev najlažje dokažemo z uporabo T1-poudarjenega MRI s tehniko izbrisa signala maščobe. Zapora arterije je lahko neposredna posledica poškodbe, lahko pa nastane posredno kot posledica disekcije ali žilnega spazma (3, 8). Tudi za zgodnje odkrivanje morebitnih ishemičnih sprememb v možganovni je MRI precej občutljivejša metoda, predvsem z uporabo difuzijsko obteženega magnetnoresonančnega slikanja (angl. *diffusion weighted imaging*, DWI) (3, 20).

Pri travmatski KKF pride do neposredne povezave med notranjo karotidno arterijo in kavernoznim sinusom. Fistula se kaže kot razširjen kavernočni sinus s hkratno kongestijo zgornje oftalmične vene ali zgornjega petroznega sinusa. Tako MR-angiografija kot CT-angiografija lahko prikažeta arterijski pretok v kavernoznem sinusu ali oftalmični veni (8, 21). Klinično se KKF kaže kot utripajoči eksoftalmus, hitro napredujoča izguba vida, tinitus, pareze možganskih živcev in hemoza (21).

Anevризme (žariščna izbočenja ali razširitve žilne svetline, zamejene z vsemi tremi plastmi žilne stene) in psevdanevrizme (poškodbe žilne stene, kjer krvavitev lokalno zamejuje adventicija ali le perivaskularna mehka tkiva) so pri poškodovancih redke, največkrat pa nastanejo na notranji karotidni arteriji v poteku kavernoznega sinusa, redkeje na sprednji možganski arteriji. Simptomi so največkrat posledica pritiska na okolne strukture (arterije ali živce). Anevризme in psevdanevrizme prikažemo s CT-angiografijo (3, 8).

Pri venski trombozi so klinični znaki neznačilni. Največje tveganje za nastanek tromboze duralnega venskega sinusa predstavlja zlom v bližini samega sinusa. Na nativnem CT lahko posumimo na vensko trombozo ob zvišani oslabitvi znotraj sinusa. Za potrditev uporabljamo CT- ali MR-venografijo, kjer vensko trombozo vidimo



Slika 7. Pri bolniku s poškodbo glave CT-angiografija (levo) pokaže koničasto zoženje in nepravilne oblike v distalnem poteku desne notranje karotidne arterije na vratu (puščica) – videz disekcije. Kontrolna CT-angiografija osem dni kasneje (desno) pokaže zaporo arterije na mestu disekcije.

kot polnitveno okvaro znotraj sinusa (znak prazne črke delta, angl. *empty delta sign*) (3, 22).

ZAKLJUČEK

Radiološke slikovnopreiskovalne tehnike imajo pomembno vlogo pri obravnavi bolnikov s poškodbo glave, ki pogosto potre-

bujejo bolnišnično zdravljenje. Preiskava izbora v urgentni obravnavi takšnih bolnikov je CT glave brez kontrastnega sredstva, medtem ko je ob sumu na poškodbo žilja treba opraviti tudi CT-angiografijo. MRI glave se ob urgentnih stanjih redko uporablja, smiselno pa je predvsem pri bolnikih s sumom na travmatsko aksonsko poškodbo.

LITERATURA

1. Gradišek P. Narava in patofiziologija hude možganske poškodbe: Kaj mora vedeti urgentni zdravnik? In: Vajd R, Gričar M, eds. Urgentna medicina – izbrana poglavja: 23. mednarodni simpozij o urgentni medicini. Portorož: Slovensko združenje za urgentno medicino; 2016. p. 45–53.
2. Polanc J. Diagnostika in kirurška oskrba hujših poškodb glave in možganov [internet]. [citirano 2021 Mar 5]. Dosegljivo na: https://www.bolnisnica-go.si/system/files/polanc_-_poskodbe_glave_in_mozganov.pdf
3. Osborn A, Hedlund G, Salzman K. Osborn's brain, second edition. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 13–87.
4. Shaikh F, Waseem M. Head trauma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [internet]; c2021 [citirano 2021 Mar 7]. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430854/>
5. Adhikari K, Gupta MK, Pant AR, et al. Clinical patterns and computed tomography findings in patients with cranio-cerebral trauma in tertiary hospital in Eastern Nepal. J Nepal Health Res Counc. 2019; 17 (1): 56–60.
6. Fracture and Hemorrhage [internet]. Carmody RF; c2016 [citirano 2021 Mar 7]. Dostopno na: <https://radiologykey.com/fracture-and-hemorrhage/>
7. Chawla H, Yadav RK, Griwan MS, et al. Sensitivity and specificity of CT scan in revealing skull fracture in medico-legal head injury victims. Australas Med J. 2015; 8 (7): 235–8.
8. Parizel PM, Philips CD. Traumatic neuroemergency: Imaging patients with traumatic brain injury—an introduction. In: Hodler J, Kubik-Huch RA, von Schulthess GK, eds. Diseases of the brain, head and neck, spine 2020–2023: Diagnostic imaging [internet]. Cham (CH): Springer; c2020 [citirano 2021 Mar 7]. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554351/>
9. Lee J, Park JH. Clinical characteristics of bilateral versus unilateral chronic subdural hematoma. Korean J Neurotrauma. 2014; 49–54.
10. Lee B, Newberg N. Neuroimaging in traumatic brain imaging. NeuroRx. 2005; 2 (2): 372–83.
11. Krishnan P, Chowdhury SR. »White cerebellum« sign – a dark prognosticator. J Neurosci Rural Pract. 2014; 5 (4): 433.
12. Lolli V, Pezzullo M, Delpierre I, et al. MDCT imaging of traumatic brain injury. Br J Radiol. 2016; 89 (1061): 20150849.
13. Simonin A, Levivier M, Nistor S, et al. Kernohan's notch and misdiagnosis of disorders of consciousness. BMJ Case Rep. 2014.
14. Transalar herniation [internet]. Radiopaedia; c2005–2020 [citirano 2021 Apr 7]. Dosegljivo na: <https://radiopaedia.org/articles/transalar-herniation>
15. Mutch CA, Talbott JF, Gean A. Imaging evaluation of acute traumatic brain injury. Neurosurg Clin N Am. 2016 Oct; 27 (4): 409–39.
16. Hesselink JR, Dowd CF, Healy ME, et al. MR imaging of brain contusions: A comparative study with CT. AJR Am J Roentgenol. 1988; 150 (5): 1133–42.
17. Paterakis K, Karantanis AH, Komnos A, et al. Outcome of patients with diffuse axonal injury: The significance and prognostic value of MRI in the acute phase. J Trauma. 2000; 49 (6): 1071–5.
18. Liu J, Kou Z, Tian Y. Diffuse axonal injury after traumatic cerebral microbleeds: An evaluation of imaging techniques. Neural Regen Res. 2014; 9 (12): 1222–30.
19. Bansal M, Sinha VD, Bansal J. Diagnostic and prognostic capability of newer magnetic resonance imaging brain sequences in diffuse axonal injury patient. Asian J Neurosurg. 2018; 13 (2): 348–56.
20. Sharma P, Hegde R, Kulkarni A, et al. Traumatic vertebral artery injury: A review of the screening criteria, imaging spectrum, mimics, and pitfalls. Pol J Radiol. 2019; 84: e307–18.
21. Rutman AM, Vranic JE, Mossa-Basha M. Imaging and management of blunt cerebrovascular injury. Radiographics. 2018; 38 (2): 542–63.
22. Singh Ghuman, M, Salunke P, Sahoo SK, et al. Cerebral venous sinus thrombosis in closed head trauma: A call to look beyond fractures and hematomas!. J Emerg Trauma Shock. 2016; 9 (1): 37–8.

Tina Pavlin¹, Eva Drmota², Nina Kovačević³, Sebastjan Merlo⁴

Paraaortna in pelvična limfadenektomija pri začetnem epitelijskem raku jajčnikov

Para-aortic and Pelvic Lymphadenectomy in Early-stage Epithelial Ovarian Cancer

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: epitelijski rak jajčnikov, paraaortna limfadenektomija, pelvična limfadenektomija, pooperativna kemoterapija, zamejitven poseg

Epitelijski rak jajčnikov je najpogostejši ginekološko-onkološki vzrok smrti pri ženskah. Zaradi neznatne simptomatike je v 75 % odkrit v napredovali stopnji bolezni. Slikovna diagnostika ne zagotavlja ustrezne zanesljivosti za oceno obsega bolezni. Kot varna diagnostična metoda se je izkazala diagnostična laparoskopija. Zdravljenje začetnega stadija raka jajčnikov je kirurško in zajema histerektomijo z obojestransko adnektomijo, omentektomijo, biopsijo potrebušnice (peritoneja) ter pelvično in paraaortno limfadenektomijo. Pelvična in paraaortna limfadenektomija sodita med zamejitvene posege z višjo stopnjo obolevnosti zaradi večjega deleža pooperativnih zapletov. Pri določenih histoloških tipih, stopnjah diferenciacije, prisotnosti ascitesa in obojestranskih adneksalnih tumorjev obstaja večja verjetnost zasevkov v bezgavkah. Izvedba sistematične limfadenektomije glede na podatke iz literature zmanjša možnost ponovitve bolezni in izboljša preživetje. Dopolnilno sistemsko zdravljenje pri najugodnejšem zamejitvenem posegu ne pripomore k boljšemu preživetju, smiselno pa je pri bolnicah, ki imajo višjo stopnjo diferenciacije ali nimajo opravljene zamejitvene operacije bezgavk. V članku podrobneje preučimo smiselnost pelvične in paraaortne limfadenektomije ter kirurške tehnike, dejavnike tveganja za zasevke v bezgavkah, operativne zaplete ob posegu in preživetje pri bolnicah z limfadenektomijo pri začetnem raku jajčnikov.

ABSTRACT

KEY WORDS: epithelial ovarian cancer, pelvic lymphadenectomy, paraaortic lymphadenectomy, post-operative chemotherapy, cytoreductive procedure

Epithelial ovarian carcinoma is the main gynaecological-oncological cause of death for women. Due to unspecific symptoms, 75% of cases are discovered in the advanced stage

¹ Tina Pavlin, dr. med., Sektor za internistično onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; tinapavlin.6@gmail.com

² Eva Drmota, dr. med., Bolnišnica za ženske bolezni in porodništvo Postojna, Prečna ulica 4, 6230 Postojna

³ Doc. dr. Nina Kovačević, dr. med., Oddelek za ginekološko onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za ginekologijo in porodništvo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁴ Doc. dr. Sebastjan Merlo, dr. med., Oddelek za ginekološko onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za ginekologijo in porodništvo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

of the disease. Imaging techniques have not been proven reliable enough to assess the extent of the disease. On the other hand, diagnostic laparoscopy presents as a safe diagnostic method. The treatment of early-stage ovarian cancer is surgical and includes a hysterectomy with bilateral adnexectomy, an omentectomy, a biopsy of the peritoneum with a pelvic and paraaortic lymphadenectomy. Pelvic and paraaortic lymphadenectomy are cytoreductive procedures with higher morbidity due to a higher number of postoperative complications. Specific histological types, grade, presence of ascites and bilateral adnexal tumours have a higher probability of metastasis in the lymph nodes. Based on literature, systematic lymphadenectomy reduces the possibility of disease recurrence and improves overall survival. Additional systemic therapy with optimal cytoreductive operation does not contribute to a better overall survival, nevertheless, it is a good treatment option for patients with a higher disease grade or patients who did not receive a cytoreductive operation of the lymph nodes. In the article, we review the usefulness of a pelvic and paraaortic lymphadenectomy and different surgical techniques, the risk factors for lymph node metastasis, operative complications, and the survival of patients receiving pelvic and paraaortic lymphadenectomy.

UVOD

Rak jajčnikov je peti najpogostejši rak in četrta najpogostejši vzrok smrti pri ženskah (1). V Sloveniji je invazivni rak jajčnikov na osmem mestu po pogostosti med ženskami, leta 2017 je za rakom jajčnikov zbolelo 157 žensk (15,1/100.000 žensk), umrlo pa 136 (13,4/100 000 žensk). V zadnjih letih se incidenca raka jajčnikov zmanjšuje, narašča pa incidenca mejno malignih rakov jajčnikov (2, 3). Do 90 % rakov jajčnikov je epiteljskega izvora (1). Zaradi neznačilnega poteka bolezni so v 75 % odkriti v napredovalem stadiju, pri čemer je petletno preživetje le 39 %. Pri začetnem stadiju bolezni je petletno preživetje 92 %. Leta 2017 je bilo v Sloveniji odkritih 21 % (33/157) rakov jajčnikov v začetnem stadiju, 78,3 % (123/157) v razsejanem stadiju, v enem primeru pa stadij ni bil znan (2). Genetsko nagnjenost k razvoju epiteljskega raka jajčnikov ima 15 % žensk. Pri tem sta bila gen dovzetnosti za raka dojke 1 (angl. *breast cancer gene 1*, BRCA1) in gen dovzetnosti za raka dojke 2 (angl. *breast cancer gene 2*, BRCA2) prepoznana kot gena, ki vplivata na nastanek 65–75 % dednih rakov jajčnikov (4).

Diagnostika raka jajčnikov obsega ginekološki pregled z vaginalnim UZ, določitev tumorskih biooznačevalcev rakavega antigena 125 (angl. *cancer antigen 125*, CA125), človeške nadmodkovne beljakovine 4 (angl. *human epididymis protein 4*, HE4), indeks ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm), histopatološko diagnostiko tumorja, UZ trebuha, RTG prsnega koša in občasno CT (3, 5). Pri mlajših bolnicah je smiselno dodatno določanje α -fetoproteina (AFP), inhibina in β -horiogonadotropina (angl. *β -human chorionic gonadotropin*, β -HCG) za izključitev germinalnih in stromalnih tumorjev (6). Kljub kombinirani diagnostiki z določanjem CA125, uporabo vaginalnega UZ in dvoročnim pregledom se le pri 30–45 % bolezni odkrije v zgodnji stopnji (7). Začetni rak jajčnikov je omejen na rodila in malo medenico. Klasifikacija FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics), prikazana v tabeli 1, prišteva v to skupino stadije I–IIA (8).

Rak jajčnikov se širi predvsem limfogeno. Pojavnost zasevkov v bezgavkah je pri zgodnjem epiteljskem raku jajčnikov 14,3 %, pri tem je 7,1 % zasevkov samo v paraaortnih bezgavkah, 2,9 % le v pelvičnih bezgavkah,

4,3 % pa v obeh regijah (5, 8). Vloga limfadenektomije pri obravnavi raka jajčnikov je v oceni razširjenosti bolezni in določitvi stadija FIGO, na podlagi katerega sledi prilagoditev nadaljnjega zdravljenja (10).

Zamejitvena operacija pri raku jajčnikov vključuje eksplorativno laparotomijo z izpirkom peritonealne votline, obojestransko salpingo-ooforektomijo, histerektomijo, biopsije peritoneja, omentektomijo ter pelvično in paraaortno limfadenektomijo (do ledvičnih ven) (5, 8). Do nedavnega je bila uve-

ljavljena kirurška tehnika laparotomija, številne retrospektivne raziskave in meta-analize pa so pokazale, da je laparoskopija varna tehnika s podobnimi kirurškimi izidi (5).

Pooperativno sledi dopolnilna kemoterapija na osnovi platine in taksanov, ki je indicirana pri začetnih stadijih z visokim tveganjem. Le pri bolnicah z nizkim tveganjem (stadij IA in IB, stopnja diferenciacije 1) z negativnim izvidom po opravljeni zamejitveni operaciji se svetuje zgolj sledenje (5).

Tabela 1. Stadiji glede na klasifikacijo FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics) pri epitelijskem raku jajčnikov, primarnem peritonealnem raku in raku jajcevodov (9). IC – intersticijsko vnetje mehurja (angl. *interstitial cystitis*).

Stadij	Opis
I	Omejena rast tumorja na jajčnika.
IA	Tumor, omejen na en jajčnik (ovojnica neprizadeta) ali jajcevod, tumorja ni na površini jajčnika ali jajcevoda, brez malignih celic v ascitesu ali peritonealnem izpirku.
IB	Tumor, omejen na oba jajčnika (ovojnica neprizadeta) ali jajcevoda, tumorja ni na površini jajčnika ali jajcevoda, brez malignih celic v ascitesu ali peritonealnem izpirku.
IC	Tumor, omejen na en ali oba jajčnika ali jajcevoda, ter: • kontaminacija ob kirurškem posegu (IC1), • predrtje ovojnice pred operacijo ali tumor na površini jajčnika ali jajcevoda (IC2) ali • maligne celice v ascitesu ali peritonealnem izpirku (IC3).
II	Omejena rast tumorja na enem ali obeh jajčnikih ali jajcevodih s širjenjem v medenico ali primarni peritonealni rak.
IIA	Širjenje in/ali zasevki v/na maternici in/ali jajcevodih in/ali jajčnikih.
IIB	Širjenje na ostala intraperitonealna tkiva medenice.
III	Tumor, omejen na en ali oba jajčnika ali jajcevoda, ali primarni peritonealni rak, s citološko ali histološko potrjenimi peritonealnimi zasevki zunaj medenice in/ali zasevki v retroperitonealnih bezgavkah.
IIIA	Samo pozitivne retroperitonealne bezgavke (citološko ali histološko potrjene): • zasevki, velikosti do 10 mm v največjem premeru (IIIA1-i), • zasevki, večji od 10 mm v največjem premeru (IIIA1-ii) ali • mikroskopski peritonealni zasevki zunaj medenice, s pozitivnimi retroperitonealnimi bezgavkami ali brez (IIIA2).
IIIB	Makroskopski peritonealni zasevki zunaj medenice, velikosti do 2 cm, z zasevki v retroperitonealnih bezgavkah ali brez.
IIIC	Makroskopski peritonealni zasevki zunaj medenice, velikosti več kot 2 cm, z zasevki v retroperitonealnih bezgavkah (vključuje širitev tumorja na ovojnico jeter in vranice brez zajetosti parenhima) ali brez.
IV	Oddaljeni zasevki (izključeni peritonealni zasevki).
IVA	Poprsnični izliv s pozitivno citologijo.
IVB	Parenhimski zasevki in zasevki v organih izven trebušne votline (vključuje dimeljske bezgavke in bezgavke zunaj trebušne votline).

SLIKOVNA DIAGNOSTIKA

Pri postavitvi diagnoze in opredelitvi obsega bolezni uporabimo slikovno diagnostiko. UZ omogoča opredelitev tumorske mase, saj lahko s pomočjo določenih morfoloških značilnosti ločimo med benignimi in malignimi okvarami. Vendar pa UZ ne more oceniti stadija bolezni, saj je občutljivost doplerskega UZ pri določanju peritonealnih zasevkov zgolj 69 % v primerjavi s 95 % na MR in 92 % na CT (11). CT je standardna metoda pri oceni razširjenosti raka jajčnikov. Pomanjkljivost te metode je slabša občutljivost pri zasevkih, manjših od 1 cm, medtem ko je občutljivost pri zasevkih, večjih od 1 cm, 85–93 % (12).

LIMFADENEKTOMIJA

Jajčnik ima kot organ zapleteno limfno drenažo. Limfa se drenira v dimeljske, zunanje in notranje iliakalne ter obturatorne bezgavke. Drenira se tudi preko infundibulopelvične vezi v paraaortne bezgavke (13). Sistematična limfadenektomija tako vključuje odstranitev paraaortnih bezgavk vse do višine leve in desne ledvične vene (14). Pojavnost zasevkov v bezgavkah se pri zgodnjem epitelijemskem raku jajčnikov v literaturi precej razlikuje, in sicer je ocenjena na 14,3 % (razpon 6,1–29,6 %). Pri tem je 7,1 % zasevkov v paraaortnih bezgavkah, 2,9 % v pelvičnih, 4,3 % pa v obeh regijah bezgavk (15, 16).

Prizadetost pelvičnih in paraaortnih bezgavk pomembno vpliva na preživetje žensk z začetnim rakom jajčnikov. Sistematična limfadenektomija predstavlja del zamejitvene operacije in ima prognozično ter tudi morebitno terapevtsko vlogo. Prav zaradi tega sta pelvična in paraaortna limfadenektomija že od leta 1988 vključeni v klasifikacijo FIGO (17).

Cilj limfadenektomije je odstraniti sumljive in klinično nesumljive, vendar morebitno mikroskopsko pozitivne bezgavke. Na podlagi histopatološke ocene odstranjenih bezgavk se sprejme odločitev o nadaljnjem zdravljenju. Po navadi se pel-

vična in paraaortna limfadenektomija izvaja z laparotomijo, vendar se zadnje čase uveljavljata tudi laparoskopska in robotska kirurška tehnika (18).

V letih 2018 in 2019 je bilo na Onkološkem inštitutu v Ljubljani operiranih 14 žensk z epitelijemskim rakom jajčnikov, pri katerih je bila bolezen omejena na malo medenico. Pri vseh ženskah je bila kot del zamejitvene operacije opravljena sistematična limfadenektomija do višine ledvičnih ven. Pri vseh kirurških posegih je bil uporabljen odprt kirurški pristop preko mediane laparotomije. Povprečno je bilo skupaj odstranjenih 32 bezgavk (razpon 12–67), od tega pelvično povprečno 11 bezgavk (razpon 3–22), paraaortno 21 bezgavk (razpon 5–45). Pelvično in paraaortno so bile bezgavke pozitivne pri 28,5 % žensk (4/14 žensk), samo paraaortno pa pri 14 % (2/14 žensk).

Raziskave so pokazale, da v primeru nepopolne zamejitvene operacije, in sicer pri izvedbi zgolj histerektomije z obojestransko salpingo-ooforektomijo, najdemo zasevke v bezgavkah v 16–42 % primerov (19).

DEJAVNIKI TVEGANJA ZA ZASEVKE V BEZGAVKAH

Izsledki dosedanjih raziskav na področju limfadenektomije pri zgodnjem raku jajčnikov se precej razlikujejo. Pogostost zasevkov je bila ocenjena na 14,3 % za bolnice s stadijem I ali II. Histološki tip, stopnja diferenciacije, obojestranska adneksalna bolezen, menopavzni status, povišana predoperativna vrednost CA125, prisotnost ascitesa in prizadetost bezgavk na slikovnih preiskavah so predstavljali večjo verjetnost za zasevke v bezgavkah (17, 20). Najpogostejše so se zasevki nahajali v paraaortnih bezgavkah (21).

ŠTEVILO ODSTRANJENIH BEZGAVK IN PREŽIVETJE

Pri začetnem epitelijemskem raku jajčnikov se svetuje popolna pelvična in paraaortna

limfadenektomija. Število bolnic, pri katerih je bila opravljena odstranitev bezgavk, se razlikuje od raziskave do raziskave, prav tako število odstranjenih bezgavk in vpliv na preživetje. Povprečno število bezgavk, ki se nahajajo v pelvičnem in paraaortnem področju, je 77 (49–129) (22). Nekatere raziskave so ugotovile, da se z višjim številom odstranjenih bezgavk preživetje izboljša, pri tem pa najboljše število odstranjenih bezgavk še ni znano (23). Le Cheng in sodelavci so ugotovili nasprotno, in sicer, da število odstranjenih bezgavk ni imelo vpliva na dolžino preživetja (24).

Yamazaki je ugotovil, da je limfogeno širjenje bolezni prisotno pri 6 % bolnic, pri katerih so opravili pelvično in paraaortno limfadenektomijo. V skupini bolnic, pri katerih niso izvedli limfadenektomije oz. so jim odstranili zgolj pelvične bezgavke, je bilo limfogeno širjenje bolezni prisotno pri 25 % bolnic (25). V zadnjih letih delež opravljenih limfadenektomij kot del zamejitvenega posega narašča, in sicer s 34,5 na 75 % (24, 26, 27).

V raziskavi, ki so jo opravili Wei in sodelavci, je bilo povprečno odstranjenih 19 do 41 pelvičnih bezgavk in 14 do 21 paraaortnih bezgavk (28). Pri bolnicah z začetnim stadijem raka jajčnikov, brez zasevkov v pelvičnih bezgavkah, so bili zasevki v paraaortnih bezgavkah prisotni pri 7,3 % bolnic. Pri bolnicah, ki niso imele prizadetih paraaortnih bezgavk, so bili zasevki v pelvičnih bezgavkah odkriti pri 2,7 % (29). Najpogosteje so bile pozitivne obturatorne bezgavke (30).

Timmermans in sodelavci so v raziskavi ocenjevali petletno in desetletno celokupno preživetje bolnic z začetnim stadijem raka jajčnikov in ugotovili, da se je petletno preživetje povečalo s 74 % med letoma 1989 in 1993 na 79 % med letoma 2009 in 2014. Desetletno preživetje se je povečalo z 62 % med letoma 1989 in 1993 na 67 % med letoma 2004 in 2008. Vzrok za daljše preživetje so pripisali obsežnejši zamejit-

veni operaciji z dodatno odstranitvijo bezgavk ter dopolnilni kemoterapiji. Višje preživetje je možno pripisati tudi napredku na področju slikovnih preiskav ter spremenjeni klasifikaciji v opisanih časovnih obdobjih. Kljub napredku v diagnostično-terapevtskih postopkih pa je zadnjih 25 let celokupno preživetje za vse stadije raka jajčnikov nespremenjeno in znaša 29 % (31). Metaanaliza, ki so jo opravili Chiyoda in sodelavci, je pokazala, da limfadenektomija izboljša celokupno preživetje, ne izboljša pa preživetja brez ponovitve bolezni (16).

PRIMERJAVA OPERATIVNEGA ZDRAVLJENJA

Pri kirurški oskrbi začetnih stadijev epiteljskega raka jajčnikov uporabljamo laparotomijo, ekstrapéritonealno in transperítonealno laparoskopijo ter ekstrapéritonealno in transperítonealno robotsko vodeno laparoskopijo. Pri raku jajčnikov je še vedno najbolj uveljavljen pristop mediana laparotomija. Opravljenih je bilo mnogo raziskav, ki so preučevale vlogo laparoskopije pri obravnavi raka jajčnikov. Izsledki raziskav so pokazali, da je bil pri laparoskopiji potreben daljši operativni čas, krajši čas bolnišnične oskrbe, manjša medoperativna izguba krvi, manjši nastanek zarastlin, krajše obdobje do pričetka kemoterapije, manjša poraba protibolečinskih zdravil medoperativno in pooperativno ter hitrejša rehabilitacija kot pri laparotomiji (32–36). Prav tako je bilo ugotovljeno, da je bil prikaz tumorja zaradi možnosti povečave boljši pri laparoskopiji (37). Delež minimalno invazivnih operacij se je v zadnjih desetih letih povečal s 3,9 % na 13,5 % (38). Delež pooperativnih zapletov je bil večji pri laparotomijah, in sicer 35,4 %, pri laparoskopijah 20,3 %, delež medoperativnih zapletov pa se ni razlikoval (35, 38). Kljub vsemu navedenemu ne gre spregledati prednosti laparotomije, pri kateri je manjša verjetnost predrtja tumorja, ni možnosti zasevkov na mestih troakarjev in je boljša možnost

ocene zasevkov v peritonealni votlini, saj lahko kirurg pretipa sumljive spremembe (37, 38).

Kot slabosti laparoskopije so se izkazale maligna vsaditev tkiva in nastanek zasevkov na mestu vstavljenih troakarjev ter večja verjetnost razlitja tumorja v trebušni votlini. Večina raziskav ni dokazala zasevkov pri vstopnih mestih kirurških inštrumentov pri začetnih rakah jajčnikov, medtem ko se tveganje za zasevke poveča pri napredovalih stadijih bolezni (32, 35). Raziskave so pokazale pomembno zmanjšanje verjetnosti za zasevke na mestih vstavljenih troakarjev z uporabo endovreč ter previdnim ravnanjem s kirurškim preparatom (39).

MEDOPERATIVNI IN POOPERATIVNI ZAPLETI

Veliko raziskav je preučevalo medoperativne in pooperativne zaplete pri zamejitvenih operacijah raka jajčnikov, ki so vključevale pelvično in paraaortno limfadenektomijo. Najpogostejši medoperativni zapleti so bile poškodbe velikih žil, živcev, sečil in prebavil (10, 33). Omara in sodelavci pri laparoskopskih operacijah niso navedli večje verjetnosti za medoperativne zaplete. Pri laparotomiji pa je v njegovi raziskavi 20 % bolnic potrebovalo transfuzijo koncentriranih eritrocitov. Gad in sodelavci so ugotovili, da je do medoperativnega predrtja ali razlitja tumorja jajčnikov prišlo v 20 % primerov pri laparoskopiji in v 13,3 % primerov pri laparotomiji (37).

Delež pooperativnih zapletov se je med raziskavami precej razlikoval (28, 32, 40). Različni avtorji navajajo pojav okužb in dehiscenc pooperativne rane, zaporo črevesja, limfedem, globoko vensko trombozo in pljučno embolijo v pooperativnem obdobju (33). Po laparoskopski operaciji raka jajčnikov je 20 % bolnic navajalo limfedem stopnje I. Laparotomijski pristop je bil, po pregledu izsledkov raziskav, povezan s prisotnostjo limfedema spodnjih okončin v 7–40 %, povprečen čas do pojava limf-

edema pa je bil 15 mesecev. Limfedem je bil odvisen od števila odstranjenih bezgavk (več kot 28) (41–43). Na njegov pojav so vplivali tudi vrsta sistemske terapije, višji stadij bolezni in pooperativna radioterapija (42, 43).

OPERACIJA Z NAMENOM OHRANITVE PLODNOSTI IN LIMFADENEKTOMIJA

Približno 10 % žensk zboli za rakom jajčnikov pred dopolnjenim 40. letom. Nekatere bolnice želijo ohraniti plodnost kljub potrjeni bolezni in predvidenemu onkološkemu zdravljenju (44). Pri bolnicah, ki še želijo zanositi in so v začetnem stadiju raka jajčnikov, se lahko odstrani le bolezensko spremenjen jajčnik, medtem ko se maternica in nasprotnostranski jajčnik ohranita. Ker je določitev stadija raka jajčnikov bistvenega pomena, se istočasno odvzame izpirek iz male medenice ter opravi omentektomija, pelvična in paraaortna limfadenektomija ter biopsija peritoneja. Po zaključenem reproduktivnem obdobju se svetuje salpingo-ooforektomija in histerektomija. Takšen način zdravljenja ni standarden in pri njem obstaja večja verjetnost ponovitve bolezni (5, 45).

28 % žensk, ki je imelo zdravljenje prilagojeno ohranitvi plodnosti, je imelo ponovitev bolezni v nasprotnostranskem jajčniku znotraj 22 mesecev po postavitvi diagnoze (44).

BIOPSIJA VAROVALNE BEZGAVKE

Limfadenektomija je kirurški poseg s številnimi zapleti, zato je bilo v zadnjih letih narejenih veliko raziskav o učinkovitosti biopsije varovalne bezgavke z namenom kirurške zamejitve raka jajčnikov (14). Sistematična limfadenektomija ima v primerjavi z biopsijo varovalne bezgavke 13 % višji delež diagnoze bezgavk z zasevki (19). Biopsija varovalne bezgavke kljub temu predstavlja uveljavljen način zdravljenja pri raku dojke in raku zunanjega spolovila (46). Nyberg in sodelavci so ugotovili, da je v 60 % varovalna bezgavka pozitivna v paraaortnih bezgavkah (14, 47).

POOPERATIVNA DOPOLNILNA KEMOTERAPIJA

Kleppe in sodelavci so v svoji raziskavi opazovali vpliv limfadenektomije in kemoterapije na preživetje bolnic z zgodnjim epiteljskim rakom jajčnikov. Limfadenektomijo je imelo opravljeno 49,6 % vključenih bolnic. Pri njih je bilo opaziti boljše preživetje kot pri bolnicah brez limfadenektomije (89 in 82 %). Pri bolnicah s stadijem I-IIA, ki so imele odstranjenih deset ali več bezgavk, ni bilo razlike v preživetju med tistimi, ki so prejele dopolnilno kemoterapijo, in tistimi, ki je niso. Prav tako je bilo to razvidno tudi v skupini bolnic z visokim tveganjem (stadij IC in IIA in/ali stopnja 3 in/ali histološko potrjen svetlocelični tip raka jajčnikov) (26).

Timmermans in sodelavci so v svoji raziskavi opazili povišan delež opravljenih limfadenektomij pri bolnicah z zgodnjim stadijem, ki je v letih 2009–2014 narasel na 62 % (v letih 1989–1993 je bil 4 %). Prav tako je bil povišan delež bolnic z napredovalim stadijem, ki so prejele kirurško zdravljenje in dopolnilno kemoterapijo (67, prej 55 %). Petletno preživetje se je izboljšalo pri obeh skupinah, tako pri zgodnjih stadijih (79 proti 74 %) kot tudi pri napredovalih stadijih (24 proti 16 %). Prav tako je bilo petletno preživetje izboljšano, če združimo obe skupini (34 proti 31 %). Desetletno preživetje je bilo rahlo izboljšano pri skupini z zgodnjim stadijem (67 proti 62 %) in skupini z napredovalim stadijem (13 proti 10 %), a je ostalo popolnoma nespremenjeno, če združimo vse bolnice (24 %). Tako so zaključili, da se kljub bolj intenzivnemu zdravljenju ter zamejitvenim posegom dolgotrajno preživetje pri bolnicah z zgodnjim epiteljskim rakom jajčnikov v zadnjih 25 letih ni izboljšalo (31).

