

# Farmaceutski vestnik 1



Š T 1 . A P R I L 2 0 1 1 . L E T N I K 6 2

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



## Pot do zdravja

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

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

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



# Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 1 • A P R I L 2 0 1 1 • L E T N I K 6 2

## Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

## Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

## Glavna urednica

Petra Slanc Može

## Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

## Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,  
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 6 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in: BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Letnik 2011 sofinancira Javna agencija za knjigo Republike Slovenije.

## UVODNIK

*Quo vadis*, slovenska farmacija? S tem vprašanjem bi lahko pospremil dogajanja v stroki v časovnem obdobju zadnjih dveh let. Kvalitativno s smerjo razvoja, predvsem pa s prepoznavnostjo slovenske farmacije ne moremo biti zadovoljni. Vsakodnevno, med naključnim pogovorom s kolegi in kolegicami farmacevtskimi, ki delajo na najrazličnejših področjih farmacije v Sloveniji, pogovor obvezno nanese na nezadovoljstvo v stroki. Kljub trudu in aktivnostim, ki jih stanovske organizacije in posamezniki izvajajo za večje prepoznavanje in pomen farmacije, ekonomska nuja vedno znova porine cenjen, zahteven in lep poklic farmacevta v skupino »trgovcev«. V eni od največjih javnih lekarn je pred kratkim obiskovalka lekarn kolegico farmacevtko naslovila z »gospo trgovko«! Medtem, ko so zdravniki in ostali zdravstveni delavci prepoznani kot strokovnjaki na svojem področju, pa farmacevte zopet bolj in bolj, proti naši volji, stigmatizirajo z ekonomskimi profitneži. Kar je tudi razumljivo, če stroko na pomembnih področjih vodijo nefarmaceuti in župani odločajo o potrebah po farmacevtskem kadru, oskrbi prebivalstva z zdravili in obstoju ali neobstoju lekarn na Slovenskem. Seveda vse to omogoča obstoječa zakonodaja, zato ne krivim drugih za nastalo stanje, ampak je za to v veliki meri kriva predvsem neaktivnost nas samih, farmacevtov, ki smo pripravljeni podrediti svoje strokovno znanje in vpliv za lokalno ekonomsko prevlado. Kdaj bomo vložili amandma za spremembo podeljevanja koncesij iz lokanega na sistemski državni nivo? Kdaj bodo zasebni koncesionarji in javne lekarnne skupaj stopili stroki na pot? Če sem že začel z latinskim vprašanjem, pa naj s tem še zaključim: sami dopuščamo neenotnost stroke, kar drugi s pridom izkoriščajo v smislu *divide et impera!*

V številki Farmaceutskega vestnika, ki je pred vami, boste lahko prebrali, da so za lajšanje težav pri osteoporozi sicer najbolj pomembni dober vir, vnos in absorpcija kalcijevih ionov in vitamina D, da pa so za zdrave kosti pomembni še drugi dejavniki in snovi, ki jih najdemo v zdravi prehrani. Drug članek je povezan z delom doc. dr. Nataše Obermajer, ki v ZDA preučuje možnosti razvoja specifičnih protirakavih cepiv na osnovi aktivacije dendritičnih celic, ki so ene najpomembnejših celic imunskega sistema v prepoznavanju tujkov. Mirjam Gosenca, mag. farm in prof. dr. Mirjana Gašperlin opisujeta uporabo tekočih kristalov v farmaciji in kozmetologiji, četrti prispevek pa nam odkriva možnost uporabe matičnih celic iz zobnih in obzobnih tkiv v regenerativnem zobozdravstvu. In še spodbudna novica: stroka je bogatejša za 16 novih doktorjev znanosti iz različnih področij farmacije.

V upanju, da se v čim večjem številu srečamo na simpozijih ob 36 skupščini SFD, ki bodo od 12.5 do 15.5 v Portorožu, vas lepo pozdravljam,

Prof. dr. Borut Štrukelj,  
Odgovorni urednik

# Vsebina

## *Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles*

---

**Simona Mencej Bedrač**

Sta za zdrave kosti dovolj kalcij in vitamin D?

*Are calcium and vitamin D sufficient to maintain bone health?*

---

**3**

**Nataša Obermajer**

Priprava protitumorskih cepiv na osnovi dendritičnih celic

*Generation of dendritic cells as cancer vaccines*

---

**9**

**Mirjam Gosenica, Mirjana Gašperlin**

Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje

*Liquid crystals in pharmacy: structure and physicochemical characterization*

---

**15**

**Maja Marušič, Matjaž Jeras**

Matične celice iz zobnega in obzobnega tkiva ter njihova potencialna uporaba v regenerativnem zobozdravstvu

*Stem cells from dental and periodontal tissue and their possible applications in regenerative dentistry*

---

**26**

## *Novice iz sveta farmacije*

---

**31**

## *Novi doktorji znanosti v letu 2010*

---

**33**

## *Iz družabnega življenja*

---

**44**

## *Navodila avtorjem*

---

**46**

# Sta za zdrave kosti dovolj kalcij in vitamin D?

## Are calcium and vitamin D sufficient to maintain bone health?

Simona Mencej Bedrač

**Povzetek:** Osteoporoza je trenutno eden največjih zdravstvenih problemov, saj zaradi podaljševanja življenjske dobe število obolelih strmo narašča. V Sloveniji je prevalenca osteoporoze pri ženskah po 50. letu 27,5 %, pri moških po 60. letu pa 14,6 %. Pri preprečevanju osteoporoznih zlomov imajo poleg kalcija in vitamina D vlogo tudi druge snovi iz prehrane. V presnovnih procesih, ki potekajo v kosteh, sodelujejo vitamini A, B, C in K, za kostno tvorbo pa je potrebna zadostna količina proteinov. Ker so v razvoj osteoporoze vpleteni tudi vnetni procesi, se učinku uživanja maščobnih kislin na zdravje kosti kažejo preko vpliva na nastajanje vnetnih citokinov. Mehanizmi delovanja vitaminov, proteinov in maščobnih kislin v kosteh so deloma pojasnjeni, vendar njihov klinični pomen pri zmanjševanju tveganja za zlome še ni dokazan, zato trenutno pri osteoporozi ni ustreznih priporočil za njihovo uživanje.

**Ključne besede:** kost, osteoporoza, prehrana, vitamin

**Abstract:** Osteoporosis is currently a major health problem, as a number of affected individuals is rapidly increasing due to longer lifespan. In Slovenia, osteoporosis affects 27.5% of women after the age of 50, and 14.6% of men after the age of 60. Besides calcium and vitamin D, other nutrients play a role in the prevention of fragility fractures. Vitamins A, B, C and K are involved in bone-related metabolic processes. In bone formation process, sufficient amount of proteins is required. As osteoporosis is also due to inflammation, the fatty acids intake could influence bone health through the regulation of inflammatory cytokines synthesis. The mechanisms of action of vitamins, proteins and fatty acids in bone homeostasis have partly been elucidated. However, their clinical relevance in fracture risk reduction is still not confirmed and no recommendations about their intake are proposed.

**Key words:** bone, osteoporosis, nutrition, vitamin

## 1 Uvod

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (MKG) in spremembe v mikroarhitekturi kostnega tkiva, kar vodi do večje lomljivosti kosti in večjega tveganja za nastanek zlomov, predvsem vretenc, kolka in zapestja (1). Osteoporoza je danes eden največjih zdravstvenih problemov, saj zaradi podaljševanja življenjske dobe število obolelih strmo narašča. V Sloveniji je njena prevalenca pri ženskah po 50. letu 27,5 %, pri moških po 60. letu pa 14,6 % (2).

Na razvoj osteoporoze kot večfaktorske bolezni vplivajo genetski in okoljski dejavniki, med katerimi je tudi prehrana. Pomanjkanje  $\text{Ca}^{2+}$  in vitamina D veljata za pomembna okoljska dejavnika tveganja za osteoporozo.  $\text{Ca}^{2+}$  je glavni kation anorganskega matriksa kostnine, vitamin D pa v telesu uravnava absorpcijo  $\text{Ca}^{2+}$  in fosfatnih ionov ter povečuje skladiščenje  $\text{Ca}^{2+}$  v kosteh. Številne raziskave so pokazale, da za zdravje kosti nista dovolj samo zadostna vnosa  $\text{Ca}^{2+}$  in vitamina D, pač pa imajo pomembno vlogo tudi drugi vitamini in snovi v prehrani.

## 2 Pomen vitaminov za zdravje kosti in razvoj osteoporoze

### 2.1 Vitamin A in karotenoidi

*Vitamin A* je skupno ime za serijo strukturno podobnih spojin, kot so retinol, retinal in retinojska kislina, ki nastanejo iz retinilnih estrov in jih v telo vnesemo s hrano živalskega izvora. Poleg tega vitamin A *in vivo* nastaja iz nekaterih karotenoidov ( $\alpha$ - in  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin), ki jih zaužijemo z rastlinsko hrano (3). Pri živalih so ugotovili, da retinojska kislina *in vitro* zavira aktivnost osteoblastov, stimulira nastajanje osteoklastov in ima antagonistični učinek vitaminu D pri uravnavanju serumske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Ti procesi vodijo do povečanja kostne razgradnje, manjše MKG in večjega tveganja za zlom. Pri kroničnih zastrupitvah z vitaminom A se pri ljudeh pojavita hiperkalcemija in zmanjšanje kostne premene (4). *Karotenoidi*,  $\alpha$ - in  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin, likopen, lutein in zeaksantin, so antioksidanti in zmanjšujejo oksidativni stres, ki nastane pri kostni razgradnji zaradi nastanka reaktivnih kisikovih intermediatov. Študije pri ljudeh, v katerih so iskali povezavo med vnosom vitamina A/retinola ali karotenoidov ter MKG ali osteoporoznimi zlomi, so dale nasprotujoče si rezultate, kar je prikazano v **preglednici 1**.

**Preglednica 1:** Pregled nekaterih študij, ki so preučevale povezanost vnosa vitamina A in karotenoidov z mineralno gostoto ali osteoporoznimi zlomi pri ljudeh.  
**Table 1:** Summary of some studies examining relationships of vitamin A and carotenoid intake and bone mineral density or osteoporotic fracture in humans.

Zasnova študije in preiskovanci	Način ocene vnosa	Preučevani osteoporozni fenotip	Rezultati študije	Referenca
<b>vitamin A in retinol</b>				
prospektivna študija pri pomenopavznih ženskah (N=75.747), ki so jih spremljali 3 leta	vprašalnik o prehrani	zlomi kolka in vsi zlomi po navedbah preiskovank, njihovih sorodnikov ali zdravnikov	ni povezave med vnosom vitamina A in retinola ter incidenco zlomov; ženske z ↓ vnosom vitamina D ( $\leq 11 \mu\text{g}/\text{dan}$ ) ter ↑ vnosom vitamina A ( $\geq 7.508 \mu\text{g}$ ekvivalentov retinola/dan) in retinola ( $\geq 1.426 \mu\text{g}$ retinola/dan) imajo ↑ tveganje za zlome	(4)
prospektivna študija pri pomenopavznih ženskah (N=72.337), ki so jih spremljali 18 let	vprašalnik o prehrani	zlom kolka po navedbah preiskovank	↑ vnos vitamina A ( $\geq 3.000 \mu\text{g}$ ekvivalentov retinola/dan) in retinola ( $\geq 2.000 \mu\text{g}$ retinola/dan) je povezan z večjim tveganjem za zlom kolka; vnos $\beta$ -karotena ni povezan z zlomom kolka	(5)
prospektivna študija pri pomenopavznih ženskah (N=34.703), ki so jih spremljali 9,5 let	vprašalnik o prehrani	zlomi kolka in drugi zlomi (nadlaktica, podlaktica, zapestje, rebra, vretenca) po navedbah preiskovank	ni povezave med vnosom vitamina A in retinola ter incidenco zlomov; preiskovanke, ki vnašajo vitamin A v obliki prehranskih dopolnil, imajo ↑ tveganje za zlom kolka kot tiste, ki vnašajo vitamin A samo s hrano	(6)
11.068 pomenopavznih žensk, starih 50 - 79 let	vprašalnik o prehrani, merjenje serumske koncentracije retinola, $\alpha$ - in $\beta$ -karotena, $\beta$ -kriptoksantina, likopena, luteina in zeaksantina (n = 379)	merjenje MKG kolka in vretenc	ni povezave med vnosom in serumskimi koncentracijami retinola, $\alpha$ - in $\beta$ -karotena, $\beta$ -kriptoksantina, likopena, luteina in zeaksantina ter MKG	(7)
longitudinalna študija pri 334 moških in 540 ženskah (75 ± 5 let)	vprašalnik o prehrani	merjenje MKG kolka in vretenc ob vključitvi v študijo in po 4 letih	ženske: ↓ vnos likopena je povezan z ↓ MKG ledvenih vretenc ob začetku študije in ↑ zmanjšanjem MKG ledvenih vretenc po 4 letih; moški: ↓ vnos celokupnih karotenoidov, $\beta$ -karotena, likopena ali luteina+zeaksantina je povezan z ↑ zmanjšanjem MKG trohantra po 4 letih	(8)
prospektivna študija pri ženskah (N=66.651), starih 40 - 76 let	vprašalnik o prehrani	zlom kolka po navedbah preiskovank	vnos $\beta$ -karotena < 3,5 mg/dan: kadilke imajo ↑ tveganje za zlom kolka kot nekadilke; vnos $\beta$ -karotena > 3,5 mg/dan: tveganje za zlom kolka se pri kadilkah še poveča	(9)
1.215 moških in žensk, starejših od 50 let z zlomom kolka, in 1.349 preiskovancev brez zlomov kolka	vprašalnik o prehrani	zlom kolka, potrjen pri zdravljenju v bolnišnici	kadilci (v preteklosti ali trenutno): ↓ tveganje za zlom kolka, če uživajo veliko $\beta$ -karotena; nekadilci: ni razlike, če uživajo $\beta$ -karoten	(10)
prospektivna študija pri 2.606 pomenopavznih ženskah, ki so jih spremljali 3 leta	merjenje serumske koncentracije -karotena, retinola in retinilpalmitata	podatki o zlomih iz zdravstvenih kartotek ali obiskov na domu ter potrjeni radiološko ali kirurško zlomi kolka in nevretenčni zlomi (rame, zapestja, komolca, gležnja, medenice), potrjeni na zdravniškem pregledu, radiološko ali kirurško	serumske koncentracije $\beta$ -karotena, retinola in retinilpalmitata niso povezane z incidenco zlomov	(11)
370 moških in 576 žensk (starost 75 ± 5 let), ki so jih spremljali 17 let	vprašalnik o prehrani	zlom kolka in nevretenčni zlom	↑ vnos karotenoidov je povezan z ↓ tveganjem za zlom kolka; ↑ vnos likopena je povezan z ↓ tveganjem za zlom kolka in nevretenčni zlom	(12)

Legenda: MKG – mineralna kostna gostota

## 2.2 Vitamini B

Zvišane plazemske koncentracije homocisteina predstavljajo dejavnik tveganja za osteoporozni zlom (13, 14) in so povezane s pomanjkanjem pomembnih kofaktorjev v presnovi homocisteina, kot so folat, vitamina B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub>. Mehanizem vpliva homocisteina na kostne celice še ni podrobno pojasnjen. Zunanji celični homocistein stimulira osteoklaste in v manjši meri tudi osteoblaste preko vezave na membranske receptorje ter inducira apoptozo preosteoblastov. Pomanjkanje folata, B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub> vodi do kopičenja homocisteina v osteoklastih in aktivacije osteoklastov. Poleg tega zvišane koncentracije homocisteina in pomanjkanje folata, B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub> vodijo do razvoja ateroskleroze žilja v kosteh, kar zmanjša perfuzijo v kosteh.