Chatterjee in sodelavci so opazili, da kemoterapija ne izboljša preživetja pri bolnicah, ki so v skupini z nizkim tveganjem (stadij IA-IB, stopnja 1). Kljub pomanjkanju doprinosa k izboljšanju preživetja v teh skupinah bolnic uporaba kemoterapije ostaja

pogosta. Nasprotno pa je dokazano, da je uporaba kemoterapije povezana z boljšim preživetjem pri bolnicah v skupini z visokim tveganjem (stadij IA in IB, stopnja 3 ali katera koli stopnja pri stadiju IC) (48).

PONOVITEV BOLEZNI

Hirose je preučeval ponovitev bolezni pri bolnicah z epiteljskim rakom jajčnikov, stadij IA in IB, ki so imele v sklopu zamejitvene operacije sistematično limfadenektomijo. Izmed bolnic jih je 68 % prejelo vsaj en cikel dopolnilne kemoterapije, 32 % pa zaradi stadija, histologije, starosti, pooperativnih zapletov ali želja bolnic kemoterapije ni prejelo. Pri 11,6 % žensk je prišlo do ponovitve bolezni, pri čemer je bil povprečen čas do ponovitve 18 mesecev. Pri 70 % bolnic se je bolezen ponovila v trebušni votlini, pri 26 % je bil razsoj hematogen, najpogosteje v jetra (20 %). Limfogeni razsoj je imelo 13 % bolnic, najpogosteje v paraaortnih bezgavkah (10 %). Med vsemi bolnicami, ki so imele sistematično limfadenektomijo, je imelo ponovitev bolezni v bezgavkah zgolj 0,9 % (49).

ZAKLJUČEK

Pelvična in paraaortna limfadenektomija predstavlja pomemben del zamejitvene operacije pri začetnih stadijih epiteljskega raka jajčnikov, na kar kaže tudi večje število opravljenih limfadenektomij v zadnjih letih. Pogostost zasevkov se ocenjuje na 7,1 % v paraaortnih bezgavkah in 2,9 % v pelvičnih bezgavkah. Prav zaradi velikega pomena limfadenektomije je zlati standard zdravljenja začetnega stadija raka jajčnikov postala zamejitvena operacija preko odprtega pristopa. Sistemsko zdravljenje z dopolnilno kemoterapijo se svetuje pri bolnicah z višjo histološko stopnjo bolezni in pri tistih bolnicah, kjer sistematična limfadenektomija ni bila opravljena. Bolnice, ki imajo opravljeno limfadenektomijo, imajo daljše celokupno preživetje in manjšo možnost ponovitve bolezni.

LITERATURA

1. Rak v Sloveniji 2017. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2020.
2. SLORA: Slovenija in rak [internet]. Ljubljana: Epidemiologija in register raka; c2020 [citirano 2021 Sep 7]. Dosegljivo na: www.slora.si
3. Arko D, Borštnar S, Bratuš D, et al., eds. Onkologija: Učbenik za študente medicine [internet]. Onkološki Inštitut Ljubljana. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; c2018 [citirano 2021 Oct 18]. Dosegljivo na: https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna_knjiznica/ostale_publikacije/Onkologija_ucbenik_za_studente_medicine_2018.pdf
4. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019; 393 (10177): 1240–53.
5. Santaballa A, Barretina P, Casado A, et al. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clin Transl Oncol*. 2016; 18 (12): 1206–12.
6. Škof E, Cerar O, Mulej K, et al., eds [internet]. Rak jajčnikov: Kaj morate vedeti o bolezni. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; c2017 [citirano 2021 Oct 18]. Dosegljivo na: <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-BZ1CAD2Q/?euapi=1&query=%27keywords%3drak+jaj%c4%8dnikov%27&sortDir=ASC&sort=date&pageSize=25&fyear=2017>
7. Takač I, Geršak K. Ginekologija in perinatologija. 1. izd. Maribor: Medicinska fakulteta; 2016.
8. Trimpos JB. Surgical treatment of early-stage ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017; 41: 60–70.
9. Barbič M, Bebar S, Cerar O, et al. Smernice za obravnavo bolnic z rakom jajčnikov, jajcevodov in s primarnim peritonealnim seroznim rakom. Ljubljana: Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD: Onkološki inštitut; 2015.
10. Omara MS, Refaie AN, Mahmoud AS, et al. Short term outcome of para-aortic lymphadenectomy in cases of ovarian cancer. *Zagazig Univ Med J*. 2020; 26 (2): 262–70.
11. Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, Iyer RB, Bhosale P. Ovarian cancer, the revised FIGO staging system, and the role of imaging. *Am J Roentgenol*. 2016; 206 (6): 1351–60.
12. Sureka B, Meena V, Garg P, et al. Computed tomography imaging of ovarian peritoneal carcinomatosis: A pictorial review. *Pol J Radiol*. 2018; 83: e500–9.
13. Mikami M, ed. Surgery for gynecologic cancer. Singapore: Springer Singapore; 2019.
14. Bakkum-Gamez JN. Lymphadenectomy in the management of gynecologic cancer. *Clin Obstet Gynecol*. 2019; 62 (4): 749–55.
15. Benedetti Panici P, Giannini A, Fischetti M, et al. Lymphadenectomy in ovarian cancer: Is it still justified? *Curr Oncol Rep*. 2020; 22 (3): 22.
16. Chiyoda T, Sakurai M, Satoh T, et al. Lymphadenectomy for primary ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Oncol*. 2020; 31 (5): e67.
17. Zhou J, Sun JY, Wu SG, et al. Risk factors for lymph node metastasis in ovarian cancer: Implications for systematic lymphadenectomy. *Int J Surg*. 2016; 29: 123–7.
18. Pujade-Lauraine E, Ray-Coquard I, Lécuru F, eds. Ovarian Cancers. Cham: Springer International Publishing; 2017.
19. Lago V, Minig L, Fotopoulou C. Incidence of lymph node metastases in apparent early-stage low-grade epithelial ovarian cancer: A comprehensive review. *Int J Gynecol Cancer*. 2016; 26 (8): 1407–14.
20. Tato-Varela S, Kuhn W. Impact of retroperitoneal lymph node dissection in ovarian cancer – time for paradigm shift? *Horm Mol Biol Clin Investig*; 2019; 41 (3): 20190020.
21. Bogani G, Tagliabue E, Ditto A, et al. Assessing the risk of pelvic and para-aortic nodal involvement in apparent early-stage ovarian cancer: A predictors- and nomogram-based analyses. *Gynecol Oncol*. 2017; 147 (1): 61–5.
22. Takei Y, Takahashi S, Machida S, et al. Impact of the number of removed lymph nodes on recurrence-free survival in stage I ovarian clear cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2018; 23 (5): 930–5.
23. Ercelep O, Ozcelik M, Gumus M. Association of lymphadenectomy and survival in epithelial ovarian cancer. *Curr Probl Cancer*. 2019; 43 (2): 151–9.
24. Cheng A, Lang J. Survival analysis of lymph node resection in ovarian cancer: A population-based study. *Front Oncol*. 2020; 10: 355.
25. Yamazaki H, Todo Y, Shimada C, et al. Therapeutic significance of full lymphadenectomy in early-stage ovarian clear cell carcinoma. *J Gynecol Oncol*. 2018; 29 (2): e19.

26. Kleppe M, van der Aa MA, Van Gorp T, et al. The impact of lymph node dissection and adjuvant chemotherapy on survival: A nationwide cohort study of patients with clinical early-stage ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016; 66: 83–90.
27. Hengeveld EM, Zusterzeel PLM, Lajer H, et al. The value of surgical staging in patients with apparent early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2019; 154 (2): 308–13.
28. Wei W, Li N, Sun Y, et al. Clinical outcome and prognostic factors of patients with early-stage epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017; 8 (14): 23862–70.
29. Heitz F, Harter P, Ataseven B, et al. Stage- and histologic subtype-dependent frequency of lymph node metastases in patients with epithelial ovarian cancer undergoing systematic pelvic and paraaortic lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol*. 2018; 25 (7): 2053–9.
30. Wafa M, Braicu EI, Muallem MZ, et al. Incidence and pattern of spread of lymph node metastasis in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2019; 39 (10): 5617–21.
31. Timmermans M, Sonke GS, Van de Vijver KK, et al. No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands. *Eur J Cancer*. 2018; 88: 31–7.
32. Lee CL, Kusunoki S, Huang CY, et al. Surgical and survival outcomes of laparoscopic staging surgery for patients with stage I ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018; 57 (1): 7–12.
33. Kerbage Y, Kakkos A, Kridelka F, et al. Lomboaortic lymphadenectomy in gynecological oncology: Laparotomy, laparoscopy or robot-assisted laparoscopy? *Ann Surg Oncol*. 2020; 27 (10): 3891–7.
34. Kusunoki S, Huang KG, Magno A, et al. Laparoscopic technique of para-aortic lymph node dissection: A comparison of the different approaches to trans- versus extraperitoneal para-aortic lymphadenectomy. *Gynecol Minim Invasive Ther*. 2017; 6 (2): 51–7.
35. Baiomy TA, Khalil OH, Abdallah WM, et al. Ovarian cancer surgical staging, laparoscopy versus laparotomy: A comparative study. *J Gynecol Surg*. 2020; 36 (4): 179–83.
36. Bogani G, Borghi C, Leone Roberti Maggiore U, et al. Minimally invasive surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017; 24 (4): 552–62.
37. Gad Z. Laparoscopy versus laparotomy for the staging of early stage ovarian cancer: Surgical outcomes. *J Cancer Sci Clin Ther*. 2019; 3 (3): 70–7.
38. Matsuo K, Chang EJ, Matsuzaki S, et al. Minimally invasive surgery for early-stage ovarian cancer: Association between hospital surgical volume and short-term perioperative outcomes. *Gynecol Oncol*. 2020; 158 (1): 59–65.
39. Gallotta V, Petrillo M, Conte C, et al. Laparoscopic versus laparotomic surgical staging for early-stage ovarian cancer: A case-control study. *J Minim Invasive Gynecol*. 2016; 23 (5): 769–74.
40. Lin Q, Liu W, Xu S, et al. The value of systematic lymphadenectomy during debulking surgery in the treatment of ovarian cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Ovarian Res*. 2020; 13 (1): 56.
41. Biglia N, Zanfagnin V, Daniele A, et al. Lower body lymphedema in patients with gynecologic cancer. *Anticancer Res*. 2017; 37 (8): 4005–15.
42. Ki EY, Park JS, Lee KH, et al. Incidence and risk factors of lower extremity lymphedema after gynecologic surgery in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2016; 26 (7): 1327–32.
43. Kunitake T, Kakuma T, Ushijima K. Risk factors for lower limb lymphedema in gynecologic cancer patients after initial treatment. *Int J Clin Oncol*. 2020; 25 (5): 963–71.
44. Bellia A, Vitale SG, Laganà AS, et al. Feasibility and surgical outcomes of conventional and robot-assisted laparoscopy for early-stage ovarian cancer: A retrospective, multicenter analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 294 (3): 615–22.
45. Watanabe T, Soeda S, Nishiyama H, et al. Clinical and reproductive outcomes of fertility-sparing surgery in stage I epithelial ovarian cancer. *Mol Clin Oncol*. 2020; 12 (1): 44–50.
46. Lago V, Bello P, Montero B, et al. Clinical application of the sentinel lymph node technique in early ovarian cancer: A pilot study. *Int J Gynecol Cancer*. 2019; 29 (2): 377–81.
47. Nyberg RH, Korkola P, Mäenpää JU. Sentinel node and ovarian tumors: A series of 20 patients. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; 27 (4): 684–9.
48. Chatterjee S, Chen L, Tergas AI, et al. Utilization and Outcomes of Chemotherapy in Women With Intermediate-Risk, Early-Stage Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol*. 2016; 127 (6): 992–1002.
49. Hirose S, Tanabe H, Nagayoshi Y, et al. Retrospective analysis of sites of recurrence in stage I epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2018; 29 (3): e37.

Anžej Hladnik^{1*}, Ivana Sedej^{2*}, Vita Dolžan³, Miha Arno⁴, Metka Lenassi⁵

Zunajcelični vezikli v urinu kot vir novih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice

Urinary Extracellular Vesicles as Novel Biomarkers of Kidney Allograft Injury

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: presaditev ledvic, biološki označevalci, zunajcelični vezikli, urin, okvara presajene ledvice, zavrnitev presadka, eksosomi, mikrovezikli

Presaditev ledvice je oblika nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi z najboljšimi kliničnimi rezultati. Dolgoročno preživetje presajene ledvice je med drugim odvisno od razvoja zavrnitvenih reakcij, ki jih glede na mehanizem nastanka delimo na T-celično in s protitelesi posredovano zavrnitev, in drugih dejavnikov, ki prispevajo k okvari presadka. Za odkrivanje okvare presadka in ustrezno zdravljenje bolnike spremljamo s pomočjo kliničnih in laboratorijskih meril (kot so serumski kreatinin, ocenjena glomerulna filtracija in proteinurija). Ker so ti nespecifični, dokončno diagnozo postavimo na podlagi histopatološkega izvida igelne ledvične biopsije, ki je invazivna in posledično težko ponovljiva preiskava. To diagnostično vrzel bi lahko zapolnili novi označevalci okvare, ki bi bili pridobljeni neinvazivno in bi tako omogočali rednejše spremljanje in hitrejšo odkrivanje okvare presadka. Kot vir tovrstnih označevalcev je najprimernejši urin, saj njegova sestava posredno odraža stanje ledvic, poleg tega pa je enostavno pridobiti velike količine vzorca v pogostejših intervalih. Kot urinski označevalci okvare ledvic so najboljše raziskane številne beljakovine, pa tudi različne nukleinske kisline. Med izjemno obetavne nove označevalce ledvične okvare se uvrščajo zunajcelični vezikli. Zunajcelični vezikli so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz vseh celic in kopičijo v telesnih tekočinah. S svojimi biofizikalnimi lastnostmi in značilno molekularno sestavo posredno odražajo lastnosti in stanje starševskih celic. Poleg tega na različne načine pomembno sodelujejo pri fizioloških ali patoloških procesih v tarčnih celicah, zaradi česar so prepoznani tudi kot možen vir sodobnih terapevtskih pristopov. V tem preglednem članku bomo predstavili zunajcelične vezikle v urinu kot nove neinvazivne biološke označevalce za odkrivanje okvare presajene ledvice.

*Avtorja si delita mesto prvega avtorja.

¹ Anžej Hladnik, dr. med., Osnovno zdravstvo Gorenjske, Zdravstveni dom Tržič, Blejska cesta 10, 4290 Tržič; Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Ivana Sedej, Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

³ Prof. dr. Vita Dolžan, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Miha Arno, Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; Katedra za interno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁵ Izr. prof. dr. Metka Lenassi, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; metka.lenassi@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: kidney transplantation, biomarkers, extracellular vesicles, urine, kidney injury, allograft rejection, exosomes, microvesicles

Kidney transplantation is the treatment of choice for end-stage kidney failure with the best clinical outcomes. Slovenia has been a member of Eurotransplant since 2000. The average number of kidneys transplanted annually is 26.4 per million. Among the various factors affecting long-term survival of a kidney transplant is allograft rejection, which can be classified as either T-cell or antibody-mediated, depending on etiopathological mechanisms. To detect allograft injury, clinical laboratory markers (i.e., serum creatinine, estimated glomerular filtration rate, and proteinuria) are monitored regularly. However, these are nonspecific and the final diagnosis is based on the histopathological features of the tissue obtained by needle biopsy, which is an invasive procedure and therefore not suitable for continuous monitoring. This diagnostic gap could be bridged with novel biomarkers obtained in a non-invasive way. Urine is the most suitable source for such biomarkers, as it is easy to obtain in large quantities and its composition indirectly reflects the (patho)physiological processes in the kidney. Proteins are the most studied urinary biomarkers of kidney injury, but various types of nucleic acids are also being investigated. Urinary extracellular vesicles are another promising new source of biomarkers. Extracellular vesicles are a heterogeneous population of membrane-bound particles that are secreted by all cells and accumulate in body fluids. Their biophysical properties and specific molecular composition indirectly reflect the properties and (patho)physiological processes of the parent cell. Moreover, they influence physiological or pathological processes in their target cells and are therefore being investigated as a source for new therapeutic strategies. In this review article, we present extracellular vesicles in urine as novel noninvasive biological markers for the detection of kidney transplant injury.

UVOD

Presaditev ledvice je oblika nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi z najboljšimi kliničnimi rezultati. Slovenija je od leta 2000 del mreže Eurotransplant, z dolgoletnim povprečjem števila presajenih ledvic 26,4 na milijon prebivalcev letno. V Sloveniji je za obdobje 2000–2016 enoletno preživetje presadka znašalo 94,3 %, petletno preživetje pa 87,5 % (povprečje za evropske države je 92,0 % in 84,4 %). Dolgoročno preživetje presajene ledvice je odvisno od ishemično-reperfuzijske poškodbe (IRP) zaradi prekinitve prekrvitve ob odvzemu presadka darovalcu, operativnega posega, kakovosti oskrbe po presaditvi in razvoja ter zdravljenja zapletov, med katere v prvi vrsti sodijo zavrnitvene

reakcije. Glede na mehanizem nastanka jih delimo na T-celično (angl. *T-cell mediated rejection*, TCMR) in s protitelesi posredovano zavrnitev (angl. *antibody mediated rejection*, ABMR).

Ključni namen sledenja bolnikov po presaditvi je spremljanje delovanja in pravočasna zaznava okvare presajene ledvice, preden ta postane nepopravljiva, ter diagnozi ustrezna prilagoditev zdravljenja. Delovanje presajene ledvice spremljamo s pomočjo kliničnih in laboratorijskih meril, kot so serumski kreatinin, ocena glomerulne filtracije (oGF) in proteinurija. Omenjeni označevalci so nespecifični, zato dokončno diagnozo postavimo na podlagi histopatološkega izvida igelne ledvične biopsije. To je invaziven poseg z možnostjo zapletov, ki

kaže zgolj na stanje vzorčnega dela presadka, diagnoza pa je dodatno odvisna od subjektivne ocene patologa. To diagnostično vrzel bi lahko zapolnili novi označevalci okvare, ki bi bili pridobljeni neinvazivno in bi tako omogočali rednejše spremljanje in hitrejšo odkrivanje okvare presadka.

Kot vir tovrstnih označevalcev je najprimernejši urin, saj njegova sestava posredno odraža stanje ledvic, poleg tega pa je enostavno pridobiti velike količine vzorca v pogostejših intervalih. Kot urinski označevalci okvare ledvic so najboljše raziskane številne beljakovine in različne nukleinske kisline. Med izjemno obetavne nove označevalce ledvične okvare se uvrščajo zunajcelični vezikli (ZV). ZV so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz vseh celic in kopičijo v telesnih tekočinah, tudi v urinu. Biofizikalne lastnosti in molekularna sestava ZV posredno odražajo lastnosti in fiziološko stanje starševskih celic. ZV pomembno sodelujejo pri fizioloških ali patoloških procesih v tarčnih celicah, zaradi česar so prepoznani tudi kot vir za sodobne terapevtske pristope. V tem preglednem članku bomo predstavili ZV v urinu kot nove neinvazivne biološke označevalce za odkrivanje okvare presajene ledvice. Opisali bomo trenutno poznano molekularno sestavo urinskih ZV, njihovo vlogo v uravnavanju fizioloških in patoloških procesov v ledvicah ter njihovo klinično uporabnost v diagnostiki in terapiji. Glede na izredno aktualnost ZV pri razumevanju, diagnostiki in terapiji bolezni bo poznavanje tega področja vse pomembnejše tudi za strokovnjake različnih medicinskih strok.

OZNAČEVALCI OKVARE PRESAJENE LEDVICE

Ledvice so pomemben parni organ, saj so ključne za izločanje toksičnih presnovkov, uravnavanje krvnega tlaka ter vzdrževanje elektrolitskega, vodnega in kislinsko-bazičnega ravnovesja v telesu. Imajo tudi

pomembno endokrino vlogo, saj z izločanjem eritropoetina v odgovor na hipoksijo povečajo hematopoezo. Delovanje ledvic je lahko okrnjeno zaradi različnih vzrokov, najpogostejša vzroka ledvične okvare sta arterijska hipertenzija in sladkorna bolezen. Omenjeni bolezni sta med prebivalstvom vse pogostejši, posledično pa narašča tudi pojavnost kronične ledvične bolezni (KLB) in njene končne stopnje – končne ledvične odpovedi. Ti bosta torej tudi v prihodnosti pomemben vzrok obolevnosti (1).

Presaditev ledvice

Presaditev ledvice je najboljši način nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi (2). Po uspešni presaditvi ledvice imajo bolniki daljšo pričakovano življenjsko dobo in boljšo kakovost življenja kot bolniki, ki ostanejo zdravljeni z dializo (3). V Evropski uniji večina presadkov izvira od umrlih darovalcev, lahko pa jih darujejo tudi zdravi živi darovalci, ki so najpogostejše sorodniki bolnika. Od leta 2000 je Slovenija del mreže Eurotransplant skupaj z Avstrijo, Belgijo, Hrvaško, Luksemburgom, Madžarsko, Nemčijo in Nizozemsko. V celotni mreži je bilo po podatkih iz leta 2020 opravljenih skupno 3.792 presaditev ledvic (27,5 presaditev ledvic na milijon prebivalcev), od tega 2.851 presaditev ledvic mrtvih darovalcev in 941 presaditev ledvic živih darovalcev. Leta 2020 je bilo kljub epidemiji koronavirusne bolezni 2019 (angl. *coronavirus disease 2019*, COVID-19) v Sloveniji presajenih 46 ledvic (22,4 na milijon prebivalcev), od tega ena s sočasno presaditvijo jeter in dve s sočasno presaditvijo trebušne slinavke; 45 presajenih ledvic je bilo pridobljenih od umrlih darovalcev, ena pa od živega darovalca (4).

Osnovni merili uspešnosti presaditev in kasnejšega zdravljenja sta eno- in petletno preživetje presadka ter bolnika. V Sloveniji je enoletno preživetje presadkov za obdobje 2000–2016 znašalo 94,3 %, petletno pa 87,5 %. V raziskavi CTS (Collaborative

Transplant Study) je bilo v letih 2006–2015 povprečje za 21 evropskih držav 92,0 % in 84,4 %. Za slovenske bolnike je preživetje v omenjenem obdobju znašalo 98,1 % in 93,8 % (5, 6). Preživetje presadka je odvisno od mnogih dejavnikov, med njimi IRP zaradi prekinitev prekrvavitve ob odvzemu presadka od darovalca, operativnega posega, kakovosti oskrbe po presaditvi in razvoja ter zdravljenja zapletov, med katere v prvi vrsti sodijo zavrnitvene reakcije presajene ledvice (2).

Okvara presajene ledvice

Ischemično-reperfuzijska poškodba

V času med odstranitvijo darovalčevega organa oz. smrtjo darovalca in ponovno vzpostavitev prekrvavitve ob presaditvi je tkivo presadka brez prekrvavitve, kar vodi v IRP tkiva. Daljši je čas hladne ishemije, hujša je okvara tkiva, zato mora biti ta čim krajši, najbolje krajši od 12 ur. IRP se lahko kaže v zakasnelem delovanju presajene ledvice (angl. *delayed graft function*, DGF), ko se ne vzpostavi ustrezno delovanje presadka neposredno po presaditvi. Bolniki zato potrebujejo premostitveno zdravljenje s hemodializo. Ob IRP se izražajo s poškodbo povezani molekularni vzorci (angl. *damage associated molecular patterns*, DAMP), ki so podobni s patogeni povezanim molekulskim vzorcem (angl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP). Te molekulske vzorce prepoznavajo vzorčno prepoznavni receptorji (angl. *pattern recognition receptors*, PRR), ki so ključni za aktivacijo imunskega odziva. Poleg omenjenega se ob IRP sproščajo tudi kemokini, proinflammatory citokini in druge v imunski odziv vpletene spojine, zato IRP predstavlja pomemben dejavnik tveganja za razvoj zgodnje akutne zavrnitvene reakcije presajene ledvice (7).

Zavrnitev presadka

Presajena ledvica je razen v primeru enojajčnih dvojčkov genetsko različna od tkiva prejemnika – predstavlja tuje tkivo, zato se

pri vseh presaditvah do neke mere razvije odziv gostiteljevega imunskega sistema na neskladne človeške levkocitne antigene (angl. *human leukocyte antigen*, HLA) presajene ledvice. Da bi omejili oz. preprečili aloimunski odziv, vse prejemnike dosmrtno zdravimo z imunosupresivnimi zdravili v skladu z aktualnimi smernicami (8).

Glede na časovni potek zavrnitvene reakcije lahko govorimo o hiperakutni, akutni in kronični zavrnitvi. Prva lahko nastane v nekaj minutah do urah oz. kmalu po vzpostavitvi krvnega pretoka skozi presadek zaradi predhodno nastalih protiteles proti neskladnim HLA darovalca, prisotnih na endoteliju kapilar presadka. Danes je hiperakutna zavrnitev presadka zaradi temeljite genotipizacije darovalca in prejemnika ter boljšega ujemanja v antigenih HLA zaradi vključenosti v program Eurotransplant izjemno redka (9). Akutna zavrnitev se zgodi v kratkem časovnem obdobju (tedni do meseci) s hitrim upadom delovanja presadka. Verjetnost njenega pojava je največja v prvih treh mesecih po presaditvi, a se lahko pojavi tudi kasneje, pojavnost pa se zmanjšuje s časom od presaditve (10). V obdobju 2000–2016 se je v prvem letu po presaditvi pojavila pri 13,7 % slovenskih bolnikov s presajeno ledvico (5). Prenizki vzdrževalni odmerki imunosupresivnih zdravil, njihovo ukinjanje ali neredno jemanje dolgoročno lahko vodijo v kronično zavrnitveno reakcijo, ki povzroča postopen upad delovanja presadka od več mesecev do let po presaditvi (11).

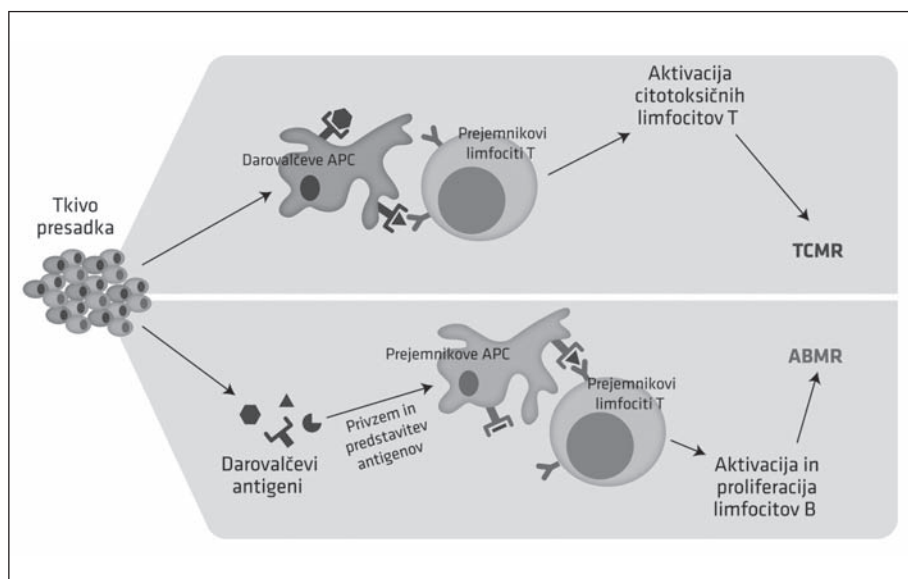
Etiopatološki mehanizem zavrnitve presadka v osnovi delimo na TCMR in ABMR, lahko pa se pojavijo tudi mešane oblike (slika 1). Prva omenjena reakcija predstavlja odziv prirojenega imunskega sistema na antigene, ki jih predstavljajo darovalčeve antigen predstavitvene celice (APC). Slednje predstavijo antigene gostiteljevim citotoksičnim limfocitom T CD (angl. *cluster of differentiation*) 8, ti pa neposredno poškodujejo celice presadka. Druga oblika je ABMR,

ki je posledica humoralnega odziva imunskega sistema, pri katerem prejemnikove APC predstavijo darovalčeve antigene HLA limfocitom T-pomagalkam. Te aktivirajo ustrezne limfocite B, ki se namnožijo in diferencirajo. Tako nastanejo plazmatke, ki tvorijo za darovalca specifična protitelesa (angl. *donor-specific antibodies*, DSA), usmerjena proti predstavljenim neskladnim darovalčevim antigenom HLA. DSA se vežejo na tarčne antigene in sprožijo uničenje tarčnih celic (10).

Zdravljenje zavrnitvenih reakcij se razlikuje glede na etiopatološki mehanizem. Tako TCMR zdravimo z imunosupresivnimi zdravili, pri čemer so ključni kortikosteroidi. Pri težjih oblikah uporabljamo protilimfocitna protitelesa (npr. antitimocitni globulin). Zdravljenje ABMR je zahtevnejše; ključno je odstranjevanje protiteles s plazmaferezo, dodatno zdravljenje pa lahko predstavljajo tudi intravenski imunoglobulini in biološka zdravila (npr. anti-CD20 protitelo – rituksimab) (8).

Kronične spremembe presadka

V presadku poleg že opisanih sprememb lahko nastanejo tudi kronične spremembe, ki so jih zgodovinsko opisovali kot kronično nefropatijo presadka, v modernejši literaturi pa je ta izraz zaradi njegove nespecifičnosti nadomestil krovni opisni izraz intersticijska fibroza s tubulno atrofijo (IFTA) (13). IFTA je neizbežna progresivna posledica imunoloških in neimunoloških vzrokov ter se v dveh letih po presaditvi razvije pri do 60 % presadkov (14, 15). Med imunološke vzroke IFTA spadajo že opisane zavrnitvene reakcije. Med njimi je najpogostejša kronična ABMR, ki je povezana z nezadostno imunosupresijo, največkrat zaradi nesodelovanja bolnikov pri zdravljenju. Med neimunološke vzroke uvrščamo nefrotoksičnost zaviralcev kalcinevrina (ciklosporin, takrolimus), ponovitev osnovne bolezni, virusne okužbe presadka in druge (15). IFTA je pomemben vzrok dolgoročne odpovedi presadka; poročano desetletno preživetje presadkov z normalno histološko



Slika 1. Shematski prikaz etiopatoloških mehanizmov različnih oblik zavrnitvene reakcije presajene ledvice (12). APC – antigen predstavitvene celice, TCMR – T-celično posredovana zavrnitev (angl. *T-cell mediated rejection*), ABMR – s protitelesi posredovana zavrnitev (angl. *antibody mediated rejection*).

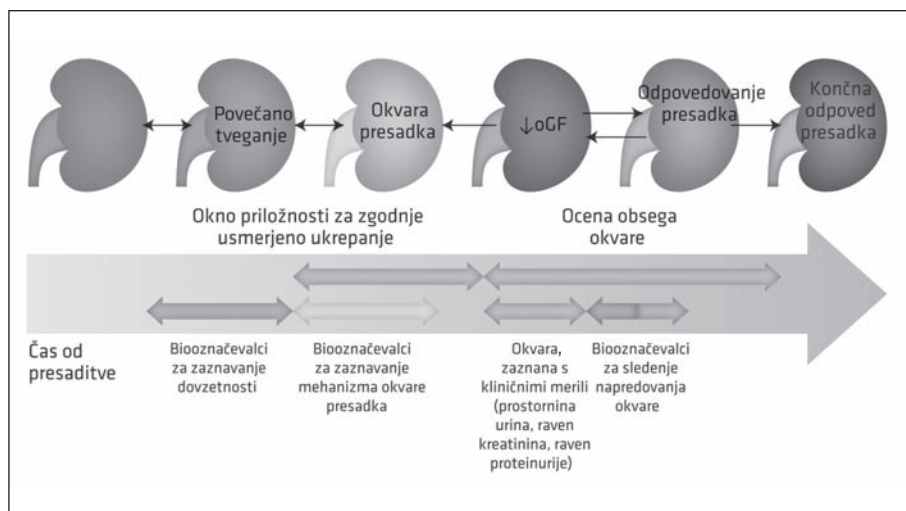
sliko je večje od 95 %, ta delež se zmanjša na 82 % pri bolnikih z IFTA brez pridružene okvare žilja in na 41 % pri IFTA s pridruženo okvaro ledvičnega žilja (16).

Spremljanje delovanja in okvare presajene ledvice

Ključni namen sledenja bolnikov po presaditvi je spremljanje delovanja in pravočasna zaznava okvare presajene ledvice, preden ta postane nepopravljiva, ter diagnozi ustrezna prilagoditev zdravljenja (slika 2). Protokol spremljanja delovanja presadka se razlikuje med centri za presaditev organov, predvsem pa se prilagaja času po presaditvi in kliničnemu stanju vsakega bolnika. Najpogostejše uporabljene metode za oceno delovanja ledvic v vsakdanji klinični praksi so raven kreatinina v serumu in na podlagi te oGF, poleg tega pa še raven proteinurije (8). Omenjeni parametri so nezadostni označevalci za ugotavljanje zavrnitvenih reakcij in drugih vzrokov okvare presadka, njihova največja pomanjkljivost je majhna občutljivost. Merjeni parametri porastejo pozno, ko je lahko okvara presadka že obsežna in nepopravljiva. Poleg tega

obstaja tudi možnost subklinične okvare presadka, pri kateri je prisotna poškodba oz. patološki procesi, ki jih lahko zaznamo z biopsijo, a še ne kažejo kliničnih znakov okvare. Omenjeni označevalci so poleg tega nespecifični, saj se pojavijo pri vseh procesih, ki okvarijo presajeno ledvico, in poslabšajo njeno delovanje (17, 18).

Nezaznana in posledično nezdravljena okvara presadka na dolgi rok pomembno prispeva k razvoju kroničnih sprememb in slabšanju njegovega delovanja. Za oceno stanja zato po presaditvi tudi pri navidezno stabilno in dobro delujoči ledvici opravljamo nadzorne igelne biopsije, navadno v prvem letu po presaditvi (8, 17, 18). V primeru, ko se delovanje presadka glede na zgoraj omenjene klinične parametre slabša in se ne odziva na podporno zdravljenje, opravimo indikacijsko ledvično biopsijo. Ta je zlati standard za končno diagnostiko vzroka okvare, saj poda informacije o histološki sliki tkiva presajene ledvice. To ocenimo glede na klasifikacijo po Banffskih merilih, ki temeljijo na prisotnosti in obsegu 15 različnih histopatoloških sprememb biopтата, iz te ocene pa lahko sklepamo



Slika 2. Shematski prikaz možnosti uporabe različnih bioznačevalcev in pomen zaznavanja okvar ledvičnega presadka pri različnih kliničnih stopnjah (20). oGF – ocenjena glomerulna funkcija.

o mehanizmu in klinični pomembnosti sprememb, ki se odvijajo v presadku (19).

Biopsija kljub svojim prednostim ni idealna preiskava. Je invaziven poseg, pri katerem lahko pride do zapletov, predvsem krvavitve. Razlaga patohistološke slike je odvisna od subjektivne ocene patologa, poleg tega ni nujno, da odvzeti vzorec predstavlja dejansko stanje presadka, saj je proces v vzorčenem delu lahko manj izražen. Povezana je tudi z visokimi stroški in je obremenjujoča za center za presaditev organov ter bolnike. Za rednejše spremljanje stanja presajene ledvice in s tem ustreznejše vodenje in zdravljenje bolnikov potrebujemo nadomestne neinvazivne označevalce okvare presajene ledvice (17).

Novi urinski biološki označevalci za odkrivanje okvare presadka

Za nove označevalce okvare presadka je ključno, da bi pokazali prisotnost, vrsto in mehanizem okvare v zgodnejših stopnjah kot trenutni klinični parametri in igelna biopsija ter tako omogočili hitrejše ukrepanje (slika 2). Pomembno je tudi, da bi tovrstne označevalce lahko pridobili na neinvaziven način iz telesnih tekočin. Izmed telesnih tekočin je pri ledvicah kot vir novih označevalcev najprimernejši urin (17, 18).

Kot biološki označevalci okvare ledvic so trenutno najboljše raziskane številne beljakovine v urinu. Te se sproščajo v urin neposredno iz okvarjenih celic nefrona ali pa iz vnetnih celic, ki posredujejo poškodbo. V prvo skupino spadajo beljakovine, kot so z ledvično poškodbo povezana molekula 1 (angl. *kidney injury molecule-1*, KIM-1), z nevtrofilno gelatinazo povezan lipokalin (angl. *neutrophil gelatinase associated lipocalin*, NGAL) in cistatin C (21). Čeprav so nekatere izmed beljakovin te skupine značilne za posamezne dele nefrona, pa so kot označevalke ledvične poškodbe nespecifične – povišane so namreč pri širokem naboru različnih patoloških stanj (22). Za bolj specifično zaznavanje akutnih zavrnitvenih

reakcij so zanimive predvsem beljakovine iz druge skupine. Mednje spadata proznetna citokina kemokinski ligand z vzorcem C-X-C (angl. *chemokine C-X-C motif ligand*, CXCL) 9 in 10, ki sta vpletena v zbiranje in aktivacijo limfocitov T (23, 24). V multicentrični raziskavi so povečano raven CXCL9 v urinu pri bolnikih z akutno zavrnitvijo presadka opazili že do 30 dni pred biopsijo (25). V drugi raziskavi pa so pokazali, da je urinski CXCL9 napovedni dejavnik TCMR, medtem ko je bil CXCL10 povezan z razvojem ABMR. Že en mesec po presaditvi je kljub stabilnemu delovanju presadka zvišana raven urinskega CXCL10 napovedovala kasnejšo akutno zavrnitveno reakcijo (26).

Poleg beljakovinskih označevalcev so raziskovalci v urinu prepoznali tudi nukleinsko-kislinske označevalce okvare, a je to področje slabše raziskano. S pomočjo transkriptomike, ki omogoča hkratno analizo prepisovanja velikega števila različnih genov, so prepoznali spremembe, značilne za posamezno obliko okvare presadka. Med njimi je najbolj zanimiv profil izražanja dveh različnih molekul informacijske RNA (angl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) (CD3ε mRNA, mRNA interferon-γ sprožilna beljakovina 10 (angl. *interferon-inducible protein 10*, IP-10)) in ene molekule ribosomalne RNA (angl. *ribosomal ribonucleic acid*, rRNA) (18S rRNA), izoliranih iz urinskih celic, ki je omogočil razlikovanje med bolniki z akutno zavrnitveno reakcijo in brez nje, ob tem pa tudi razlikovanje med TCMR in ABMR (27).

Obetaven vir novih bioloških označevalcev so tudi nekodirajoče molekule RNA, izmed katerih so dobro raziskane predvsem mikro RNA (angl. *micro ribonucleic acid*, miRNA). Raziskave so se osredotočale predvsem na povezanost izražanja miRNA v biopsijskih vzorcih ledvičnega tkiva, mononuklearnih celicah periferni krvi (angl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) ali v urinu prisotnih celicah ter klinično ali histopatološko sliko okvare presadka. Na

vzorcih ledvičnih biopsij so tako pokazali povečano izražanje sedmih miRNA pri DGF, med njimi sta najbolj izstopali miR-182-5p in miR-21-3p (28, 29). Za akutno zavrtnitveno reakcijo je bilo značilno povečano izražanje miR-142-5p, miR-155, miR-223, miR-10b in miR-30a-3p, pri čemer je imela kombinacija prvih treh miRNA > 90 % občutljivost in specifičnost za napoved akutne zavrtnitve (30). Glede na profile izražanja miR-142-3p, miR-142-5p, miR-155 in miR-223 v biopsijskem vzorcu ali že samo miR-142-3p in miR-223 v PBMC so lahko ločili med biopsijskimi vzorci z izraženo TCMR in biopsijskimi vzorci z normalnim histopatološkim izvidom (31). Med najobetavnejšimi miRNA je miR-155, saj je njeno izražanje odzivno na zdravljenje akutne zavrtnitve, pri katerem se ob uspešnem zdravljenju raven miR-155 zniža (32). Spremembe v izražanju miRNA so opazili tudi pri kronični okvari delovanja presadka, ki je posledica IFTA. Najbolj izstopajo miRNA-21, katere izražanje je povečano v urinskih celicah, PBMC in biopsijskih vzorcih, ter že omenjeni miR-142-3p in miR-155, katerih izražanje je povečano v PBMC in urinskih celicah (33, 34).

Kot obetaven biološki označevalec poškodbe presadka se v transplantacijski medicini vse bolj uveljavlja darovalčeva prostocelična DNA (angl. *donor-derived cell-free deoxyribonucleic acid*, dd-cfDNA), ki se sprošča iz poškodovanih celic presadka in jo najdemo v urinu in krvi. Raven dd-cfDNA, izražena kot delež skupne prostocelične DNA (angl. *cell-free deoxyribonucleic acid*, cfDNA), odraža stopnjo okvare celic, ki vsebujejo darovalčevo DNA, in je zato nespecifičen znak. Raven dd-cfDNA v krvi bolnikov s presajeno ledvico je navadno < 1 %, a se značilno poveča ob akutni zavrtnitvi (35). V eni izmed raziskav je bil delež dd-cfDNA v krvi ob akutni zavrtnitvi 1,6 %, v primerjalni skupini pa 0,3 %, raven dd-cfDNA pa se je razlikovala tudi med različnimi tipi zavrtnitve in je bila višja pri

ABMR kot pri TCMR (36, 37). Prednost uporabe dd-cfDNA pred klasičnimi označevalci okvare presadka je predvsem njena občutljivost, saj so povišane ravni dd-cfDNA opazili tudi do 31 tednov pred klinično diagnozo akutne zavrtnitve (35, 38). Hkrati nizek delež dd-cfDNA (< 0,5 %) z veliko verjetnostjo izključuje klinično pomembno okvaro presadka.

Trenutno se kot izjemno obetavni biološki označevalci številnih bolezni, tudi na področju transplantacijske medicine, uveljavljajo ZV.

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI IZ URINA

ZV so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz celic tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. ZV imajo pomembno vlogo pri sporazumevanju med celicami organizma ter med posameznimi organizmi, na kar nakazuje tudi evolucijska ohranjenost vloge ZV (39). Pri sesalcih so jih izolirali iz raznolikih telesnih tekočin, kot so kri, urin, bronhoalveolarni izpirek, sinovialna tekočina, plodovnica, sperma, mleko, slina, dokazali pa so tudi prisotnost veziklov, izvirajočih iz črevesne mikrobiote, in njihovo pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema (40–42). ZV lahko le z vezavo ali vstopom in s sproščanjem svojega tovora vplivajo na delovanje sosednjih tarčnih celic (parakrino) ali na bolj oddaljene celice (endokrino) (43, 44).

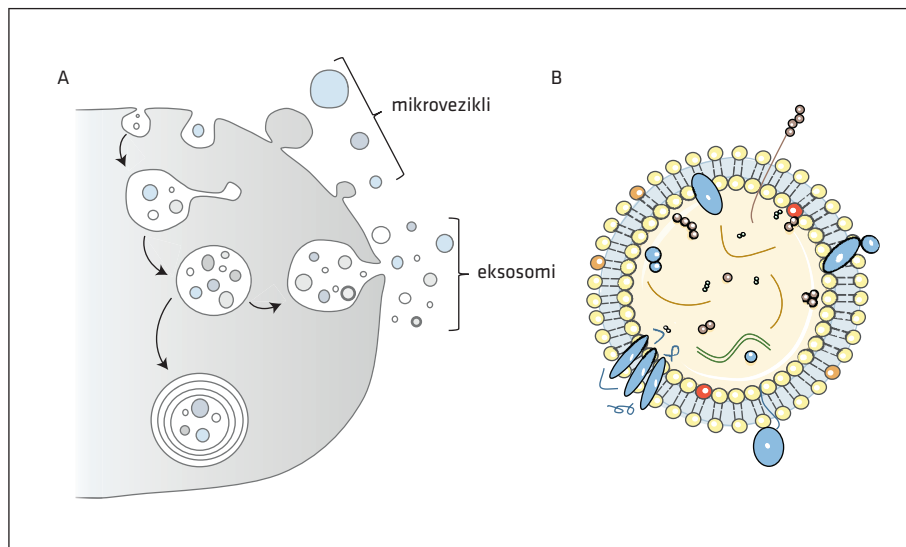
ZV se med seboj razlikujejo po nastanku, celičnem izvoru, velikosti, molekularni sestavi ter biološki vlogi. Glede na nastanek in velikost ZV razlikujemo (slika 3A): vezikle endocitotskega izvora, imenovane eksosomi (premer 30–100 nm), mikrovezikle, ki nastanejo z brstenjem plazmaleme (premer 100–1.000 nm), in apoptotska telesca, ki nastanejo med programirano celično smrtjo (premer 1.000–5.000 nm). Različni mehanizmi nastanka ZV so podrobneje opisani v predhodnih objavah (46). Raziskovalci se v svojih raziskavah osredotočajo

predvsem na preučevanje eksosomov in mikroveziklov, saj se ti sproščajo tako v fizioloških kot tudi patoloških pogojih, do nastanka apoptotskih telesc pa prihaja le v času programirane celične smrti. Znotraj celic lahko hkrati prihaja do nastajanja več tipov ZV, za katere pa je z obstoječimi raziskovalnimi metodami težko nedvoumno določiti mehanizem nastanka, ki je ključen za pravilno poimenovanje npr. eksosomov ali mikroveziklov. Zato je mednarodno društvo za zunajcelične vezikle ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) v svojih smernicah za raziskave zunajceličnih veziklov namesto izrazov eksosom/mikrovezikel predlagalo poimenovanje glede na velikost na majhne (< 200 nm) in velike (> 200 nm) ZV (47).

Biofizikalne lastnosti ZV so pomembne, saj odražajo izvor ZV, poleg tega pa vplivajo na njihovo biološko vlogo. Mednje uvrščamo velikost, koncentracijo, gostoto in optične lastnosti ZV ter mehanske lastnosti membran, kot sta elastičnost in naboj (ζ-potencial). Z analizo koncentracije in velikosti sproščenih veziklov lahko spremljamo dogajanje v telesu. Spremembe koncentracije ZV v krvi v povezavi z bolezenskimi spremembami so opisali pri več vrstah raka (48, 49), srčno-žilnih in avtoimunskih boleznih (50, 51), pri tem pa naj bi bili ključni procesi hipoksija, avtofagija in stres. Pri številnih vrstah raka so opisali tudi spremembe v velikosti veziklov (52–55). Podtipi ZV imajo zelo podobno gostoto. Za eksosome je značilna gostota 1,13–1,19 g/ml, medtem ko je za apoptotska telesa značilna gostota 1,16–1,28 g/ml, oboje pa se prekriva z gostoto lipoproteinov z visoko gostoto (angl. *high density lipoprotein*, HDL), kar lahko oteži izolacijo ZV iz krvi (56). Mehanske lastnosti ZV, kot sta elastičnost in naboj, vplivajo na kroženje ZV po telesu, privzem v celice in sproščanje tovara. Elastične membrane ZV se po stresu povrnejo v prvotno obliko, medtem ko plastične membrane ZV ostanejo spremenjene.

ζ-elektrokemijski potencial je pokazatelj koloidne stabilnosti ZV, ko se ti gibljejo v tekočem mediju, in določa stabilnost medsebojnega učinkovanja med posameznimi vezikli, vezikli s tekočino, vključno s težnjo veziklov k tvorbi skupkov (57). Mehansko togost oz. stabilnost ZV določata tudi njihova velikost in geometrija. Raziskave so že pokazale statistično značilne razlike v spremembi oblike veziklov, izvirajočih iz rakavih ter nerakavih celičnih linij (58).

Molekularni tovor ZV (slika 3B) predstavljajo različne beljakovine, lipidi, nukleinske kisline in ogljikovi hidrati (59, 60). Molekularna sestava je značilna za posamezni tip ZV, kot tudi tip starševske celice. Izsledki obsežnih raziskav glede prisotnosti omenjenih molekularnih zvrsti v ZV so objavljeni v javno dostopnih podatkovnih bazah: Vesiclepedia, ExoCarta in EVpedia (61–63). V ZV so najpogostejše zastopane beljakovine, ki so vključene v nastanek in sproščanje veziklov, tetraspanini, beljakovine v signalnih poteh, beljakovine, vključene v predstavitev antigenov in transmembranske beljakovine (59–61). Razvrščanje beljakovinskega tovara v vezikle lahko poteka odvisno od endosomskega razvrščevalnega kompleksa, potrebnega za prenos (angl. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) ali od vključevanja v membranske domene, pri čemer so ključne številne posttranslacijske spremembe beljakovin (64–66). Beljakovinska sestava ZV posredno vpliva na fiziološke in patološke učinke v njihovih tarčnih celicah (41). Beljakovine in lipidi na površini ZV so lahko glikozilirani, pri čemer so za ZV iz različnih vrst tkiv in organizmov značilni različni glikozilacijski vzorci (66). Ti uravnavajo privzem ZV v tarčne celice in s tem pomembno vplivajo na (pato)fiziologijo ZV (39). Glede lipidne sestave so membrane eksosomov obogatene s holesterolom, sfingomielinom, glikosfingolipidi in fosfatidilserinom, podobno



Slika 3. Shematski prikaz biogeneze (A) in značilne molekularne sestave (B) zunajceličnih veziklov. Podrobnejši opis je podan v besedilu (45).

kot lipidni rafti (67, 68). *In vitro* so pokazali, da ZV iz tumorskih in metastatskih celic vsebujejo več sterolov, sfingolipidov in glicerofosfolipidov (69, 70). Metabolom je najmanj raziskana molekulska zvrst ZV. Eksosomi naj bi vsebovali različne tipe molekul z nizko molekulsko maso, kot npr. organske kisline, aminokisline, sladkorje in njihove konjugate, nukleotide in nukleozide, ciklične alkohole, karnitine, aromatske spojine in vitamine (70).

ZV vsebujejo raznolike molekule RNA, kot npr. mRNA, rRNA, prenašalne (angl. *transfer ribonucleic acid*, tRNA), najbolj preučevane miRNA, dolge nekodirajoče (angl. *long non-coding ribonucleic acid*, lncRNA), interakcijske (»piwi«) in krožne RNA (59, 71). Razvrščanje miRNA v ZV naj bi potekalo s pomočjo katalitične komponente argonavtske beljakovine z RNA sproženega utiševalnega kompleksa 2 (angl. *argonaute ribonucleic acid induced silencing complex catalytic component 2*, AGO2) in GW182 ali možno tudi v ceramidni poti, odvisno pa je tudi od same strukture in zaporedja RNA (72–74). Molekule RNA v tarčnih celicah

uravnavajo izražanje genov ali prenesejo informacijo za izgradnjo funkcionalne beljakovine (71, 75–77). Raziskave so dokazale prisotnost mitohondrijske in genomske DNA v ZV, vendar je ta tip molekul manj raziskan (78). Žive celice aktivno izločajo DNA preko ZV, vendar mehanizem še ni pojasnjen. DNA, ki je lahko eno- ali dvoverižna, ima povprečno dolžino 200 baznih parov (bp) v manjših ZV in do 2.000.000 bp v velikih ZV. Lahko se nahaja na površini ali pa v notranjosti ZV, kjer je še dodatno zaščiten z lipidnim dvoslojem (79). Z analizo vezikularne DNA lahko pridobimo informacijo o celotnem genomu starševskega organizma, ponuja pa tudi vpogled v stanje somatskih mutacij v starševski celici (80–82). Prenos vezikularne DNA v tarčne celice lahko preko prepisa v mRNA in beljakovine vpliva na funkcijo celic (83, 84).

Zunajcelični vezikli v urinu

Urin vsebuje pester nabor anorganskih soli, presnovkov, organskih spojin (npr. beljakovine, hormone) in tudi ZV. Je lahko dostopna telesna tekočina z veliko pro-

stornino in je zato odličen vir neinvazivnih bioloških označevalcev okvare ledvic. Prisotnost ZV v urinu so opisali že leta 1990, prvič pa so ZV izolirali iz urina Pisitkun in sodelavci, ki so s proteomsko analizo prepoznali 295 različnih vezikularnih beljakovin (85, 86). Urin vsebuje tudi visoke koncentracije uromodulina (drugo ime Tamm-Horsfallova beljakovina (angl. *Tamm-Horsfall protein*, THP)), ki se sprošča iz Henlejeve zanke in lahko tvori obsežne polimere, ter kristalov kalcijevega oksalata, ki otežujejo izolacijo ZV iz urina (87).

Vir ZV v urinu so celice vsakega posameznega odseka nefrona, tj. celice epitelijske, glomerulni podociti, celice proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula in zbiralc ter epitelne celice urogenitalnega trakta (88). Raziskave so nakazale na razliko v urinskih ZV pri živih darovalcih ledvic različnega spola, pri čemer so opazili višjo vsebnost ZV v urinu prejemnikov darovalk ženskega spola. V urinu so zaznali tudi povišane ravni ZV iz mezangijskih in parietalnih epitelijskih celic. Sproščanje eksosomov, zlasti iz jukstaglomerularnih celic in podocitov, naj bi se s starostjo zmanjševalo (89).

Vezikularne beljakovine predstavljajo 3 % mase beljakovin, ki jih najdemo v urinu (90, 91). Z uporabo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC/MS/MS), so prepoznali kar 1.412 edinstvenih beljakovin v urinu zdravih ljudi, celokupno pa naj bi proteom urinskih ZV obsegal že več kot 3.000 beljakovin (90, 92). V ZV iz urina so pravzaprav zaznali vse prevladujoče apikalne ionske in vodne prenašalne beljakovine (90). Najpogostejše beljakovine glede na izsledke proteomskih raziskav ZV iz urina so aneksini (angl. *annexins*, ANX) A1, A4 in A5, znotrajcelični kloridni kanal 1 (angl. *chloride intracellular channel 1*, CLIC1), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (angl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*,

GAPDH), laktat dehidrogenaza B (LDHB), z Ras povezan substrat botulinškega toksina C3 1 (angl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, RAC1) in stomatin (STOM) (93). ANX so membransko vezane beljakovine, ki imajo pomembno vlogo pri eksocitozi ter pri uravnavanju koagulacije ter imunskega odziva. CLIC1, RAC1 in STOM pa so integralne membranske beljakovine ali z membrano povezane beljakovine, ki lahko vplivajo na prenos ionov in s tem na membranski potencial, bodisi neposredno z uravnavanjem prenosa klorida (CLIC1) bodisi posredno z uravnavanjem beljakovin, ki prenašajo natrij (STOM) ali vodikov ion (RAC1). GAPDH in LDHB imata oksidoreduktivno aktivnost, ki lahko vpliva na lokalni pH in redoks potencial ter prispeva k ohranjanju aktivacijsko-inaktivacijskega stanja ZV v urinu med celično difuzijo.

Raziskav glikozilacije ZV iz urina je razmeroma malo. Gerlach in sodelavci so z uporabo pretočne citometrije in lektinskih mikromrež raziskovali profil glikozilacije na površini ZV iz urina zdravih posameznikov (94). Prepoznali so širok nabor različnih oligosaharidov, pri čemer so bile razširjene bolj razvejane O-vezane strukture, manj pogosti pa O-vezani glikani mucinskega tipa. Sami glikozilacijski profili ZV se med posamezniki niso bistveno razlikovali, so se pa razlikovali od glikozilirane THP. Z uporabo masne spektrometrije v povezavi z lektinskimi mikromrežami so pokazali, da je površina urinskih ZV obogatena s kompleksnimi N-glikani ter s terminalnimi spremembami manoznih in fukoznih ostankov (95). Beljakovine na površini urinskih ZV naj bi sovpadale z glikozilacijskim profilom ledvičnih epitelijskih celic, ta pa je odvisen od translacije, zvijanja, razvrščanja ter izločanja beljakovin. Spremembe površinske glikozilacije omenjenih ZV lahko neposredno odražajo patološka stanja (94).

Pri ZV iz urina so zaznali različno vsebnost holesterola, sfingolipidov in fosfatidilserina

v primerjavi s celično membrano, pri čemer je bila vsebnost holesterola v ZV kar 63 %. Na podlagi lipidne sestave so uspeli razlikovati med ZV obolelih za rakom prostate in zdravih posameznikov (69).

Raziskave RNA tovora ZV v urinu so pokazale, da v njih prevladujejo nekodirajoče RNA, v največjem obsegu rRNA. V primerjavi z drugimi telesnimi tekočinami so urinski ZV najbolj obogateni z zaporedji, ki kodirajo beljakovine. Odkrili so namreč več kot 13.000 mRNA (96). Analiza slednjih je pokazala, da se znotraj veziklov nahajajo zaporedja genov, značilnih za vse odseke nefrona, sečevoda ter mehurja in prostate, torej kodirajoča zaporedja, ki pokrivajo celoten urogenitalni trakt. Nekodirajoči del RNA tovora ZV pa vpliva na prepisovanje genov in posttranskripcijske spremembe (97, 98). Pri urinskih ZV so najbolj preučevane mRNA in miRNA, njihovo pakiranje v ZV pa je zelo selektiven proces (93). Dokazali so, da je v fizioloških pogojih vsebnost miRNA v veziklih višja v primerjavi z miRNA v urinu in celicah iz urina, kar nakazuje, da so molekule RNA v veziklih zaščitene pred razgradnjo in zato bolj stabilne (99). Urinski ZV so tudi dober vir novih, redkejših vrst RNA, kot so krožne RNA. Vezikularne zvrsti RNA zato predstavljajo dober vir neinvazivnih bioloških označevalcev.

DNA je najmanj raziskan tovor urinskih ZV (100). Lee in sodelavci so preučevali vezikularno DNA iz urina bolnikov z rakom sečnega mehurja in pokazali, da vezikularna DNA neposredno odraža genomski profil tumorja (somatske mutacije, variacije v številu kopij) (101). Tudi na Kliničnem oddelku za nefrologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana v povezavi z Inštitutom za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani raziskujemo uporabo vezikularne DNA iz urina kot neinvazivnega biološkega označevalca okvare presajene ledvice.

VLOGA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV V URAVNAVANJU FIZIOLOŠKIH IN PATOLOŠKIH PROCESOV V LEDVICAH

Fiziološka vloga zunajceličnih veziklov v ledvicah

Sprva so raziskovalci menili, da je vloga ZV predvsem izločanje celici nepotrebnih celičnih gradnikov. Kmalu se je izkazalo, da imajo številne druge, pomembnejše vloge za vzdrževanje fiziološkega stanja v ledvicah. Te so povezane predvsem z vpletenostjo ZV v medcelično sporazumevanje, saj so pomembni prenašalci različnih molekul v notranjosti in na membrani vezikla, ki so vpletene tudi v patološke procese. ZV se lahko vežejo na površino oz. receptorje tarčnih celic in aktivirajo signalne poti, tarčne celice pa lahko tudi privzamejo ZV, v celice sproščena vsebina pa nato vpliva na različne procese v tarčni celici. Pri tem je pomembno, da so ZV v primerjavi z drugimi načini medceličnega sporazumevanja (avtokrino, parakrino, endokrino) bolj dinamični, saj je njihov učinek na tarčne celice odvisen od njihove sestave, ta pa od stanja starševske celice (102).

Med pomembnejše vloge ledvičnih ZV spada sporazumevanje med različnimi celicami znotraj organa. V tem oziru so ledvični ZV posebni, saj nepoškodovana glomerulna bazalna membrana preprečuje prehod velike večine ZV iz plazme v filtrat – ledvični ZV izvirajo torej predvsem iz celic, prisotnih v ledvičnem tkivu (celice nefrona, imunske celice). ZV v filtrat sproščajo večinoma celice proksimalnih delov nefrona (podociti, celice proksimalnega tubula), nato pa ti s filtratom potujejo do distalnejših celic nefrona (celice distalnega tubula in zbiralca) (86, 103). Te jih privzamejo, s tem pa je omogočeno medcelično sporazumevanje proksimalnega in distalnega dela nefrona. *In vitro* so pokazali, da ZV, sproščeni iz proksimalnih tubulnih celic, gojenih v prisotnosti agonista dopaminskih receptorjev, zmanjšujejo nastajanje reaktivnih

kisikovih spojin in bi tako lahko delovali protivnetno (104).

ZV lahko prenašajo molekule, vpletene v vzdrževanje homeostaze vode in elektrolitov v telesu. Primer tega je prenos akvaporina (angl. *aquaporin*, AQP) 2 z ZV med celicami zbiralca, ki v tarčnih celicah povzroči povečanje prenosa vode (105). ZV proksimalnih tubulnih celic prenašajo tudi aktiven GAPDH, ki zniža aktivnost epiteljskih natrijevih kanalčkov (angl. *epithelial sodium channels*, ENaC) v celicah distalnih tubulov in zbiralca (106).

Pomembno vlogo ZV igrajo tudi pri razvoju in samoobnovi ledvičnega tkiva. Posredujejo medcelično sporazumevanje med mezenhimskimi in epiteljskimi celicami ledvice. Z njihovo pomočjo lahko tubularne epiteljske celice sprožijo diferenciacijo mezenhimskih stromalnih celic v epiteljske celice, kar je pomemben korak embrionalnega razvoja ledvic (107).

Vloga zunajceličnih veziklov pri ledvičnih boleznih

ZV so bili opredeljeni kot pomemben del etiopatogenetskih mehanizmov pri kopici patoloških stanj, od KLB do raka. Obširno raziskana je vloga ZV pri KLB, posebej pri diabetični nefropatiji (DN). V urinu prisotni ZV imajo pomembno vlogo v vseh organih urogenitalnega trakta, a smo se pri pregledu literature osredotočili le na ledvice. ZV iz glomerulnih epiteljskih celic, gojenih v prisotnosti visokih koncentracij glukoze, prispevajo k aktivaciji epiteljsko-mezenhimskega prehoda in fibrotičnim spremembam podocitov in mezangijskih celic pri DN (108). Visoke ravni glukoze v urinu prispevajo tudi k povečanemu sproščanju ZV iz makrofagov, kar nadalje povzroči proliferacijo mezangijskih celic in aktivira vnetno reakcijo, ki vodi v ledvično fibrozo (109).

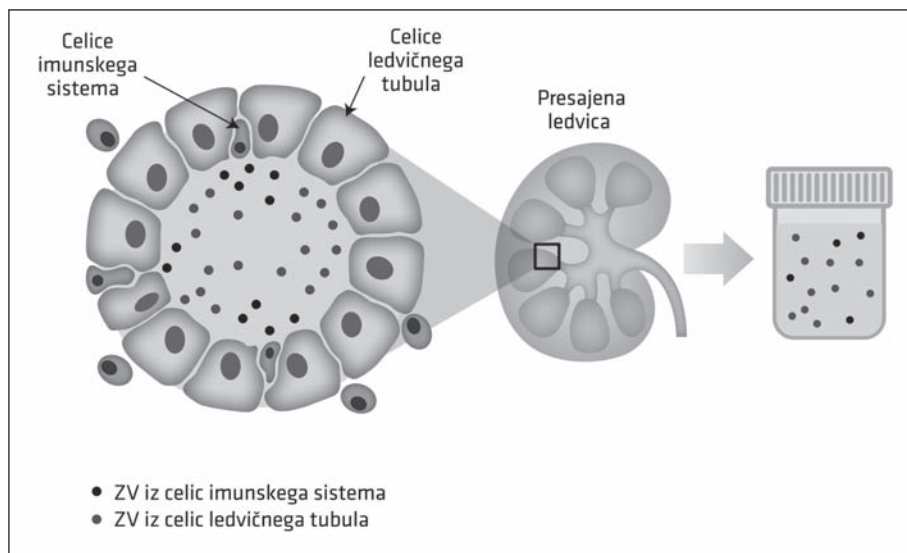
Poleg KLB so glede na patološka stanja v ledvici najboljše raziskane vloge ZV pri karcinomu ledvičnih celic (KLC). Tumorsko

tkivo vzpostavi lastno mikrookolje, ki vzpodbuja rast in razvoj tumorja. Zato ni presenetljivo, da imajo ZV pomembno vlogo pri tumorogenezi in napredovanju KLC. Ena izmed raziskav je pokazala, da so ZV iz primarnih celic pri svetloceličnem KLC bogati s spreminjajočim rastnim dejavnikom $\beta 1$ (angl. *transforming growth factor* $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) in znižajo odziv citotoksičnih limfocitov T na rakave celice (110). V drugi raziskavi pa so pokazali, da ZV, sproščeni iz rakavih zarodnih celic bolnikov s KLC, spodbujajo razmnoževanje in epiteljsko-mezenhimski prehod, ki sta pomembna za napredovanje KLC (111).

Številne raziskave se osredotočajo tudi na zaščitni učinek ZV pri IRP. Tovrstna vloga ZV ima pomembne implikacije za preživetje presajenih ledvic preko zmanjšanja IRP. V ospredju raziskav so ZV, sproščeni iz mezenhimskih stromalnih celic. Povezani so z zmanjšano okvaro in hitrejšim izboljšanjem ledvičnega delovanja po IRP pri podganah (112). Podoben učinek je imel tudi intravenski vnos ZV iz podganjih in človeških ledvičnih tubulnih celic (113, 114). Poleg omenjenega so ZV pomembni posredniki vnetnega odziva. Pri miših so pokazali, da visoko izražanje receptorja za kemokinski ligand z vzorcem C-C 2 (angl. *C-C motif chemokine ligand 2*) na ZV lahko prispeva k zmanjšanemu učinku CCL2 na makrofage in s tem zmanjšanemu vnetnemu odzivu po IRP (115).