Vitamin B<sub>6</sub> tudi inhibira lizin-oksidozo, kar vodi do motenj v prečnem premreževanju kolagena v kosteh (15). Študije pri ljudeh, v katerih so preučevali povezave med vnosom ali koncentracijo vitaminov B ter osteoporoznim fenotipom, so prikazane v **preglednici 2**.

## 2.3 Vitamin C

Vitamin C je antioksidant in zmanjšuje oksidativni stres, ki je posledica reaktivnih kisikovih intermediatov, nastalih pri kostni razgradnji (22). Kostni matriks je v 90 % sestavljen iz kolagena, vitamin C pa je kofaktor pri njegovi tvorbi ter pri sintezi hidroksiprolina in hidroksilizina, ki gradita kolagen (23).

**Preglednica 2:** Pregled nekaterih študij, ki so preučevale povezanost vnosa vitaminov B z mineralno kostno gostoto ali osteoporoznimi zlomi pri ljudeh.

**Table 2:** Summary of some studies examining relationships of intake of vitamins B and bone mineral density or osteoporotic fracture in humans.

Zasnova študije in preiskovanci	Preučevani vitamini in način ocene vnosa	Preučevani osteoporozni fenotip	Rezultati študije	Referenca
1.869 perimenopavznih žensk, starih povprečno 50 let	<b>folat, vitamina B<sub>2</sub> in B<sub>12</sub></b> , vprašalnik o prehrani	- MKG (začetek, po 5 in 10 letih) - klinično in/ali radiološko potrjeni zlomi	↓ vnos folata je bil po 5 letih spremljanja povezan z ↓ MKG ledvenih vretenc; ni povezave z zlomi	(16)
5.304 moških in žensk, starejših od 55 let	<b>folat, vitamini B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub></b> ; vprašalnik o prehrani	- MKG (začetek in po povprečno 6,5 letih) - nevretenčni zlomi, opredeljeni na osnovi podatkov v zdravstvenem kartonu, vretenčni zlomi, opredeljeni radiološko	↑ vnos vitaminov B <sub>2</sub> in B <sub>6</sub> je povezan z ↑ MKG vratu stegenice in ledvene hrbtenice; ↑ vnos vitamina B <sub>6</sub> je povezan z ↓ tveganjem za zlome	(17)
2.268 moških in 3.070 žensk, starih 47 do 50 let ali 71 do 75 let	<b>folat, vitamin B<sub>12</sub>, homocistein</b> ; merjenje plazemskih koncentracij	- MKG kolka	↑ koncentracije homocisteina (≥15 μmol/l) so pri ženskah povezane z ↓ MKG kolka; ↓ koncentracije folata (<3,8 nmol/l) so pri ženskah povezane z ↑ MKG kolka; pri moških niso dokazali vpliva na MKG kolka	(18)
1.123 moških (starost 59,4 ± 9,5 let) in 1.453 žensk (58,4 ± 9,4 let)	<b>vitamin B<sub>12</sub></b> ; merjenje plazemskih koncentracij	- MKG kolka in vretenc	koncentracija vitamina B <sub>12</sub> <148 pmol/l je pri moških povezana z ↓ MKG kolka, pri ženskah pa z ↓ MKG ledvene hrbtenice	(19)
prospektivna, longitudinalna študija, v kateri je sodelovalo 1.002 moških in žensk (starost 75 ± 5 let)	<b>folat, vitamina B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub>, homocistein</b> ; merjenje plazemskih koncentracij	- MKG (začetek in po 4 letih) - zlomi kolka na osnovi podatkov iz zdravstvenega kartona	↓ koncentracija vitamina B <sub>6</sub> je povezana z ↑ izgubo MKG po 4 letih; ↓ koncentracije vitaminov B <sub>6</sub> in B <sub>12</sub> so povezane z ↑ tveganjem za zlom; koncentracije homocisteina >14 μmol/l so povezane z ↑ tveganjem za zlom	(20)
prospektivna študija pri 2.639 ženskah in 2.127, moških starih 65-67 let (mediana spremljanja 12,6 let)	<b>homocistein, folat in vitamin B<sub>12</sub></b> ; merjenje plazemskih koncentracij	zlom kolka na osnovi odpustnice iz bolnišnice	pri ženskah in moških so koncentracije homocisteina >15 μmol/l povezane z ↑ tveganjem za zlom; pri ženskah so koncentracije folata <2,9 nmol/l povezane z ↑ tveganjem za zlom	(21)

MKG – mineralna kostna gostota

Študije o vplivu vitamina C na kosti so dale nasprotujoče si rezultate. Uživanje vitamina C v obliki prehranskih dopolnil je bilo v študiji pri 994 pomenopavznih ženskah povezano z večjo MKG, povezava pa je bila še izrazitejša pri sočasni uporabi estrogenov in/ali kalcija. Ženske (n = 277) so uživale vitamin C v obliki prehranskih dopolnil v odmerkih od 70 do 5.000 mg/dan (povprečno 745 mg/dan) (24). Največji celokupni vnos vitamina C (242 mg/dan) je bil pri moških (n = 334), ne pa tudi pri ženskah (n = 540), povezan z večjo MKG v vratu stegenice in manjšo 4-letno izgubo MKG v predelu vratu stegenice in trohantra, pri moških kadicah pa z manjšo MKG v predelu trohantra (25). V prospektivni študiji, v kateri so pri 366 moških in 592 ženskah (starost 75 ± 5 let) 17 let spremljali incidenco osteoporoznih zlomov, so pokazali, da je incidenca zlomov kolka in nevretenčnih zlomov značilno manjša pri tistih z največjim celokupnim vnosom vitamina C (~ 310 mg/dan) v primerjavi s tistimi z najmanjšim (~ 95 mg/dan) ter pri tistih, ki so uživali največjo količino vitamina C s prehranskimi dopolnili (~ 260 mg/dan) v primerjavi s tistimi, ki vitamina C v obliki prehranskih dopolnil niso uživali (26).

## 2.4 Vitamin K

Vitamin K povezujemo z dvema skupinama naravnih spojin, in sicer s filokinoni (vitamin K<sub>1</sub>) in menakinoni (vitamin K<sub>2</sub>). Glavna naloga vitamina K je  $\gamma$ -karboksilacija od vitamina K odvisnih proteinov, med katere spada tudi osteokalcin. Osteokalcin je glavni protein, ki nastaja v osteoblastih in uravnava kalcifikacijo skeleta (27).

Ne prav številne študije o vplivu vitamina K kažejo, da je majhen vnos vitamina K<sub>1</sub> povezan z večjim tveganjem za zlom kolka (28, 29),

povezave z MKG pa niso pokazali (28, 30, 31). V zanimivi študiji, v kateri je sodelovalo več kot 3.700 ortopedskih oddelkov iz celotne Japonske, so s pomočjo vprašalnika ocenili incidenco zlomov kolka v posameznih regijah. Rezultate so povezali z nacionalno raziskavo o prehrani ljudi ter ugotovili, da uživajo v regijah z majhno incidenco zlomov kolka več vitamina K kot v regijah z veliko incidenco (32).

## 3 Pomen drugih snovi v prehrani za zdravje kosti in razvoj osteoporoze

### 3.1 Proteini

Dolgo časa je veljalo, da je velik vnos proteinov dejavnik tveganja za razvoj osteoporoze. Pokazali so namreč, da pri večjem vnosu proteinov nastane pri oksidaciji aminokislin, ki vsebujejo žveplo, več H<sup>+</sup> ionov, ki se izločajo preko ledvic. Izločanje Ca<sup>2+</sup> ionov je v ledvicah neposredno odvisno od izločanja H<sup>+</sup> in korelira tudi z vnosom proteinov. Vendar velik vnos proteinov živalskega izvora ne poveča samo izločanja Ca<sup>2+</sup> preko ledvic, pač pa tudi njegovo absorpcijo v gastrointestinalnem traktu. Pri majhnem vnosu proteinov se zaradi zmanjšane absorpcije kalcija iz črevesja, poveča izločanje paratiroidnega hormona in sproščanje kalcija iz kosti (33). Študije pri ljudeh, v katerih so iskali povezavo med vnosom proteinov (celokupnih, živalskega ali rastlinskega izvora) ter osteoporoznim fenotipom, so prikazane v **preglednici 3**.

**Preglednica 3:** Pregled nekaterih študij, ki preučujejo vpliv celokupnih proteinov ter proteinov živalskega in rastlinskega izvora na zdravje kosti pri starejših ženskah in moških.

**Table 3:** Summary of some studies examining the effect of total protein, animal protein and plant protein intakes on bone health in elderly women and men.

Število preiskovancev	Trajanje študije (leto)	Povprečen vnos proteinov	Rezultati študije	Referenca
572 žensk in 388 moških, starih povprečno 71 let*	4	71 g/dan	↑ vnos PŽI je povezan z ↑ MKG ↑ vnos PRI je povezan z ↓ MKG	(34)
32.006 žensk, starih povprečno 61 let	3	78 g/dan	↑ vnos PŽI je povezan z ↓ zlomi ↑ vnos celokupnih proteinov je povezan z ↓ zlomi	(35)
391 žensk, 224 moških, starih povprečno 75 let*	4	68 g/dan	↑ vnos PŽI je povezan z ↓ zlomi ↑ vnos celokupnih proteinov je povezan z ↑ MKG	(36)
138 moških in žensk, starejših od 65 let*	3	79 g/dan	↑ vnos celokupnih proteinov je povezan z ↑ MKG (vir proteinov ni pomemben)	(37)
1.035 žensk, starejših od 65 let	~7	50 g/dan	↑ razmerje med vnosom celokupnih proteinov in PRI je povezano z ↑ zlomi kolka	(38)
85.900 žensk, starih 35 - 59 let	12	79,6 g/dan	vnos celokupnih proteinov je povezan z ↑ zlomi (> 95 g proteinov)	(39)
2.501 žensk in moških, starih 50 - 89 let	5	~ 39 g/1000 kcal/dan	↑ vnos celokupnih proteinov je povezan z ↓ zlomi kolka (pri moških in ženskah, starih 50 - 69)	(40)
36.217 žensk, starih 40 - 65 let	8,4	~ 46 g/1000 kcal/da	↑ vnos celokupnih proteinov je povezan z ↑ zlomi (če je vnos Ca <sup>2+</sup> <400 mg/1000 kcal) ↑ vnos PŽI je povezan z ↑ zlomi	(41)

Legenda: PŽI – proteini živalskega izvora, PRI – proteini rastlinskega izvora, MKG – mineralna kostna gostota. \* Podatki in rezultati za ženske in moške so predstavljeni skupaj.



### 3.2 Maščobne kisline

Polinenasičene maščobne kisline (PMK) imajo ključno vlogo pri delovanju membran in medcelični komunikaciji. Študije kažejo, da  $\omega$ -3 in  $\omega$ -6 esencialne PMK vplivajo na zdravje kosti preko zaviranja učinkov vnetnih citokinov, predvsem IL-1, IL-6 in tumorje nekrotizirajočega faktorja  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Pri osteoporozi namreč ne gre samo za izgubljanje kostne mase, pač pa pri njenem razvoju sodeluje tudi imunski sistem. Vnetni citokini spodbujajo nastanek in aktivacijo osteoklastov ter podaljšajo njihovo življenjsko dobo (42). V študij pri 891 ženskah na prehodu v menopavzo so pokazali, da je večji vnos PMK pri ženskah povezan s hitrejšo izgubo kostne mase (43). Pri 1.532 starejših moških in ženskah so opazili, da je večje razmerje  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PMK povezano z manjšo MKG. V razvitem svetu je hrana večinoma bolj bogata z  $\omega$ -6 (rastlinsko olje, žitarice, mleko, jajca in meso) kot pa z  $\omega$ -3 PMK (nekateri ribe, semena in oreški) (44). Podobno so tudi mladostniki moškega spola ( $n = 78$ ), ki uživajo več  $\omega$ -3 PMK, dosegli višjo največjo kostno maso (45).

Mononenasičene maščobne kisline (MMK), katerih glavni vir je olivno olje, bi lahko ugodno vplivale na zdravje kosti, saj bi lahko imelo olivno olje protivnetno delovanje (46). V manjši grški študiji so pri 36 moških in 118 ženskah (starost 25 - 69 let) pokazali, da je uživanje večje količine MMK povezano z večjo MKG (47), medtem ko je bil pri 891 ženskah na prehodu v menopavzo večji vnos MMK povezano s hitrejšo izgubo kostne mase (43).

Nasičene maščobne kisline (NMK) lahko pri živalih zavirajo absorpcijo kalcija in mineralizacijo kosti (48), uživanje NMK pa je povezano tudi z večjimi koncentracijami vnetnih dejavnikov, kot so C-reaktivni protein, IL-1, IL-6 in TNF $\alpha$  (49). V študiji pri otrocih in mladostnikih so pokazali, da je večji vnos NMK povezan z višjo MKG (50). V študiji pri 14.850 odraslih, starejših od 20 let, so pokazali nasprotno: moški, mlajši od 50 let, ki so uživali manj NMK, so imeli večjo MKG vratu stegenice, pri ženskah pa podobnega učinka niso opazili (51).

## 4 Omejitve študij vpliva vnosa snovi s prehrano na razvoj osteoporoze

Do sedaj so študije povezanosti vnosa nekaterih vitaminov, proteinov in maščobnih kislin z razvojem osteoporoze dale zelo nekonsistentne rezultate, na podlagi katerih je težko podati zaključke. Vzroki za razlike v rezultatih študij so skriti v sami zasnovi in izvedbi študij, ki se med seboj pomembno razlikujejo v naslednjih vidikih:

- število vključenih preiskovancev (od nekaj 100 do več 10.000) in trajanje študije, poleg tega v študijah preučujejo različne podskupine npr. pomenopavzne ženske, kar vodi do bolj homogenih skupin, otežuje pa primerjavo z drugimi raziskavami;
- opredelitev osteoporoznega fenotipa (zlomi na različnih mestih skeleta, MKG), saj so zlomi boljši osteoporozni fenotip kot MKG, ki ne korelira dobro z zlomi. Zanesljive podatke o zlomih je pogosto težko zbrati, saj so ti v nekaterih študijah zbrani izključno na osnovi vprašalnikov, ki so jih izpolnili preiskovanci. Omenjeni način zbiranja je nezanesljiv predvsem pri prepoznavanju vretenčnih zlomov, ki pogosto niso diagnosticirani klinično ali z rentgenskim slikanjem.

c) vrednotenje vnosa snovi s prehrano v študijah ni standardizirano, saj se v njih uporabljajo različni semikvantitativni vprašalniki, ki zahtevajo navedbo vnosa hrane in prehranskih dopolnil v določenem obdobju (zadnjih 24 ur, zadnji teden, zadnje 3 mesece). Uporaba različnih vprašalnikov je deloma razumljiva zaradi razlik v prehrani med populacijami, vendar to otežuje medsebojno primerjavo študij in daje različno kvaliteto podatkov. Za oceno vnosa se uporablja tudi merjenje koncentracije določenega vitamina v serumu ali plazmi, kar nam da zanesljivejšee podatke, vendar je odvzem krvi za preiskovance invaziven poseg, izmerjena koncentracija pa odraža vnos vitamina samo v določenem obdobju pred meritvijo.

d) vrednotenje drugih vplivov na zlome in MKG, saj so v statistično analizo običajno vključene številne kovariate, ki tudi lahko vplivajo na zlome in MKG (npr. uporaba hormonskega nadomestnega zdravljenja, kajenje, uživanje alkohola, fizično aktivnost, spremljajoče bolezni, uporaba zdravil, ki lahko vplivajo na kosti, itd.) in se med študijami razlikujejo.