KLINIČNA UPORABNOST ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV IZ URINA

Nabor lipidov, membranskih in citosolnih beljakovin ter nukleinskih kislin v ZV odseva molekularno sestavo starševske celice, bodisi v navadnih fizioloških pogojih ali spremenjene zaradi patoloških procesov. Značilno stanje celice se lahko odraža tudi v količini ali velikosti izločenih ZV. Raziskave so pokazale, da je pogostost sproščanja ZV odvisna od okolja, v katerem se



Slika 4. Zunajcelični vezikli v urinu so pomemben vir novih, neinvazivnih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice (123). ZV – zunajcelični vezikli.

celica nahaja, npr. koncentracije raztopljenega kisika v tekočini, pH in tipa same starševske celice, pri čemer rakave celice izločajo znatno višje število ZV (116–118). Molekule DNA in RNA so v sproščenih ZV zaščitene pred razgradnjo z DN-azami in RN-azami v urinu (119). Podobno pa bi lahko ZV zaščitili molekule pred ostalimi encimi, prisotnimi v urinu, kot so oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze in liaze (120). Zaradi vseh naštetih lastnosti so ZV pomemben neinvaziven vir bioloških označevalcev bolezni urogenitalnega trakta, kar se kaže tudi v vedno večjem številu raziskav (121, 122) (slika 4).

Zunajcelični vezikli kot biološki označevalci okvare presajene ledvice

ZV s površinskim označevalcem CD133 bi lahko služili kot biološki označevalci ledvične funkcije ter potenciala za samoonovo. Raziskave so namreč pokazale, da se ZV CD133 nahajajo v urinu zdravih posameznikov, odsotni pa so v urinu bolnikov s končno ledvično odpovedjo. Že prvi

dan po presaditvi ledvic omenjenim bolnikom so v urinu zaznali ZV CD133, njihova koncentracija pa se je s časom višala (124). Poročali so tudi o razlikah v vsebnosti prostih beljakovin NGAL in interlekvina-18 in njunih mRNA v eksosomih iz urina po presaditvi ledvic (22). Dodatno so ugotovili, da je povišana raven vezikularnega NGAL v urinu bolnikov, ki so jim presadili ledvice, povezana z zakasnjanim delovanjem presadka. NGAL v ZV je tudi bolj občutljiv zgodnji biološki označevalec kot NGAL iz celične frakcije urina (125).

Ob IRP ledvic pride do značilnega zmanjšanja ravni AQP1 v ZV iz urina. Ob primerjavi stanja ishemije-reperfuzije na podganjem modelu nefrotičnega sindroma ter bolnikov s proteinurijo pri slednjih niso zaznali sprememb v vezikularnem AQP1. Pri presaditvi organov prav tako pride do IRP, tako so tudi pri analizi ZV iz urina bolnika s presajeno ledvico opazili znižano raven AQP1. To nakazuje, da je vsebnost AQP1 v ZV označevalec IRP (126).

Raziskava na področju bioloških označevalcev okvare presajene ledvice je pre-

poznala nabor vezikularne mRNA za zaznavanje okvare presajene ledvice in mRNA za razlikovanje med akutno TCMR ter ABMR (127). V ZV iz urina bolnikov s presajeno ledvico, pri katerih je prišlo do TCMR, so dodatno dokazali zvišane ravni vezikularnega tetraspanina 1 in hemopeksina in ju predlagali kot diagnostična označevalca za TCMR (128). Pri bolnikih z zavrnitveno reakcijo so poročali tudi o povišani ravni urinskih ZV s površinskim označevalcem CD3 (123). Sigdel in sodelavci so z uporabo masne spektrometrije pri bolnikih z akutno okvaro presajene ledvice odkrili enajst beljakovin, ki so bile funkcionalno udeležene v vnetni in stresni odziv, ter tako dokazali, da vsebnost beljakovin v ZV iz urina odraža stanje presadka (129).

Zunajcelični vezikli kot biološki označevalci ostalih ledvičnih bolezni

Pri osebah s centralnim diabetesom insipidusom so pokazali, da je v urinu prišlo do povišanega izločanja AQP2 z ZV kot odziv na antidiuretik vazopresin, v primerjavi z bolniki z nefrogenim diabetesom insipidusom (130). Analiza ZV z vsebujočim AQP2 lahko tako razlikuje med centralnim in nefrogenim diabetesom insipidusom.

DN predstavlja resen zaplet pri sladkorni bolezni in je povezana s povečano obolevnostjo in smrtnostjo v primerjavi z drugimi vzroki bolezni ledvic. Spremlja jo proteinurija, ki je posledica napredujoče poškodbe in posledičnega propada glomerulnih podocitov. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 so ugotovili močno povišano količino urinskih ZV, izvirajočih iz podocitov, ki je bila vidna že pred spremembami drugih bioloških označevalcev (albuminurija, nefrin). ZV iz podocitov bi tako lahko predstavljali zgodnji označevalci glomerulne okvare pri sladkorni bolezni tipa 1 (131). Barutta in sodelavci so pokazali, da med bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1, ki imajo oz. nimajo DN, pride do razlik

v izražanju nekaterih miRNA v urinskih ZV (miRNA-130a, miRNA-145, miRNA-155 in miRNA-424), pri čemer so vlogo vezikularne miRNA-145 izpostavili kot pomembno pri razvoju bolezni (132). Nadalje so Zubiri in sodelavci (133, 134) v urinskih ZV odkrili nabor treh spremenjenih beljakovin (alfa-1 mikroglobulinski/bikuninski prekursor (AMBP), histonska metiltransferazna levkemična beljakovina mešanega porekla 3 (angl. *histone methyltransferase mixed-lineage leukemia protein 3*, MLL3) in napetostno odvisni anionsko selektivni kanal 1 (angl. *voltage-dependent anion-selective channel 1*, VDAC1)), povezanih s prisotnostjo DN. Z analizo ZV-podocitov so avtorji ugotovili, da povišana raven mRNA z zapisom za onkoprotein Wilmsovega tumorja 1 (WT1) odraža poškodbo glomerulov pri bolnikih z DN v primerjavi z bolniki z najmanjšimi spremembami nefrotskega sindroma. Spremljanje ravni vezikularnega WT1 omogoča razločevanje bolnikov glede na tveganje za pojav zapletov (135). Prisotnost vezikularnega WT1 v urinu so povezali tudi z okvaro podocitov (134).

V ZV iz urina bolnikov z akutno ledvično okvaro so v primerjavi z zdravimi preiskovanci odkrili povišano vsebnost Na^+/H^+ izmenjevalnega prenašalca 3 (angl. *sodium-hydrogen exchanger 3*, NHE3), še posebej v primeru akutne tubulne nekroze. Vezikularni NHE3 so predlagali kot označevalce tubulne okvare in za razlikovanje med akutno tubulno nekrozo in drugimi vzroki okvare ledvic (136). Zhou in sodelavci so poročali o glikozirani beljakovini fetuin A, za katerega se je izkazalo, da se v večjem obsegu nahaja v ZV pri akutni ledvični okvari kot pri zdravih ljudeh (137). V sklopu akutne okvare ledvic so kot označevalca poškodb tubulnih celic opisali še vezikularni aktivacijski transkripcijski dejavnik 3 (angl. *activating transcription factor 3*, ATF3) (138).

Na ZV iz urina so izvedli kvantitativno proteomsko analizo in prepoznali 83 različno izraženih beljakovin pri bolnikih

z avtosomno dominantno policistično boleznijo ledvic (ADPBL). Za to bolezen je značilna okvara v genih *PKD1* ali *PKD2*, ki zapisujeta beljakovini policistin 1 (PC1) in policistin 2 (PC2). Veliko zaznanih beljakovin je izviralo iz apikalne membrane in so bili vpleteni v signalne poti primarnih cilij (npr. PC1 in PC2), celični cikel, diferenciacijo celic in signalizacijo preko ionov Ca^{2+} . Povečano izražene beljakovine so bile vpletene tudi v organizacijo citoskeleta in vzdrževanje polarnosti celic, kar sovпада z nastankom cist zaradi spremenjene zgradbe celic. Zaznali so nižjo vsebnost beljakovine AQP2 in jo povezali z razredčenim urinom pri teh bolnikih (139). Nadalje so primerjali proteome ZV iz urina bolnikov z ADPBL, bolnikov z drugimi cističnimi boleznimi ledvic in zdravih posameznikov. Prepoznali so 30 beljakovin, ki so bile vsaj dvakrat bolj zastopane pri obolelih z ADPBL, pri čemer je izstopalo 5 beljakovin; citoskeletne beljakovine vilin 1, periplakin, envoplakin in beljakovini sistema komplementa C3 ter C9. Avtorji so povečane vsebnosti beljakovin komplementa povezali z zgodnjim potekom, povečanje citoskeletnih beljakovin pa s kasnejšimi stopnjami poteka bolezni (140). Pokazali so tudi, da je v primeru okvare gena *PKD1* vsebnost beljakovin PC1 in PC2 v ZV nižja, vsebnost transmembranske beljakovine 2 (TMEM2) pa povišana, in da bi lahko s pomočjo razmerja PC1/TMEM2 razlikovali med posamezniki z okvaro gena *PKD1* in brez nje (141). S proteomiko ZV iz urina lahko učinkoviteje spremljamo patološko stanje ledvic, saj je izplen redkih beljakovin z možno patofiziološko in diagnostično vrednostjo tudi do 30-krat večji v primerjavi z izplenom iz ledvičnega tkiva (91).

Tudi pri preučevanju bolnikov s cistinurijo so se Bourderioux in sodelavci poslužili proteomske analize ZV iz urina (142). Izsledki so razkrili nabor 38 povišano izraženih beljakovin, med drugimi tudi beljakovino lipokalin 2. Ta je značilna za nevtrofilce, prisotna pa je tudi v ledvicah

in služi kot biološki označevalec poškodb proksimalnih tubulov in akutne poškodbe ledvic. Nabor beljakovin je omogočil razlikovanje med zdravimi in obolelimi ter med zmernimi in hudimi oblikami cistinurije. Pri glomerulonefritisu raven fibroblastno specifične beljakovine 1 (angl. *fibroblast-specific protein 1*, FSP1), ki se iz podocitov sprošča z ZV, odraža aktivno in stalno poškodbo glomerulov (143). Omenjena odkritja nakazujejo, da so ZV iz urina zelo pomemben vir bioloških označevalcev strukturnih bolezni ledvic (44).

Terapevtski potencial zunajceličnih veziklov

ZV s prenašanjem beljakovin, nukleinskih kislin in drugih presnovkov sodelujejo pri spreminjanju fizioloških ali patoloških procesov v tarčnih celicah. Lastnosti ZV pa lahko tudi priredimo in jih usmerimo do značilnih tarčnih celic. Natančneje, celice lahko genetsko spremenimo, da proizvedejo in na površino ZV vgradijo določeno površinsko molekulo, ki jo prepoznajo značilne tarčne celice in privzamejo ZV (60). V ZV lahko tudi vgradimo terapevtska sredstva ali genetski material, ki so nato pred razgradnjo z DN-azami in RN-azami v telesnih tekočinah zaščiteni s fosfolipidnim dvo-slojem. Na osnovi omenjenih pristopov se razvijajo različni inovativni terapevtski pristopi, ob tem pa ostajajo izzivi v proizvodnji, izolaciji in kvantifikaciji ZV za terapevtske namene (144).

Mehanizmi delovanja ZV so bili analizirani na različnih modelih *in vitro*, med drugim tudi na modelu ledvičnih tubulnih epitelijskih in endotelnih celicah. V omenjenih celicah so dokazali, da iz njih sproščeni vezikli oz. njihov tovor zmanjšuje izražanje vnetnih molekul, spodbuja celično proliferacijo in zavira apoptozo (145). Na primeru raka mehurja so odkrili, da rakave celice mnogo pogosteje privzemajo ZV v primerjavi z nespremenjenimi oz. zdravimi celicami urotelija (144). V primeru led-

vične fibroze so zasnovali ZV iz mezenhimske matične celice s prekomerno izraženo miRNA let-7c, ki so po prevzemu v tarčne celice omilili ledvično poškodbo (146). Na modelu miši z akutno okvaro ledvic so dokazali proregenerativne lastnosti urinskih ZV, in sicer je vnos slednjih omilil stopnjo poškodbe tkiv, spodbudil proliferacijo tubulnih celic ter preprečil aktivacijo provnetnih citokinov. Poročali so o močno zmanjšani vsebnosti dejavnika klotho v obolenih miših, nasprotno pa so po dodajanju urinskih ZV opazili izgradnjo dejavnika *de novo* in povrnitev njegove fiziološke ravni. Gre za dejavnik, ki ima v topni obliki dokazano protivnetno, antioksidativno in antifibrotično delovanje v ledvičnem tkivu (147). Vnos človeških eksosomov iz urina v podgane z DN je zavrl apoptozo podocitov in pospešil obnovo žil ter izboljšal preživetje celic (148). Pokazali so še, da vezikli iz ledvičnih mezenhimske matične celice vsebujejo mRNA-zapise žilnega endotelijskega rastnega dejavnika A (angl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A), inzulinu podobnega rastnega dejavnika 1 (angl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) in fibroblastnega rastnega dejavnika (angl. *fibroblast growth factor*, FGF), ki spodbujajo endotelne celice in tvorbo novih žil pri ishemičnih poškodbah ledvičnega tkiva (149). *In vitro* so pokazali, da vnos eksosomov regulatornih celic T povzroči zavoro proliferacije celic, *in vivo* pa ome-

njeni eksosomi zakasnjajo zavrnitveno reakcijo in s tem podaljšajo čas preživetja presadka v podganjem modelu presajene ledvice (150). ZV bi lahko tako v prihodnosti služili za zdravljenje raznolikih ledvičnih bolezni, vključno okvare presajene ledvice.

ZAKLJUČEK

S pričujočim preglednim prispevkom smo bralcem na primeru problematike zaznavanja okvare presajene ledvice želeli predstaviti ZV in njihovo možno klinično uporabo. V zadnjih letih je vse več raziskav, ki raziskujejo lastnosti ZV in njihovo patofiziološko vlogo pri različnih boleznih. Hkrati hitro narašča tudi število raziskav, v katerih že uveljavljene ugotovitve poskušajo prenesti v klinično prakso, kjer ZV obetajo kot možni biološki označevalci različnih bolezni, kot tarče za preprečevanje razvoja bolezni in celo kot dostavni sistem za zdravilne učinkovine. Zaradi širokega nabora možnih uporab ZV in vse več dokazov o njihovem pomenu pri etiopatogenezi različnih bolezni bo v prihodnje poznavanje tega področja vse pomembnejše tudi za strokovnjake različnih medicinskih strok.

ZAHVALA

Avtorji se lepo zahvaljujemo Maruši Puschner in asist. dr. Mariji Holcar za pomoč pri pripravi slik. Zahvaljujemo se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za pomoč pri financiranju (P3-0323, P1-0170).

LITERATURA

1. Thomas R, Kanto A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care*. 2008; 35 (2): 329–44.
2. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331 (6): 365–76.
3. Fiebiger W, Mitterbauer C, Oberbauer R. Health-related quality of life outcomes after kidney transplantation. *Health Qual Life Outcomes*. 2004; 2: 2.
4. Kidney transplants in 2020, by country, by donor type, by organ combination [internet]. Eurotransplant statistics library; c2021 [citirano 2021 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://statistics.eurotransplant.org>
5. Kandus A, Ponikvar Buturovič J, Mlinšek G, et al. Kidney transplantation in Slovenia from 1970 to 2015. *Therap Aph Dia*. 2016; 20 (3): 229–33.
6. Coemans M, Süsal C, Döhler B, et al. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int*. 2018; 94 (5): 964–73.
7. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: Relevant mechanisms in injury and repair. *J Clin Med*. 2020; 9 (1): 253.
8. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 Suppl 3: S1–155.
9. Rife G, Mousson C, Martin L, et al. Donor-specific antibodies in allograft rejection: Clinical and experimental data. *Transplantation*. 2005; 79 Suppl 3: S14–8.
10. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. *Transplantation*. 2012; 93 (1): 1–10.
11. Riella LV, Djmal A, Pascual J. Chronic allograft injury: Mechanisms and potential treatment targets. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017; 31 (1): 1–9.
12. Barra JM, Tse HM. Redox-dependent inflammation in islet transplantation rejection. *Front Endocrinol*. 2018; 9: 175.
13. Haas M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: What is in a name? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23 (3): 245–50.
14. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, et al. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int*. 1992; 41 (1): 155–60.
15. Granata S, Benedetti C, Gambaro G, et al. Kidney allograft fibrosis: What we learned from latest translational research studies. *J Nephrol*. 2020.
16. Serón D, Moreso F, Ramón JM, et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2000; 69 (9): 1849–55.
17. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, et al. Establishing biomarkers in transplant medicine: A critical review of current approaches. *Transplantation*. 2016; 100 (10): 2024–38.
18. Menon MC, Murphy B, Heeger PS. Moving biomarkers toward clinical implementation in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (3): 735–47.
19. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, et al. A 2018 reference guide to the banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation*. 2018; 102 (11): 1795–814.
20. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*. 2014; 85 (3): 513–21.
21. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: A critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014; 51 Suppl 3: 335–51.
22. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, et al. A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e98644.
23. Hirt-Minkowski P, De Serres SA, Ho J. Developing renal allograft surveillance strategies – urinary biomarkers of cellular rejection. *Can J Kidney Health Dis*. 2015; 2: 28.
24. Hirt-Minkowski P, Amico P, Ho J, et al. Detection of clinical and subclinical tubulo-interstitial inflammation by the urinary CXCL10 chemokine in a real-life setting. *Am J Transplant*. 2012; 12 (7): 1811–23.
25. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 2013; 13 (10): 2634–44.
26. Rabant M, Amrouche L, Morin L, et al. Early low urinary CXCL9 and CXCL10 might predict immunological quiescence in clinically and histologically stable kidney recipients. *Am J Transplant*. 2016; 16 (6): 1868–81.
27. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013; 369 (1): 20–31.

28. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, et al. MiRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation*. 2013; 95 (6): 835–41.
29. Wilflingseder J, Sunzenauer J, Toronyi E, et al. Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: Assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e104164.
30. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (13): 5330–5.
31. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, et al. Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute t-cell mediated rejection. *Transpl Immunol*. 2015; 33 (1): 1–6.
32. Millán O, Budde K, Sommerer C, et al. Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017; 83 (12): 2636–50.
33. Zununi Vahed S, Omid Y, Ardalan M, et al. Dysregulation of urinary miR-21 and miR-200b associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in renal transplant recipients. *Clin Biochem*. 2017; 50 (1–2): 32–9.
34. Ben-Dov IZ, Muthukumar T, Morozov P, et al. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*. 2012; 94 (11): 1086–94.
35. Knight SR, Thorne A, Lo Faro ML. Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in solid organ transplantation. A systematic review. *Transplantation*. 2019; 103 (2): 273–83.
36. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (7): 2221–32.
37. Whitlam JB, Ling L, Skene A, et al. Diagnostic application of kidney allograft-derived absolute cell-free DNA levels during transplant dysfunction. *Am J Transplant*. 2019; 19 (4): 1037–49.
38. García Moreira V, Prieto García B, Baltar Martín JM, et al. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem*. 2009; 55 (11): 1958–66.
39. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012; 80 (6): 1948–57.
40. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6 (3): 267–83.
41. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 27066.
42. Macía L, Nanan R, Hosseini-Beheshti E, et al. Host- and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. *Int J Mol Sci*. 2019; 21 (1): 107.
43. Simons M, Raposo G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21 (4): 575–81.
44. González E, Falcón-Pérez JM. Cell-derived extracellular vesicles as a platform to identify low-invasive disease biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15 (7): 907–23.
45. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30 (1): 255–89.
46. Ferdin J, Lenassi M. Zunajcelični vezikli in njihov klinični potencial. *Med Razgl*. 2016; 55 (1): 63–82.
47. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7 (1): 153750.
48. Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y, et al. Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2016; 36 (5): 2535–43.
49. Fang S, Tian H, Li X, et al. Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0175050.
50. Sinning JM, Losch J, Walenta K, et al. Circulating CD31+/annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*. 2011; 32 (16): 2034–41.
51. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost*. 2006; 95 (1): 94–9.
52. Zhang W, Peng P, Kuang Y, et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumour Biol*. 2016; 37 (3): 4213–21.

53. Yang JS, Lee JC, Byeon SK, et al. Size dependent lipidomic analysis of urinary exosomes from patients with prostate cancer by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2017; 89 (4): 2488–96.
54. Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, et al. Extracellular vesicles: New players in lymphomas. *Int J Mol Sci.* 2018; 20 (1): 41.
55. Badovinac D, Goričar K, Zavrtnik H, et al. Plasma extracellular vesicle characteristics correlate with tumor differentiation and predict overall survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma undergoing surgery with curative intent. *J Pers Med.* 2021; 11 (2): 77.
56. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; 64 (3): 676–705.
57. Midekessa G, Godakumara K, Ord J, et al. Zeta potential of extracellular vesicles: Toward understanding the attributes that determine colloidal stability. *ACS Omega.* 2020; 5 (27): 16701–10.
58. Yokota S, Kuramochi H, Okubo K, et al. Extracellular vesicles nanoarray technology: Immobilization of individual extracellular vesicles on nanopatterned polyethylene glycol-lipid conjugate brushes. *PLoS One.* 2019; 14 (10): e0224091.
59. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36 (3): 301–12.
60. Ståhl AL, Johansson K, Mossberg M, et al. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2019; 34 (1): 11–30.
61. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10 (12): e1001450.
62. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016; 428 (4): 688–92.
63. Kim DK, Kang B, Kim OY, et al. EVpedia: An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2.
64. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19 (4): 213–28.
65. Vasconcelos MH, Caires HR, Âbols A, et al. Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2019; 47: 100647.
66. Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76 (24): 4829–48.
67. Skotland T, Sagini K, Sandvig K, et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020; 159: 308–21.
68. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion.* 2015; 55 (3): 507–21.
69. Skotland T, Kroos K, Kauhanen D, et al. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur J Cancer.* 2017; 70: 122–32.
70. Zebrowska A, Skowronek A, Wojakowska A, et al. Metabolome of exosomes: Focus on vesicles released by cancer cells and present in human body fluids. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (14): 3461.
71. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9 (6): 654–9.
72. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009; 11 (9): 1143–9.
73. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008; 319 (5867): 1244–7.
74. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014; 8 (6): 1649–58.
75. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2012; 14 (3): 249–56.
76. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood.* 2012; 119 (3): 756–66.
77. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, et al. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017; 8 (4): 10.
78. Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, et al. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front Immunol.* 2016; 7: 335.

79. Malkin EZ, Bratman SV. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (7): 584.
80. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014; 289 (7): 3869–75.
81. Vagner T, Spinelli C, Minciacci VR, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J Extracell Vesicles.* 2018; 7 (1): 1505403.
82. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014; 24 (6): 766–9.
83. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* 1999; 93 (11): 3956–63.
84. Cai J, Han Y, Ren H, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5 (4): 227–38.
85. Sato S, Zhu XL, Sly WS. Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (16): 6073–6.
86. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (36): 13368–73.
87. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 2010; 77 (8): 736–42.
88. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, et al. Extracellular vesicles in renal pathophysiology. *Front Mol Biosci.* 2017; 4: 37.
89. Turco AE, Lam W, Rule AD, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. *J Extracell Vesicles.* 2016; 5: 29642.
90. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20 (2): 363–79.
91. Dimov I, Jankovic Velickovic L, Stefanovic V. Urinary exosomes. *ScientificWorldJournal.* 2009; 9: 1107–18.
92. Bijnsdorp IV, Maxouri O, Kardar A, et al. Feasibility of urinary extracellular vesicle proteome profiling using a robust and simple, clinically applicable isolation method. *J Extracell Vesicles.* 2017; 6 (1): 1313091.
93. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13 (12): 731–49.
94. Gerlach JQ, Krüger A, Gallogly S, et al. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e74801.
95. Saraswat M, Joenväära S, Musante L, et al. N-linked (N-) glycoproteomics of urinary exosomes. [Corrected]. *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14 (2): 263–76.
96. Everaert C, Helmsmoortel H, Decock A, et al. Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 17574.
97. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, et al. Non-coding RNAs: Regulators of disease. *J Pathol.* 2010; 220 (2): 126–39.
98. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96094.
99. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, et al. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int.* 2014; 86 (2): 433–44.
100. Elzanowska J, Semira C, Costa-Silva B. DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Mol Oncol.* 2021; 15 (6): 1701–14.
101. Lee DH, Yoon H, Park S, et al. Urinary exosomal and cell-free DNA detects somatic mutation and copy number alteration in urothelial carcinoma of bladder. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14707.
102. Rigalli JP, Barros ER, Sommers V, et al. Novel aspects of extracellular vesicles in the regulation of renal physiological and pathophysiological processes. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 244.
103. Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. *Clin Biochem.* 2014; 47 (15): 89–94.
104. Bruno S, Porta S, Bussolati B. Extracellular vesicles in renal tissue damage and regeneration. *Eur J Pharmacol.* 2016; 790: 83–91.
105. Street JM, Birkhoff W, Menzies RI, et al. Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells. *J Physiol.* 2011; 589 (24): 6119–27.
106. Jella KK, Yu L, Yue Q, et al. Exosomal GAPDH from proximal tubule cells regulate ENaC activity. *PLoS One.* 2016; 11 (11): e0165763.

107. Chiabotto G, Bruno S, Collino F, et al. Mesenchymal stromal cells epithelial transition induced by renal tubular cells-derived extracellular vesicles. *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0159163.
108. Wu XM, Gao YB, Cui FQ, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis. *Biol Open*. 2016; 5 (4): 484–91.
109. Zhu QJ, Zhu M, Xu XX, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate glomerular mesangial cells via TGF- β 1/Smad3 pathway *in vivo* and *in vitro*. *Faseb J*. 2019; 33 (8): 9279–90.
110. Xia Y, Zhang Q, Zhen Q, et al. Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway. *Oncotarget*. 2017; 8 (23): 37783–95.
111. Wang L, Yang G, Zhao D, et al. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: Role of remote MiR-19b-3p. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 86.
112. Zhang G, Zou X, Huang Y, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles protect against acute kidney injury through anti-oxidation by enhancing Nrf2/ARE activation in rats. *Kidney Blood Press Res*. 2016; 41 (2): 119–28.
113. Dominguez JH, Liu Y, Gao H, et al. Renal tubular cell-derived extracellular vesicles accelerate the recovery of established renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (12): 3533–44.
114. Dominguez JM 2nd, Dominguez JH, Xie D, et al. Human extracellular microvesicles from renal tubules reverse kidney ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One*. 2018; 13 (8): e0202550.
115. Shen B, Liu J, Zhang F, et al. CCR2 positive exosome released by mesenchymal stem cells suppresses macrophage functions and alleviates ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 1240301.
116. King HW, Michael MZ, Gleagle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012; 12: 421.
117. Kucharzewska P, Belting M. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
118. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, et al. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (12): 3285–301.
119. Bryzgunova OE, Lakhtionov PP. Extracellular nucleic acids in urine: Sources, structure, diagnostic potential. *Acta Naturae*. 2015; 7 (3): 48–54.
120. Raab WP. Enzymes and isoenzymes in urine. *Curr Probl Clin Biochem*. 1968; 2: 17–83.
121. Roy S, Hochberg FH, Jones PS. Extracellular vesicles: The growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7 (1): 1438720.
122. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016; 5: 32945.
123. Park J, Lin HY, Assaker JP, et al. Integrated kidney exosome analysis for the detection of kidney transplant rejection. *ACS Nano*. 2017; 11 (11): 11041–6.
124. Dimuccio V, Ranghino A, Praticò Barbato L, et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e104490.
125. Alvarez S, Suazo C, Boltansky A, et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2013; 45 (10): 3719–23.
126. Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297 (4): F1006–16.
127. El Fekih R, Hurley J, Tadigotla V, et al. Discovery and validation of a urinary exosome mRNA signature for the diagnosis of human kidney transplant rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2021; 32 (2): 994–1004.
128. Lim JH, Lee CH, Kim KY, et al. Novel urinary exosomal biomarkers of acute T cell-mediated rejection in kidney transplant recipients: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2018; 13 (9): e0204204.
129. Sigdel T, Dinh V, Vitalone M, et al. Identification of transplant injury specific metabolites in the kidney transplant urine by metabolomics.: Abstract# A497. *Transplantation*. 2014; 98: 884–5.
130. Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med*. 1995; 332 (23): 1540–5.
131. Lytvyn Y, Xiao F, Kennedy CR, et al. Assessment of urinary microparticles in normotensive patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017; 60 (3): 581–4.
132. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, et al. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e73798.
133. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics*. 2014; 96: 92–102.

134. Zhou H, Kajiyama H, Tsuji T, et al. Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305 (4): F553–9.
135. Abe H, Sakurai A, Ono H, et al. Urinary exosomal mRNA of WT1 as diagnostic and prognostic biomarker for diabetic nephropathy. *J Med Invest*. 2018; 65 (3.4): 208–15.
136. du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, et al. Urinary measurement of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis*. 2003; 42 (3): 497–506.
137. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal fetuin-a identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*. 2006; 70 (10): 1847–57.
138. Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2008; 74 (5): 613–21.
139. Pocsfalvi G, Raj DAA, Fiume I, et al. Urinary extracellular vesicles as reservoirs of altered proteins during the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Proteomics Clin Appl*. 2015; 9 (5–6): 552–67.
140. Salih M, Demmers JA, Bezstarosti K, et al. Proteomics of urinary vesicles links plakins and complement to polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27 (10): 3079–92.
141. Hogan MC, Bakeberg JL, Gainullin VG, et al. Identification of biomarkers for PKD1 using urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26 (7): 1661–70.
142. Bourderioux M, Nguyen-Khoa T, Chhuon C, et al. A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. *J Proteome Res*. 2015; 14 (1): 567–77.
143. Morikawa Y, Takahashi N, Kamiyama K, et al. Elevated levels of urinary extracellular vesicle fibroblast-specific protein 1 in patients with active crescentic glomerulonephritis. *Nephron*. 2019; 141 (3): 177–87.
144. Lv LL, Wu WJ, Feng Y, et al. Therapeutic application of extracellular vesicles in kidney disease: Promises and challenges. *J Cell Mol Med*. 2018; 22 (2): 728–37.
145. Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, et al. Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. *Nefrologia*. 2017; 37 (2): 126–37.
146. Greco KA, Franzen CA, Foreman KE, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. *Urology*. 2016; 91: 241.e1–7.
147. Wang B, Yao K, Huuskens BM, et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous microRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis. *Mol Ther*. 2016; 24 (7): 1290–301.
148. Grange C, Papadimitriou E, Dimuccio V, et al. Urinary extracellular vesicles carrying klotho improve the recovery of renal function in an acute tubular injury model. *Mol Ther*. 2020; 28 (2): 490–502.
149. Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type i diabetes in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 24.
150. Yu X, Huang C, Song B, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model. *Cell Immunol*. 2013; 285 (1–2): 62–8.

Amadea Zupan¹

Depresija in prehrana

Depression and Nutrition

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: depresija, prehrana, makrohranila, mikrohranila, čustveno prenajedanje, nevronske nagradne mreže

Za depresivnimi motnjami trpi že več kot 280 milijonov svetovnega prebivalstva, obenem pa so v porastu tudi nezdravi vzorci prehranjevanja. Raziskave zadnjih let, ki preučujejo povezavo med prehrano in depresijo, odpirajo nove možnosti za preprečevanje in zdravljenje depresivnih motenj. Zdravi vzorci prehranjevanja, ki temeljijo na visokem vnosu sadja in zelenjave, rib in polnozrnatih izdelkov, so obratno povezani s tveganjem za depresijo, nezdravi/zahodni vzorci prehranjevanja, ki temeljijo na visokem vnosu rdečega in/ali predelane mesa, predelanih zrn, sladkarij in mlečnih izdelkov z visoko vsebnostjo maščob, pa so pozitivno povezani s tveganjem za depresijo. Mikrohranila, ki so se izkazala kot pomembna za najboljše duševno zdravje, so folna kislina, vitamina B6 in B12, vitamin D, cink, selen, magnezij in železo. Za ustrezno delovanje dopaminergičnih in serotonergičnih živčnih prenašalcev in posledično zmanjšanje simptomov depresije in tesnobe so pomembne tudi nenasičene maščobne kisline ter aminokisline triptofan, tirozin, histidin, fenilalanin, holin in glutaminska kislina. Depresivne motnje so povezane tudi s spremembami v črevesnih mikroorganizmih prek vnetja, oksidativnega stresa in nevroplastičnosti.

ABSTRACT

KEY WORDS: depression, diet, macronutrients, micronutrients, emotional overeating, neural reward networks

More than 280 million people worldwide suffer from depressive disorders, and at the same time, unhealthy eating patterns are on the rise. Research in recent years examining the link between diet and depression opens up new possibilities for the prevention and treatment of depressive disorders. Healthy eating patterns based on a high intake of fruits and vegetables, fish and whole grains are inversely associated with a risk of depression, while unhealthy/western eating patterns based on a high intake of red and/or processed meat, refined grains, sweets and dairy products with a high fat content are positively associated with a risk of depression. The micronutrients that have been shown to be important for optimal mental health are folic acid, vitamins B6 and B12, vitamin D, zinc, selenium, magnesium and iron. Unsaturated fatty acids and the amino acids tryptophan, tyrosine, histidine, phenylalanine, choline and glutamic acid are also important for the proper functioning of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters and the consequent reduction of symptoms of depression and anxiety. Depressive disorders are also associated with changes in intestinal microorganisms through inflammation, oxidative stress, and neuroplasticity.

¹ Amadea Zupan, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; amadea.zupan@gmail.com

UVOD

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije več kot 280 milijonov svetovnega prebivalstva trpi za veliko depresivno motnjo oz. depresijo. Zanj so značilni pogosti občutki žalosti in brezupa ter/ali izguba zanimanja za dejavnosti, v katerih so ti posamezniki včasih uživali. Po klasifikaciji DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth edition) mora biti za diagnozo prisotnih vsaj pet kriterijev v obdobju dveh tednov, med katerimi mora biti vsaj eden od zgoraj navedenih, poleg tega pa se lahko pojavlja tudi značilna izguba ali povečanje telesne teže, povečanje ali zmanjšanje teka, upočasnitev misli in zmanjšanje fizičnega gibanja, utrujenost ali izguba energije, občutek ničvrednosti, prekomerne ali neprimerne krivde, zmanjšana sposobnost razmišljanja, zbranosti ali neodločnost, ponavljajoče se misli o smrti, samomorilne misli brez točno določenega načrta, poskus samomora ali načrt za samomor (1, 2). Pogosto se pri razumevanju in razlagi depresije uporablja bio-psiho-socialni model, ki vključuje in poudarja medsebojno delovanje vseh pomembnih bioloških, psiholoških in socialnih dejavnikov, ki lahko prispevajo k razvoju in vzdrževanju depresije. Psihološki dejavniki, ki vplivajo na depresijo, vključujejo značilne negativne vzorce razmišljanja, pomanjkanje sposobnosti spoprijemanja, težave pri presoji in oslABLJENO čustveno inteligenco (težave s sposobnostjo zaznavanja, razumevanja in izražanja čustev). S psihološkimi dejavniki se lahko do določene mere prepletajo tudi biološki, kot so spol, starost, bolezn, vnetja, prehrana in z njo povezan mikrobiom, določene genetsko pogojene osebnostne značilnosti, epigenetika itd., in socialni dejavniki, kot so načini spoprijemanja s stresnimi stanji, ki se jih posameznik priuči od oseb v svojem socialnem okolju, socialno-ekonomski položaj, družbeno-politične razmere, socialna podpora in socialna diskriminacija (npr.

homofobija, seksizem, rasizem) (3, 4). Depresija zaradi velike razširjenosti in dolgotrajnosti povzroča veliko gospodarsko, osebno in zdravstveno breme (2). Pri mladostnikih je samomor kot posledica velike depresivne motnje drugi najpogostejši razlog smrti (1, 5). Preprečevanje in obvladovanje depresije je zato svetovna prioriteta javnega zdravja.

Najpogostejša in najučinkovitejša pristopa za zdravljenje depresije sta psihoterapevtska obravnava, kjer prevladuje vedenjsko-spoznavni pristop, in/ali jemanje antidepresivov (6). Pri mladostnikih se lahko tako pri psihoterapevtski obravnavi kot tudi pri farmakološkem zdravljenju pojavi do 50-% neodzivnost na zgoraj omenjena pristopa ali pa se jim depresivna obdobja znova ponovijo, zato je pomembno področje javnozdravstvenega ukrepanja preprečevanje pojavnosti depresije (7–9).

Eden izmed možnih drugačnih pristopov je tudi nutritivni. Številne raziskave so namreč potrdile, da se depresija pozitivno povezuje z nezdravimi vzorci prehranjevanja, hkrati pa obstaja pozitivna povezava med zdravim načinom prehranjevanja in izboljšanjem depresivnih motenj brez priključene psihoterapije ali farmakološke obravnave (10–14). Vseeno pa večina raziskav ni nadzorovala ostalih dejavnikov, ki se prav tako povezujejo z depresijo, kot so npr. socialno-ekonomski položaj, socialna izključenost ter kultura in starost, zato jih moramo tolmačiti previdno.

ODNOS DO HRANE IN DEPRESIJA

V zadnjih letih smo pričali porastu nezdravega načina prehranjevanja, hkrati pa močno narašča delež ljudi, ki trpijo za depresivnimi motnjami (4). Dokazi iz različnih kliničnih preskušanj in epidemioloških raziskav kažejo, da lahko zdrav način prehranjevanja zmanjša simptome depresije in tveganje zanj (4, 12, 15–21). Številne raziskave potrjujejo povezavo med vzorci prehra-

njevanja, vnetjem, oksidativnim stresom, možgansko plastičnostjo in pojavnostjo depresije (22).

Depresivne motnje lahko spodbujajo nezdrave vzorce prehranjevanja (4). Pojavi se lahko izguba teka in posledično izgubljanje telesne teže ali pa povečan tek in zato pridobivanje na teži. Čustveno prenašanje je opredeljeno kot težnja k prehranjevanju kot odziv na negativna čustva, kot so npr. depresija, stres in tesnoba (23). Navadno gre za vnos visokokalorične in okusne hrane. Možni vzroki za čustveno prehranjevanje so strogo prehransko omejevanje, slaba interoceptivna zavest, nezmožnost ubeseditve ali prepoznavne čustev pri sebi ali pri drugih ljudeh (aleksitimija), moteno uravnavanje čustev in neustrezno delovanje stresne osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza, neustrezno starševstvo (izvajanje psihološkega nadzora in vzbujanje krivde, ko otrok v čem ni uspešen) ali depresivni občutki v povezavi z genetsko občutljivostjo (24). Nenormalen porast teka je eden od kriterijev za diagnozo atipične depresije (25–27). Konttinen in sodelavci so ugotovili, da je čustveno prehranjevanje pomemben vedenjski mehanizem, povezan tako z depresijo kot tudi z debelostjo (23).

Po drugi strani se lahko pri depresiji pojavi tudi izguba teka in posledično telesne teže. Nekateri raziskovalci to pojasnjujejo s pojavom anhedonije, ki je značilen simptom pri depresivnih motnjah. Gre za zmanjšano sposobnost doživljanja užitka in zmanjšano občutljivost na nagrajevalne dražljaje, kot je npr. okusna hrana, kar lahko vodi do zmanjšane teke (28). Anhedonija naj bi bila prisotna pri veliki depresivni motnji, vendar pa naj bi se pojavljala tudi pri shizofreniji, pri osebah, ki so nagnjene k uživanju raznih snovi in k tveganim vedenjem, pri Parkinsonovi bolezni in prenašanju (29–34). Za pojavnost le-te pa naj bi bili odgovorni tako geni kot tudi dejavniki okolja (35).

NEVROBIOLOŠKO OZADJE DEPRESIJE

Za občutenje hedonije oz. drugega prijetnega čustva je pomembna sposobnost zaznave morebitno nagrajevalnega dražljaja, ocene hedonično pomembnega dražljaja in izražanja čustva. V to pa sta vključena dva pomembna sistema (35).

Ventralni sistem vključuje inzulo, amigdalno, ventralni striatum in ventralna področja prednjega (anteriornega) cingulata girusa in prefrontalne skorje. Ta sistem naj bi bil ključen pri prepoznavi čustvenega pomena okoljskih dražljajev in odzivu na ta čustva s proizvodnjo afektivnih stanj. Prav tako naj bi samodejno uravnaval in posredoval avtonomne odzive na čustvene dražljaje iz okolja, ki spremljajo afektivna stanja. Dorzalni sistem zajema hipokampus in dorzalna področja anteriornega cingulata girusa in prefrontalne skorje. Ta naj bi se bolj povezoval z izvršilnimi funkcijami, kot sta npr. načrtovanje in izbira pozornost, in bil zato vključen v uravnavanje neavtonomnih in miselno napornejših afektivnih stanj (35).

Pri nevrobiološkem ozadju nagrajevalnih mrež so ključne dopaminergične mezo-limbicne poti. Te izvirajo v ventralnem tegmentalnem področju (angl. *ventral tegmental area*, VTA) in projicirajo v ventralni striatum (zlasti nukleus akumbens (NA), strio terminalis, hipokampus in amigdalo) (36). V glavnino (60 %) teh poti je vključen dopamin (aktivacija VTA ima za posledico sproščanje dopamina iz NA), prisotni pa so tudi drugi živčni prenašalci, kot sta γ -aminobutanojska kislina (angl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) in glutamat (37). NA prejema aferentne signale tudi iz ostalih področij, ki so vključena v čustva (amigdala, orbitofrontalna skorja in srednja (medialna) prefrontalna skorja medialnih možganov), iz motoričnih področij (kot sta dorzalni kavdat in globus palidus), iz področij možganskega debla (npr. VTA) in iz področij, ki so vključena v spomin (npr.

hipokampus), iz njega pa vodijo eferentne poti nazaj v VTA, ventralni palidum, cingulatno in medialno prefrontalno skorjo, talamus, hipotalamus in amigdale (35). NA tako povezuje številne signale tako iz skorje kot tudi iz limbičnih predelov možganov (38). NA, ventralni kavdat in ventralni putamen kažejo povečano aktivnost in slednja dva tudi povečano izločanje dopamina pri npr. denarni nagradi, prijetni glasbi, privlačnih obrazih in pri zaužitju kokaina (39–43). NA vsebuje dva različna tipa živčnih celic, ki izražajo dopaminske (D) 1 ali D2 receptorje. Aktivacija D1-receptorjev spodbuja nagrajevanje in hkrati povečuje odpornost na depresijo, zaviranje D1 pa povečuje občutljivost za anhedonične dražljaje. Nasprotno pa povečanje aktivnosti D2-receptorjev povečuje ranljivost za socialno izogibanje (44).

Orbitofrontalna skorja ima pomembno vlogo v nagrajevalnih mrežah. Povezuje senzorične informacije, uravnava avtonomne odzive in je ključna pri procesih predvidevanja, učenja, nagrajevanja in odločanja za čustvena in druga vedenja. Vključena je tudi v subjektivno ovrednotenje dražljaja kot nagrajevalnega (45). Tesno se povezuje s številnimi zgoraj omenjenimi središči, ki so vključena v predelovanje čustev (35). Medialna prefrontalna skorja, ki se tesno povezuje z orbitofrontalno skorjo, skupaj z VTA in NA tvori »mezokortikolimbično nagrajevalno mrežje« (46).

Pomembne strukture v procesu nagrajevanja možganov so tudi inzula, anteriorna cingulatna skorja in amigdala. Slednja igra ključno vlogo pri pripisovanju čustvenega pomena dražljajem iz okolja (47). Izdatneje se odziva na dražljaje, ki jim pripišemo negativno vrednost, in ima ključno vlogo pri strahu in tesnobi (48, 49). Anteriorna cingulatna skorja je vključena v prepoznavo in obdelavo interoceptivnih ali eksteroceptivnih čustvenih signalov in v odziv nanje (50). Inzula se aktivira pri morebitno stresnih spoznavnih ali interoceptivnih senzoričnih dražljajih. Tako npr.

spomin na žalosten dogodek poveča njeno aktivnost (51, 52).

Pomembno vlogo pri sistemu nagrajevanja naj bi imela tudi stranska (lateralna) habenula. Ta ima dopaminergične povezave s črno snovjo (kompaktnim delom) in VTA, hkrati pa prek serotonina projicira tudi na mediana in dorzalna jedra rafe (53). Lateralna habenula zaviralno vpliva na dopaminergične živčne celice, okvare le-te se zato odražajo z višjo ravno dopamina v skorji in striatnem področju (54, 55).

Ključni v sistemu nagrajevanja možganov so tudi živčni prenašalci. Med pomembnejšimi je dopamin. Raziskave pozitronske emisijske tomografije so pokazale, da nagrajevalni dražljaji povzročijo sproščanje dopamina v NA striatuma (46). Ta se je tako npr. sproščal pri poskusnih živalih med hranjenjem, uživanjem drog in spolnim vedenjem (35, 56). Ključen naj bi bil prenos dopamina znotraj mezokortikolimbične nevronske mreže, ki zajema izločanje dopamina iz črne snovi in VTA medialnih možganov do NA, amigdale, ventralnega paliduma in prefrontalne skorje (57). Dopamin je ključen v motivacijskem vedenju. Prav tako pa naj bi bil pomemben za odkrivanje morebitnih nagrajevalnih dražljajev, kot tudi odvratilnih dražljajev (zmanjša se hitrost sprožitve dopaminergičnih živčnih celic) (35). Prav tako naj bi tudi spodbujal učenje nagrajevanja in izbiro nagrad. Tako se npr. dopaminergične živčne celice hitreje sprožijo pri nepredvidenih rezultatih nagrad v primerjavi s pričakovanimi (46, 58).

Kljub temu da NA zajema 60 % dopaminergičnih živčnih celic, pa so pomembne tudi živčne celice, ki izločajo glutamat (15 %), in tiste, ki izločajo živčni prenašalec GABA (25 %) (59). Glutamat tako npr. projicira iz frontalne skorje in hipokampusa v VTA in NA (46).

Pomembno vlogo imajo še opioidni receptorji v NA. Opioidi so skupaj s serotoninom pomembni pri konzumativnem užitku (46). Tako se npr. ob hkratnem vnosu

opioida dva- do trikrat poveča hedonična izkušnja pri uživanju saharoze (60). Opioidni sistem naj bi bil vključen tudi v posredovanje spodbudne motivacije in učenje preko μ - in δ -opioidnih receptorjev v NA (61). Antagonisti opioidnih receptorjev zmanjšajo nagrajevalno vedenje in zavirajo sproščanje dopamina (35).

V sistemu nagrajevanja je pomemben živčni prenašalec tudi glutamat. Ta se iz glutaminičnih živčnih celic iz različnih področij možganov veže na N-metil-D-aspartatne (NMDA) receptorje v NA. Aktivacija NMDA-receptorjev je vključena v skrajšanje odzivnega časa pri odzivih na nagrajevalne dražljaje (62). Pomembno vlogo pa naj bi imela tudi acetilholin in holecistokinin, saj uravnava sproščanje dopamina in glutamata (63, 64).

Serotonin se v procesih nagrajevanja projicira iz jedra rafe v številna področja skorje in področja pod njo. Imel naj bi predvsem vlogo uravnavanja, saj vpliva na sproščanje opioidov in dopamina preko vezave na različne receptorje, kot so 5-hidroksitriptaminski (5-HT) 1A, 5-HT_{2A} in serotoninški prenašalec (angl. *5-hydroxytryptamine transporter*, 5-HTT) (65). Serotonin naj bi bil povezan tako s konzumnim užitkom kot tudi s pričakovanjem nagrade. Ob zaviranju ponovnega prevzema serotonina v presinaptično živčno celico se zviša prag za nagrado, ki vzbudi možgane, in se zmanjša hitrost sprožitve dopaminskih živčnih celic v VTA (35, 66, 67). Pri posameznikih z veliko depresivno motnjo se je pokazalo pomembno zmanjšanje 5-HTT v striatumu in medialnih možganih (68). Prav tako zavora sinteze serotonina ali sproščanja glutamata povzroči delne okvare v poskusih nagrajevanja (69).

Pri anhedoniji, ki je eden izmed simptomov depresije po DSM-V, pride na fiziološki ravni do sprememb nevronske mreže, ki sodelujejo pri procesih nagrajevanja možganov. Primarno naj bi se zmanjšala aktivnost živčnih celic v ventralnem stria-

tumu (zlasti v NA), hkrati pa naj bi se sekundarno povečala aktivnost v ventralnem delu prefrontalne skorje (ventromedialna prefrontalna skorja in orbitofrontalna skorja) (35).

Pri posameznikih z veliko depresivno motnjo prihaja do zmanjšanja gostote in prostornine, hkrati pa do povečanja aktivnosti področij, ki so ključna pri prepoznavi tako pozitivnih kot negativnih čustvenih dražljajev in tvorbi čustvenega odziva (cingulatni girus, amigdala, ventrolateralna prefrontalna skorja, ventralni striatum, talamus in inzula). Hkrati se zmanjša aktivnost v področjih, ki zahtevajo spoznavno bolj naporen odziv na čustven dražljaj (dorzolateralni in dorzomedialni del prefrontalne skorje). Pri posameznikih, ki so uspešno ozdravljeni velike depresivne motnje, se vzorec aktivnosti navadno obrne (70, 71).

Metaanaliza, ki je zajela 22 raziskav s 341 bolniki z veliko depresivno motnjo in primerjalno skupino s 367 osebami, je preučevala aktivnost možganov med obdelovanjem nagrajevalnega dražljaja. Pri depresivnih bolnikih se je pokazala zmanjšana aktivnost v subkortikalnih in limbičnih področjih (talamus, putamen, inzula, kavdat, anteriorna cingulatna skorja) in povečala aktivnost v kortikalnih predelih (fuziformni in lingvalni girus, kuneus, deli frontalne skorje) (72).

Pri veliki depresivni motnji naj bi se nefunkcionalno predelovanje nagrajevanja povezovalo z motenimi povezavami med kortikalnimi in subkortikalnimi strukturami (NA naj bi imel zmanjšane in motene povezave s kavdatom, medialno orbitofrontalno skorjo, dorzomedialno prefrontalno skorjo, zgornjim temporalnim girusom, inzulo ter rostralno in dorzalno anteriorno cinglutano skorjo) (73–75). Med obdelavo dražljajev, povezanih z izgubo, se je pri depresivnih osebah povečala povezava ventralnega striatuma s prefrontalnimi področji in z levim kavdatom ter medialnim cingulatnim girusom (76).

Do anhedonije med hranjenjem bi lahko pri depresiji prišlo zaradi zmanjšane občutka nagrade, za kar naj bi bilo odgovorno zmanjšano sproščanje dopamina v lupini NA, ali pa zaradi nenormalne sposobnosti razločevanja spodbujevalne vrednosti, ki jo ima pogojni dražljaj hrane, za kar naj bi bilo odgovorno zmanjšano sproščanje dopamina iz medialne prefrontalne skorje in NA (35).

Amigdala naj bi bila značilno vključena v pojav anhedonije. Tako naj bi se zmanjšana prostornina amigdale odražala v omejenem razponu doživljanja čustev (saj je okrnjeno zaznavanje veljavnosti čustvenih dražljajev), povečana aktivnost amigdale pa v nagnjenosti k zaznavanju bolj negativnih čustev, saj se amigdala na splošno odzove na bolj negativne dražljaje (35).

Raziskave so tudi pokazale pozitivno povezavo med anhedonijo in nižjo presnovo v putamnu, anteroventralnem kavdatu in striatumu ter zmanjšanim odzivu desnega putamna za obrazne izraze sreče. Prav tako je bila ugotovljena povečana aktivnost v ventromedialni prefrontalni skorji pri depresivnih bolnikih z anhedonijo. Ti naj bi si namreč pogosteje prizadevali za vključevanje v vesele trenutke, saj si želijo izboljšati svoje razpoloženje, vendar žal neuspešno (35, 46, 77).

Raziskave kažejo, da lahko stres, prav tako kot depresija, povzroči prekomerno ali zmanjšano prehranjevanje (78). Čustveno prehranjevanje pri depresiji lahko ublaži simptome depresije, vendar je tako olajšanje zgolj prehodno. Pogosto namreč pride do ponavljajočega se tolažilnega prehranjevanja, povečanega tveganja za kompulzivno prehranjevanje, povečanje telesne mase in debelosti ter sobolezenskih dejavnikov (79–81).

Depresivne osebe s povečanim tekom kažejo višje ravni leptina in odpornost na inzulin. Prav tako je pri njih povečana aktivnost v področjih inzule in parahipokampusa. Pri osebah z zmanjšanim tekom

pa je pogosto povišan serumski nočni kortizol. Prav tako lahko pri takih osebah zaznamo zmanjšano aktivnost v ventralnem striatumu (vključno z NA) (82).

MAKRO- IN MIKROHRANILA PRI PREPREČEVANJU IN ZDRAVLJENJU DEPRESIJE

Makro- in mikrohranila, ki jih v telo vnašamo s hrano, imajo pomembno vlogo pri preprečevanju in zdravljenju depresije. Mednarodno združenje za raziskave prehranske psihiatrije (The International Society for Nutritional Psychiatry Research) je priporočilo, naj se prehranska medicina šteje za glavno v psihiatrični praksi, kar podpirajo številne raziskave in programi za promocijo zdravja (4). Kljub temu je treba upoštevati dvosmerno vzročnost. Slaba prehrana s pomanjkanjem makro- in mikrohranil je lahko eden izmed vzrokov ali posledic depresivnih motenj (4, 83).

Metaanaliza 21 raziskav, ki je zajela 117.229 udeležencev različnih starosti iz desetih držav, je ugotovila, da so zdravi vzorci prehranjevanja, ki temeljijo na visokem vnosu sadja in zelenjave, rib in polnozrnatih izdelkov, obratno povezani s tveganjem za depresijo, nezdravi/zahodni vzorci prehranjevanja, ki temeljijo na visokem vnosu rdečega in/ali predelanega mesa, predelanih zrn, sladkarij in mlečnih izdelkov z visoko vsebnostjo maščob, pa so pozitivno povezani s tveganjem za depresijo. Ker je metaanaliza zajela udeležence iz desetih različnih držav, bi lahko razlike v rezultatih delno pripisali tudi drugačnim prehranjevalnim vzorcem, ki so značilni za določeno geografsko območje in kulturo (povezava med zdravimi prehranjevalnimi vzorci in zmanjšanim tveganjem za depresivno motnjo je bila bolj očitna pri udeležencih azijskega porekla). Prav tako ima lahko na rezultate vpliv tudi različna starost preiskovancev (povezava med zdravimi prehranjevalnimi vzorci in zmanjšanim tveganjem za depresivno motnjo je bila npr. bolj značilna pri

starostni skupini, mlajši od 50 let). Med zajetimi raziskavami so tudi razlike v njihovi zasnovi. Tako so bile povezave bolj statistično značilne pri kohortnih raziskavah. So pa v metaanalizi zajeli raziskave, ki so nadzirale in poenotile količino zaužite hrane, tako pri zdravem kot nezdravem vzorcu prehranjevanja, kljub temu pa hrana znotraj prehranjevalnega vzorca med različnimi raziskavami ni bila nikoli popolnoma enaka. Raziskave, zajete v metaanalizi, so se razlikovale tudi glede ostalih dejavnikov, ki so jih v raziskavah nadzirali. Določene so tako npr. nadzorovale socialni položaj, razvade, fizično aktivnost, bolezni, hormonski status, izobrazbo itd., druge pa zgolj spol in starost, zato moramo biti pri tolmačenju metaanalize previdni (84).

Molendijk in sodelavci so z metaanalizo 24 prospektivnih kohortnih raziskav prav tako pokazali pozitivno povezavo med zdravo/sredozemsko prehrano in manjšim tveganjem za pojav depresivnih simptomov (21). Tudi nizek prehranski vnetni indeks (ocenjuje vpliv prehrane na vnetni status posameznika, pri čemer nizka ocena nakazuje na protivnetno zmožnost določene hrane) je bil statistično značilno povezan z nižjo incidenco depresivnih simptomov. V metaanalizi so nadzirali oceno depresije (diagnoza ali samoporočilo), nadzor simptomov depresije na začetku raziskave (da ali ne), geografsko območje, nadzor časovno spremenljivih dejavnikov (kot je npr. pojav sladkorne bolezni). Prav tako so nadzirali starost in spol preiskovancev, incidenco depresije ter metodološko kakovost raziskave. Avtorji metaanalize navajajo tudi nekaj njenih pomanjkljivosti. Večina zajetih raziskav se je namreč posluževala merjenja prehranskih navad z zgolj eno oceno, kar je manj natančno kot z več ocenami. Prav tako so določene raziskave depresijo opredelile z uporabo strukturiranih intervjujev, druge pa z uporabo antidepresivov (različne ravni specifičnosti in občutljivosti). V metaanalizi prav tako niso nadzoro-

vali dejavnikov, kot so kultura, socialno-ekonomski položaj in socialna izključenost, kar bi vse lahko vplivalo na izid metaanalize (21).

Nekatere raziskave kažejo povezavo med uživanjem ogljikovih hidratov z visokim glikemičnim indeksom in pojavnostjo depresije (85). Glikemični indeks je relativna razvrstitev ogljikovih hidratov v živilih glede na hitrost njihove prebave, vsrkanja in presnove ter na hitrost dviga glukoze v krvi in posledično inzulina. Živila z visokim glikemičnim indeksom povzročijo hiter dvig glukoze in inzulina v krvi (86). Načini prehrane, ki vsebujejo velike količine rafiniranih ogljikovih hidratov in sladkorjev, poleg povečanega tveganja za debelost in sladkorno bolezen, negativno vplivajo tudi na psihološko počutje in so v pozitivni povezavi s pojavnostjo simptomov depresije (87). Po drugi strani večje količine vlaknin, ki jih najdemo predvsem v zapletenih ogljikovih hidratih, delujejo varovalno na pojavnost depresije. Raziskave razlagajo povezavo med uživanjem ogljikovih hidratov z visokim glikemičnim indeksom in pojavnostjo depresije z izrazitim nihanjem koncentracije glukoze v krvi, kar pa preko mehanizmov uravnavanja sproži izločanje stresnih hormonov, kot so kortizol, adrenalin, glukagon in rastni hormon (88, 89). Ti hormoni povzročijo spremembe v tesnobi, razdražljivosti in lakoti (90). Poleg tega so opazovalne raziskave, v katerih so sistematično opazovali dejavnik tveganja, tj. krvni sladkor, brez poskusnih stanj, torej brez poskusov spreminjanja, kdo je izpostavljen dejavniku tveganja in kdo ne, pokazale, da je ponavljajoč se nizek krvni sladkor povezan z motnjami razpoloženja (89). Raziskovalci predvidevajo, da je pomemben posrednik med prehrano z visokim glikemičnim indeksom in depresijo vnetni odziv. Ta ima negativen vpliv na zdravje možganov, vključno s spoznavnim upadom in pojavom depresivnih motenj (91). Hiter porast v glukozi namreč sproži tvorbo prostih radikalov, ki

aktivirajo biokemijsko sosledje, katerega posledice so vnetje, nenormalno delovanje notranjega sloja majhnih arterij (endotelijska disfunkcija) in povečana aktivnost simpatičnega živčnega sistema (92, 93).

Mikrohranila sodelujejo v presnovnih poteh, ključnih za razvoj in najboljše delovanje živčnega sistema. Tako lahko neustrezen vnos negativno vpliva na psihološko stanje in s tem poveča tveganje za depresivne motnje. Mikrohranila, ki so se izkazala kot pomembna za najboljše duševno zdravje, so folna kislina, vitamina B6 in B12, vitamin D, cink, selen, magnezij in železo (94). Hranila triptofan, vitamin B6, vitamin B12, folna kislina (folati), tirozin, histidin, fenilalanin, holin in glutaminska kislina so potrebna za proizvodnjo živčnih prenašalcev, kot so serotonin, noradrenalin in dopamin. Ti pa so ključni pri uravnavanju razpoloženja, teka in mišljenja (95). Za ustrezno delovanje dopaminergičnih in serotonergičnih živčnih prenašalcev in posledično zmanjšanja simptomov depresije in tesnobe so pomembne tudi nenasičene maščobne kisline, vključno z mononenasičenimi (avokado, olive, arašidi, sončnično olje) in polinenasičenimi viri (omega-3 v lanenih, bučnih semenih in ribah ter omega-6 v svetlinovem, boragovem olju, sončničnih semenih, sezamu, orehih itd.) (96).

Makro- in mikrohranila v prehrani imajo tudi posreden vpliv na pojavnost depresije preko črevesnega mikrobioma (91). Številne raziskave so potrdile, da so depresivne motnje povezane s spremembami v črevesnih mikroorganizmih (97). Ti naj bi vplivali na vnetje, oksidativni stres in nevroplastičnost, kar lahko vodi do duševnih težav (98–101). Sudo in sodelavci so pokazali, da miši s pomanjkanjem mikroorganizmov v črevesju kažejo prekomeren stresni odziv in nižje ravni nevrotrofičnih dejavnikov (ti uravnavajo tvorbo in plastično preoblikovanje nevronske mreže) in serotoninских receptorjev v skorji in hipo-

kampusu možganov (102). Prav tako je bilo ugotovljeno, da stresna aktivacija osi hipotalamus–hipofiza–nadledvična žleza uravnava mikrobo sestavo pri podganah (103). Stres povzroča povečano prepustnost črevesja, kar bakterijam in bakterijskim antigenom omogoča, da prečkajo epitelno pregrado in aktivirajo imunski odziv sluznice, kar posledično spremeni sestavo mikrobioma in vodi do povečanega stresnega odziva (104).

PREHRANA MATERE V NOSEČNOSTI IN ČUSTVENO- VEDENJSKE TEŽAVE OTROK

Nekatere raziskave nakazujejo, da je za razvoj motenj uravnavanja čustev in vedenja v otroštvu pomembno že obdobje pred rojstvom (105). Slaba prehrana matere v času nosečnosti in neustrezna prehrana otroka v zgodnjem življenju lahko namreč negativno vplivata na čustveno-vedenjski razvoj otroka in prispevata k večji verjetnosti za pojav depresivnih motenj v kasnejših obdobjih (13, 106–108).

Kohortna raziskava, ki je zajela 7.814 parov mati-otrok, je preučevala povezavo med simptomi depresije pri materi in nezdravo prehrano (ocenjeno med nosečnostjo in poporodnim obdobjem) v zvezi z motnjami uravnavanja čustev in vedenja otrok v starosti dveh, štirih in sedmih let. Nezdrava prehrana matere tako v nosečnosti kot v obdobju po rojstvu je bila pozitivno povezana s simptomi predrojstvene depresije pri materi in z večjimi motnjami uravnavanja čustev in vedenja otrok do starosti sedem let. Večje motnje uravnavanja čustev in vedenja otrok so se prav tako neodvisno pozitivno povezovali z nezdravo prehrano matere in večjimi simptomi depresije pri materi. V raziskavi so nadzirali ostale dejavnike, ki bi lahko vplivali na izid, kot so zapletitost v nosečnosti in pri porodu, izobrazba matere, revščina itd. (107).

Druga prebivalstvena kohortna raziskava, ki je zajemala nizozemske matere, je

preučevala prehranske vzorce matere med nosečnostjo in povezavo z razvojem možganov ploda in nadaljnjim vedenjem potomcev. Za slednje so zajeli 3.014 otrok, starih eno, tri, pet ali šest let. Ocenjevali so težave s ponotranjanjem (internalizacijo) (tesnoba/depresivnost, umaknitveno obnašanje, čustveno reaktivno obnašanje in somatske pritožbe) ter težave s pozunanjanjem (eksternalizacijo) otroka (napadalnost, nepazljivost). Med prehranske vzorce so vključili sredozemsko prehrano (visok vnos zelenjave in sadja, rastlinskih olj in rib ter manjši vnos mesa), tradicionalno nizozemsko prehrano (manjši vnos sadja in zelenjave ter višji vnos mesa in krompirja) in prehranjevalni vzorec, ki je temeljil na slaščicah. V raziskavi so ugotovili, da sta med nosečnostjo tako nizko sledenje sredozemski prehrani kot tudi visoko sledenje tradicionalni nizozemski prehrani pozitivno povezani z večjim tveganjem za kasnejše težave otroka z eksternalizacijo. V raziskavi so prav tako upoštevali ostale možne dejavnike, ki bi lahko vplivali na izid, kot so starost matere, indeks telesne mase (ITM) matere pred nosečnostjo, materino predrojstveno kajenje, dodajanje multivitaminov in folne kisline, očetovsko narodno poreklo, izobrazba obeh staršev, zakonski status, dohodki v družini in morebitna psihopatologija. Upoštevali so tudi predrojstveni povprečni dnevni kalorijski vnos. Pri otrocih so upoštevali poleg starosti in spola tudi težo ob rojstvu in status dojenja pri šestih mesecih. Prav tako so upoštevali prehranjevalne navade otroka, kot so uživanje sladkarij in ostalih prigrizkov (108).

Določene raziskave tudi ugotavljajo, da je večje uživanje sredozemske prehrane med nosečnostjo povezano z manjšim tveganjem za okvare nevralne cevi in razcep ustnice in neba, uživanje tradicionalne prehrane pa naj bi to tveganje povečalo (109). Napadalo vedenje in težave s pozornostjo so lahko posledica spremenjene strukture in delovanja možganov, ki se lahko pojavijo že

pred rojstvom. Pri otrocih s pomanjkanjem pozornosti in hiperaktivnostjo, z motnjami vedenja in s hudo depresivno motnjo so raziskave nevrološkega slikanja ugotovile strukturne in funkcijske spremembe možganov (110).