Za bolj kakovostno opredelitev vpliva snovi iz prehrane na osteoporozo bi bile potrebne študije na velikem številu preiskovancev s standardiziranimi vprašalniki za oceno vnosa in dodatnim merjenjem koncentracije snovi tudi v krvi ter zanesljivo oceno prisotnosti zloma. Zaželeno bi bilo spremljanje preiskovanca v rednih intervalih v daljšem časovnem obdobju ter ob tem upoštevati tudi možne druge vplive na razvoj osteoporoze.

## 5 Sklep

Prehrana je pomemben okoljski dejavnik, ki vpliva na kakovost kostnine in razvoj osteoporoze. Za zdrave kosti ne zadostujeta samo zadostni količini kalcija in vitamina D, pač pa imajo lahko pomembno vlogo še druge snovi iz prehrane, kot so nekateri vitamini, proteini in maščobne kisline. Študije o vplivu vnosa snovi v telo s hrano in prehranskimi dopolnili na razvoj osteoporoze nakazujejo, da imajo najverjetneje vitamini A, B, C in K ter proteini in maščobne kisline prav tako vlogo pri razvoju osteoporoze, vendar pa raziskave zaradi nekonsistentnih rezultatov še niso dale končnega odgovora. Uporabnost predstavljenih rezultatov študij v farmacevtskem svetovanju je omejena, saj pomen opisanih snovi v prehrani za zdravje kosti ni popolnoma dokazan, poleg tega pa ni znano, kolikšna je najprimernejša količina vnosa opisanih snovi pri preprečevanju osteoporoze. Za pojasnitev in potrditev pomena obravnavanih vitaminov, proteinov in maščobnih kislin ter njihovo vključitev v vsakodnevno klinično uporabo pri zdravljenju in preprečevanju osteoporoze bodo v prihodnje potrebne dodatne, kakovostno izvedene raziskave na velikem številu preiskovancev, na podlagi katerih bo mogoče oblikovati tudi ustrezna priporočila za uporabo in odmerjanje.

## 6 Literatura

- Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002; 359: 1929-1936.
- Žorž G. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. *ISIS* 2006; 15 (3): 34-36.
- Ribaya-Mercado JD, Blumberg JB. Vitamin A: is it a risk factor for osteoporosis and bone fracture? *Nutr Rev* 2007; 65 (10): 425-438.

4. Caire-Juvera G, Ritenbaugh C, Wactawski-Wende J et al. Vitamin A and retinol intakes and the risk of fractures among participants of the Women's Health Initiative Observational study. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 323-330.
5. Feskanich D, Singh V, Willett WC et al. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *JAMA* 2002; 287: 47-54.
6. Lim LS, Harnack LJ, Lazovich D et al. Vitamin A intake and the risk of hip fracture in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Osteoporos Int* 2004; 15 (7): 552-559.
7. Wolf RL, Cauley JA, Pettinger M et al. Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (3): 581-588.
8. Sahni S, Hannan MT, Blumberg J et al. Inverse association of carotenoid intakes with 4-y change in bone mineral density in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 2008; 89 (1): 416-424.
9. Melhus H, Michaelsson K, Holmberg L et al. Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (1): 129-135.
10. Zhang J, Munger RG, West NA et al. Antioxidant intake and the risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status. *Am J Epidemiol* 2006; 163 (1): 9-17.
11. Barker ME, McCloskey E, Saha S et al. Serum retinoids and beta-carotene as predictors of hip and other fractures in elderly women. *J Bone Miner Res* 2005; 20 (6): 913-920.
12. Sahni S, Hannan MT, Blumberg J et al. Protective effect of total carotenoid and lycopene intake on the risk of hip fracture: a 17-year follow-up from Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2009; 24 (6): 1086-1094.
13. McLean RR, Jacques PF, Selhub J et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350 (20): 2042-2049.
14. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350 (20): 2033-2041.
15. Herrmann M, Schmidt JP, Umanskaya N et al. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> deficiencies in osteoporosis – a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45 (12): 1621-1632.
16. Rejnmark L, Vestergaard P, Herrmann AP et al. Dietary intake of folate, but not vitamin B<sub>2</sub> or B<sub>12</sub>, is associated with increased bone mineral density 5 years after the menopause: results from a 10-year follow-up study in early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2008; 82: 1-11.
17. Yazdanpanah N, Zillikens MC, Rivadeneira F et al. Effect of dietary B vitamins on BMD and risk of fracture in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2007; 41: 987-994.
18. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density. *Arch Intern Med* 2006; 166: 88-94.
19. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N et al. Low plasma vitamin B<sub>12</sub> is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20 (1): 152-158.
20. McLean RR, Jacques PF, Selhub J et al. Plasma B vitamins, homocysteine, and their relation with bone loss and hip fracture in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (6): 2206-2212.
21. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 and the risk of hip fracture: the Hordaland homocysteine study. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (5): 747-756.
22. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 275-279.
23. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1135S-1140S.
24. Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16 (1): 135-140.
25. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D et al. High vitamin C intake is associated with lower 4-year bone loss in elderly men. *J Nutr* 2008; 138 (19): 1931-1938.
26. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D et al. Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture – a 17-year follow-up from Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 2009; 20 (11): 1853-1861.
27. Kaneki M, Hosoi T, Ouchi Y et al. Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health or beyond? *Nutrition* 2006; 22: 845-852.
28. Feskanich D, Weber P, Willett WC et al. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 74-79.
29. Booth SL, Tucker KL, Chen H et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1201-1208.
30. Booth SL, Broe KE, Gagnon DR et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 512-516.
31. Macdonald HM, McGuigan FE, Lanham-New SA et al. Vitamin K<sub>1</sub> intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1513-1520.
32. Yaegashi Y, Onoda T, Tanno K et al. Association of hip fracture and intake of calcium, magnesium, vitamin D, and vitamin K. *Eur J Epidemiol* 2008; 23: 219-225.
33. Rizzoli R, Bonjour JP. Dietary protein and bone health. *J Bone Miner Res* 2004; 19 (4): 527-531.
34. Promislow J, Goodman-Gruen D, Slymen DJ et al. Protein consumption and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 636-644.
35. Munger RG, Cerhan JR, Chiu B. Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 147-152.
36. Hannan MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B et al. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2504-2512.
37. Dawson-Hughes B, Harris SS. Calcium intake influences the association of protein intake with rates of bone loss in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 773-779.
38. Sellmeyer DE, Stone KL, Sebastian A et al. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2001; 72: 118-122.
39. Feskanich D, Willett WC, Stampfer MJ et al. Protein consumption and bone fractures in women. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 472-479.
40. Wengreen HJ, Munger RG, West NA et al. Dietary protein intake and risk of osteoporotic hip fracture in elderly residents of Utah. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 537-545.
41. Dargent-Molina P, Sabia S, Touvier M et al. Proteins, dietary acid load, and calcium and risk of postmenopausal fractures in the E3N French women prospective study. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 1915-1922.
42. Kettler DB. Can manipulation of the ratios of essential fatty acids slow the rapid rate of postmenopausal bone loss? *Altern Med Rev* 2001; 6 (1): 61-77.
43. Macdonald HM, New SA, Golden MHN et al. Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol, and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 155-165.
44. Weiss LA, Barrett-Connor E, von Mühlen D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 934-938.
45. Höglström M, Nordström P, Nordström A. n-3 fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO<sub>2</sub> Study. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 803-807.
46. Ueda H, Howson JM, Esposito L et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-511.
47. Trichopoulos A, Georgiou E, Bassiakos Y et al. Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece. *Prev Med* 1997; 26: 395-400.
48. Zernicke RF, Salem GJ, Barnard RJ et al. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone* 1995; 16 (1): 25-31.
49. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA et al. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2004; 79 (6): 969-973.
50. Gunnes M, Lehmann EH. Dietary calcium, saturated fat, fiber and vitamin C as predictors of forearm cortical and trabecular bone mineral density in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* 1995; 84 (4): 388-392.
51. Corwin RL, Hartman TJ, Maczuga SA et al. Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III. *J Nutr* 2006; 136: 159-165.

# Priprava protitumorskih cepiv na osnovi dendritičnih celic

## Generation of dendritic cells as cancer vaccines

Nataša Obermajer

**Povzetek:** Odkritje s tumorjem-povezanih antigenov, ki jih bodisi selektivno ali preferenčno izražajo tumorji, skupaj z najnovejšimi spoznanji o ključni vlogi dendritičnih celic (DC) v imunskem sistemu, je postavilo temelje za pričetek imunoterapije raka na osnovi DC. 29. aprila 2010 je FDA odobrila Provenge (sipuleucel-T) kot prvo avtologno celično imunoterapijo za zdravljenje asimptomatskega ali minimalno simptomatskega metastaznega ter androgeno-neodvisnega (kastratno rezistentnega) raka prostate. Kljub temu so terapije z uporabo DC še na začetku razvoja, saj se metode, ki omogočajo pripravo DC, ki so sposobne učinkovito predstavljati tumorske antigene, ter izboljšanja njihovih imunostimulacijskih funkcij, neprestano optimizirajo. Poleg tega je nedavno izboljšanje spremljanja imunskih odzivov nakazalo potrebo po pazljivem načrtovanju tega dela kliničnih preizkušanj. Kljub temu obstajajo številni dokazi, ki podpirajo uporabo DC v kliničnih terapijah. V tem članku je predstavljen razvoj pridobivanja DC, primernih za klinično rabo, metode obdelave DC s tumorskimi antigeni ter pristopi spremljanja imunskih odzivov pri terapiji s cepivi na osnovi DC.

**Ključne besede:** dendritične celice, protitumorska cepiva, rak, imunoterapija, celice T

**Abstract:** The discovery of tumor-associated antigens, which are either selectively or preferentially expressed by tumors, together with an improved insight in dendritic cell (DC) biology illustrating their key function in the immune system, have provided a rationale to initiate DC based cancer immunotherapy. On April 29, 2010, the FDA approved Provenge (sipuleucel-T) as a first autologous cellular immunotherapy for the treatment of asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castrate resistant (hormone refractory) prostate cancer. Nevertheless, DC vaccination is at an early stage, as methods for preparing tumor antigen presenting DC and improving their immunostimulatory function are continuously being optimized. In addition, recent improvements in immunomonitoring have indicated a need for a more careful design of this part of the trials. Still, valuable proofs-of-principle have been obtained, which favor the use of DC in clinical therapy. Here, the developments in clinical DC generation, antigen loading methods and immunomonitoring approaches for DC-based vaccination therapy are presented.

**Keywords:** dendritic cells, cancer vaccines, tumor, immunotherapy, T cells

## 1 Uvod

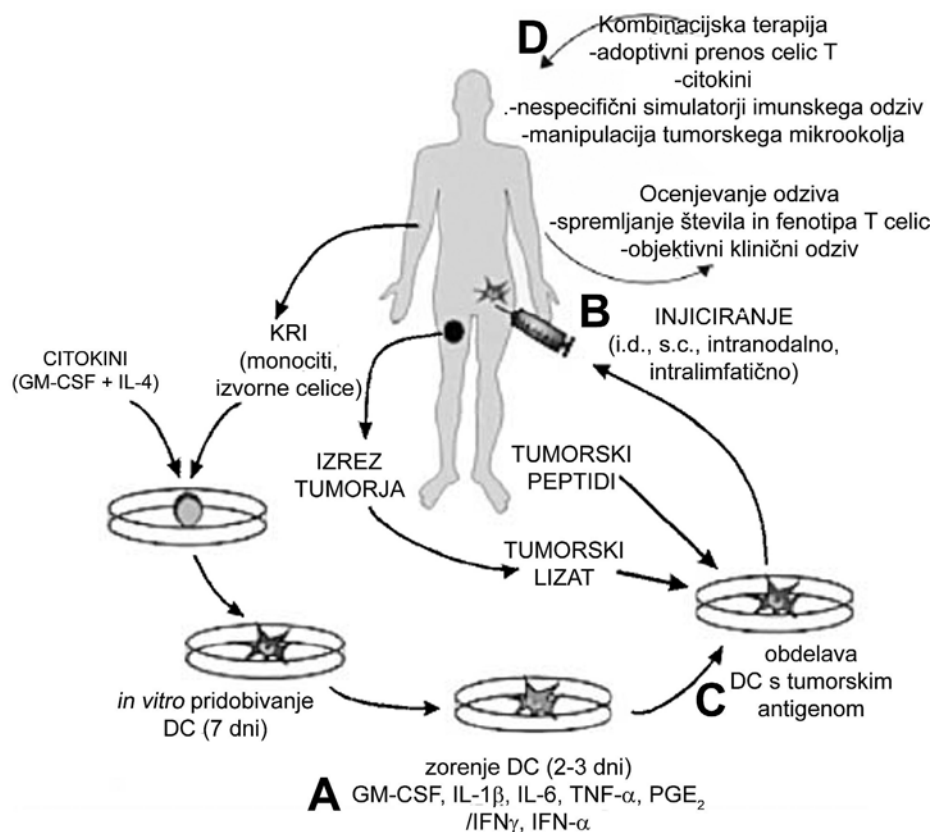
Koncept 'imunskega nadzora' je vodil do iskanja načinov *de novo* iniciacije protitumorskega imunskega odziva in spodbujanja odstranitve rakavih celic, medtem ko bi zdravo tkivo ostalo nedotaknjeno. Koncept je sprva podkrepila detekcija spontano nastalih tumor-infiltrirajočih limfocitov (TIL), ki so bili sposobni uničiti maligne celice, ter kasneje odkritje s tumorjem-povezanih antigenov (TAA, angl. tumor-associated antigens), proti katerim je usmerjen protitumorski imunski odziv.

Tumorske celice razvijejo mehanizme odpornosti na imunski sistem in se tako izogone odstranitvi s pomočjo imunskega odziva. Tumorske celice, ki uidejo imunskemu nadzoru, vztrajajo v ravnotežju z imunskim sistemom, dokler se to ravnotežje ne prevesi v prid napredovanja tumorja, na račun slabo imunogenih tumorskih celic ter zaviranja imunskega odziva. Za tovrstno spodbuditev imunskega odziva, indukcijo imunskega spomina ter prekinitev imunske tolerance proti tumorju so se dendritične celice (DC) izkazale kot idealno celično

orodje. Intenzivne raziskave v zadnjih 20 letih so omogočile načine učinkovite prezentacije TAA imunskemu sistemu s pomočjo DC, t.j. v kombinaciji s potrebnimi pomožnimi signali (dostava 'signala 1' in 'signala 2'; več v poglavju 2) (1, 2). Ker lahko tumorske celice izražajo več različnih TAA, bi bile idealno protitumorsko cepivo DC, ki bi predstavljale kombinacijo TAA, ki jih izraža tumor posameznega bolnika. V preteklih letih so razvili različne strategije, ki danes omogočajo pridobitev velikega števila DC, ki zadoščajo kliničnim potrebam. Vzporedno so bili izdelani protokoli obdelave DC s tumorskimi antigeni. Tovrstne raziskave so omogočile pričetek kliničnih študij z antigenom obdelanih DC pri rakavih bolnikih.