Raziskava, ki je preučevala povezavo med razvojem možganov ploda in tremi različnimi prehranjevalnimi vzorci nosečih mater (sredozemski, tradicionalni nizozemski in na sladica temelječi), je pokazala, da imajo pri zorenju in razvoju živčnih celic pomembno vlogo omega-3- in omega-6-maščobne kisline (108). Pomembne so npr. pri ustrezni pretočnosti membrane, hkrati pa vplivajo tudi na izražanje genov (111). Maščobne kisline se med nosečnostjo prenašajo na plod preko posteljice, neravnovesje med omega-3- in omega-6-maščobnimi kislinami (z veliko prevlado slednjih) pa naj bi neugodno vplivalo na duševni razvoj otroka (112). Omega-6 so se v večji meri nahajale v tradicionalni nizozemski prehrani (v sončničnem in koruznem olju, mesu, jajcih in pustih ribah), medtem ko so se omega-3-maščobne kisline v večji meri nahajale v sredozemskem prehranjevalnem vzorcu (in sicer v mastnih ribah, lanenem in sojinem olju) (108).

Raziskovalci so si razlike v duševnem razvoju otrok glede na prehranjevalni vzorec matere razlagali tudi s količino oksidativnega stresa, ki ga je bila mati deležna v nosečnosti. Zanj je značilna povečana proizvodnja prostih radikalov na eni strani in hkrati neustrezni antioksidativni obrambni mehanizmi na drugi strani. Prekomeren vnos nasičenih maščob (več jih je bilo v tradicionalni nizozemski prehrani) je tako povečeval oksidativni stres, medtem ko je povečan vnos zelenjave in sadja (v sredozemski prehrani) deloval antioksidativno in tako zniževal raven oksidativnega stresa (108, 113). Povišan oksidativni stres deluje neugodno na rast in diferenciacijo živčnih

celic, saj zmanjšuje raven možganskega nevrotrofičnega dejavnika (113).

ZAKLJUČEK

Iz pregledane literature je razvidno, da lahko zdravi prehranjevalni vzorci pomagajo pri preprečevanju depresivnih motenj in morebitno pri obvladovanju depresije (4, 114). Za zdrav način prehranjevanja pa se priporoča sledenje zdravstvenim smernicam (4). Vse več raziskav kaže, da imata prehrana in prehranske navade pomembno vlogo pri preprečevanju, obvladovanju in zdravljenju depresivnih motenj in da so javno-zdravstvena posredovanja s prehranskega vidika pomemben možen drugačen pristop poleg do sedaj že uveljavljenega psiho-

terapevtskega in farmakološkega zdravljenja depresije. Pomembno pa je tudi, da se zavedamo dvosmernega odnosa med prehrano in depresivnimi motnjami. Begdache in sodelavci so opisali, da optimalno duševno počutje lahko spodbuja prakse zdravega načina življenja, hkrati pa lahko odsotnost praks zdravega načina življenja vodi v slabše duševno stanje (4). Zavedati pa se moramo tudi, da je kljub temu prehrana le eden izmed številnih dejavnikov, ki se tesno povezujejo z depresijo. Pomembno je zavedanje medsebojnega delovanja številnih bioloških, psiholoških in socialnih dejavnikov, med katerimi je mnogo takih, na katere posameznik nima vpliva.

LITERATURA

1. APA: What is depression [internet]. Washington: American Psychiatric Association; 2021 [citirano 2021 Sep 22]. Dosegljivo na: <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>
2. WHO: Depression [internet]. World Health Organisation; 2021 [citirano 2021 Sep 22]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
3. MentalHelp.net.: Current understandings of major depression – biopsychosocial model [internet]. MentalHelp.net; 2021 [citirano 2021 Sep 22]. Dosegljivo na: <https://www.mentalhelp.net/depression/biopsychosocial-model/>
4. Kris-Etherton PM, Petersen KS, Hibbeln JR, et al. Nutrition and behavioral health disorders: Depression and anxiety. *Nutr Rev.* 2021; 7 (3): 247–60.
5. Patel V, Flisher AJ, Hetrick S, et al. Mental health of young people: A global public-health challenge. *Lancet.* 2007; 369 (9569): 1302–13.
6. NICE: Depression in children and young people: Identification and management [internet]. National Institute for Health and Care Excellence; 2015 [citirano 2022 Jan 27]. Dosegljivo na: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg28>
7. Whittington CJ, Kendall T, Fonagy P, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors in childhood depression: Systematic review of published versus unpublished data. *Lancet.* 2004; 363 (9418): 1341–5.
8. Kennard BD, Silva SG, Tonev S, et al. Remission and recovery in the Treatment for Adolescents with Depression Study (TADS): Acute and long-term outcomes. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2009; 48 (2): 186–95.
9. Goodyer I, Dubicka B, Wilkinson P, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and routine specialist care with and without cognitive behaviour therapy in adolescents with major depression: Randomised controlled trial. *Br Med J.* 2007; 335 (7611): 142.
10. Jacka FN, Rothman C, Taylor S, et al. Diet quality and mental health problems in adolescents from East London: A prospective study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2013; 48 (8): 1297–306.
11. Jacka FN, Pasco JA, Mykletun A, et al. Association of Western and traditional diets with depression and anxiety in women. *Am J Psychiatry.* 2010; 167 (3): 305–11.
12. Lai JS, Hiles S, Bisquera A, et al. Systematic review and meta-analysis of dietary patterns and depression in community-dwelling adults. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99 (1): 181–97.
13. O'Neil A, Quirk SE, Housden S, et al. Relationship between diet and mental health in children and adolescents: A systematic review. *Am J Public Health.* 2014; 104 (10): e31–42.
14. Rao S, Shah N, Jawed N, et al. Nutritional and lifestyle risk behaviors and their association with mental health and violence among Pakistani adolescents: Results from the National Survey of 4583 individuals. *BMC Public Health.* 2015; 15: 431.
15. Anderson Girard T, Russell K, Leyse-Wallace R. Academy of Nutrition and Dietetics: Revised 2018 standards of practice and standards of professional performance for registered dietitian nutritionists (competent, proficient, and expert) in mental health and addictions. *J Acad Nutr Diet.* 2018; 118 (10): 1975–86.
16. Firth J, Marx W, Dash S, et al. The effects of dietary improvement on symptoms of depression and anxiety: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Psychosom Med.* 2019; 81 (3): 265–80.
17. Opie RS, O'Neil A, Itsiopoulos C, et al. The impact of whole-of-diet interventions on depression and anxiety: A systematic review of randomised controlled trials. *Public Health Nutr.* 2015; 18 (11): 2074–93.
18. Parletta N, Zarnowiecki D, Cho J, et al. Mediterranean-style dietary intervention supplemented with fish oil improves diet quality and mental health in people with depression: A randomized controlled trial (HELFIMED). *Nutr Neurosci.* 2019; 22 (7): 474–87.
19. Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA, Estruch R, et al. Mediterranean dietary pattern and depression: The PREDIMED randomized trial. *BMC Med.* 2013; 11: 208.
20. Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A. Food patterns and the prevention of depression. *Proc Nutr Soc.* 2016; 75 (2): 139–46.
21. Molendijk M, Molero P, Ortuño Sánchez-Pedreño F, et al. Diet quality and depression risk: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *J Affect Disord.* 2018; 226: 346–54.
22. Jacka FN, Mykletun A, Berk M, et al. The association between habitual diet quality and the common mental disorders in community-dwelling adults: The Hordaland Health study. *Psychosom Med.* 2011; 73 (6): 483–90.
23. Konttinen H, van Strien T, Männistö S, et al. Depression, emotional eating and long-term weight changes: A population-based prospective study. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2019; 16 (1): 28.
24. van Strien T. Causes of emotional eating and matched treatment of obesity. *Curr Diab Rep.* 2018; 18 (6): 35.

25. APA: Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5) [internet]. Washington: American Psychiatric Association; 2021 [citirano 2021 Sep 22]. Dosegljivo na: <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>
26. Levitan RD, Davis C, Kaplan AS, et al. Obesity comorbidity in unipolar major depressive disorder: Refining the core phenotype. *J Clin Psychiatry*. 2012; 73 (8): 1119–24.
27. Ohayon MM, Roberts LW. Challenging the validity of the association between oversleeping and overeating in atypical depression. *J Psychosom Res*. 2015; 78 (1): 52–7.
28. Ribot T. The Psychology of Emotions [internet]. London, UK: W. Scott; 1897 [citirano 2021 Sep 22]. Dosegljivo na: https://openlibrary.org/books/OL24243007M/The_psychology_of_the_emotions
29. Klein D. Depression and anhedonia. In: Clark C, Fawcett J, eds. *Anhedonia and affect deficit states*. New York: PMA Publishing; 1984.
30. Ahmed SH, Koob GF. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science*. 1998; 282: 298–300.
31. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, et al. Role of dopamine the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: Insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem*. 2002; 78 (3): 610–24.
32. Franken IHA, Zijlstra C, Muris P. Are nonpharmacological induced rewards related to anhedonia? A study among skydivers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30 (2): 297–300.
33. Isella V, Iurlaro S, Piolti R, et al. Physical anhedonia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003; 74: 1308–11.
34. Davis C, Woodside DB. Sensitivity to the rewarding effects of food and exercise in the eating disorders. *Comp Psychiatry*. 2002; 43: 189–94.
35. Gorwood P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2008; 10 (3): 291–9.
36. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64 (3): 327–37.
37. Dobi A, Margolis EB, Wang HL, et al. Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2010; 30 (1): 218–29.
38. Heshmati M, Russo SJ. Anhedonia and the brain reward circuitry in depression. *Curr Behav Neurosci Rep*. 2015; 2 (3): 146–53.
39. Knutson B, Fong GW, Adams CM, et al. Dissociation of reward anticipation and outcome with event-related fMRI. *Neuroreport*. 2001; 12 (17): 3683–7.
40. O'Doherty J, Kringelbach ML, Rolls ET, et al. Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. *Nat Neurosci*. 2001; 4 (1): 95–102.
41. Blood AJ, Zatorre RJ. Intensely pleasurable responses to music correlate with activity in brain regions implicated in reward and emotion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (20): 11818–23.
42. Aharon I, Etcoff N, Ariely D, et al. Beautiful faces have variable reward value: fMRI and behavioral evidence. *Neuron*. 2001; 32 (3): 537–51.
43. Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM, et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron*. 1997; 19 (3): 591–611.
44. Francis TC, Chandra R, Friend DM, et al. Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biol Psychiatry*. 2015; 77 (3): 212–22.
45. Kringelbach ML. The human orbitofrontal cortex: Linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6 (9): 691–702.
46. Höflich A, Michenthaler P, Kasper S, et al. Circuit mechanisms of reward, anhedonia, and depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2019; 22 (2): 105–18.
47. Irwin W, Davidson RJ, Lowe MJ, et al. Human amygdala activation detected with echo-planar functional magnetic resonance imaging. *Neuroreport*. 1996; 7 (11): 1765–9.
48. Morris JS, Friston KJ, Büchel C, et al. A neuromodulatory role for the human amygdala in processing emotional facial expressions. *Brain*. 1998; 121 (1): 47–57.
49. Ketter TA, Andreason PJ, George MS, et al. Anterior paralimbic mediation of procaine-induced emotional and psychosensory experiences. *Arch Gen Psychiatry*. 1996; 53 (1): 59–69.
50. Lane RD, Reiman EM, Axelrod B, et al. Neural correlates of levels of emotional awareness. Evidence of an interaction between emotion and attention in the anterior cingulate cortex. *J Cogn Neurosci*. 1998; 10 (4): 525–35.
51. Reiman EM, Lane RD, Ahern GL, et al. Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am J Psychiatry*. 1997; 154 (7): 918–25.

52. Lane RD, Reiman EM, Ahern GL, et al. Neuroanatomical correlates of happiness sadness and disgust. *Am J Psychiatry*. 1997; 154 (7): 926–33.
53. Herkenham M, Nauta WJ. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1979; 187 (1):19–47.
54. Matsumoto M, Hikosaka O. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*. 2007; 447 (7148): 1111–5.
55. Nishikawa T, Fage D, Scatton B. Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulointerpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. *Brain Res*. 1986; 373(1–2): 324–36.
56. Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci*. 1999; 11 (12): 4389–97.
57. Volkow ND, Wang CJ, Fowler JS, et al. Food and drug reward: Overlapping circuits in human obesity and addiction. *Brain imaging in behavioral neuroscience*. 2012; 11: 1–24.
58. Schultz W. Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016; 18 (1): 23–32.
59. Volman SF, Lammel S, Margolis EB, et al. New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *J Neurosci*. 2013; 33 (45): 17569–76.
60. Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: Reward in humans and animals. *Psychopharmacology*. 2008; 199 (3): 457–80.
61. Laurent V, Morse AK, Balleine BW. The role of opioid processes in reward and decision-making. *Br J Pharmacol*. 2015; 172 (2): 449–59.
62. Hauber W, Bohn I, Gierter C. NMDA, but not dopamine D(2), receptors in the rat nucleus accumbens are involved in guidance of instrumental behavior by stimuli predicting reward magnitude. *J Neurosci*. 2000; 20 (16): 6282–8.
63. Ikemoto S, Panksepp J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev*. 1999; 31 (1): 6–41.
64. Bush DE, De Sousa NJ, Vaccarino FJ. Self-administration of intravenous amphetamine: Effect of nucleus accumbens CCKB receptor activation on fixed-ratio responding. *Psychopharmacology*. 1999; 147 (3): 331–4.
65. Yan QS. Activation of 5-HT_{2A/2C} receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission. *Brain Res Bull*. 2000; 51 (1): 75–81.
66. Lee K, Kornetsky C. Acute and chronic fluoxetine treatment decreases the sensitivity of rats to rewarding brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 60 (2): 539–44.
67. Di Mascio M, Di Giovanni G, Di Matteo V, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Bull*. 1998; 46 (6): 547–54.
68. Gryglewski G, Lanzenberger R, Kranz GS, et al. Meta-analysis of molecular imaging of serotonin transporters in major depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34 (7): 1096–103.
69. Liu Z, Zhou J, Li Y, et al. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*. 2014; 81 (6): 1360–74.
70. Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, et al. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*. 2003; 54 (5): 504–14.
71. Kennedy SH, Evans KR, Krüger S, et al. Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry*. 2001; 158 (6): 899–905.
72. Zhang WN, Chang SH, Guo LY, et al. The neural correlates of reward-related processing in major depressive disorder: A meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies. *J Affect Disord*. 2013; 151 (1): 531–9.
73. Kraus C, Castrén E, Kasper S, et al. Serotonin and neuroplasticity – links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 77: 317–26.
74. Spies M, Kraus C, Geissberger N, et al. Default mode network deactivation during emotion processing predicts early antidepressant response. *Transl Psychiatry*. 2017; 7 (1): e1008.
75. Kraus C, Klöbl M, Tik M, et al. The pulvinar nucleus and antidepressant treatment: Dynamic modeling of antidepressant response and remission with ultra-high field functional MRI. *Mol Psychiatry*. 2019; 24 (5): 746–56.
76. Quevedo K, Ng R, Scott H, et al. Ventral striatum functional connectivity during rewards and losses and symptomatology in depressed patients. *Biol Psychol*. 2017; 123: 62–73.
77. Keedwell PA, Andrew C, Williams SC, et al. The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2005; 58 (11): 843–53.

78. Coccarello R, D'Amato FR, Moles A. Chronic social stress, hedonism and vulnerability to obesity: Lessons from rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33 (4): 537–50.
79. Tomiyama AJ, Dallman MF, Epel ES. Comfort food is comforting to those most stressed: Evidence of the chronic stress response network in high stress women. *Psychoneuroendocrinology.* 2011; 36 (10): 1513–9.
80. Finch LE, Tomiyama AJ. Comfort eating, psychological stress, and depressive symptoms in young adult women. *Appetite.* 2015; 95: 239–44.
81. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, et al. Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry.* 2010; 67 (3): 220–9.
82. Simmons WK, Burrows K, Avery JA, et al. Appetite changes reveal depression subgroups with distinct endocrine, metabolic, and immune states. *Mol Psychiatry.* 2020; 25 (7): 1457–68.
83. Begdache L, Chaar M, Sabounchi N, et al.. Assessment of dietary factors, dietary practices and exercise on mental distress in young adults versus matured adults: A cross-sectional study. *Nutr Neurosci.* 2019; 22 (7): 488–98.
84. Li Y, A, Lv MR, Wei YJ, et al. Dietary patterns and depression risk: A meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2017; 2530: 373–82.
85. Gangwisch JE, Hale L, Garcia L, et al. High glycemic index diet as a risk factor for depression: Analyses from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr.* 2015; 102 (2): 454–63.
86. Firth J, Gangwisch JE, Borsini A, et al. Food and mood: How do diet and nutrition affect mental wellbeing? *BMJ.* 2020; 369: 2382.
87. Salari-Moghaddam A, Saneel P, Larijani B, et al. Glycemic index, glycemic load, and depression: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2019; 73 (3): 356–65.
88. Ludwig DS. The glycemic index: Physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *J Am Med Assoc.* 2002; 287 (18): 2414–23.
89. Seaquist ER, Anderson J, Childs B, et al. American Diabetes Association. Endocrine Society Hypoglycemia and diabetes: A report of a workgroup of the American Diabetes Association and the Endocrine Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (5): 1845–59.
90. Towler DA, Havlin CE, Craft S, et al. Mechanism of awareness of hypoglycemia. Perception of neurogenic (predominantly cholinergic) rather than neuroglycopenic symptoms. *Diabetes.* 1993; 42 (12): 1791–8.
91. O'Keefe JH, Gheewala NM, O'Keefe JO. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51 (3): 249–55.
92. Bonora E, Corrao G, Bagnardi V, et al. Prevalence and correlates of post-prandial hyperglycaemia in a large sample of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006; 49 (5): 846–54.
93. Weissman A, Lowenstein L, Peleg A, et al. Power spectral analysis of heart rate variability during the 100-g oral glucose tolerance test in pregnant women. *Diabetes Care.* 2006; 29 (3): 571–4.
94. Rubio-López N, Morales-Suárez-Varela M, Pico Y, et al. Nutrient intake and depression symptoms in Spanish children: The ANIVA study. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13 (3): 352.
95. Sarris J, Logan AC, Akbaraly TN, et al. Nutritional medicine as mainstream in psychiatry. *Lancet Psychiatry.* 2015; 2 (3): 271–4.
96. Lin PY, Huang SY, Su KP. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry.* 2010; 68 (2): 140–7.
97. Kelly JR, Borre Y, O'Brien C, et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res.* 2016; 82: 109–18.
98. Berk M, Williams LJ, Jacka FN et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med.* 2013; 11: 200.
99. Moylan S, Berk M, Dean OM et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 45: 46–62.
100. Jacka FN, Cherbuin N, Anstey KJ et al. Western diet is associated with a smaller hippocampus: A longitudinal investigation. *BMC Med.* 2015; 13: 215.
101. Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN et al. Gut microbiota, bacterial translocation, and interactions with diet: pathophysiological links between major depressive disorder and non-communicable medical comorbidities. *Psychother Psychosom.* 2017; 86 (1): 31–46.
102. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiology.* 2004; 558 (1): 263–75.
103. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: Implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry.* 2009; 65 (3): 263–7.

104. Dinan TG, Cryan JF. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37 (9): 1369–78.
105. Marx W, Moseley G, Berk M, et al. Nutritional psychiatry: The present state of the evidence. *Proc Nutr Soc*. 2017; 76 (4): 427–36.
106. Jacka FN, Ystrom E, Brantsaeter AL et al. Maternal and early postnatal nutrition and mental health of offspring by age 5 years: A prospective cohort study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2013; 52 (10): 1038–47.
107. Pina-Camacho L, Jensen SK, Gaysina D, et al. Maternal depression symptoms, unhealthy diet and child emotional-behavioural dysregulation. *Psychol Med*. 2015; 45 (9): 1851–60.
108. Steenweg-de Graaff J, Tiemeier H, Steegers-Theunissen RP, et al. Maternal dietary patterns during pregnancy and child internalising and externalising problems. *Generation R Study*. *Clin Nutr*. 2014; 33 (1): 115–21.
109. Carmichael SL, Yang W, Feldkamp ML, et al. National birth defects prevention study. Reduced risks of neural tube defects and orofacial clefts with higher diet quality. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012; 166 (2): 121–6.
110. Arnsten AFT, Rubia K. Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: Disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012; 51 (4): 356–67.
111. Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, et al. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr*. 2010; 169 (2): 149–64.
112. Hadders-Algra M. Prenatal long-chain polyunsaturated fatty acid status: The importance of a balanced intake of docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Perinat Med*. 2008; 36 (2): 101–9.
113. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004; 19 (7): 1699–707.
114. Opie RS, Itsiopoulos C, Parletta N, et al. Dietary recommendations for the prevention of depression. *Nutr Neurosci*. 2017; 20 (3): 161–71.

Prispelo 7. 12. 2021

Septabene®

Tvoje grlo je tvoja moč.

EDINSTVENA KOMBINACIJA

benzidaminijevega klorida in
cetilpiridinijevega klorida

Ob **PRVIH ZNAKIH**
bolečega in vnetega grla.



Trojna moč,
ki hitro uglaši
vaše boleče grlo!

www.septabene.si

 **KRKA**

Pred uporabo natančno preberite navodilo!

O tveganju in neželenih učinkih se posvetujte z zdravnikom ali s farmacevtom.

Andrej Steyer¹, Tina Mikuletič², Tjaša Cerar Kišek³, Tina Triglav⁴

Virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo cetilpiridinijevega klorida in benzdaminijevega klorida na virus influence A

Virucidal Efficacy of Lozenges with a Fixed-dose Combination of Cetylpyridinium Chloride and Benzydamine Hydrochloride Against Influenza A Virus

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cetilpiridinijev klorid, benzdaminijev klorid, virus influence A tipa H3N2, okužba dihal

IZHODIŠČA. Virusi so najpogostejši povzročitelji vnetja žrela. Čeprav se večina okužb dihal konča spontano, bolniki pogosto uporabljajo različne izdelke za samozdravljenje. Pastile s kombinacijo benzdaminijevega klorida (BK) in cetilpiridinijevega klorida (CPK) dokazano učinkovito lajšajo simptome vnetega žrela. Antiseptik CPK so že opisali kot učinkovit baktericid, nekatere raziskave pa potrjujejo njegovo učinkovitost tudi pri določenih virusih z ovojnico. **METODE.** Namen raziskave je bil preučiti virucidno delovanje CPK ter kombinacije BK in CPK v obliki proste (čiste) učinkovine in v obliki pastil (testne snovi) na virus influence A v pogojih *in vitro*. Testne snovi v suspenzijah različnih koncentracij in virus smo inkubirali 1 minuto, 5 minut ali 15 minut ter ugotavljali količino infektivnih virusov. **REZULTATI.** Kombinacija BK in CPK v obliki pastile v suspenziji z visoko koncentracijo zniža virusni titer za več kot $4 \log_{10}(c)$ po eni minuti, medtem ko CPK ter BK in CPK kot proste učinkovine podobno znižanje dosežejo po petih minutah. Po 5–15 minutah znižanje virusnega titra za $4 \log_{10}(c)$ dosega še kombinacija BK in CPK v obliki pastile v suspenziji s srednjo koncentracijo. **RAZPRAVA.** Rezultati testiranja *in vitro* dokazujejo učinkovito, močno virucidno delovanje pastil s kombinacijo BK in CPK na virus influence A.

¹ Dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

² Dr. Tina Mikuletič, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Asist. Tina Triglav, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: cetylpyridinium chloride, benzydamine hydrochloride, influenza virus A subtype H3N2, respiratory tract infection

BACKGROUND. Viruses are the most common causes of pharyngitis. Although most respiratory infections resolve spontaneously, patients very often use various self-medication therapies. Lozenges with a fixed-dose combination of benzydamine hydrochloride (BH) and cetylpyridinium chloride (CPC) have been shown to be effective in relieving symptomatic sore throat. The antiseptic CPC has already been described as an effective bactericide, and some researches confirm its effectiveness in certain enveloped viruses. **METHODS.** The aim of the study was to investigate the *in vitro* virucidal activity of CPC and the fixed-dose combination of BH/CPC as a free active substance or as a lozenge on influenza A virus. The virus and the suspensions of different concentrations of test substances were incubated for 1 minute, 5 minutes and 15 minutes, and the amount of infectious viruses was determined. **RESULTS.** The fixed-dose combination of BH/CPC in the form of a lozenge in high-concentration suspension reduces the viral titer by $4 \log_{10}(c)$ after only one minute, while in the case of CPC and BH/CPC as free active substances, a similar reduction is achieved only after five minutes. A reduction of the viral titer by $4 \log_{10}(c)$ is also achieved by BH/CPC lozenges in medium-concentration suspension between 5 and 15 minutes. **DISCUSSION.** The results of *in vitro* testing demonstrate effective, potent virucidal activity of BH/CPC lozenges on influenza A virus.

IZHODIŠČA

Izbruh koronavirusa hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) je sprožil intenzivno iskanje in preučevanje učinkovitih metod zdravljenja in preprečevanja okužbe. Pozornost so pritegnili tudi oralni antiseptiki, s katerimi bi morda lahko zmanjšali virusno obremenitev ustne votline in tveganje za prenos okužbe. Med preučevanimi antiseptiki je cetilpiridinijev klorid (CPK), za katerega razpoložljivi znanstveni podatki kažejo najbolj spodbudne rezultate. Ima širok razpon delovanja, saj deluje baktericidno in virucidno (1). V nekaterih kliničnih raziskavah so ugotovili, da ustne vode s CPK lahko zmanjšajo virusno obremenitev s SARS-CoV-2, kar kaže na možno vlogo te učinkovine pri nadzoru koronavirusne bolezni 2019 (angl. *coronavirus disease-19*, COVID-19) (2, 3). CPK kot samostojno učinkovino ali v kombinaciji z drugimi učinkovinami

običajno vsebujejo izdelki za lokalno peroralno uporabo v obliki tekočine za izpiranje ust (grgranje), pastil in pršil.

Virusne okužbe dihal spadajo med najpogostejše bolezni na svetu. Običajno se kažejo s simptomi, kot so vnetje nosne sluznice, kašelj, zvišana telesna temperatura in vnetje žrela. Čeprav se večina okužb dihal konča spontano in ne zahteva posebnega zdravljenja, bolniki zelo pogosto uporabljajo različne izdelke za samozdravljenje, ki lahko blažijo simptome ali odpravijo vzrok okužbe (4).

Pastile s fiksno kombinacijo benzydaminovega klorida (BK) in CPK so klinično učinkovite pri odpravljanju simptomov vnetega žrela (5). Nedavno je bil v testiranju *in vitro* potrjen tudi njihov virucidni učinek na SARS-CoV-2 (6). Virucidna učinkovitost CPK je dokazana tudi za različne seve virusa influence, saj so s testiranjem *in vitro* dokazali razpad virusne ovojnice ob izpostavitvi tej učinkovini (7).

Z raziskavo, ki smo jo izvedli na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, smo želeli v pogojih *in vitro* potrditi virucidno delovanje pastil s fiksno kombinacijo BK in CPK na virus influence A in hkrati primerjati virucidni učinek CPK ter kombinacije BK in CPK kot prostih učinkovin. Tako smo želeli ovrednotiti možni vpliv ostalih učinkovin (BK) in pomožnih sestavin v pastili na virucidno učinkovitost.

METODE

Testiranje je potekalo skladno z metodami in zahtevami, ki jih določa standard Slovenskega inštituta za standardizacijo za vrednotenje virucidnega delovanja v humani medicini (8). Pogoji testiranja in časi stika so bili izbrani in prilagojeni fizikalno-kemičnim lastnostim ustne votline pri človeku z upoštevanjem dejavnikov, kot so temperatura, sestava (biološka obremenitev) in količina sline, ki nastane med raztapljanjem pastil, ter dinamika raztapljanja pastil (različen čas stika).

Osamitev virusa in kvantifikacija

Testni ortomiksovirus, tj. virus influence A, sev A/Victoria/3/75, tip hemaglutinin 3 nevraminidaza 2 (H3N2), smo pridobili iz Ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection, ATCC), ga predhodno pomnožili v celični kulturi in določili količino virusa. Za gojenje virusa smo uporabili celično linijo Madin-Darbyjevih pasjih ledvičnih (angl. *Madin-Darby canine kidney*, MDCK) celic in najmanjše osnovno gojišče z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (FGS) in tripsina iz goveje trebušne slinavke (angl. *trypsin from bovine*

pancreas, TPCK) v končni koncentraciji tripsina 2 µg/ml. Koncentracija virusnega izolata je bila določena s Spearman-Kärberjevo metodo (9). Virusnemu sevu smo določili razredčino virusa (izraženo v virusni enoti na mililiter), pri kateri virus okuži 50 % celic v celični kulturi – 50-% odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*, TCID₅₀/ml). Izhodna koncentracija pomnoženega virusa je bila 10^{9,41} TCID₅₀/ml (tabela 1).

Test virucidnosti in nadzorni postopki

Testne snovi smo raztopili v trdi vodi z dodatkom »moteče snovi« (v nadaljevanju suspenzija), da smo ustvarili biološko obremenjene pogoje in simulirali sestavo sline. Suspenzija je bila raztopina govejega serumskega albumina (GSA) (3,0 g/l vode) z eritrociti v koncentraciji 3,0 ml/l. Virusne kulture smo izpostavili testnim snovem pri temperaturi 37 °C za 1 minuto, 5 minut ali 15 minut, kar ustreza povprečnemu času lizanju pastil (5–10 minut). Uporabili smo tri koncentracije testnih snovi, ki smo jih pridobili z raztapljanjem testne snovi v 4 ml (visoka koncentracija), 20 ml (srednja koncentracija) in 30 ml (nizka koncentracija) suspenzije. Testne snovi so prikazane v tabeli 2.

Sočasno s testom virucidnosti vsake od testnih snovi so potekale ustrezne kontrole celic in virusa, virusa v celotnem inkubacijskem času testa, zaviralnega učinka testne snovi v ledeno hladnem celičnem mediju, vpliva testne snovi na dovzetnost celic za virus in njenega citotoksičnega učinka na celice.

Tabela 1. Izhodne koncentracije virusa, uporabljenega pri testiranju. IZ – interval zaupanja, H3N2 – hemaglutinin 3, nevraminidaza 2.

Testni virus	Oznaka seva	Prvi datum osamitve	log ₁₀ (c)	95-% IZ
Virus influence A, tip H3N2	A/Victoria/3/75	3. 5. 2021	9,41	± 0,67

Tabela 2. Testne snovi, ki smo jih preizkusili. BK – benzidaminijev klorid, CPK – cetilpiridinijev klorid, E – Evropa, FCF – za obarvanje hrane (angl. *for coloring food*).

Testna snov	Sestava testne snovi
Pastila z BK in CPK, evkalipt (pastila Septabene®)	3 mg BK, 1 mg CPK, evkaliptovo olje, levomentol, citronska kislina (E 330), sukraloza (E 955), izomalt (E 953), briljantno modro FCF (E 133)
Pastila s placebom, evkalipt	evkaliptovo olje, levomentol, citronska kislina (E 330), sukraloza (E 955), izomalt (E 953), briljantno modro FCF (E 133)
Pastila z BK in CPK (pastila Septabene®), limona, med	3 mg BK, 1 mg CPK, eterično olje poprove mete, levomentol, sukraloza (E 955), citronska kislina (E 330), izomalt (E 953), aroma limone, aroma medu, kurkumin (E 100), natrijev benzoat (E 211)
Pastila s placebom, limona, med	eterično olje poprove mete, levomentol, sukraloza (E 955), citronska kislina (E 330), izomalt (E 953), aroma limone, aroma medu, kurkumin (E 100), natrijev benzoat (E 211)
CPK kot prosta učinkovina	1 mg CPK
BK in CPK kot prosti učinkovini	3 mg BK, 1 mg CPK

REZULTATI

Rezultati kontrolnih testov

V pogojih testnega sistema je bil virus stabilen ves čas testiranja, koncentracija infektivnih virusov se ni bistveno znižala.

Zaviralni učinek hladnega celičnega medija na delovanje testne snovi v visoki koncentraciji (testna snov, raztopljena v 4 ml medija) je bil potrjen. Titer virusa pred izpostavitvijo in po njej se ni bistveno razlikoval in ni presegel razlike $1 - \log_{10}(c)$ vrednosti koncentracije, ki jo standard določa kot mejno vrednost.

Nobena od testnih snovi v najvišji ne-citotoksični koncentraciji ni vplivala na dovzetnost celic za virus. Opazili smo le zelo majhna, a še sprejemljiva odstopanja.

Citotoksičnost testnih snovi v visoki koncentraciji smo testirali na razredčitvah od 10^{-1} do 10^{-11} . Citotoksičnost z deformacijo ali uničenjem celičnega sloja se je pri testnih snoveh CPK, kombinaciji BK in CPK kot prostih učinkovin, pri pastilah z BK in CPK z okusom po evkaliptu in pri pastilah s placebom ter okusom po evkaliptu pokazala pri razredčitvah 10^{-1} in 10^{-2} . Pri pastilah z BK in CPK z okusom po limoni in medu ter pastilah s placebom in z okusom po limoni in

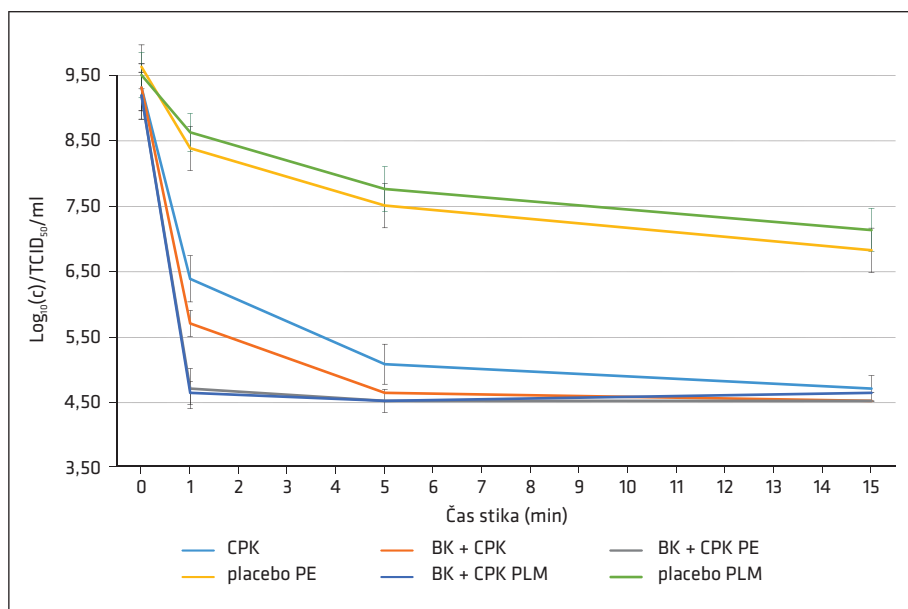
medu pa smo citotoksičnost zaznali le pri razredčitvi 10^{-1} . S tem smo določili mejo, pri kateri je smiselno odčitavanje citopatskega učinka virusa. Raven citotoksičnosti glede na razredčitev virusa v testni suspenziji je prikazana v tabeli 4.

Rezultati učinkovanja testnih snovi na inaktivacijo virusa

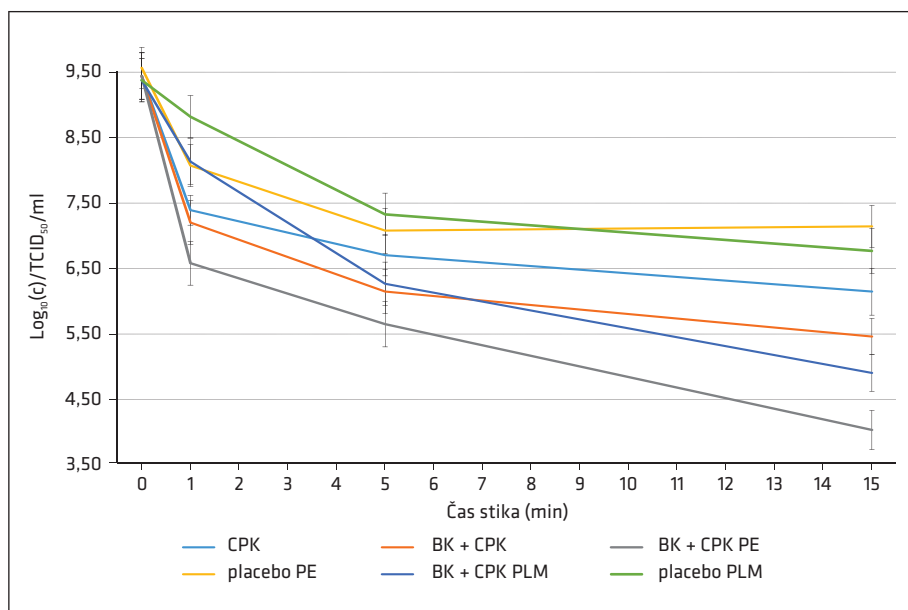
Vsako testno koncentracijo smo testirali dvakrat, na različna dneva. Končni rezultat je prikazan kot povprečje obeh testiranj. Številski prikaz rezultatov je v tabelah 3 in 4, grafični prikaz pa na slikah 1, 2 in 3.

Virucidnost je bila močno izražena v najvišji koncentraciji, ki je ekvivalent raztapljanja ene pastile v 4 ml suspenzije. V srednji koncentraciji, ki je ekvivalent raztapljanja ene pastile v 20 ml suspenzije, je bila virucidnost še vedno izražena, toda s spremenjeno dinamiko, saj so se podobni učinki pokazali šele po 15 minutah.

Rezultati kažejo na izrazito razliko med virucidnostjo pastil z učinkovinami in pastilami s placebom. Najbolj opazna je pri visoki in srednji koncentraciji, vidna pa je tudi pri nizki koncentraciji.



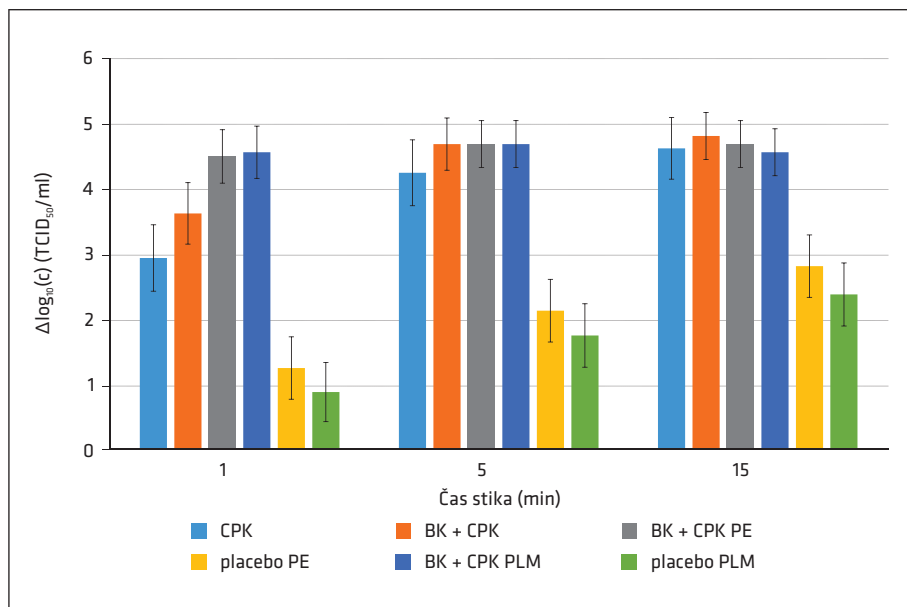
Slika 1. Izpostavitve virusa influence A testni snovi v najvišji koncentraciji (ekvivalent raztopine ene pastile v 4 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.



Slika 2. Izpostavitve virusa influence A testni snovi v srednji koncentraciji (ekvivalent raztopine ene pastile v 20 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.

Tabela 3. Testne učinkovine z vrednostjo pH in znižanjem koncentracije infektivnih delcev virusa influence A glede na koncentracijo in čas stika. CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, IZ – interval zaupanja.

CPK kot prosta učinkovina		BK in CPK kot prosti učinkovini		Pastila z BK in CPK, evkalipt		Pastila s placebom, evkalipt		Pastila z BK in CPK, limona, med		Pastila s placebom, limona, med	
Visoka koncentracija (raztopljeno v 4 ml suspenzije)											
Vrednost pH	7,86		8,06		3,27		3,14		2,73		2,69
Čas (min)	$\Delta \log_{10}(c) \pm 95\text{-}\% \text{ IZ}$										
1	$-2,94 \pm 0,51$		$-3,63 \pm 0,47$		$-4,50 \pm 0,41$		$-1,25 \pm 0,48$		$-4,57 \pm 0,40$		$-0,88 \pm 0,45$
5	$-4,25 \pm 0,47$		$-4,69 \pm 0,40$		$-4,69 \pm 0,36$		$-2,13 \pm 0,48$		$-4,69 \pm 0,36$		$-1,75 \pm 0,49$
15	$-4,63 \pm 0,41$		$-4,82 \pm 0,36$		$-4,69 \pm 0,36$		$-2,82 \pm 0,48$		$-4,57 \pm 0,36$		$-2,38 \pm 0,48$
Srednja koncentracija (raztopljeno v 20 ml suspenzije)											
Vrednost pH	7,92		7,93		4,45		4,61		3,72		3,55
Čas (min)	$\Delta \log_{10}(c) \pm 95\text{-}\% \text{ IZ}$										
1	$-2,06 \pm 0,42$		$-1,63 \pm 0,49$		$-2,88 \pm 0,49$		$-1,50 \pm 0,45$		$-1,25 \pm 0,48$		$-0,56 \pm 0,47$
5	$-2,75 \pm 0,48$		$-3,19 \pm 0,50$		$-3,81 \pm 0,49$		$-2,50 \pm 0,47$		$-3,13 \pm 0,47$		$-2,06 \pm 0,47$
15	$-3,31 \pm 0,51$		$-3,75 \pm 0,47$		$-5,44 \pm 0,45$		$-2,44 \pm 0,45$		$-4,50 \pm 0,44$		$-2,62 \pm 0,48$
Nizka koncentracija (raztopljeno v 30 ml suspenzije)											
Vrednost pH	7,85		7,97		5,33		5,21		4,00		4,04
Čas (min)	$\Delta \log_{10}(c) \pm 95\text{-}\% \text{ IZ}$										
1	$-0,62 \pm 0,34$		$-1,19 \pm 0,47$		$-1,50 \pm 0,44$		$-1,00 \pm 0,45$		$-1,26 \pm 0,47$		$-0,75 \pm 0,45$
5	$-1,87 \pm 0,32$		$-1,63 \pm 0,44$		$-2,25 \pm 0,47$		$-1,32 \pm 0,47$		$-2,00 \pm 0,47$		$-1,19 \pm 0,47$
15	$-2,62 \pm 0,34$		$-3,38 \pm 0,47$		$-3,32 \pm 0,41$		$-1,94 \pm 0,47$		$-3,00 \pm 0,43$		$-2,13 \pm 0,40$



Slika 3. Primerjava znižanja količine infektivnih virusov pri najvišji koncentraciji (ekivalent raztopine ene pastile v 4 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. median tissue culture infectious dose), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.

RAZPRAVA

Virucidno delovanje CPK proti virusu influence so preučevale in potrdile že nekatere predhodne raziskave (7). V nedavnem testiranju *in vitro* je bila dokazana virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo BK in CPK proti SARS-CoV-2. Koncentracija virusa v suspenziji z najvišjo koncentracijo se je že po eni minuti znižala za $4 \log_{10}(c)$ (6).

Ta raziskava je, kot je bilo pričakovano, pokazala podobne trende virucidnosti pastile s kombinacijo BK in CPK na virus influence A, saj sta bila v obeh testiranjih *in vitro* uporabljena virusa z ovojnico, na katero naj bi neposredno učinkoval CPK (6, 7).

Testiranje je potekalo po enakem protokolu in pod enakimi pogoji, kot so bili uporabljeni pri testiranju z virusom SARS-CoV-2. Pomembno razliko je predstavljal le tripsin v vzdrževalnem mediju, saj ga je bilo treba dodati zaradi zagotavljanja infektivnosti virusov influence. Zaradi izjemno

nizke koncentracije tripsina v gojišču njegovega vpliva na testne snovi nismo preverjali, saj je bila prvotna inkubacija virusa z učinkovino brez tega dodatka. Dodan je bil le mediju, v katerem smo pripravljali razredčitve testne snovi z virusom pred nanosom na celične kulture.

Največji virucidni učinek vseh testnih snovi se je po pričakovanjih pokazal pri suspenzijah z visoko koncentracijo, pri katerih smo dokazali, da se koncentracija infektivnih virusov že po petih minutah zniža za več kot $4 \log_{10}(c)$ (10.000-kratno oz. 99,99-% znižanje). Pastile s kombinacijo BK in CPK (z okusom po evkaliptu in z okusom po limoni in medu) so znižanje za $4 \log_{10}(c)$ dosegle že po eni minuti (sliki 1 in 3). Ob upoštevanju vseh kontrolnih postopkov rezultati nakazujejo veliko virucidno učinkovitost testnih snovi z učinkovinami. Virucidni učinek pastil s placebo (z okusom po evkaliptu in z okusom po limoni in

medu) značilno odstopa od učinka pastil s kombinacijo BK in CPK, kar je razvidno na sliki 1 in sliki 3 ter v tabeli 4. Pastili s kombinacijo BK in CPK sta dosegli ustrezno znižanje koncentracije infektivnih virusov za $4 \log_{10}(c)$ tudi v suspenzijah s srednjo koncentracijo, ki se je ob upoštevanju vseh parametrov dinamike raztapljanja pastile in izločanju sline (približno 4,0 do 5,0 ml/min med stimulativnimi aktivnostmi, npr. pri lizanju pastile) najbolj približala domnevni koncentraciji, ki bi bila lahko dosežena ob dejanski uporabi pastile, če je za raztopitev pastile potrebnih 5–10 minut (10). Tudi CPK ter kombinacija BK in CPK kot prostih učinkovin sta se približali meji zmanjšanja za $4 \log_{10}(c)$.

Podobno kot pri predhodnem testiranju s SARS-CoV-2 *in vitro* tudi pri testiranju seva virusa influence testne snovi v nizki koncentraciji niti po 15 minutah niso dosegle znižanja za $4 \log_{10}(c)$ (6).

Jasen trend zmanjševanja količine virusa je bil opazen med celotnim 15-minutnim časa stika pri suspenzijah testnih snovi v vseh koncentracijah (razen pri pastilah s placebom).

Tako pastile s kombinacijo BK in CPK kot BK in CPK kot prosti učinkovini so kazali jasno dinamiko virucidnega delovanja – najhitrejši učinki so se kazali pri najvišji koncentraciji, hitrost delovanja pa se je manjšala z nižanjem koncentracije. Krivulja padanja koncentracije virusov je bila s časom položnejša pri srednji, še bolj pa pri najnižji koncentraciji (slika 1 in slika 2). Ta dinamika ni bila opazna pri pastilah s placebom (z obema okusoma), pri katerih je bil po 15 minutah konstantni učinek znižanja koncentracije infektivnih virusov med 1,94 in $2,82 \log_{10}(c)$. Kot so pri testiranjih z virusom SARS-CoV-2 *in vitro* že ugotovili, je dejavnik inaktivacije virusov verjetno tudi nizka vrednost pH, ki je podobna kot pri pastilah s kombinacijo BK in CPK (6).

Ena od pomembnejših lastnosti, ki bi jih moral imeti peroralni antiseptik, je obstoj-

nost na mestu nanosa. Vemo, da je obstojnost CPK velika (od tri do pet ur), kar lahko omogoči večjo in daljšo učinkovitost proti virusu (1). Poleg tega lahko k učinkovitosti prispeva tudi farmacevtska oblika. Med farmacevtske oblike za lokalno lajšanje vnetja žrela spadajo tekočine za izpiranje ust (grgranje), pršila in pastile. Pokazalo se je, da pride pri pastilah do večjega začetnega odlaganja učinkovine v ustih in žrelu ter do počasnejšega izpiranja iz ustne votline kot pri pršilih in tekočinah za izpiranje ust (grgranje). To nakazuje, da je učinek pastil lahko trajnejši (11).

Rezultati testiranj temeljijo na nadzorovanih laboratorijskih pogojih, s katerimi smo se skušali približati fiziološkemu pogojem v ustni votlini.

Rezultatov testiranja *in vitro* zaradi številnih dejavnikov ni mogoče preslikati v *in vivo* pogoje tudi, če upoštevamo fizikalno-kemijske pogoje, ki smo se jim skušali približati. Raziskava je dokazala le, da CPK, kombinacije BK in CPK kot prostih učinkovin in kombinacije BK in CPK v pastili delujejo virucidno in bi podobno verjetno delovale tudi na sluznici ust in žrela. V vsakem primeru pa bi bil virucidni učinek omejen le na proste infektivne viruse na sluznici ali v slini, ki bi bili neposredno izpostavljeni učinkovini. Podatki iz literature nakazujejo, da je koncentracija virusnih delcev v slini v območju od 4 do $6 \log_{10}(c)$ virusnih genomskih kopij na mililiter (12). Pri testiranju smo uporabili bistveno višjo koncentracijo virusov ($8\text{--}10 \log_{10}(c)$ infektivnih virusnih delcev na mililiter). Nadaljnje raziskave bi bile smiselne v okviru kliničnih testiranj. Če bi rezultati kazali na podobno učinkovitost, bi lahko uporaba pastil s kombinacijo BK in CPK močno vplivala na zmanjšanje verjetnosti kapljičnega prenosa.

Z raziskavo *in vitro* smo potrdili virucidno delovanje CPK ter kombinacije BK in CPK v obliki proste (čiste) učinkovine in v obliki pastil na virus influence A.

Najvišjo učinkovitost, ki se je pomembno razlikovala od učinkovitosti pastil s placebom, smo dokazali za pastile s kom-

binacijo BK in CPK; primerljiva je bila pri pastili z okusom po evkaliptu in pastili z okusom po limoni in medu.

LITERATURA

1. Mateos-Moreno MV, Mira A, Ausina-Márquez V, Ferrer MD. Oral antiseptics against coronavirus: In-vitro and clinical evidence. *J Hosp Infect.* 2021; 113: 30–43.
2. Ming-Hsu C, Po-Chun C. The effectiveness of mouthwash against SARS-CoV-2 infection: A review of scientific and clinical evidence. *J Formos Med Assoc.* 2021; S0929-6646(21)00469-1.
3. Seneviratne CJ, Balan P, Ko KKK, et al. Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: Randomized control trial in Singapore. *Infection.* 2021; 49: 305–11.
4. Morokutti-Kurz M, Graf C, Prieschl-Grassauer E. Amylmetacresol/2,4-dichlorobenzyl alcohol, hexylresorcinol, or carrageenan lozenges as active treatments for sore throat. *Int J Gen Med.* 2017; 10: 53–60.
5. Košir P. Primerjalna raziskava terapevtske enakovrednosti med testnim in referenčnim zdravilom fiksne kombinacije 3 miligramov benidaminijevega klorida in 1 miligrama cetilpiridiniijevega klorida pri preiskovancih z vnetim žrelom, povezanim z okužbami zgornjih dihal. *Med Razgl.* 2015; 54 (3): 433–42.
6. Steyer A, Marušić M, Kolenc M, et al. A throat lozenge with fixed combination of cetylpyridinium chloride and benzydamine hydrochloride has direct virucidal effect on SARS-CoV-2. *COVID.* 2021; 1 (2): 435–46.
7. Popkin DL., Zilka S, Dimaano M, et al. Cetylpyridinium chloride (CPC) exhibits potent, rapid activity against influenza viruses in vitro and in vivo. *Pathog Immun.* 2017; 2 (2): 252–69.
8. SIST EN 14476:2013+A2:2019 [internet]. Ljubljana: Slovenski inštitut za standardizacijo; c2009 [citirano 2021 Dec 10]. Dosegljivo na: <http://ecommerce.sist.si/catalog/project.aspx>
9. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 1931; 162: 480–7.
10. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *J Med. Life.* 2009; 2 (3): 303–7.
11. Farrer F. Sprays and lozenges for sore throats. *S Afr Pharm J.* 2011; 78 (4): 26–31.
12. Kw To K, Lu L, Cy Yip C, et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6 (6): e49.

Lucija Kobal¹

Rak dojke

Gospa, stara 39 let, je bila iz ginekološke ambulante napotena na mamografijo. Pred štirimi meseci si je v levi dojki zatipala nebolečo premično zatrdlino, veliko 1 × 1 cm. Zaskrbljena je postala, ko se je začela zatrdlina s časom povečevati. Ob pregledu v ginekološki ambulanti so opazili, da je bradavica na levi dojki uvlečena, zatipali pa so tudi zatrdlino v levi pazduhi. Preostali status je bil brez posebnosti. Gospa ima sicer redne menstruacije, ne kadi in ne pije alkohola. Pove, da je njena teta umrla za rakom na dojkah.

Vprašanja

1. Kakšna bi bila vaša delovna diagnoza?
2. Kakšne so možne diferencialne diagnoze zatrdline v dojkah?
3. Kdaj je zatrdlina sumljiva za raka?
4. Kaj sploh je rak dojk?
5. Kakšna je incidenca raka dojk pri nas?
6. Kateri dejavniki povečajo tveganje za nastanek raka dojk?
7. Kakšne diagnostične preiskave opravimo pri sumu na raka dojk?
8. Kaj je mamografija?
9. Kakšne vrste mamografij poznamo?
10. Pri katerih posameznicah mamografije ne uporabljamo kot prve diagnostične metode in zakaj?
11. Kako poteka zdravljenje raka dojk?

Odgovore na vprašanja najdete na naslednji strani.

¹ Lucija Kobal, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; lucija.kobal@medrazgl.si

Odgovori

1. Rak dojke.
2. Ni vsaka zatrdlina v dojkah rakava. Zavedati se moramo, da je velika večina tipnih mas na dojkah benignih, diagnozo raka pa postavimo pri približno 10 % bolnic (1). Zatrdlina lahko nastane kot posledica okužbe (npr. vnetja dojk), travme, nastanka cist, fibroadenomov, maščobne nekroze itd. Ciste in fibroadenomi so še posebej pogosti pri mlajših, predmenopavzalnih ženskah. Pri mlajših ženskah prej pomislimo, da gre za benigno maso, s starostjo pa narašča verjetnost, da je zatrdlina rakavo spremenjena (2).
3. Sumljive zatrdline so trde in grčaste. Bolečina je redka. Velikokrat take spremembe uvlečejo kožo ali bradavico, lahko povzročijo tudi izcedek iz bradavice (krvav ali bister), na dojki pa se lahko pojavijo razjede in ekcem. Skrbi nas, če tudi v pazduhi opazimo zatrdlino in če spremembe trajajo dlje časa. Benigne zatrdline večinoma ne uvlečejo kože ali bradavice, so okrogle, elastične in gladke. Po navadi so boleče (1, 3).
4. Rak dojk je v razvitem svetu najpogostejši rak pri ženskah. Gre za heterogeno bolezen, pri kateri pride do nenadzorovane delitve rakavih celic v dojki, vendar se bolezen pri posameznikih razlikuje glede na vzorec genetskih sprememb, patohistološko sliko, klinično sliko itd. Poznamo več tipov raka dojk, saj lahko maligne celice nastanejo na različnih mestih – vznikne lahko v žleznihi mešičkih (lobulusih), mlečnih vodih (duktusih) ali v vezivnem tkivu dojke. Najpogostejša tipa sta invazivni duktalni ter lobularni karcinom, ki se lahko razvijeta iz neinvazivnih *in situ* oblik. Med duktalni karcinom *in situ* uvrščamo tudi Pagetovo bolezen, ki tipično povzroča ekcem bradavice in ga zato lahko zamenjamo za okužbo. Redkejši obliki raka sta tudi npr. mucinozni in vnetni rak dojk (4, 5).
5. Zavedati se moramo, da za rakom dojk ne zbolevalo izključno ženske, dober odstotek bolnikov predstavlja moški. Leta 2018 so diagnozo raka postavili 1.527 bolnikom (1.516 žensk in 11 moških). Incidenca z leti narašča, tako v Sloveniji kot tudi drugje po svetu rak dojk predstavlja pomembno javnozdravstveno težavo (4, 6).
6. Raziskovalci so odkrili, da je skoraj četrtina vseh rakov dojk dedno ali družinsko pogojenih (7). Opredelili so številne gene, katerih mutacije lahko povečajo možnost za nastanek raka. Najbolj poznane so mutacije v genih dovzetnosti za raka dojk (angl. *breast cancer*, *BRCA*) 1 in *BRCA2*. Incidenca raka dojke pri ženskah narašča z leti. Odkrili so tudi povezavo z reproduktivnimi dejavniki, kot so zgodnja menarha, pozna menopavza, višja starost ob prvem porodu in nizko število otrok oz. nerodnost. Vsi ti dejavniki so povezani z daljšo izpostavljenostjo endogenim estrogenom. Tudi zdravljenje z oralno kontracepcijo in hormonsko nadomestno zdravljenje zaradi vnosa eksogenih estrogenov predstavljata nevarnostni dejavnik za pojav raka dojke. Na pojav raka dojk vplivajo tudi dejavniki življenjskega sloga, kot so debelost, prekomerno pitje alkohola in kajenje (8).
7. Diagnozo raka dojk pri navidezno zdravih ženskah lahko postavimo s pomočjo presegalnih programov ali pa opravimo diagnostične preiskave, ko bolnica zaradi tipne zatrdline v dojki ali pazduhi poišče pomoč pri osebnem zdravniku ali ginekologu. Zaradi

presejalnih programov tumorje odkrivamo prej, kar je povezano z manjšo možnostjo za zasevanje in posledično z manjšo umrljivostjo. Presejanje opravljamo s pomočjo mamografije. Pri tipni zatrdlini ali drugi sumljivi spremembi v dojki diagnozo postavimo s kliničnim pregledom, ultrazvočno preiskavo in mamografijo. Če je sprememba v dojki klinično in radiološko sumljiva, se navadno odločimo tudi za biopsijo: bodisi za tankoigelnno aspiracijsko biopsijo ali debeloigelnno biopsijo. Pri sumu na višje stadije bolezni se lahko odločimo tudi za MRI ali CT prsnega koša, trebušnih in medeničnih organov (9).

8. Mamografija je slikanje dojk z rentgenskimi žarki na napravi, ki se imenuje mamograf. Dojko predhodno stisnejo med dve plošči. Pri slikanju uporabljajo nizke doze rentgenskih žarkov, ki potujejo skozi tkivo dojke in na drugi strani dojke tvorijo sliko. Vsako dojko slikajo v dveh prikazih (kraniokavdalni in mediolateralni polstranski prikaz), vendar se včasih uporabi tudi dodatne prikaze. Mamografija je najbolj zanesljiva in natančna metoda za odkrivanje začetnih rakavih sprememb dojk in spremembe v dojki lahko odkrije veliko prej kot katera koli druga preiskava. Raziskave kažejo, da redne mamografije po 50. letu starosti zmanjšajo umrljivost za rakom dojk za več kot 30 %. Največji omejujoč dejavnik mamografije je gostota tkiva dojk, goste dojke so namreč mamografsko slabo pregledne (10, 11).
9. Mamografijo delimo na preventivno oz. presejalno in diagnostično. S presejalno mamografijo želimo pri sicer navidezno zdravih ženskah odkriti spremembe, še preden te postanejo tipne/vidne. Presejalne mamografije pri nas izvajamo v sklopu presejalnega programa DORA (ženske od 50. do 69. leta, slikanje vsaki dve leti), izvedemo pa jih tudi pri posameznicah po 40. letu, ki so družinsko obremenjene ali imajo prisotne druge dejavnike tveganja (npr. so prvič rodile po 30. letu, imajo benigne spremembe na dojki). Diagnostično mamografijo izvedemo pri simptomatskih posameznicah, starejših od 35 let (11, 12).
10. Pri ženskah, mlajših od 35 let, kot prvo diagnostično metodo uporabljamo UZ, saj je mamografija slabše pregledna zaradi večje količine žleznega tkiva v dojkah (11).
11. Raka dojk zdravimo s kombinacijo kirurškega zdravljenja, sistemskega zdravljenja in obsevanja. Zgodnjega raka dojke običajno (ne pa vedno) začnemo zdraviti kirurško, izvede se lahko ohranitvena operacija ali odstranitev celotne dojke. Po operativnem posegu se priporoča rehabilitacija, saj lahko odstranitev bezgavk povzroči omejeno gibljivost ramenskega sklepa. Pod sistemsko zdravljenje uvrščamo hormonska zdravila, citostatike in biološka zdravila. Izbor sistemskega zdravljenja je odvisen od lastnosti raka. Hormonska zdravila lahko uporabimo samo pri tumorjih, ki v svojih celicah izražajo estrogenske receptorje ali progesteronske receptorje oz. so hormonsko odvisni. Proti receptorju 2 za epidermalni rastni dejavnik (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER-2) usmerjena biološka zdravila uporabljamo samo pri raki, pri katerih je HER-2 prekomerno izražen. Pri nekaterih bolnicah se poleg kirurškega zdravljenja poslužimo tudi obsevanja, da uničimo morebitne preostale maligne celice. Obsevanje je lahko tudi zdravljenje izbora pri bolnicah, ki jih sicer ne moremo operirati (4, 13).

LITERATURA

1. Barton MB, Elmore JG, Fletcher SW. Breast symptoms among women enrolled in a health maintenance organization: Frequency, evaluation, and outcome. *Ann Intern Med.* 1999; 130 (8): 651–7.
2. Morrow M. The evaluation of common breast problems. *Am Fam Physician.* 2000; 61 (8): 2371–8.
3. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, et al. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017; 48: 140–6.
4. Rak dojk [internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; c2019 [citirano 2021 Dec 27]. Dosegljivo na: https://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/rak_dojk
5. CDC: What is breast cancer? [internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2021 [citirano 2021 Dec 27]. Dosegljivo na: https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
6. Zadnik V, Primic Žakelj M, Lokar K, et al. Cancer burden in Slovenia with the time trends analysis. *Radiol Oncol.* 2017; 51 (1): 47–55.
7. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, et al. Family history and risk of breast cancer: An analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 165 (1): 193–200.
8. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2017; 13 (11): 1387–97.
9. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, et al. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J Nucl Med.* 2016; 57 (1): 9S–16S.
10. Bassett LW, Manjikian V 3rd, Gold RH. Mammography and breast cancer screening. *Surg Clin North Am.* 1990. 70 (4): 775–800.
11. Hertl K. Mamografija in druge metode za ugotavljanje bolezenskih sprememb v dojkah [internet]. Ljubljana; 2013 [citirano 2021 Dec 27]. Dosegljivo na: <http://www.onkologija.org/wp-content/uploads/2017/04/ZgibankaMamografija.pdf>
12. DORA [internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; c2019 [citirano 2021 Dec 27]. Dosegljivo na: <https://dora.onko-i.si/>
13. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: A review. *J Am Med Assoc.* 2019. 321 (3): 288–300.

Seznam diplomantov, ki so diplomirali na Medicinski fakulteti v Ljubljani od 24. novembra 2021 do 10. februarja 2022

Diplomanti medicine

Šujica Ana	18. 11. 2021	Kristan Borut	22. 12. 2021
Lupša Martina	25. 11. 2021	Morassutti Vitale Federico	22. 12. 2021
Krašovec Tjaša	26. 11. 2021	Prusnik Joanna	22. 12. 2021
Tornič Tajda	6. 12. 2021	Vadnjal Urban	22. 12. 2021
Čufer Teja	14. 12. 2021	Strmole Zala	23. 12. 2021
Tomazin Rok Tit	14. 12. 2021	Stojkowska Anisija	28. 12. 2021
Zupanc Teodora	15. 12. 2021	Vöröš Maja	28. 12. 2021
Skoliber Una	16. 12. 2021	Barbarič Žiga	21. 1. 2022
Lazarevič Julija	17. 12. 2021	Šikonja Jaka	25. 1. 2021

Diplomanti dentalne medicine

Kibarovski Matija	15. 12. 2021	Posilovič Nina	17. 12. 2021
Jeram Eva	17. 12. 2021	Hrovatin Maša	26. 1. 2022
Plut Jan	17. 12. 2021	Knap Okretič Urša	26. 1. 2022

Diplomanti na Medicinski fakulteti v Mariboru

Bernjak Janja	30. 11. 2021	Lavbič Metka	12. 1. 2022
Fluher Klara	4. 1. 2022	Potočnik Ivana	21. 1. 2022

Navodila avtorjem

Medicinski razgledi so recenzirana strokovna revija z več kot 50-letno tradicijo, ki izhaja štirikrat letno. V reviji so objavljeni raziskovalni in pregledni članki z vseh področij biomedicinskih znanosti ter klinični primeri. Namen revije je ciljnemu bralstvu, predvsem študentom splošne in dentalne medicine ter družinskim zdravnikom v splošni praksi, v slovenskem jeziku posredovati najnovejša dognanja na področju biomedicine. S tem želimo pripomoči k napredku in uveljavljenosti slovenske biomedicinske znanosti. Cilj uredništva je objavljati kakovostne znanstvene prispevke, ne glede na vrsto in tematiko, pri čemer dajemo prednost raziskovalnim člankom in zanimivim kliničnim primerom iz prakse.

PRIPRAVA PRISPEVKA

Prispevki morajo biti pripravljeni v skladu s priporočili, ki jih objavlja International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) – Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals. Priporočila so dostopna na <http://www.icmje.org/recommendations/>

Uredništvo sprejema samo prispevke, ki še niso bili in ne bodo objavljeni drugje. Izjemoma lahko uredništvo presodi, da v uredniški postopek sprejme že objavljen oz. podoben prispevek, za katerega je koristno, da doseže najširši krog bralstva (npr. klinične smernice in priporočila), pri čemer morajo avtorji to uredništvu sporočiti ob oddaji prispevka in zagotoviti pristanek odgovornega urednika revije, kjer je prispevek že bil objavljen. Vse oddane prispevke uredništvo pregleda s programsko opremo za odkrivanje plagiatov. Dele prispevka, ki so povzeti po drugi literaturi (predvsem slike in tabele), mora spremljati dovoljena avtorja in založnika prispevka za reprodukcijo.

Jezik besedila

Zaželeno je, da so prispevki v slovenskem jeziku, pri čemer jih mora obvezno spremljati prevod izvlečka (angl. *abstract*) in ključnih besed (angl. *key words*) v angleščini.