## 2 Vloga dendritičnih celic pri aktivaciji protitumorskega imunskega odziva

Citotoksični limfociti T (CTL) so najučinkovitejše celice pri obrambi proti tumorskim celicam (3). Zatorej je eno poglavitnih vprašanj v tumorski



**Slika 1:** Shematični diagram priprave DC kot protitumorskih cepiv. Čeprav obstaja še vrsta nerešenih vprašanj, lahko na podlagi dosedaj izvedenih kliničnih preizkušanj sklepamo naslednje. (A) Trenutna dogma je, da naj bi se za izdelavo cepiv uporabljale zrele DC, pri čemer pa obstaja velika razprava glede optimalnih zorenjenih dejavnikov. (B) Glede načina aplikacije bo potrebno optimalni način dostave še določiti, čeprav so bili v kliničnih preizkušanjih testirani številni načini, vključno z intravensko, intradermalno, intralimfatično, intranodalno, intratumorsko ter subkutano aplikacijo (9, 10). Kljub zelo variabilni migraciji DC v bezgavke po intravenski, intradermalni ali intralimfatični aplikaciji, je Fong s sod. ugotovil, da so prisotni specifični T celični odzivi v bolnikovi krvi ne glede na način aplikacije (11), kar kaže na to, da so za T celično aktivacijo potrebne le maloštevilne DC, ki uspešno dosežejo tarčno mesto. Malo je tudi znanega glede optimalnega števila cepljenj, v splošnem pa velja, da večje število cepljenj koristi. Pri tem pa ni znan optimalni interval med posameznimi cepljenji. (C) Uporabljene so bile številne metode obdelave DC z antigenom, vendar pa se le pri pristopih, ki uporabljajo različne TAA lahko selekcionirajo najbolj imunogeni odzivi. (D) Številne študije kombinirajo terapijo z DC z drugimi dejavniki: KLH (angl. keyhole limpet hemocyanin, hemocianin iz školjke) (povzroči ne-specifično CD4<sup>+</sup> T-celično pomoč), TLR ligandi (aktivirajo DC in vivo), citokini (aktivirajo imunski sistem), ciklofosfamid, ONTAK (denileukin diftotox; fuzijski protein IL-2 ter difterijskega toksina) (zavirajo tumorsko inducirano imunosupresijo).

**Figure 1:** Schematic diagram of DC generation for cancer vaccines. Although many issues still need to be resolved, the following conclusions can be drawn from the clinical trials carried out so far. (A) The present view is that mature DC need to be used for vaccinations, however considerable controversy still exists about the optimal maturation stimuli. (B) Concerning the immunization route, the optimal route of delivery for DC vaccines has yet to be determined, though several different routes have been tested in clinical trials, including intravenous, intradermal, intralymphatic, intranodal, intratumoral and subcutaneous (9, 10). In spite of the highly variable migration of DC to lymph nodes when administered by intravenous, intradermal or intralymphatic routes, Fong et al. found that specific T cell responses were detectable in patients' blood regardless of delivery method (11), suggesting that only small numbers of DC successfully accessing their target site are required for T cell priming. Little is known about the optimal number of vaccinations, but it is generally believed that repeated injections are beneficial. However there is little or no information about the optimal interval between vaccinations. (C) A whole variety of methods has been used to load DC with antigens, however the use of approaches employing different TAA could select for the most immunogenic responses. (D) Finally, a number of studies combine DC therapy with other agents: KLH (keyhole limpet hemocyanin) (to provide non-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help), TLR ligands (to activate DC in vivo), cytokines (to activate the immune system), cyclophosphamide, ONTAK (denileukin diftotox; an engineered protein combining IL-2 and diphtheria toxin) (to attenuate tumor-induced immunosuppression).

imunologiji, kako ustvariti učinkovit odziv CTL, ki bo sprožil antigensko-specifičen in zaščitni T celični odziv *in vivo*. Znano je, da je imunski odziv na tumorske antigene in druge antigene spremenjen v bolnikih s tumorjem. Te spremembe zadevajo številne elemente imunskega odziva in preprečujejo učinkovito proliferacijo limfocitov T, specifičnih za tumorske antigene in njihovo prepoznavanje tumorskih celic.

Antigen-predstavitvene celice (APC) igrajo poglavitno vlogo pri indukciji protitumorskih imunskih odzivov z ustvarjanjem tumor-specifičnih limfocitov T (3). T celični receptor (TCR) tumor specifičnih limfocitov T prepozna s tumorjem povezane peptide, ki jih predstavljajo APC vezane na molekule histokompatibilnostnega kompleksa razreda I (MHC-I, angl. major histocompatibility complex) ali razreda II (MHC-II) (tako imenovan 'signal 1'). Uspešno prepoznavanje tumorskih antigenov pa ni odvisno le od interakcije TCR-peptid-MHC, vendar morajo biti zagotovljeni še drugi, t.i. pomožni oz. kostimulatorni signali, ki preprečujejo T celično anergijo ('signal 2') (4). To so večinoma interakcije CD80/CD86 – CD28 ali CD40 – CD40L (5). Te interakcije poudarjajo pomembno vlogo DC, ki so najbolj učinkovite APC (v primerjavi z monociti, makrofagi in celicami B).

Fenotipsko in funkcijsko razlikujemo več tipov DC, ki tvorijo različne citokine in s tem povzročijo polarizacijo celic T pomagalk v bodisi Th1 (celice T pomagalk tipa 1, angl. type 1 helper T cells) ali Th2 celice T ('signal 3'). Signal 3 torej vodi razvoj tipa-1 (Th1) ali tipa-2 (Th2) imunosti ter bistveno vpliva na različno udeležbo posameznih efektorskih mehanizmov in različno sposobnost zavrnitve raka (6,7).

Številne *in vitro* in *in vivo* raziskave so pokazale sposobnost DC, da sprožijo tumor-specifični T celični imunski odziv (8). Ti rezultati kažejo, da (i) so endogene DC najverjetneje spremenjene pri protitumorskem imunskem odzivu, (ii) so eksogene DC sposobne premagati tumor-zaščitne spremembe pri rakavih bolnikih z indukcijo učinkovitih odzivov CTL, oziroma (iii) oboje. Cepljenje z DC, ki jih predhodno obdelamo s tumorskimi peptidi ali tumorskim lizatom, je pokazalo klinično učinkovitost indukcije tumor-specifične terapije pri številnih malignih obolenjih. Pomembno pa je dejstvo, da na uspešnost cepiv z DC vplivajo številni dejavniki kot so: (i) priprava DC; (ii) izbira tumorskih antigenov za obdelavo DC; (iii) način dostave tumorskega antigena DC; in (iv) način dostave DC (Slika 1).

### 3 Priprava dendritičnih celic

Fiziološko se človeške DC večinoma nahajajo v tkivih in predstavljajo le majhen delež (< 0.5%) levkocitov v periferni krvi. Za terapevtske namene pa je potrebno veliko število DC. DC lahko bodisi nastanejo iz proliferirajočih CD34<sup>+</sup> prekurzorov celic kostnega mozga (12) pod vplivom različnih citokinov, vključno s SCF, Flt3, GM-CSF, TGF- $\beta$  in TNF- $\alpha$  ali iz neproliferirajočih perifernih CD14<sup>+</sup> celic (monocitov) (13). Običajno CD34<sup>+</sup> prekurzorje, mobilizirane s G-CSF, izoliramo z levkaferozo z namenom pridobitve velikega števila perifernih celic za terapevtske namene. Te celice naj bi bile učinkovitejše za aktivacijo tumor-specifičnih CTL kot DC, ki izhajajo iz CD14<sup>+</sup> celic (14). CD34<sup>+</sup> celice se namnožijo 10 – 30-krat in običajno pri levkaferizi dobimo 5 x 10<sup>6</sup> celic. Po drugi strani so monociti številčno zastopani v periferni krvi in se jih zlahka dobi z odvzemom krvi ali levkaferozo. Protokoli za pripravo velikega števila DC iz monocitov so znani od leta 1994 (13, 15) in se uporabljajo tako v eksperimentalne kot terapevtske namene. V

tem primeru levkocite pridobimo iz periferne krvi s centrifugiranjem na osnovi gostotnega gradienta s pomočjo Ficoll – Hypaque raztopine. Monocite nato izoliramo s centrifugiranjem na osnovi gostote s Percoll raztopino ter nadaljnjim pritrjevanjem in jih gojimo v prisotnosti GM-CSF in IL-4 ter zaželjeno v brezserumskem gojišču (16, 17). Po tednu dni je pričakovano donos DC med 25 – 50% začetne kulture monocitov, kar pomeni 0,5 – 2,0 x 10<sup>6</sup> DC na 10 ml krvi. DC po tednu dni gojenja z IL-4 in GM-CSF so t.i. nezrele DC in kažejo tipične citoplazemske izrastke. Nezrele DC v prisotnosti zoritvenih dejavnikov kot so TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in PGE<sub>2</sub> (standardne DC, sDC) ali TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$  in IFN- (alfa DC tipa 1,  $\alpha$ DC1, DC1) po nadaljnjih 2 – 3 dneh gojenja pridobijo zrel fenotip. DC na svoji površini izkazujejo številne antigene, med katerimi so vsi karakteristični, vendar ne specifični. Najbolj tipične molekule so molekule MHC razreda I in razreda II ter kostimulatorne molekule (CD80, CD86). V nasprotju z nezrelimi DC so zrele DC veliko bolj učinkovite za indukcijo Th1 ter CTL odzivov, hkrati pa so tudi rezistentne na imunosupresivne učinke, ki jih tvori tumor (18). Iz navedenih razlogov se v protokolih protitumorskih cepiv uporabljajo zrele DC (19).

### 4 Izbira tumorskih antigenov za obdelavo DC

Majhni antigenski peptidi (sestavljani iz 8 – 10 aminokisljin) se direktno naložijo iz zunajceličnega področja na molekule MHC razreda I, medtem ko se tumorski lizati – kot proteini ali oligopeptidi (> 10 aminokisljin) – z endocitozo internalizirajo v APC, procesirajo in nato predstavijo preko molekul MHC razreda II. Navzkrižna predstavitev tumorskih lizatov je tudi verjetna, kar pomeni, da se po internalizaciji in procesiranju proteini ali oligopeptidi predstavijo na molekulah MHC razreda I (20). Iz tega razloga lahko obdelava s tumorskim lizatom ali oligopeptidi sproži tudi neposredno aktivacijo CD8<sup>+</sup> limfocitov T (CTL) preko molekul MHC-I in ne zgolj aktivacije CD4<sup>+</sup> celic T pomagalk preko konvencionalne poti (preko molekul MHC-II). Hkrati interakcija DC s CD4<sup>+</sup> celicami T začasno aktivira DC, ki lahko nato izzovejo odzive CD8<sup>+</sup> celic T (5).

Izbiro peptidov namenjenih za obdelavo DC narekujejo številna dejstva: vrsta tumorja, MHC-I ali -II bolnika, uspešna indukcija CTL odzivov *in vitro* ali *in vivo*, itd. Znanih je več kot 50 epitopov povezanih z melanomom, ki jih lahko prepoznavajo celice T. Ti epitopi se predstavljajo preko različnih molekul MHC razreda-I in razreda-II (npr. HLA A1, HLA A2, HLA DR4,...). V primeru malignega melanoma optimalna izbira epitopov omogoča zdravljenje skoraj 100% bolnikov s peptid-obdelanimi DC.

Cepljenje tumorskih bolnikov z enim peptidom sproži citotoksičnost, ki je specifična za le-ta peptid. Pri tem se lahko pojavi problem prepoznavanja tumorja, in sicer v primeru izgube s tumorjem-povezanih epitopov ali esencialnih antigen predstavitev molekul. Tovrstnemu problemu se lahko izognemo z uporabo polivalentnih cepiv pri posameznem bolniku, t.j. z uporabo tumorskih lizatov ali aplikacijo različnih peptidov. S tumorjem-povezani peptidi se lahko vežejo z določeno afiniteto tako na MHC razreda-I kot na MHC razreda-II ter TCR. Ali je peptid uporaben v terapevtske namene ali ne je pretežno odvisno od njegove afinitete. Nizka afiniteta do MHC molekul je enačena z nizko jakostjo indukcije CTL, medtem ko visoka afiniteta

pomeni veliko jakost indukcije CTL (21). V te namene se za cepljenje uporablja t.i. heteroklitne peptide, ki imajo spremenjeno MHC-vezavno domeno, s čimer je povečana afiniteta med MHC in peptidom, in so močni imunogeni. Sposobni so sprožiti navzkrižno-reaktivnost z originalnim peptidom, saj vezavna domena za TCR ostane nespremenjena. Posledica je, da se lahko doseže tumor-zaščitni imunski odziv proti originalnemu peptidu po cepitvi s heteroklitnim peptidom (22).

### 5 'Generacije' cepiv na osnovi dendritičnih celic

Indukcija odzivov protitumorskih CTL s cepivi na osnovi DC temelji na visokem izražanju kostimulatornih molekul ter CCR7 odzivnosti (t.j. migracijski odzivnosti na citokina CCL19 in CCL21, ki se tvorita v bezgavkah in usmerjata DC v sekundarna limfatična tkiva), kar so bistvene karakteristike zrelih DC. Poleg tega visoka produkcija IL12p70 dramatično poveča sposobnost DC, da inducirajo tumor-specifične Th1 celice in CTL in promovirajo zavrnitev tumorja. Izdelava DC z vsemi temi značilnostmi (visoka imunostimulatorna funkcija, migracijska sposobnost ter produkcija IL-12p70) je ključen cilj izdelave cepiv na osnovi DC.

Po začetnem uspehu terapevtskih cepiv na osnovi delno-zrelih DC ('prva generacija' DC) pri folikularnem limfomu in melanomu v 90. letih (23, 24), so se tovrstne DC uporabljale za zdravljenje bolnikov s številnimi drugimi malignimi obolenji. Nezrele ali delno-zrele DC izražajo suboptimalne vrednosti kostimulatornih molekul in predstavljajo šibkejši imunogen kot kasneje implementirane zrele DC ('druga generacija' DC) (10, 25). Hkrati lahko nezrele ali delno-zrele DC inducirajo tudi t.i. regulatorne celice T, ki dodatno zavirajo protitumorski imunski odziv. Kljub temu, da so objektivni klinični odzivi (merjeni po RECIST ali WHO kriterijih) tovrstnih pripravkov DC primerljivi drugim vrstam cepiv in redko presegajo 10-15 % (26, 27), sta dve nedavni klinični študiji III. faze cepiv na osnovi 'prve generacije' DC proti raku prostate (sipuleucel-T/Provenge) pokazali sposobnost podaljšanja celokupnega preživetja bolnikov z napredovanim rakom (28, 29). Ti podatki kažejo, da imajo nezrele DC terapevtski potencial pri napredovalem raku in relativizirajo pojavnost 'objektivnih' kliničnih odzivov po RECIST kriterijih, ki so bili razviti z namenom spremljanja direktnih citotoksičnih učinkov kemoterapevtikov, ter verjetnost, da lahko dejansko napovejo dolgotrajno prednost protirakavih cepiv na osnovi DC. Cepiva na osnovi DC namreč ne posredujejo takojšnjih protitumorskih učinkov, temveč zahtevajo reprogramiranje kompleksnega sklopa interakcij v bolnikovem imunskem odzivu in med imunskimi celicami ter tumorjem in zato zahtevajo daljši čas za preverjanje njihove terapevtske sposobnosti.

'Prva generacija' cepiv na osnovi DC torej uporablja nezrele ali delno zrele DC, ki so imunogene in sposobne posredovanja klinične aktivnosti, vendar imajo nepopolno sposobnost migracije v bezgavke ter aktivacije celic T. Z namenom, da bi prešli omejitve 'prve generacije' cepiv na osnovi DC, je bilo veliko truda vloženega v razvoj klinično-primernih protokolov pridobivanja zrelih DC, ki zahtevajo klinične pogoje gojenja v brezserumskem gojišču. Uveljavila sta se dva načina, ki oba vključujeta PGE<sub>2</sub>, t.j. uporaba makrofagno-kondicioniranega gojišča (30, 31) ali citokinskega koktejla z IL-1β, TNFα, IL-6 in PGE<sub>2</sub>

(16), ki inducirata zrele DC z visokim izražanjem kostimulatornih molekul ter dodatnimi zaželenimi lastnostmi, kot so visoko izražanje CCR7 ter visoka migracijska odzivnost na kemokine, izražene v bezgavkah, CCL19 in CCL21 (32). 'Druga generacija' DC, induciranih z IL-1β, TNFα, IL-6 in PGE<sub>2</sub> citokinskim koktejlom, je očitno boljše glede na njihovo imunogenost in migratorno odzivnost in so bile obsežno preizkušane v kliničnih preizkušanjih. Nepričakovano, pa je nedavno klinično testiranje III. faze pri bolnikih z napredovalim melanomom pokazalo njihovo omejeno učinkovitost, manjšo od 10 %, primerljivo dekarbazinu. Čeprav je nejasno v kakšni meri je ta omejena učinkovitost posledica izbranega zoritvenega koktejla, je pomembno dejstvo, da PGE<sub>2</sub> inducira neželen negativen učinek na produkcijo IL-12p70, dejavnika s številnimi učinki ključnimi za indukcijo in preživetje tipa-1 imunskih celic (33), ter za aktivacijo regulatornih celic T (34).

'Druga generacija' cepiv na osnovi DC torej temelji na zrelih DC, ki pa imajo zmanjšano sposobnost produkcije IL-12p70 (t.i. izčrpanje DC). Tovrstni omejitvi se je možno izogniti z izpostavitvijo nezrelih DC bodisi tipu-1 in tipu-2 interferonom v kombinaciji s TNFα ali ligandi TLR ali pa aktiviranim celicami NK ali spominskim CD8<sup>+</sup> celicami T (35-37). Nastale 'tip-1 polarizirane' DC (αDC1; DC, ki inducirajo Th1 polarizirane odzive) kažejo izredno povečano sposobnost indukcije dolgoživečih tumor-specifičnih celic T z močno izraženimi protitumorskimi funkcijami v človeških *in vitro* ter mišjih *in vivo* modelih, ter visoko sposobnostjo povečanja protitumorskih funkcij celic NK. Direktna primerjava s standardnimi (s)DC, zorenimi s koktejlom IL-1β, TNFα, IL-6 in PGE<sub>2</sub>, ki se pogosto uporablja pri cepivih na osnovi 'druge generacije' DC, je pokazala, da αDC1, obdelane z različnimi oblikami TAA (peptidi ali tumorski lizat), inducirajo v povprečju 20-70 krat višje število aktivnih tumor-specifičnih CD8<sup>+</sup> celic T.

### 6 Spremljanje imunskega odziva ter kliničnega izida

Ponovljivo spremljanje imunskega odziva, ki ga sproži cepljenje z DC, bi olajšalo interpretacijo rezultatov kliničnih preizkušanj. Uveljavitev zanesljivih, ponovljivih in kvantitativnih testov za ocenjevanje s cepivom-induciranega imunskega odziva je kritičnega pomena. Metode spremljanja imunskega odziva so odvisne od načina izdelave cepiva, in se razlikujejo v primeru uporabe znanih epitopov, znanih TAA, medtem ko nedefinirani antigeni zahtevajo drugačne pristope. Dodaten problem, ki otežuje spremljanje imunskega odziva inducirane s cepivom, je fenomen širitve epitopa: tudi v primeru cepitve z enim peptidom se lahko imunski odziv po cepljenju razširi na druge epitope. Zato je potrebno pri merjenju imunskega odziva razlikovati med odzivom limfocitov T usmerjenim proti cepivu oziroma proti tumorju.

Poleg kvantifikacije števila celic T usmerjenih proti cepivu, je pomembno določiti tudi njihove značilnosti (Slika 2). V principu bi morali limfociti T usmerjeni proti cepivu, imeti sposobnost migracije v tumor, produkcije citokinov, proliferacije po ponovni izpostavitvi antigenu ter sprožitve lize tumorskih celic. Zatorej, bi v spremljanje imunskega odziva morali vključiti tako limfocite T v samem tumorskem tkivu, kot tudi v krvnem obtoku, saj stanje v krvnem obtoku ne odraža vedno stanja v tumorskem tkivu. Hkrati bi morali tumor-specifične limfocite T analizirati z različnimi metodami, da bi dobili celoten pregled

profila inducirane T celičnega imunskega odziva. Če je le mogoče, bi bilo potrebno zasledovati tudi tumorsko infiltracijo regulatornih celic T, ki jih posamezna cepiva na osnovi DC lahko inducirajo in so bile povezane s slabo prognozo.

Velike razlike, opažene med induciranim imunskim odzivom ter kliničnim izidom bolnikov, so najverjetneje povezane s širino in kvaliteto indukcije T-celičnih odzivov. To je bodisi posledica nesposobnosti celic T, induciranih proti cepivu, da uničijo tumorske celice, ali pa je posledica nastanka imunosupresivnih mehanizmov pri posameznih bolnikih.

## 7 Sklep

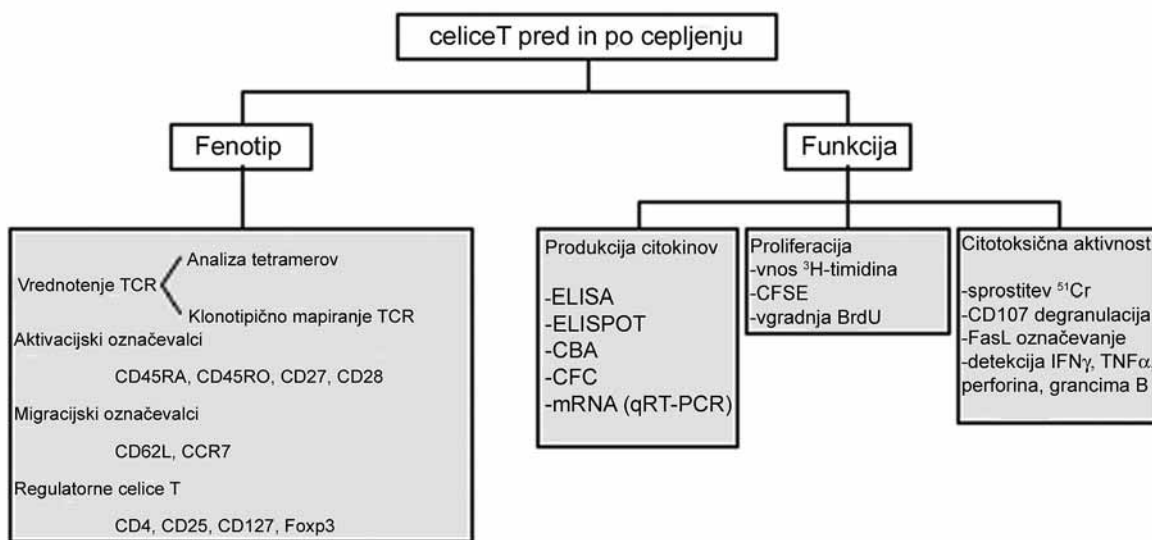
Terapija raka na osnovi DC je obetavna, saj so DC izkazale sposobnost indukcije specifičnih protitumorskih imunskih odzivov. Kljub temu pa so s tovrstnimi protitumorskimi imunskimi odzivi povezani klinični odzivi pri bolnikih pod pričakovanji. To je delno posledica same metodologije kliničnih preizkušanj, ki je prilagojena ocenjevanju konvencionalnih ciototoksičnih učinkovin, in uporablja kot kriterij uspešnosti zmanjšanje tumorja kmalu po terapiji. Tovrstni hitri odzivi najverjetneje niso primerni za ocenjevanje protirakavih cepiv, pri katerih je potreben čas, da se razvijejo učinkoviti imunski odzivi in se prične regresija tumorja. Kljub temu je potrebno poudariti, da bo dejansko signifikanten terapevtski uspeh cepiv na osnovi DC je namreč odvisen od številnih dejavnikov, saj gre za večstopenjski proces, ki zajema tako pridobivanje celic, zorenje, obdelavo z antigenom ter dostavo. Neuspešna optimizacija na kateremkoli koraku lahko vodi do neuspešnega cepiva. Pomembno pa

je dejstvo, da se je terapija na osnovi DC izkazala za varno ter z minimalnimi stranskimi učinki, saj vključuje bolnikove lastne celice, in je trenutno terapija z DC smiselna tako pri bolnikih z metastazami, pri bolnikih z minimalno rezidualno boleznijo ali kot adjuvantna terapija pri visoko rizičnih primerih, pri katerih je tumorska obremenitev nizka in so z DC-aktivirane imunološke efektorske celice sposobne specifično prepoznati in odstraniti tumor.

Trenutno na Univerzi v Pittsburghu (University of Pittsburgh Cancer Institute) poteka več kliničnih preizkušanj, pri katerih se ugotavlja klinična učinkovitost tretje generacije cepiv na osnovi DC z uporabo  $\alpha$ DC1, ki jih razvijamo v laboratoriju prof. dr. Pawla Kalinskega, in sicer pri kožnem T celičnem limfomu (NCT00099593; PI: L.Geskin), gliomih (NCT00766753; PI: H. Okada), melanomih (NCT00390338; PI: J. Kirkwood), raku črevesja (NCT00558051; PI: D. Bartlett) in raku prostate (UPCI 06-070; PI: G. Chatta), pri čemer bodo predvidoma prvi klinični rezultati znani v letu 2011. V Sloveniji se tovrstna terapija na ravni kliničnih preizkušanj še ne izvaja.

## 8 Literatura

1. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 296-306.
2. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419-429.
3. Lanzavecchia A. Identifying strategies for immune intervention. *Science* 1993; 260: 937-944.
4. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-1356.



**Slika 2:** Shematični prikaz metod spremljanja imunskega odziva- karakterizacija inducirane T celičnega odziva. Številni testi so bili razviti z namenom določitve fenotipskih ter funkcijskih karakteristik celic T. Usklajena uporaba teh testov zagotavlja informacije o širini in kvaliteti inducirane imunskega odziva.

**Figure 2:** Schematic overview of immunomonitoring methods to characterize induced T-cell response. Several assays have been developed to determine phenotypical and functional characteristics of T cells. The combined use of these assays provides information about the breadth and the quality of the induced immune response.

5. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393: 478–480.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
7. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal M, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183–1186.
8. Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1183-1187.
9. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, . Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 56-58.
10. De Vries IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LP, Ruiter DJ, Gerritsen MJ, . Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 5091-5100.
11. Fong L, Brockstedt D, Benike C, . Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 2001; 166: 4254-4259.
12. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184: 695–706.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109–1118.
14. Mortarini R, Anichini A, Di Nicola M, Siena S, Bregni M, Belli F, Molla A, Gianni AM, Parmiani G. Autologous dendritic cells derived from CD34+ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. *Cancer Res* 1997; 57: 5534–5541.
15. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83–93.
16. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3135–3142.
17. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223: 1-15.
18. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93: 1634–1642.
19. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brossmer EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669–1678.
20. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 1997; 186: 65-70.
21. Sette A, Vitiello A, Rehman B, Fowler P, Nayarsina R, Kast WM, Melief CJ, Oseroff C, Yuan L, Ruppert J (1994) The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 1994; 153: 5586–5592.
22. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998; 4: 321–327.
23. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, . Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58.
24. Nestle FO, Alijagic S, Gillet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, . Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4:328-332.
25. Dhodapkar MV, Steinman, RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovskiy J, . Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 173-180.
26. Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 163-169.
27. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Rev Cancer* 2004; 10: 909-915.
28. Sipulecel-T:APC8015, APC-8015, prostate cancer vaccine-Dandreon. *Drugs R D* 2006; 7:197-201.
29. Harzstark AL, Small EJ. Immunotherapy for prostate cancer using antigen-loaded antigen-presenting cells: APC8015 (Provence). *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7:1275-1280.
30. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardway N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; 196: 121-135.
31. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardway N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997; 90: 3640-3646.
32. Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groetrip M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1354-1361.
33. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146.
34. Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol Rev* 2006; 212: 314-329.
35. Kalinski P, Nakamura Y, Watchmaker P, Giermasz A, Mathuszamy R, Maillard RB. Helper roles of NK and CD8+ T cells in the induction of tumor immunity, Polarized dendritic cells as cancer vaccines. *Immunol Res* 2006; 36: 137-146.
36. Wesa A, Kalinski P, Kirkwood JM, Tatsumi T, Storkus WJ. Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patients TH1-type antimelanoma CD4+ T cell responses in vitro. *J Immunother* 2007; 30: 75-82.
37. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, . Alpha type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004; 64: 5934-5937.



# Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje

## Liquid crystals in pharmacy: structure and physicochemical characterization

Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin

**Povzetek:** Tekoči kristali predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim. Združujejo tako lastnosti tekočin (tok) kot trdnih snovi (anizotropnost, dvolomnost, urejenost). Delimo jih na termotropne in liotropne tekoče kristale glede na to, ali je za njihov nastanek potrebna povišana temperatura ali dodatek topila. V članku so opisane različne strukture termotropnih in liotropnih tekočih kristalov ter ključne metode za njihovo raziskovanje: polarizacijska in transmisijska elektronska mikroskopija, rentgensko sipanje, jedrska magnetna resonanca, mikroskopija na atomsko silo, reologija ter diferenčna dinamična kalorimetrija. Predstavljene so tudi možnosti uporabe tekočih kristalov v farmaciji in kozmetologiji.

**Ključne besede:** tekoči kristali, struktura, metode, fizikalno kemijsko vrednotenje

**Abstract:** Liquid crystals are the state of matter existing between the liquid and the crystalline phase. The liquid crystalline state combines properties of both liquid and solid state and are divided in two main types, i.e. thermotropic and lyotropic liquid crystals, depending on whether liquid crystalline state is reached either by increasing the temperature or by adding a solvent. In this article various structures of thermotropic and lyotropic liquid crystals are presented as well as relevant methods for investigation and characterization: polarized light and transmission electron microscopy, X-ray scattering, nuclear magnetic resonance, atomic force microscopy, rheology and differential scanning calorimetry. Liquid crystals for pharmaceutical application and in cosmetics are also presented.