Avtorstvo

Pogoji za avtorstvo so natančno opisani v priporočilih ICMJE, ključni pa so naslednji kriteriji:

- znatno sodelovanje pri zasnovi in oblikovanju prispevka oz. pri zbiranju, analizi in interpretaciji podatkov,
- zasnovanje osnutka prispevka oz. pregled vsebine le-tega,
- pregled in strinjanje s končno verzijo prispevka in
- strinjanje s prevzemom odgovornosti za prispevek in pripravljenost k razreševanju vseh vprašanj, povezanih z natančnostjo in integriteto prispevka.

Avtorji prispevka morajo izpolnjevati vse štiri zgoraj navedene kriterije. Samo zbiranje podatkov ne zadostuje za avtorstvo. Kakršne koli spremembe v avtorstvu prispevka po oddaji prispevka uredništvu morajo s podpisom potrditi vsi avtorji prvotno oddanega prispevka.

Etična načela in navzkrižje interesov

Pri prispevkih, ki obravnavajo raziskave na ljudeh ali živalih, mora biti v poglavju metode navedeno ustrezno soglasje pristojne komisije oz. ustanove, da je raziskava etično sprejemljiva in v skladu z načeli Helsinške deklaracije oz. ostalimi pomembnimi dokumenti, ki obravnavajo etičnost biomedicinskih raziskav. Za klinične študije (angl. *clinical trial*) je zaželeno registracija študije pri enem od javnih registrov, odobrenih s strani ICMJE, v skladu s standardi Svetovne zdravstvene organizacije. Več informacij,

vključno z definicijo klinične študije, je dostopnih na <http://www.who.int/ictcp/en/>

Obvezno je, da avtorji kliničnih primerov (angl. *case report*) pridobijo privolitev bolnikov (oz. če to ni mogoče, bližnjih svojcev) za objavo kliničnega primera. Privolitev ni potrebna le v primeru, če lahko avtorji prispevka zanesljivo zagotovijo, da istovetnost bolnika ni ugotovljiva.

Avtorji so uredništvu dolžni posredovati informacije o vseh (finančnih, osebnih, akademskih itd.) navzkrižjih interesov (angl. *conflict of interest*), ki bi lahko vplivala na objektivnost in verodostojnost prispevka.

Struktura prispevka

Prispevek naj bo pripravljen v programskem paketu Microsoft Word® ali OpenOffice.org (datoteke s končnicama .doc ali .docx), pisava naj bo Times New Roman, velikost črk 12pt, razmik med vrsticami 1,5 in širina robov 2,5 cm. Skupaj z naslovno stranjo in literaturo naj prispevek obsega največ 30 strani. Prispevek mora obvezno imeti naslovno stran, izvlečka in ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku ter seznam literature. Raziskovalni članki naj bodo členjeni na naslednja poglavja: izhodišča, metode, rezultati in razprava. Pregledni članki in klinični primeri so lahko zasnovani drugače, pri čemer naj bo delitev na poglavja in podpoglavja jasno razvidna, obvezno pa morajo vsebovati uvod in zaključek.

Naslovna stran

Obsega naj naslov prispevka v slovenskem in angleškem jeziku, imena avtorjev z natančnimi akademskimi in strokovnimi naslovi, kontaktnim elektronskim naslovom ter popoln naslov ustanove, inštituta ali klinike, kjer je prispevek nastal. Naslov naj bo kratek in natančen, opisen in ne trdiljen (povedi v naslovih niso dopustne). Navedeni naj bodo viri finančnih sredstev, opreme, zdravil itd., potrebnih za izvedbo raziskave, in izjava avtorjev o možnih navzkrižjih interesov.

Izvleček in ključne besede

Druga stran naj obsega izvlečka v slovenskem in angleškem jeziku. Izvlečka naj obsegata od 150 do 250 besed. Izvleček raziskovalnega članka naj bo strukturiran (izhodišča, metode, rezultati in zaključki), izvlečki ostalih prispevkov so nestrukturirani. V izvlečku naj bo predstavljen osnovni namen prispevka, vsebinsko naj povzema in ne le našteva bistvene vsebine prispevka. Izvleček ne sme vsebovati kratic in okrajšav. Avtorji naj navedejo do sedem ključnih besed, ki natančneje opredeljujejo vsebino prispevka.

Izhodišča, uvod

V izhodiščih (pri raziskovalnih člankih) oz. uvodu (pri preglednih člankih in kliničnih primerih) avtorji predstavijo temo prispevka v logičnem zaporedju, od širšega konteksta in trenutno veljavnih dejstev, do ožje opredeljenega specifičnega problema oz. novih spoznanj, ki jih želijo predstaviti v prispevku (t. i. struktura lijaka). Pri raziskovalnih člankih mora biti v izhodiščih jasno oblikovana hipoteza.

Metode

V poglavju metode avtorji opišejo protokol, s katerim so želeli razjasniti zastavljeni problem oz. potrditi hipotezo. Opis protokola mora biti dovolj natančen in temeljit, da bi bilo enako raziskavo možno ponoviti. Avtorji morajo navesti tip in proizvajalca opreme ter imena zdravilnih učinkovin, uporabljenih v raziskavi. Prav tako morajo navesti statistične metode in programsko opremo, ki je bila uporabljena za analizo podatkov. Obvezna je izjava o etični ustreznosti raziskave (več podrobnosti najdete v poglavju Etična načela in navzkrižje interesov).

Rezultati

V besedilu poglavja rezultati avtorji predstavijo glavne ugotovitve raziskave oz. odgovor na raziskovalno vprašanje, podrob-

ne podatke pa podajo v tabelah ali slikah. Avtorji se morajo izogibati podvajanju podatkov iz tabel ali slik v besedilu. P-vrednosti je treba podati najmanj na tri decimalke natančno.

Razprava, zaključek

Razprava ni namenjena ponovnemu navajanju rezultatov, temveč njihovi interpretaciji in primerjavi s sorodnimi objavami v literaturi. Treba je podati zaključek (pri preglednih člankih in kliničnih primerih naj bo to samostojno poglavje), kjer avtorji razpravljajo o uporabnosti in pomembnosti svojega prispevka ter možnih usmeritvah za prihodnje delo.

Tabele

Tabele naj bodo smiselno vstavljene v besedilo prispevka. Ločeno jih oštevilčite po vrstnem redu, na vsako tabelo se je treba sklicevati v besedilu. Nad tabelo sodi spremno besedilo, ki naj vsebuje zaporedno številko tabele in kratek naslov, pojasnjene naj bodo tudi vse kratice, okrajšave in nestandardne enote, ki se pojavljajo v tabeli.

Slike

Slike morajo biti profesionalno izdelane ali fotografirane. Slike sprejemamo samo v digitalni obliki in samo v kvaliteti, primerni za tisk (300 DPI). Sprejemamo slike v rastrskih zapisih (datoteke s končnicami .jpeg, .tiff, .png, .gif itd.) ali v vektorskem zapisu (datoteke s končnicami .ai, .eps, .cdr itd.). Preproste sheme lahko narišete tudi s pomočjo programskega paketa Microsoft Word®. Črke, številke ali simboli na sliki morajo biti jasni, enotni in dovolj veliki, da so berljivi tudi na pomanjšani sliki. Fotografijam, na katerih se lahko ugotovi istovetnost bolnika, obvezno priložite pisno dovoljenje bolnika.

Na vsako sliko se je treba sklicevati v besedilu prispevka. Slik ne vstavljajte le v besedilo prispevka, ampak jih posredujte tudi v samostojnih datotekah, poimeno-

vanih z zaporedno številko slike in imenom prvega avtorja. Pod vsako sliko morate obvezno dodati spremno besedilo, ki naj vsebuje zaporedno številko slike, naslov slike in potrebno razlago vsebine. Slika skupaj s spremnim besedilom mora biti razumljiva tudi brez branja ostalega besedila. Pojasniti morate vse okrajšave na sliki. Če imate kakršnekoli dvome glede kakovosti slik, se predhodno posvetujte z uredništvom.

Merske enote

V besedilu uporabljajte enote, ki so v skladu z mednarodnim sistemom enot (SI).

Kratice in okrajšave

V naslovih (pod)poglavij in izvlečkih naj ne bo kratic. Na mestu, kjer se kratica prvič pojavi v besedilu, naj bo le-ta polno izpisana, kratica pa naj bo napisana v oklepaju. Izjema so mednarodno veljavne oznake merskih enot in splošno uveljavljene okrajšave (3D, aids, AMP, ATP, cAMP, cGMP, CT, DNA, EKG, EUR, GMP, GTP, HIV, MRI, RNA, RTG, UZ, ZDA).

Literatura

Vsako navajanje trditev ali dognanj drugih morate podpreti z referenco. Reference v besedilu, slikah in tabelah navedite ležeče v oklepaju z arabskimi števkami na koncu citirane trditve, pred piko oz. dvopičjem (t. i. Vancouvrski sistem citiranja). Reference naj bodo v besedilu oštevilčene po vrstnem redu, tako kot se pojavljajo. Reference, ki se pojavljajo samo v tabelah ali slikah, naj bodo oštevilčene tako, kot se bodo pojavile v besedilu. Seznam citirane literature naj bo na koncu prispevka. Literaturo citirajte po navodilih, ki jih navaja ameriška National Library of Medicine v vodiču Citing Medicine (dosegljivo na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>), za pomoč pri citiranju imen revij priporočamo uporabo spletnega portala PubMed (dosegljivo na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). V citatu navedite vse avtorje, le v primeru, da so avtorji več kot

trije, navedite le prve tri in pripišite et al. Isto velja za navajanje urednikov knjig.

V nadaljevanju navajamo nekaj primerov pravilnega citiranja literature:

Članek v reviji

Petek Šter M, Švab I. Bolniki s sočasnimi boleznimi v družinski medicini. *Med Razgl.* 2008; 48 (2): 205–11.

Bajuk Studen K, Preželj J, Kocjan T, et al. Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdrav Vestn.* 2009; 78: 129–35.

Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, et al. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005; 62 (1): 112–6.

Članek v reviji, kjer je avtor organizacija

American Diabetes Association. Diabetes update. *Nursing.* 2003; Suppl: 19–20, 24.

Volumen s suplementom

Vesel S. Spremembe na srcu pri Kawasaki-jevi bolezni. *Med Razgl.* 2002; 41 Suppl 2: 139–43.

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 Suppl 2: 275–82.

Številka s suplementom

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol.* 1996; 23 (1 Suppl 2): 89–97.

Posamezni deli članka (izvlečki, pisma uredništvu ipd.)

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [izvleček]. *Kidney Int.* 1992; 42: 1285.

Jackson B, Fleming T. A drug is effective if better than a harmless control [pismo uredništvu]. *Nature.* 2005; 434 (7037): 1067.

Knjiga

Ahčan U. Prva pomoč: priročnik s praktičnimi primeri. Ljubljana: Rdeči križ Slovenije; 2007.

Jenkins PF. Making sense of the chest x-ray: a handson guide. New York: Oxford University Press; 2005.

Eyre HJ, Lange DP, Morris LB. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; c2002.

Advanced Life Support Group. Acute medical emergencies: the practical approach. London: BMJ Books; 2001.

Poglavje v knjigi

Možina M, Jamšek M, Šarc L, et al. Zastrupitve. In: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. *Interna medicina*. Ljubljana: Littera picta; 2005. p. 1143–507.

Rojko JL, Hardy WD Jr. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: Sherding RG, ed. *The cat: diseases and clinical management*. New York: Churchill Livingstone; 1989. p. 229–332.

Kone BC. Metabolic basis of solute transport. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *Brenner and Rector's the kidney*. 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders Elsevier; c2008. p. 130–55.

Poročila s kongresov

Ferreira de Oliveira MJ, ed. Accessibility and quality of health services. *Proceedings of the 28th Meeting of the European Working Group on Operational Research Applied to Health Services (ORAHs)*; 2002 Jul 28–Aug 2; Rio de Janeiro, Brazil. Frankfurt (Germany): Peter Lang; c2004.

10th International Psoriasis Symposium; 2004 Jun 10–13; Toronto, ON. Chicago: Skin Disease Education Foundation; 2004.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, et al. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, eds. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17–22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. p. 437–68.

Doktorska in magistrska dela, raziskovalne naloge

Šabovič M. Mehanizem fiziološkega in farmakološkega raztapljanja krvnih strdkov [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1992.

Liu-Ambrose TY. Studies of fall risk and bone morphology in older women with low bone mass [doktorsko delo]. Vancouver (BC): University of British Columbia; 2004.

Weisbaum LD. Human sexuality of children and adolescents: a comprehensive training guide for social work professionals [magistrsko delo]. Long Beach (CA): California State University, Long Beach; 2005.

Pravne listine in zakoni

Zakon o zdravniški službi 1999. Uradni list RS št. 98/1999.

Internetna stran

AMA: helping doctors help patients [internet]. Chicago: American Medical Association; c1995–2007 [citirano 2007 Feb 22]. Dosegljivo na: <http://www.ama-assn.org/>

Članek na internetu

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a casecontrol study. Infect Control Hosp Epidemiol [internet]. 2006 [citirano 2007 Jan 5]; 27 (1): 347. Dosegljivo na: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>

Knjiga na internetu

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al., eds. Harrison's online [internet]. 16th ed. Colum-

bus (OH): McGraw-Hill Companies; c2006 [citirano 2006 Nov 20]. Dosegljivo na: <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=4>

Podatkovna baza na internetu

Online Archive of American Folk Medicine [internet]. Los Angeles: Regents of the University of California. 1996 [citirano 2007 Feb 1]. Dosegljivo na: <http://www.folkmed.ucla.edu/>

Članek na CD-ju, DVD-ju ipd.

Kauffman CA, Bonilla HF. Trends in antibiotic resistance with emphasis on VRE. FPR [CD-ROM]. 1998; 20 (10).

Knjiga na CD-ju, DVD-ju ipd.

Kacmarek RM. Advanced respiratory care [CD-ROM]. Verzija 3.0. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000.

Računalniški program na CD-ju, DVD-ju ipd.

Meader CR, Pribor HC. DiagnosisPro: the ultimate differential diagnosis assistant [CD-ROM]. Verzija 6.0. Los Angeles: MedTech USA; 2002.

Neobjavljeni prispevek

Laking G, Lord J, Fischer A. The economics of diagnosis. Health Econ. V tisku 2006.

ODDAJA PRISPEVKA

Prispevek in slike pošljite po elektronski pošti na naslov prispevki@medrazgl.si

V elektronskem sporočilu, s katerim odgovornemu uredniku oddajate prispevek, na kratko predstavite vsebino prispevka in pomembne nove ugotovitve v njem ter navedite korespondenčnega avtorja (s polnim naslovom, telefonsko številko in elektronskim naslovom), ki bo skrbel za komunikacijo z uredništvom in ostalimi avtorji.

Oddani prispevek mora obvezno spremljati izjava o avtorstvu in avtorskih pravicah, s katero potrjujete, da izpolnjujete kriterije ICMJE za avtorstvo prispevka in da

se strinjate s prenosom avtorskih pravic na Društvo Medicinski razgledi. Izjavo morajo lastnoročno podpisati vsi avtorji in originalni izvod poslati po navadni pošti na naslov uredništva: Društvo Medicinski razgledi, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana. Dokler izjave ne prejmemo, prispevka ne bomo objavili. Izjavo najdete na naši spletni strani: http://www.medrazgl.si/arhiv/mr_izjava_o_avtorstvu.pdf

UREDNIŠKO DELO

Odgovorni urednik vsak oddani prispevek pregleda in se odloči o uvrstitvi v uredniški postopek. Prispevke, uvrščene v uredniški postopek, posreduje ostalim članom uredniškega odbora, ki poskrbijo za tehnične in slogovne popravke, ter popravljen prispevek vrnejo avtorjem v pregled. Nato vsebino prispevka oceni strokovni recenzent, ki avtorjem ni znan, prav tako strokovni recenzent

ni seznanjen z identiteto avtorjev. Prispevek pregledata tudi lektorja za slovenski in angleški jezik. Avtor pred objavo prispevka dobi na vpogled krtačne odtise (t. i. prve korekture), vendar na tej stopnji upoštevamo samo popravke tiskarskih napak. Komentarje na krtačne odtise morate vrniti v treh dneh, sicer menimo, da nimate pripomb.

Uredništvo pri svojem delu upošteva priporočila Committee on Publication Ethics (COPE), objavljena na <http://publication-ethics.org/>

Pri prispevkih, kjer je eden od avtorjev glavni urednik, odgovorni urednik, tehnični urednik ali član uredniškega odbora Medicinskih razgledov, se držimo priporočil COPE za zagotavljanje neodvisnega in preglednega uredniškega postopka.

Navodila avtorjem prispevkov so bila nazadnje posodobljena 23. 3. 2014. Navodila so dostopna na <http://www.medrazgl.si/>

Guidelines for Authors

Medicinski razgledi is a quarterly peer-reviewed scientific journal, which has been in continuous publication for over 50 years. It publishes research and review articles from all fields of biomedical sciences as well as clinical case reports. The scope of Medicinski razgledi is to offer its target readership, specifically medical and dental students as well as family doctors, information about the latest biomedical developments in Slovenian language and thus contribute to the advancement and recognition of Slovenian biomedicine. The aim of the editorial board is to publish good scientific manuscripts, regardless of topic and form, with a special emphasis on research articles and interesting clinical case reports.

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts must conform to the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals published by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The recommendations are available at <http://www.icmje.org/recommendations/>

Only manuscripts that have not already been submitted and will not be submitted elsewhere are accepted. It is at the editorial board's discretion to decide whether a duplicate or an overlapping publication might be justifiable due to the nature of the manuscript (e.g. clinical guidelines and recommendations, published with the intent of reaching the broadest audience possible). If such an exception is to be made, the authors have to notify the editorial board of a possible duplicate or an overlapping publication in advance and obtain the permission of the editor of the journal to which the manuscript was originally submitted. All submitted manuscripts will be analyzed with plagiarism detection soft-

ware. If a part of a submitted manuscript was taken from another publication (e.g. figures and tables), the authors must obtain copyright permission from the author of the original publication and its publisher.

Language

The preferred language of Medicinski razgledi is Slovenian. The abstract and key words should be submitted in both Slovenian and US English.

Authorship

As per ICMJE recommendations, determination of authorship is based on the following four criteria:

- substantial contributions to the conception or design of the manuscript; or the acquisition, analysis, or interpretation of data,
- drafting of the manuscript or critical revision for important intellectual content,
- final approval of the version to be published, and
- agreement to be accountable for all aspects of the manuscript in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the manuscript are appropriately investigated and resolved.

All designated authors of a manuscript should meet all aforementioned criteria for authorship. Participation in data acquisition alone is insufficient for manuscript authorship. Any changes in the authorship of the manuscript after submission have to be confirmed to the editorial board in writing by everyone listed as authors in the originally submitted manuscript.

Ethical considerations and conflicts of interest

Manuscripts based on research involving humans or animals must list under methods

the approval of an appropriate ethical review board which states that the research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and other important documents pertaining to the ethics of biomedical research. Clinical trials should be registered in one of ICMJE-approved public trials registries in accordance with the World Health Organization standards; more information regarding clinical trial registration is available at <http://www.who.int/ictwp/en/>

It is mandatory for the authors of case reports to obtain permission from the patient (or, if that is not possible, close relatives) before submitting the case report. Permission is not required only if the authors can guarantee that the case cannot be identified.

Authors should disclose information on any possible conflict of interest (financial, personal, academic etc.) that could influence the objectivity and validity of the manuscript.

Organization of the manuscript

Manuscripts should be edited using Microsoft Word® or OpenOffice.org software and submitted as .doc or .docx files. The font should be Times New Roman, size 12 pt, with line spacing of 1.5 and margins of 2.5 cm. The length of the manuscript should not exceed 30 pages, including the first (title) page and references. The manuscript must contain a first page, abstracts and key words in Slovenian and English as well as a list of references. Research articles should have the following structure: introduction, methods, results and discussion. Review articles and case reports can be structured differently, but have to include an introduction and conclusions.

First (title) page

The first page should carry the article title in both Slovenian and English, full names of the authors (including their academic and

professional titles), contact e-mail and address of the institution, institute or clinic to which the work should be attributed. The title should be concise, descriptive and not affirmative (no sentences). Sources of financial support, equipment, drugs etc. should be stated along with the disclosure of conflicts of interest.

Abstract and key words

The second page should contain the abstracts in Slovenian and English. The abstracts should be between 150 and 250 words in length. Research article abstracts should have the following structure: backgrounds, methods, results and conclusions. Review article abstracts and case report abstracts should be unstructured. The purpose of the abstract is to present the aim of the manuscript while recapitulating the content. The abstract should not contain abbreviations. Authors must list up to seven key words, which summarize the content of the manuscript.

Introduction

The authors should present the problem in a brief, yet structured way, proceeding from the general, broad context and already known facts, to the problem itself and its solutions within the manuscript (the so-called funnel structure). In research articles, the introduction should contain a clear hypothesis.

Methods

The methods chapter should describe the protocol authors used to find an answer to a problem or to test the hypothesis. Protocol description should be precise enough to allow for the repeatability of the research. Authors have to state the type and manufacturer of the scientific equipment and chemicals used in the research. Methods and software used for statistical analysis have to be clearly described. The approval of relevant ethical committees must also be

stated (for more information see chapter Ethical considerations and conflicts of interest).

Results

The text of the results chapter should clearly state the main findings, with additional details provided in tables and figures. Authors should avoid repeating the data from the tables and figures in the text. They should provide exact P-values (at least three decimal places).

Discussion, conclusions

The purpose of the discussion is not to recapitulate results, but to interpret them and compare them with relevant existing publications. Conclusions (in review articles or in clinical case reports they should form a separate chapter), are intended for the authors to discuss the implications of their findings and possible considerations for future research.

Tables

Tables should be logically inserted into the text and sequentially numbered. Each table has to be referenced in the text of the manuscript. Tables should contain a title with the sequential number and an explanation of all the abbreviations and non-standard units used in the table.

Figures

Figures should be professionally designed or photographed and submitted in digital form and in print quality (300 DPI). Figures can be submitted as raster graphics (.jpeg, .tiff, .png, .gif etc.) or as vector graphics (.ai, .eps, .cdr etc.) Simple schemes can be created using Microsoft Word® software. Letters, numbers or symbols shown in the figures should be clear, uniform, and large enough to be readable once the figure is minimized. Figures from which the identity of the patient can be determined must be accompanied by written consent of the patient.

In the text, every figure has to be referenced. As well as being inserted into the appropriate place in the manuscript, figures should be also submitted as separate files, with file names containing the sequential number of the figure and the name of the first author of the manuscript. Legends under the figures should contain the sequential number, figure title and the information necessary for the understanding of figure content. Figures together with accompanying legends should be understandable without reading the body text. All abbreviations in the figures must be explained. If you have any doubts about the technical adequacy of figures, please consult the editorial board before submission.

Units of measurement

All units of measurement used in the manuscript should be stated using the International System of Units (SI).

Abbreviations

The chapter headings and abstracts should not contain abbreviations. All non-standard abbreviations should be explained in the following way: the term should be written in full the first time it appears in the text, followed by the abbreviation in parentheses. The exception to this rule are standard units of measurement and abbreviations (3D, aids, AMP, ATP, cAMP, cGMP, CT, DNA, EKG, EUR, GMP, GTP, HIV, MRI, RNA, RTG, US, USA).

References

Every citation or fact stated in the text, figures or tables must be supported with a reference. References should be listed with sequential Arabic numbers in parentheses before the full stop or colon, written in italic formatting (so-called Vancouver citation style). The reference numbers included only in the figures and tables should follow the same sequence as in the text. The section listing all the references appearing

in the manuscript should be included at the end of the manuscript. Reference formatting described in the National Library of Medicine's Citing Medicine guide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>) should be used. Journal names should be abbreviated as on PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). The names of the first three referenced authors of the manuscript should be stated, followed by et al.

Examples of correct reference formatting:

Journal article

Petek Šter M, Švab I. Bolniki s sočasnimi boleznimi v družinski medicini. *Med Razgl.* 2008; 48 (2): 205–11.

Bajuk Studen K, Preželj J, Kocjan T, et al. Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdrav Vestn.* 2009; 78: 129–35.

Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, et al. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005; 62 (1): 112–6.

Journal article with organization as author

American Diabetes Association. Diabetes update. *Nursing.* 2003; Suppl: 19–20, 24.

Journal article volume with supplement

Vesel S. Spremembe na srcu pri Kawasaki-jevi bolezni. *Med Razgl.* 2002; 41 Suppl 2: 139–43.

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 Suppl 2: 275–82.

Journal article issue with supplement

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol.* 1996; 23 (1 Suppl 2): 89–97.

Journal article with type of article indicated

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [izvleček]. *Kidney Int.* 1992; 42: 1285.

Jackson B, Fleming T. A drug is effective if better than a harmless control [pismo uredništvu]. *Nature.* 2005; 434 (7037): 1067.

Book

Ahčan U. Prva pomoč: priročnik s praktičnimi primeri. Ljubljana: Rdeči križ Slovenije; 2007.

Jenkins PF. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005.

Eyre HJ, Lange DP, Morris LB. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; c2002.

Advanced Life Support Group. Acute medical emergencies: the practical approach. London: BMJ Books; 2001.

Chapter in a book

Možina M, Jamšek M, Šarc L, et al. Zastrupitve. In: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. *Interna medicina*. Ljubljana: Littera picta; 2005. p. 1143–507.

Rojko JL, Hardy WD Jr. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: Sherding RG, ed. *The cat: diseases and clinical management*. New York: Churchill Livingstone; 1989. p. 229–332.

Kone BC. Metabolic basis of solute transport. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *Brenner and Rector's the kidney*. 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders Elsevier; c2008. p. 130–55.

Conference proceedings

Ferreira de Oliveira MJ, ed. Accessibility and quality of health services. *Proceedings*

of the 28th Meeting of the European Working Group on Operational Research Applied to Health Services (ORAHs); 2002 Jul 28–Aug 2; Rio de Janeiro, Brazil. Frankfurt (Germany): Peter Lang; c2004.

10th International Psoriasis Symposium; 2004 Jun 10–13; Toronto, ON. Chicago: Skin Disease Education Foundation; 2004.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, et al. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, eds. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17–22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. p. 437–68.

Dissertations and theses, scientific reports
Šabovič M. Mehanizem fiziološkega in farmakološkega raztapljanja krvnih strdkov [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1992.

Liu-Ambrose TY. Studies of fall risk and bone morphology in older women with low bone mass [doktorsko delo]. Vancouver (BC): University of British Columbia; 2004.

Weisbaum LD. Human sexuality of children and adolescents: a comprehensive training guide for social work professionals [magistrsko delo]. Long Beach (CA): California State University, Long Beach; 2005.

Legal documents

Zakon o zdravniški službi 1999. Uradni list RS št. 98/1999.

Web sites

AMA: helping doctors help patients [internet]. Chicago: American Medical Association; c1995–2007 [citirano 2007 Feb 22]. Dosegljivo na: <http://www.ama-assn.org/>

Journal articles on the internet

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after

femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [internet]. 2006 [citirano 2007 Jan 5]; 27 (1): 34–7. Dosegljivo na: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>

Books on the internet

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al., eds. *Harrison's online* [internet]. 16th ed. Columbus (OH): McGraw-Hill Companies; c2006 [citirano 2006 Nov 20]. Dosegljivo na: <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=4>

Databases on the internet

Online Archive of American Folk Medicine [internet]. Los Angeles: Regents of the University of California. 1996 [citirano 2007 Feb 1]. Dosegljivo na: <http://www.folk-med.ucla.edu/>

Journal articles on CD-ROM, DVD, or Disk

Kauffman CA, Bonilla HF. Trends in antibiotic resistance with emphasis on VRE. FPR [CD-ROM]. 1998; 20 (10).

Books on CD-ROM, DVD, or Disk

Kacmarek RM. Advanced respiratory care [CD-ROM]. Verzija 3.0. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000.

Computer programs on CD-ROM, DVD, or Disk

Meador CR, Pribor HC. *DiagnosisPro: the ultimate differential diagnosis assistant* [CD-ROM]. Verzija 6.0. Los Angeles: Med-Tech USA; 2002.

Forthcoming journal articles

Laking G, Lord J, Fischer A. The economics of diagnosis. *Health Econ*. V tisku 2006.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts and figures should be submitted via e-mail to prispevki@medrazgl.si

The submission should be accompanied by a Letter to the Editor stating the topic

and major findings of the manuscript along with corresponding author's information (full name, phone number and e-mail address).

All submitted manuscripts must be accompanied by the Authorship and Copyright Statement Form, with which the authors confirm that they fulfill the ICMJE criteria for manuscript authorship and that the copyright of all material published is vested in Društvo Medicinski razgledi. All authors must sign the statement form and send the original to the following address: Društvo Medicinski razgledi, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana, Slovenia. Accepted manuscripts will not be published until signed statements from all authors have been received. The Authorship and Copyright Statement Form is available at http://www.medrazgl.si/arhiv/mr_statement_of_authorship.pdf

EDITORIAL WORK

The editor reviews every submitted manuscript. Accepted manuscripts are forwarded to editorial board members for technical

editing. The manuscripts are then returned to the authors and subsequently forwarded to peerreviewers. The peerreview process is confidential with neither the authors nor the peerreviewers being aware of each other's identity. Manuscripts are also proofread by readers for Slovenian and English. Before publication, authors receive page proofs. The authors must notify the editorial board of any print errors in the page proofs in three working days, as no further corrections are possible afterwards.

The editorial board conducts its work in accordance with the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines, which are available at <http://publicationethics.org/>

Manuscripts which are co-authored by the editor-in-chief, editor, production editors or members of the editorial board are subject to COPE recommendations for an independent and unbiased editing.

Guidelines for manuscript authors were last updated on 23. 3. 2014 and are available at <http://www.medrazgl.si>

MEDICINSKI RAZGLEDI

Biomedical research, professional and review articles

EDITORIAL OFFICE

Društvo Medicinski razgledi
Korytkova ulica 2
1000 Ljubljana
Slovenia

T +386 1 524 23 56 **F** +386 1 543 70 11
E info@medrazgl.si
W www.medrazgl.si
POR: 02014-0050652588

EDITOR-IN-CHIEF

Gašper Tonin

MANAGING EDITOR

Gaja Markovič

PRODUCTION EDITORS

Anamarija Hribar, Jurij Martinčič,
Hana Rakuša, Živa Šubic

EDITORIAL BOARD

Manca Bregar, Pina Držan, Lucia
Jankovski, Tamara Jarm, Julija Kalcher,
Lucija Kobal, Nina Kobal, Tilen
Kristanc, Naneta Legan Kokol,
Maja Osojnik, Zala Roš, Jera Aideen
Schiffner, Uroš Tršan, David Vidmar,
Ines Žabkar, Larisa Žerovnik

READERS FOR SLOVENIAN

Mateja Hočevar Gregorič, Gašper Tonin

READER FOR ENGLISH

Lea Turner

DTP

SYNCOMP d. o. o.

PRINTING PRESS

Nonparel d. o. o.

FRONT COVER

Marko Šubic

SUPPORTED BY

Faculty of Medicine, University
of Ljubljana
Slovenian Research Agency

Medicinski razgledi is published in four issues a year, 1,650 copies per issue.
Regular price per copy is **6 €**, for students **4 €**, for institutions **10 €**.

COPYRIGHT © MEDICINSKI RAZGLEDI 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means without written permission from the publisher.



- 3** The First and Second Wave of Coronavirus Infectious Disease-19 in Slovenia: Epidemiology, Clinical Presentation, Complications and Treatment in the Intensive Care Unit – *Domen Kulovec, Naneta Legan Kokol, Sara Maraž, Matjaž Jereb*
- 25** The Use of Melatonin in the Diagnostics and Treatment of Dementia – *Lara Malec, Anja Kokalj Palandačič*
- 37** *Candidatus* Neoehrlichia Mikurensis – An Emerging Pathogen? – *Katja Strašek Smrdel*
- 49** Chronic Lateral Ankle Instability and Concepts of Treatment – *Aljaž Belšak, Matjaž Merc*
- 61** The Role of Imaging in a Head Injury Patient – *Jan Tehovnik, Jernej Avsenik*
- 71** Para-aortic and Pelvic Lymphadenectomy in Early-stage Epithelial Ovarian Cancer – *Tina Pavlin, Eva Drmota, Nina Kovačević, Sebastjan Merlo*
- 81** Urinary Extracellular Vesicles as Novel Biomarkers of Kidney Allograft Injury – *Anžej Hladnik, Ivana Sedej, Vita Dolžan, Miha Arnot, Metka Lenassi*
- 105** Depression and Nutrition – *Amadea Zupan*
- 121** Virucidal Efficacy of Lozenges with a Fixed-dose Combination of Cetylpyridinium Chloride and Benzidamine Hydrochloride Against Influenza A Virus – *Andrej Steyer, Tina Mikuletič, Tjaša Cerar Kišek, Tina Triglav*
- 131** Diagnostic challenge
- 135** List of Graduated Students
- 143** Guidelines for Authors