**Key words:** liquid crystals, structure, methods, physicochemical characterization

## 1 Uvod

Že leta 1853 je nemški zdravnik Rudolf Virchow odkril dvolomnost mielina, ki tvori ovojnico živčnih vlaken, vendar si takrat pojava še niso znali razložiti. Nato je avstrijski botanik Friedrich Reinitzer leta 1888 ugotovil, da se holesterilbenzoat tali drugače od ostalih snovi. Menil je, da ima snov dve tališči; pri prvem postane tekoča, a je še vedno zelo motna, medtem ko se pri drugem popolnoma zbistri in postane običajna tekočina. Svoja opažanja je posredoval Ottu Lehmannu, ki je nadaljeval z raziskavami in odkril, da se polarizirana svetloba obnaša »nenavadno«, ko prehaja skozi vzorec pri temperaturi med obema tališčema. Ugotovil je, da je snov dvolomna, čeprav je tekoča; da ima torej v vmesnem temperaturnem območju hkrati lastnosti kristalinične trdne snovi kot tekočine. Leto kasneje je v nemški reviji objavil članek z naslovom *O tekočih kristalih* in tako je nenavadna snov dobila ime (1, 2).

Danes vlada veliko zanimanje za področje tekočih kristalov (TK) v različnih vejah znanosti. Prikaz slike s tekočokristalnimi prikazovalniki

(LCD tehnologija) je verjetno ena izmed najbolj pomembnih in razširjenih uporab TK. Na področju farmacije pa uvrščamo TK med sodobne koloidne nosilne sisteme, ki v primerjavi s klasičnimi farmacevtskimi oblikami (mazila, kreme, geli, emulzije, raztopine) izkazujejo številne prednosti kot so visoka solubilizacijska kapaciteta, nadzorovano sproščanje in povečana stabilnost zdravilnih učinkovin.

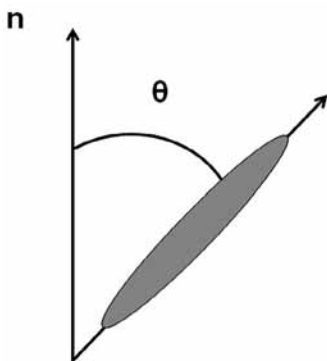
## 2 Tekoči kristali

TK predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim. Zanje so značilne različne strukture oziroma faze, med katerimi lahko prehajajo v specifičnem zaporedju in pod določenimi pogoji, in jih imenujemo mezofaze; molekule, ki tvorijo TK, pa mezogeni. Čeprav izraz »tekoči kristal« sestavljata dva nasprotujoča si pojma, le-ta dobro opisuje stanje snovi, ki združuje tako lastnosti kristalinične trdne snovi (anizotropnost, dvolomnost, urejenost, mehanska stabilnost) kot tekočine (tok) (3). Kristalinična snov izkazuje urejenost tako na kratke (urejenost v razdalji nekaj velikosti molekul) kot dolge razdalje

(urejenost celotnega področja) glede na pozicijsko (urejenost molekul v mrežo) in orientacijsko urejenost (orientacija molekul). Tekočine so v osnovi neurejene, vendar lahko izkazujejo urejenost na kratke razdalje glede na orientacijsko in/ali pozicijsko urejenost molekul. TK izkazujejo najmanj orientacijsko urejenost na dolge razdalje, lahko tudi na kratke, ne izkazujejo pa pozicijske urejenosti na dolge razdalje (4). Za opis orientacijske urejenosti potrebujemo dva podatka: ureditveni parameter  $S$  in ureditveni normalni vektor  $\mathbf{n}$ . Slednji odraža smer, v katero so v povprečju orientirane molekule v sistemu. Nasprotno usmerjena vektorja  $\mathbf{n}$  in  $-\mathbf{n}$  sta enakovredna. Ureditveni parameter  $S$  nam pove stopnjo urejenosti molekul in je definiran kot:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2 \vartheta(t) - 1 \rangle \quad \text{Enačba 1}$$

kjer je  $\vartheta$  kot med trenutno smerjo vzdolžne molekule in normalnim vektorjem  $\mathbf{n}$  (slika 1).



**Slika 1:** Smer orientiranosti molekul je podana z ureditvenim vektorjem  $\mathbf{n}$ .  $\vartheta$  je kot med trenutno smerjo posamezne molekule in ureditvenim vektorjem  $\mathbf{n}$  (6).

**Figure 1:** Director vector  $\mathbf{n}$  indicates orientational order of the molecules. Angle  $\vartheta$  is the angle between individual molecules and the director  $\mathbf{n}$  (6).

V trdnem kristalu je vrednost  $S$  blizu 1 in pomeni skoraj popolno urejenost, medtem ko imajo TK vrednost parametra navadno med 0,3 in 0,9. Prav tako smer ureditvenega vektorja ni enaka za celoten kristal. So pa TK bolj stabilni, kadar imajo vse molekule smer vektorja  $\mathbf{n}$ , torej je enak 0. Enotno urejeno območje, znotraj katerega je smer vektorja povsod enaka, je veliko le nekaj mikrometrov, sčasoma pa se območja združujejo in snov je večinoma enakomerno orientirana. Tudi zunanji dejavniki (električno/magnetno polje, površine vsebnikov...) lahko vplivajo na spremembo smeri vektorja. V primeru, da smeri vektorja na meji med dvema območjema ne moremo določiti, govorimo o defektu orientacije vektorja oziroma defektu tekočega kristala (5, 6).

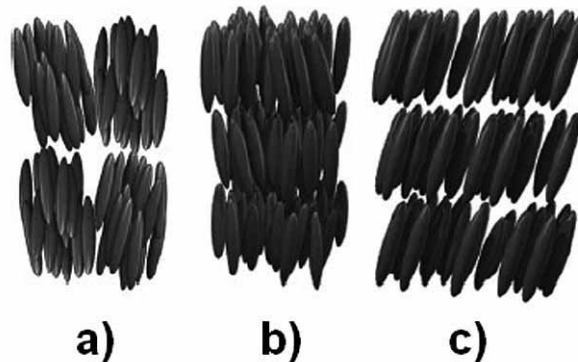
Glede na nastanek delimo TK na termotropne in liotropne. Termotropni TK nastanejo s segrevanjem trdne snovi, ki je značilno sestavljena iz podolgovatih molekul ali molekul v obliki diska, s togim osrednjim delom in gibljivimi stranskimi verigami. Liotropni TK nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi, ki ima specifično strukturo podolgovatih amfifilnih molekul; pri slednjih lahko prehod med različnimi fazami nastopi tudi s spreminjanjem temperature (4).

## 2.1 Termotropni tekoči kristali

Termotropne TK delimo na **kalamitične**, ki jih tvorijo podolgovate, paličaste molekule, in **diskotične**, ki nastanejo iz molekul v obliki diska. Oba tipa molekul imata anizotropno strukturo z rigidnim osrednjim delom (največkrat aromatski obroč) ter gibljivimi stranskimi verigami (običajno alifatske verige) (5). Tako kalamitični kakor tudi diskotični TK se lahko nahajajo v **nematični** ali **smektični** fazi. Nematične faze nimajo pozicijske urejenosti, nasprotno pa smektične faze izkazujejo pozicijsko urejenost vsaj v eni smeri oziroma izražajo plastno strukturo (7).

### Kalamitični tekoči kristali

Smektične faze kalamitičnih TK lahko dodatno ovrednotimo glede na urejenost molekul znotraj posameznega sloja ter glede na orientacijo ravnine plasti. V primeru smektične faze A so ravnine plasti vzporedne, medtem ko so znotraj posamezne plasti molekule razporejene naključno. Nasprotno pa se pri nižjih temperaturah urejajo v smektično fazo C, kjer so molekule nagnjene za določen kot glede na pravokotnico na ravnino plasti. Kot je navadno večji pri nižji temperaturi (slika 2). Znotraj posamezne plasti pa se molekule lahko še dodatno uredijo v heksagonalne strukture in posledično tvorijo tridimenzionalno rešetko (7).



**Slika 2:** Kalamitični tekoči kristali: a) nematična faza; b) smektična faza A; c) smektična faza C (6).

**Figure 2:** Calamitic liquid crystals: a) nematic phase; b) smectic A phase; c) smectic C phase (6).

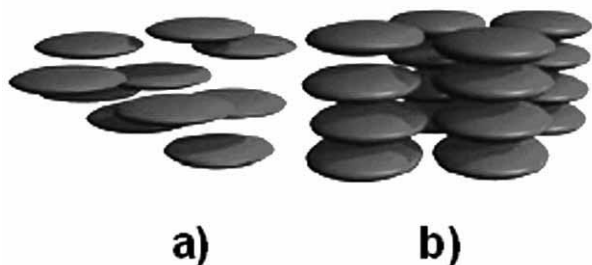
Kadar so gradniki TK kiralne molekule, govorimo o **holesteričnih** TK, ki izkazujejo lastnosti kalamitičnih nematičnih faz. Slednji nastanejo tudi, če dodamo kiralni mezogen nematičnim TK. Zanje je značilno, da so ravnine molekul med seboj vzporedne, medtem ko posamezne plasti rotirajo v končno obliko vijačnice, zaradi česar nimajo pozicijske urejenosti, temveč izkazujejo usmeritveno periodičnost (slika 3). V primeru, da je razdalja, potrebna za zavoj vijačnice za  $360^\circ$ , iste dolžine kot valovna dolžina vidne svetlobe, izkazujejo na površini vzorca palete barv, ki se spreminjajo tudi s temperaturo, saj slednja vpliva na razdaljo enega zavoja (7, 8).



**Slika 3:** Holesterolni tekoči kristal.  
**Figure 3:** Cholesteric liquid crystal.

Diskotični tekoči kristali

V primeru nematičnih diskotičnih faz molekule niso urejene, medtem ko smektične diskotične faze izkazujejo dvodimenzionalno ureditev molekul v stolpce, ki imajo lahko obliko heksagonalne ali kvadratne mreže (slika 4). Stolpci so prav tako lahko nagnjeni za določen kot glede na pravokotnico na ravnino plasti (7).



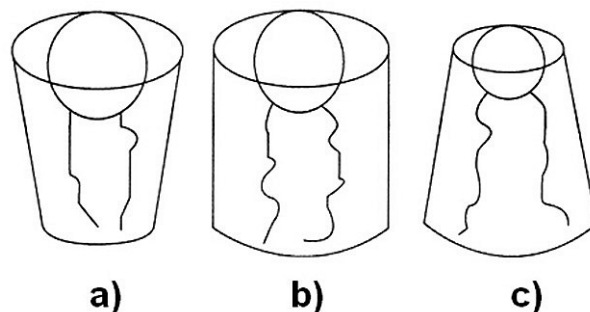
**Slika 4:** Diskotični tekoči kristali: a) nematična faza; b) smektična faza (7).

**Figure 4:** Discotic liquid crystals: a) nematic phase; b) smectic phase (7).

## 2.2 Liotropni tekoči kristali

Liotropni TK nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi in jih navadno tvorijo površinsko aktivne snovi (PAS) oziroma natančneje njihovi hidrati ali solvati ob prisotnosti vodne in/ali oljne faze. V odsotnosti oljne faze se PAS raztapljajo in pri točno določeni koncentraciji, imenovani kritična micelarna koncentracija, spontano urejajo v asociate koloidnih velikosti oz. micelle, pri čemer se hidrofilni deli obrnejo navzven, hidrofobni pa navznoter. Obratno velja pri reverzih micelah, ki nastanejo v oljni fazi v odsotnosti vode. Z naraščanjem koncentracije PAS nastajajo specifične strukture z značilno tridimenzionalno urejenostjo; izotropna micelarna raztopina se spremeni v anizotropno, viskoznost se poveča, nastanejo TK. Le-ti nastanejo v določenem koncentracijskem in temperaturnem območju. Za razliko od

termotropnih TK imajo torej liotropni TK dodatne prostostne stopnje, ki jih predstavljajo koncentracije posameznih komponent v sistemu, kar jim omogoča urejanje v specifične strukture: lamelarne, heksagonalne in kubične, odvisno od oblike hidratiranih molekul PAS. Hidrati ali solvati PAS, ki so gradniki liotropnih TK, imajo obliko stožca ali valja, in sicer se molekule v obliki valja urejajo v lamelarne plasti, stožčaste molekule tvorijo heksagonalne faze, obrnjeni stožci pa inverzne heksagonalne faze (slika 5). Kubične mezofaze sestavljajo agregati sferične ali paličaste oblike, ki so urejeni v kubično rešetko v obliki preproste, prostorsko ali ploskovno centrirane rešetke (9, 10).

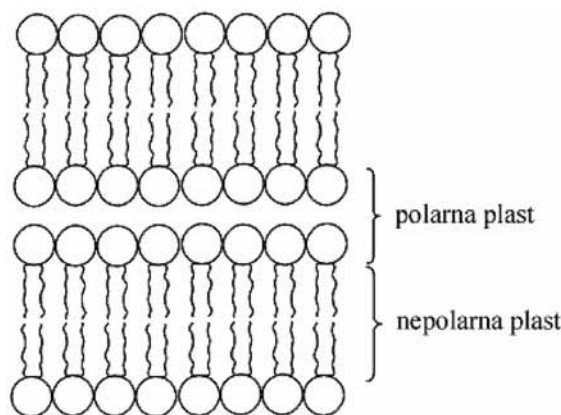


**Slika 5:** Geometrija hidratiranih molekul PAS: a) stožec; b) valj; c) obrnjen stožec (4).

**Figure 5:** Geometry of hydrated molecules: a) cone; b) cylinder; c) inverse cone (4).

Fazni prehodi liotropnih tekočih kristalov

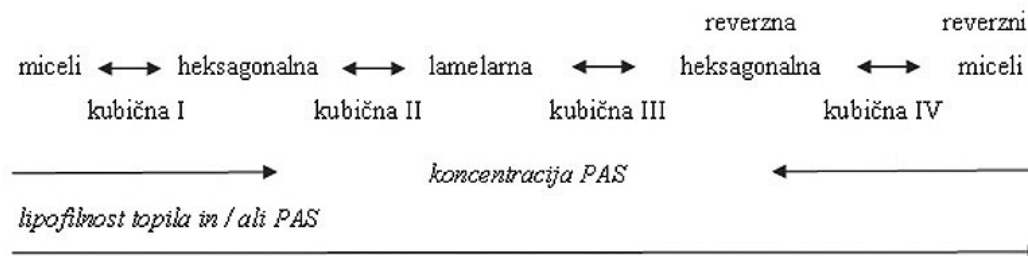
Molekule v obliki valja se urejajo v plasti (izmenjaje polarne in nepolarne (slika 6)) in tvorijo lamelarne faze.



**Slika 6:** Osnovna struktura lamelarnih faz.

**Figure 6:** Lamellar phase structure.

Voda ali vodne raztopine se vežejo na polarne glave PAS in se vključijo med plasti, zaradi česar se poveča njihova debelina, medtem ko se nepolarne molekule vključijo med lipofilne repe PAS. Z večanjem količine topila oziroma debeline lamelarnih faz se lahko molekule topila začnejo vključevati tudi med posamezne molekule PAS, kar povzroči spremembo njihove oblike iz valjaste v stožčasto, kadar je topilo voda, oz. v obrnjen stožec v primeru lipofilnega topila. Posledično pride do



**Slika 7:** Fazni prehodi liotropnih TK v odvisnosti od koncentracije PAS in lipofilnosti topila in / ali PAS (4).

**Figure 7:** Transitions of lyotropic liquid crystals regarding surfactant concentration and lipophilicity of solvent and / or surfactant (4).

spremembe asociacijskih struktur iz lamelarnih v heksagonalne oziroma reverzne heksagonalne strukture. Heksagonalne faze lahko sprejmejo le omejeno količino topila. Z nadaljnjim dodajanjem topila pride do nastanka kubičnih faz tipa I ali obrnjenih kubičnih faz tipa IV, ki jih sestavljajo sferični oziroma inverzni miceli. Med lamelarnimi in heksagonalnimi fazami pa lahko nastane še ena vrsta TK, in sicer kubična faza tipa II, kadar je topilo polarno, in kubična faza tipa III, kadar je topilo nepolarno. Prehodi med posameznimi fazami so predstavljeni na sliki 7. Nastanejo lahko tudi nematične (med strukturami TK in izotropno micelarno raztopino), holesterične in še nekatere druge vmesne faze. Pričakujemo lahko torej nastanek več različnih tipov liotropnih mezofaz, odvisno od koncentracije mezogena, lipofilnih oz. hidrofilnih lastnosti topila ter od lastnosti same molekule PAS, vsi naštetni tipi mezofaz pa ne nastanejo vedno (4, 9, 10). S spreminjanjem temperature lahko pride tudi do termotropnih faznih prehodov, posledično poleg liotropnih mezofaz hkrati nastanejo tudi različne faze termotropnih TK (11).

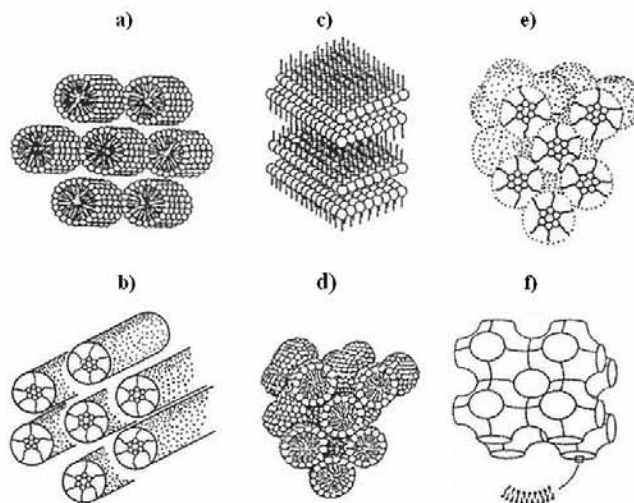
#### Heksagonalne faze

Heksagonalne faze nastanejo, kadar je koncentracija PAS 30–50%, v širokem temperaturnem območju. Sestavljene so iz tesno zloženih paličastih agregatov heksagonalne oblike (slika 8a). Viskoznost sistema se z nastankom heksagonalnih struktur močno poveča, kar je posledica njihove dvodimenzionalne ureditve; gibljejo se lahko le vzdolž svoje dolžine. Glede na polarnost zunanje faze lahko nastanejo poleg heksagonalnih faz ( $H_1$ ) tudi reverzne heksagonalne faze ( $H_2$ ), kjer so polarne glave molekul PAS usmerjene v notranjost heksagonalnih struktur (slika 8b). Vmesni prostor med sosednjimi cilindri je zapolnjen s hidrofobnimi verigami, zato pride do tesnejšega urejanja, posledično je koncentracijsko območje nastanka reverznih heksagonalnih faz v primerjavi z normalnimi heksagonalnimi fazami manjše.

#### Lamelarne faze

Lamelarne faze nastanejo pri višjih koncentracijah PAS kot heksagonalne faze, njihov nastanek pa označuje drastičen padec viskoznosti v primerjavi s heksagonalnimi strukturami. Navadno nastanejo v najširšem koncentracijskem in temperaturnem območju. Sestavljene so iz dvoplasti PAS, ki niso lateralno omejene (slika 8c). Njihova debelina je približno enaka eni do dvema dolžinama PAS, ki jo

tvori. Plasti lahko drsijo druga ob drugi, njihovo gibanje je omejeno le z ravnino plasti, kar pojasnjuje nižjo viskoznost teh struktur. Glede na urejanje molekul delimo lamelarne strukture na tri podskupine. Tekoče lamelarne faze ( $L_a$ ) so najmanj urejene. Gibanje znotraj plasti ni omejeno, saj so lipofilne verige gibljive, prihaja do interakcij med molekulami v posamezni plasti, možni, čeprav redki, pa so tudi premiki molekul med posameznimi plastmi. Pod temperaturo »taljenja« lipofilnih verig je njihova gibljivost omejena, kar omogoča urejanje v lamelarne gelske faze ( $L_b$ ) in lamelarne kristalinične faze ( $L_c$ ). Pri  $L$  fazah so verige v trans konfiguraciji in delno urejene.  $L$  faze delimo na tiste, pri katerih so lipofilne verige pravokotne na ravnino plasti ( $L_a$ ) in tiste, pri katerih verige izkazujejo določen odklon od pravokotnice na ravnino plasti ( $L_b$  in  $L_c$ ). V  $L_c$  fazah so verige »zamrznjene« v rešetko in so najbolj urejena oblika lamelarnih faz.



**Slika 8:** Molekularne strukture liotropnih TK: a) heksagonalna; b) inverzna heksagonalna; c) lamelarna; d) kubična tip I; e) inverzna kubična tip IV; f) kubična tip II (4).

**Figure 8:** Molecular structure of lyotropic liquid crystals: a) hexagonal; b) inverse hexagonal; c) lamellar; d) cubic type I; e) inverse cubic type IV; f) cubic type II (4).

## Kubične faze

Kubične faze so izotropne, posledično edine ne izkazujejo dvolomnosti. Zanje je značilna visoka viskoznost, ki je posledica tridimenzionalne ureditve agregatov. Prav iz tega razloga jih lahko opredelimo kot TK, čeprav nimajo orientacijske urejenosti. Sferični agregati tvorijo fazo tipa I (slika 8d) oz. v primeru reverzних micelov fazo tipa IV (slika 8e), le-ta je vmesna faza med izotropno micelarno raztopino in heksagonalno fazo. Faza tipa II (slika 8f) oz. reverzna faza tipa III sta sestavljeni iz agregatov paličaste oblike in nastaneta med heksagonalno in lamelarno fazo. Za razliko od diskontinuiranih kubičnih faz tipa I in IV so kubične faze tipa II in III bikontinuirane (4, 9, 10, 12).

## 3 Metode za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti tekočih kristalov

Za določitev tipičnih struktur TK so na voljo različne metode, ki skupaj dajejo komplementarne rezultate. Ključne informacije o strukturi dobimo z neposrednimi metodami kot so polarizacijska in transmisijska elektronska mikroskopija, rentgensko sipanje, mikroskopija na atomsko silo, jedrska magnetna resonanca ter posrednimi metodami kot so reologija in diferenčna dinamična kalorimetrija. Pri načrtovanju TK kot dostavnih sistemov lahko z omenjenimi metodami dobimo informacije o vplivu vgrajene zdravilne učinkovine na strukturo sistema.

Makai in sodelavci so proučevali lamelarne TK, ki jih tvori Brij 96 ob dodatku vode v določenem koncentracijskem območju. Z namenom razvoja sistemov z relativno nizko vsebnostjo emulgatorja so TK dodali kratkoveržni alkohol glicerol ter za povečanje solubilizacijske kapacitete tekoči parafin. Glicerol in tekoči parafin nista povzročila signifikantne razlike v strukturi lamelarnih TK, kar so dokazali s polarizacijsko in presevno elektronsko mikroskopijo ter reološkimi meritvami. Ugotovitve so potrdili tudi z metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja, s katero so ugotovili, da se razdalja med plastmi veča z večanjem koncentracije glicerola. Nadalje so v TK vgradili modelni učinkovini, ki se bistveno razlikujeta v topnosti, in sicer skoraj netopen tenoksikam ali zelo topen efedrinijev klorid, oba v koncentraciji 1%. Vzorci z vgrajeno zdravilno učinkovino so obdržali lamelarno strukturo, kar so potrdili z ozkokotnim rentgenskim sipanjem in reološkimi meritvami, vendar se je razdalja med posameznimi plastmi povečala. Učinkovini sta se namreč vgradili v oziroma med lamelarne plasti in izkazovali podaljšano sproščanje (13).

Libster in sodelavci so preučevali vpliv vgradnje večje količine ciklosporina A in pospeševalcev dermalne absorpcije kot so Labrasol, etanol in fosfatidilholin na strukturo reverzних heksagonalnih faz TK za dermalno uporabo s sestavo monoolein/trikaprilin/voda. Za ugotavljanje strukturnih lastnosti so uporabili reološka merjenja, diferenčno dinamično kalorimetrijo in ozkokotno rentgensko sipanje. Dokazali so, da fosfatidilholin izboljša elastične lastnosti reverzних heksagonalnih faz in poveča njihovo termično stabilnost. Nasprotno pa vgradnja ciklosporina A reverzne heksagonalne faze destabilizira, posledično se bistveno spremenijo reološke lastnosti sistema. Destabilizacijski efekt ima tudi vgradnja večjih količin Labrasola, medtem ko etanol, v kolikor masno razmerje etanol/voda ni večje od 0,20, strukture ne poruši (14).

## 3.1 Polarizacijska mikroskopija

Tako kot kristali so tudi TK, z izjemo kubičnih faz, optično anizotropni in zato izkazujejo dvolomnost, ki jo lahko opazujemo pod polarizacijskim mikroskopom. Optična anizotropija pomeni, da se svetloba različno obnaša pri prehodu skozi snov, če potuje skozi snov v različnih smereh. Pri dvolomnih kristalih definiramo dva različna lomna količnika in optično os. Če skozi snov pošljemo različno polarizirane svetlobne žarke v smeri optične osi, bodo ti žarki skozi snov potovali z isto hitrostjo (»čutili« bodo isti lomni količnik, ki ga imenujemo redni). Če pa različno polarizirane svetlobne žarke pošljemo skozi snov v drugi smeri, bodo ti »čutili« različne lomne količnike, in se bodo razširjali skozi snov z različnimi hitrostmi. V tem primeru se žarek v snovi razcepi na rednega in izrednega. Optična os je v tesni povezavi z urejenostjo molekul v vzorcu. Zaradi simetrije lahko vzorec vrtime okoli optične osi, ki jo določa ureditveni vektor, in se pri tem njegove lastnosti ne bodo spremenile.

Pri polarizacijskem mikroskopu imamo dva polarizatorja, med katera vstavimo preiskovani vzorec. Polarizatorja sta postavljena pravokotno drug na drugega. Prvi je namenjen temu, da svetlobo polariziramo. Če polarizirana svetloba potuje skozi optično izotropni vzorec, se njena polarizacija ne spremeni in skozi drugi polarizator (analizator), ki je pravokoten na to polarizacijo, ne pride nič svetlobe, vidimo črno. Kadar vzorec izkazuje dvolomnost, pa se bo polarizacija obrnila, ne bo več pravokotna na analizator, ki jo bo torej prepustil in videli bomo svetlo. Ker skozi vzorec pošiljamo belo svetlobo, opazimo tipično črno – belo teksturo TK. V tekočih kristalih vidimo defekte pod polarizacijskim mikroskopom kot specifične črne črte, skupine črt in pike, kar nam omogoča določitev strukture TK. Defekti so v tesni povezavi s faznimi prehodi, ki so zaznamovani s spremembo v simetriji fizikalnega sistema (npr. prehod iz izotropne faze v fazo TK) (15). Za barvne učinke vstavimo v polarizacijski mikroskop filter za izbrano valovno dolžino, ki valovanje s to valovno dolžino izloči iz belega spektra svetlobe. Rotacija polariziranega žarka svetlobe je odvisna od valovne dolžine. Prepustnost analizatorja pa je odvisna od stopnje rotacije, torej imajo za njim različni svetlobni žarki različne intenzitete, kar opazimo kot barvne učinke teksture v rumeni, turkizni in roza barvi.

Heksagonalne mezofaze prepoznamo po pahljačasti teksturi zaradi stožčaste oblike PAS v osnovni strukturi stolpca. Za lamelarne mezofaze so značilne oljne črte z malteškimi križi. Ti nastanejo zaradi defektov imenovanih konfokalna področja, ki se pojavijo zaradi koncentrične razporeditve vodoravnih plasti. V nekaterih lamelarnih mezofazah ti defekti prevladujejo in takrat ne pride do pojava oljnih črt, temveč so malteški križi prevladujoča struktura (slika 9) (4).

Nematične faze termotropnih TK zaradi polarizacije, ki je vzporedna ali pravokotna glede na polarizator ali analizator, vidimo kot tipično Schlieren-ovo teksturo v obliki čopiča s točkovnim defektom v središču (slika 10).



**Slika 9:** Značilni malteški križi (primer označen s puščico) lamelnih TK pod polarizacijskim mikroskopom.

**Figure 9:** Polarized light micrographs of lamellar liquid crystal sample with characteristic Maltese cross textures (pointed by an arrow).



**Slika 10:** Schliernova tekstura nematične faze TK pod polarizacijskim mikroskopom. Obkroženi so primeri defektov (6).

**Figure 10:** Polarized light micrographs of nematic liquid crystal sample with characteristic Schlieren textures. Circles indicates defects, i.e. disclinations (6).

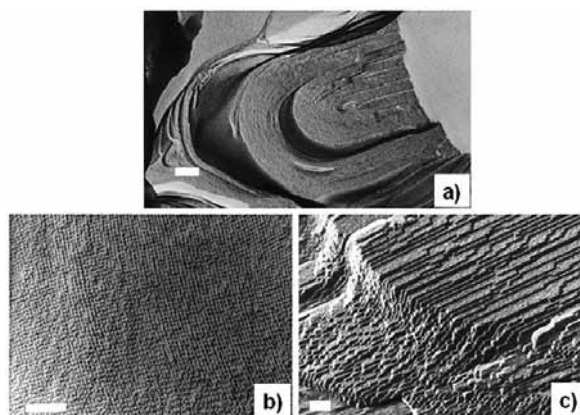
Za holesterične TK je prav tako značilna dvolomnost, vendar se svetloba, kadar potuje vzdolž spiralne osi, zaradi kiralnih lastnosti vzorca drugače lomi. Normalni vektor rotira in zato z njim tudi oba žarka, tako da po zavoju za  $360^\circ$  izkazujejo isti lomni količnik. Lahko pa nastopi krožna polarizacija svetlobe, kjer dva žarka konstantno rotirata v nasprotni smeri. Holesterični TK posledično izkazujejo bistveno kompleksnejšo teksturo, značilna je ti. modra faza, kadar je razdalja, potrebna za zavoj vijačnice, manjša od  $1 \mu\text{m}$  (5). Pri smektičnih mezofazah dobimo različne teksture, ki pa so podobne pahljačasti teksturi liotropnih heksagonalnih mezofaz.

### 3.2 Transmisijska elektronska mikroskopija

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) omogoča proučevanje notranjosti sistema oziroma mikrostrukture TK. Pri vzorcih, ki vsebujejo

vodo, pride v visokem vakuumu elektronskega mikroskopa do izgube le-te in s tem do sprememb v mikrostrukturi. Posledično so ključnega pomena posebne tehnike priprave vzorcev. Za uspešno se je izkazala tehnika zamrzovalnega lomljenja (*»freeze fracture technique«*), kjer naredimo repliko vzorca in le-to opazujemo pod elektronskim mikroskopom. Freeze fracture TEM (FF-TEM) je komplementarna krio-SEM (vrstična elektronska mikroskopija), ki omogoča opazovanje površine po fiksaciji z zamrzovanjem in je v osnovi bolj primerna za bolj viskozne sisteme in/ali sisteme z večjim deležem organskih snovi (4, 16).

Postopek priprave replike z zamrzovalnim lomljenjem, s katerim ohranimo mikrostrukturo vzorca, je sledeč: vzorce TK najprej hitro zamrznemo, tako da tanko plast vzorca med dvema zlatima ploščama potopimo v tekoči propan ( $-196^\circ\text{C}$ ) ali tekoči dušik ( $-210^\circ\text{C}$ ). Zamrznjen vzorec nato prenesemo v aparaturo za zamrzovalno lomljenje pri  $-100^\circ\text{C}$  in vakuumu med  $10^{-6}$  in  $5 \times 10^{-7}$  bar. V homogenem vzorcu se lom zgodi naključno, ker imajo vsi strukturni elementi enake možnosti lomljenja. Vendar pa ima pogosto tudi homogen vzorec področja z različno polarnostjo. Lom je bolj verjeten v nepolarnih kot polarnih področjih, saj so med slednjimi prisotne močnejše interakcije zaradi vodikovih vezi, ki preprečujejo lom. Posledično profil vzorca po lomljenju odraža njegovo mikrostrukturo zgolj kvalitativno ne pa tudi kvantitativno. Po lomljenju lahko vzorec še jedkamo, da kristalčki ledu sublimirajo in postanejo razlike na površini vzorca bolj izrazite. Večinoma je velikost kristalčkov ledu manjša od nekaj nm, ločljivost pa znaša  $5 \text{ nm}$  v primeru platina/ogljik, kar še vedno omogoča opazovanje struktur v večjem merilu (16). Površino vzorca nato pod kotom  $45^\circ$  napršimo z  $2 \text{ nm}$  debelo plastjo platine in naparimo še z  $20 \text{ nm}$  plastjo ogljika, kar poveča mehansko stabilnost in posledično olajša rokovanje z repliko (čiščenje, sušenje, opazovanje pod TEM...). Zaradi neravne površine struktur je pod kotom  $45^\circ$  naparjena plast platine ponekod debelejša, drugod tanjša. Različne debeline platine pod transmisijskim elektronskim mikroskopom različno absorbirajo elektrone, kar da kontrastno sliko; FF-TEM slika je tako bolj nazorna (4).



**Slika 11:** FF-TEM slike liotropnih TK: a) lamelarna faza; b) heksagonalna faza; c) kubična faza tipa I (merilo  $100 \text{ nm}$ ) (4).

**Figure 11:** Transmission electron micrographs of freeze fractured liquid crystals: a) lamellar phase; b) hexagonal phase; c) cubic of type I (bar  $100 \text{ nm}$ ) (4).

S FF-TEM tehniko lahko natančno proučujemo prehode med različnimi fazami liotropnih TK (slika 11) in tako dobimo komplementarne podatke z ostalimi metodami predvsem z vidika notranje strukture in potencialno prisotnih defektov, bistven prispevek pa je bil narejen na področju detekcije različnih kubičnih faz. Na področju termotropnih TK je manj raziskav, že zaradi dejstva, da se FF-TEM klasično uporablja za proučevanje vodnih sistemov, pa tudi zaradi dejstva, da fazni prehodi nastopijo pri precej višjih temperaturah in navadno v ozkem temperaturnem območju. Kljub temu je mogoče določiti razdaljo enega obrata pri holesterični fazi in strukturo modre faze v zmesi dveh termotropnih TK. Metoda torej poda določene informacije o notranji strukturi, za bolj podrobne informacije pa je potrebno uporabiti kvantitativne metode, npr. metode sipanja (16).

### 3.3 Rentgensko sipanje

Metode sipanja, med njimi rentgenska in ozkokotna nevtronska difrakcija ter statično in dinamično sipanje svetlobe, so ene izmed najpogostejše uporabljenih metod pri strukturnih raziskavah koloidnih sistemov, kjer so specifične strukture ali delci odgovorni za sipanje svetlobe (17). Z dobljenimi rezultati pogosto nadgradimo informacije o strukturi, ki jih dobimo z ostalimi metodami (18). V TK zaznamo Braggovo sipanje, če je valovna dolžina svetlobe primerljiva velikosti molekul oziroma razdalji med plastmi, zato uporabimo rentgensko sipanje, saj so tipične valovne dolžine rentgenske svetlobe okoli 0.1 nm.

Pri rentgenskem sipanju beležimo kotno odvisnost intenzitete sipane svetlobe, kjer urejena mikrostruktura TK daje značilne interference. Tipični interferenčni vzorec nastane zaradi značilnih ponovitev razdalj med plastmi  $d$ , ki ga izračunamo po Braggovi enačbi:

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin\theta} \quad \text{Enačba 2}$$

kjer je  $\lambda$  valovna dolžina rentgenskih žarkov,  $n$  je celo število, ki pove red interference in  $\theta$  kot uklona rentgenskih žarkov, pri katerem se pojavi interferenca.

Iz Braggove enačbe vidimo, da sta  $d$  in  $\theta$  obratno sorazmerna. Večje razdalje med plastmi z ozirom na urejenost na dolge razdalje zaznamo s tehniko ozkokotne rentgenske difrakcije (SAXS), medtem ko manjše razdalje med plastmi glede na urejenost na kratke razdalje (med sosednjimi molekulami) zaznamo s tehniko širokokotne rentgenske difrakcije (WAXS). SAXS je pomemben za natančno določanje razdalj  $d$  v tekočih kristalih, medtem ko z WAXS lahko ugotovimo izgubo urejenosti TK v ožjem območju, ki se kaže kot odsotnost interferenc, značilnih za kristalno stanje (4). Pri lamelarnih liotropnih TK je navadno razdalja med posameznimi plastmi 3-4 nm ter širina vrinjenih plasti vode 2 nm, kar je odvisno od temperature in koncentracije v mejnih področjih lamelarnih plasti. Konfiguracija molekul PAS oz. verig ter nagnjenost molekul znotraj plasti pa vplivata na odklon od določene vrednosti. Premer cilindrov heksagonalne faze je za faktor 1,3-2 večji od dolžine verige PAS, medtem ko je vmesna razdalja med sosednjimi cilindri 5 nm oziroma 0,8-3 nm v primeru reverzних faz (10).

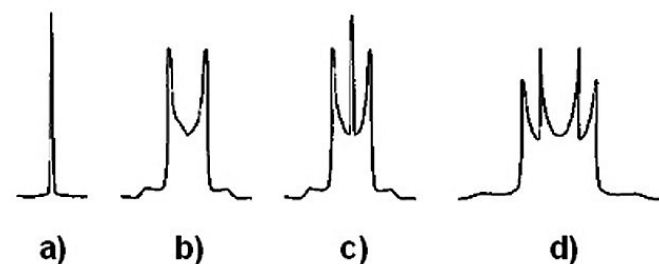
SAXS metoda ne samo da zazna interference, iz katerih izračunamo razdalje med plastmi, ampak tudi omogoča, da iz zaporedja interferenc določimo tip TK. Zaporedja za različne TK so:

- a) lamelarni: 1:1/2:1/3:1/4...
- b) heksagonalni: 1:1/√3:1/√4:1/√7...
- c) kubični: 1:1/√2:1/√3:1/√4... ali 1:1/√4:1/√5:1/√6...

### 3.4 Jedrska magnetna resonanca

Metoda jedrske magnetne resonance (NMR) poda najbolj natančne informacije za določitev ureditvenega parametra  $S$ , saj lahko jasno ločimo med različnimi molekularnimi segmenti. Pogosto uporabljene NMR tehnike so:  $^1\text{H}$  NMR,  $^2\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR (20). Izbira ustrezne tehnike je odvisna od značilnosti sistema; v primeru TK, kjer ima izmed vseh komponent zgolj lecitin en fosforjev atom, dobimo s  $^{31}\text{P}$  NMR zelo natančne podatke o različnih fazah v odvisnosti od temperature in vsebnosti vode (19).

$^1\text{H}$  NMR spektri TK so široki, s slabo ločljivostjo, posamični vrhovi se namreč prekrivajo, zato ni najbolj primerna metoda za proučevanje TK. Nasprotno pa se pogosto uporablja pri študijah manjših molekul, vgrajenih v TK.



**Slika 12:** Značilni  $^2\text{H}$ -NMR spektri: a) izotropne faze; b) tekočega kristala (velikost sklopitve narašča s stopnjo anizotropije, torej je večja za lamelarne faze v primerjavi s heksagonalnimi); c) dvofaznega sistema iz izotropne in anizotropne faze; d) dvofaznega sistema dveh anizotropnih faz (12).

**Figure 12:** Typical  $^2\text{H}$ -NMR spectra of: a) isotropic phase; b) liquid crystal (magnitude of splitting increases with the degree of anisotropy, therefore being larger for lamellar phase than for a hexagonal one); c) a two-phase sample consisting of isotropic and anisotropic phases; d) a two-phase sample consisting of two anisotropic phases (12).

Devterijeva jedrska magnetna resonanca ( $^2\text{H}$  NMR) je primerna tehnika za opazovanje faznih ravnotežij, ker lahko z njo določimo posamezne faze. Temelji na dejstvu, da v primeru izotropnih faz nastane ozek singletni signal kvadropolnega jedra kot je  $^2\text{H}$ , medtem ko pri anizotropnih fazah nastane dubletni signal zaradi kvadropolne sklopitve jeder. Anizotropne faze lahko med seboj ločimo tudi po velikosti sklopitve. Sistemi večih faz dajejo  $^2\text{H}$  NMR signale, ki so sestavljeni iz signalov posameznih faz, kar nam omogoča njihovo določitev znotraj večfaznega sistema (slika 12) (12). Kljub temu pa sta glavni dve pomanjkljivosti metode občutljivost in sposobnost natančne določitve faz (20).

S  $^{13}\text{C}$  NMR dobimo najbolj zanesljive informacije o orientacijski ureditvi in faznih prehodih; prav tako sta pri tej metodi ustrezni ločljivost in razmerje signal/šum (20).

### 3.5 Mikroskopija na atomsko silo

Princip delovanja mikroskopa na atomsko silo (AFM) temelji na merjenju medatomske sile med ostro preiskovalno konico nanometerskih dimenzij in površino vzorca. V grobem obstajata dva načina delovanja AFM: kontaktni način snemanja, kjer je konica v stiku s površino vzorca ter nekontaktni način, kjer tipalo ne pride v neposredni stik s površino, kar omogoča snemanje zelo občutljivih vzorcev, kot so npr. polimeri, membrane za ultra- in nanofiltracijo, rahlo adsorbirane plasti PAS v vodnih raztopinah... Tako dobimo podatke o topografiji ali nekaterih drugih lastnostih (namagnetnost, naelektrjenost, elastičnost ...) na izbranih koordinatah na površini. Najpogosteje beležimo višino površine in tako posnamemo topografsko sliko izbrane površine (21).

AFM se pogosto uporablja za proučevanje lipidnih dvoslojev, za katere je značilno urejanje v različne tipe lamelarnih faz ( $L_{\alpha}$ ,  $L_{\beta}$ ,  $L_c$ ) v odvisnosti od temperature. Predvsem v lamelarnih fazah  $L_{\alpha}$  potekajo številni biološko pomembni procesi, zato so izrednega pomena študije strukturnih in mehanskih lastnosti teh faz, kjer AFM omogoča opredelitev topografskih lastnosti v tekočem mediju (22).

### 3.6 Reologija

Sisteme v grobem delimo na idealne ali Newtonske in realne ali ne-Newtonske. Newtonski sistemi so idealizirane tekočine (plini, voda, raztopine topljencev z nizko molekulkulo maso, mineralna olja), pri katerih je viskoznost neodvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja. Realne kapljevine, poltrdni in trdni sistemi pa se v glavnem obnašajo ne-Newtonsko in so bolj kompleksni. Njihova viskoznost je odvisna od obremenitve, kar pomeni od delovanja strižne sile na sistem, za nekatere sisteme pa tudi od časa delovanja le-te (23).

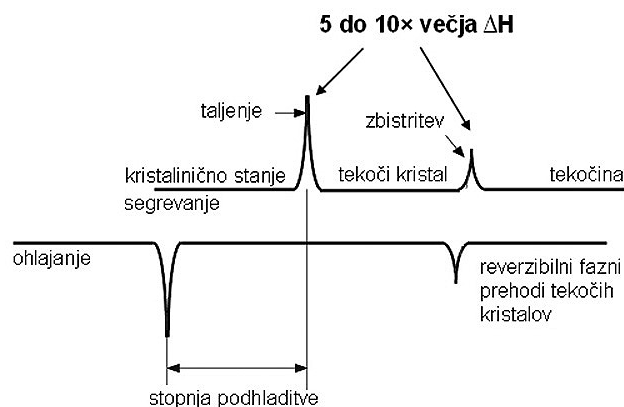
Za merjenje viskoznosti gelov TK so najbolj primerni oscilacijski viskozimetri. Ti omogočajo določitev viskoelastičnih lastnosti TK brez sprememb v mrežni mikrostrukturi, kar se običajno zgodi pri določanju reoloških lastnosti z mehanično deformacijo.

Različni tipi TK izkazujejo različne reološke lastnosti. Z večanjem urejenosti v mikrostrukturi TK se povečuje tudi viskoznost. Koeficient dinamične viskoznosti  $\eta$ , ki opisuje viskoznost Newtonskih sistemov, je velik za kubične in heksagonalne mezofaze in nižji za lamelarne. Viskoznost kubičnih in heksagonalnih mezofaz je velika zaradi tridimenzionalne in dvodimenzionalne urejenosti, medtem ko imajo lamelarne mezofaze zaradi enodimenzionalne urejenosti na dolge razdalje manjšo viskoznost. Vendar je treba opozoriti, da ti sistemi izkazujejo pretočne lastnosti, ki niso Newtonske, ampak plastične v primeru kubičnih in heksagonalnih faz ter psevdoplastične v primeru lamelarnih faz. Pri termotropnih TK se viskoznost večja v naslednjem zaporedju: nematični < smektični A < smektični C (9).

### 3.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Termična analiza meri toplotne ali temperaturne spremembe vzorca pri segrevanju ali ohlajanju. Predvsem diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je zelo primerna metoda zaradi svoje enostavnosti

in cene izvedbe. Fazne prehode spremlja sprememba v prosti energiji in so posledica spremembe v entalpiji ( $\Delta H$ ) ali entropiji ( $\Delta S$ ) sistema. Spremembe v entalpiji se kažejo kot endotermni ali eksotermni signali v odvisnosti od tega, ali se energija porablja (npr. taljenje trdne snovi) ali sprošča (npr. rekristalizacija izotropne taline). Prehod iz kristaliničnega v amorfno stanje zahteva veliko energije. Prehod iz kristaliničnega v TK ali iz TK v amorfno stanje pa tako kot prehod med različnimi kristalnimi stanji porabi majhne količine energije. Zato moramo biti pozorni, da ima merilna naprava primerno občutljivost in dovolj nizko mejo detekcije (slika 13).



Slika 13: DSC krivulja tekočega kristala.

Figure 13: DSC curve of liquid crystal.

Entropijsko povzročene fazne prehode lahko prepoznamo s spremembo naklona bazne linije, ki nastane zaradi spremembe specifične toplotne kapacitete. Takšni fazni prehodi so zlasti opazni pri polimernih TK, so entropijsko odvisni in jih smatramo za prehode drugega reda, kar običajno imenujemo steklasti prehod. Spremlja jih lahko entalpijski efekt, ki otežuje njihovo detekcijo (9).

## 4 Uporaba tekočih kristalov v farmaciji in kozmetologiji

TK se v farmaciji uporabljajo kot koloidni nosilni sistemi za različne načine uporabe: oralno, nazalno, dermalno in transdermalno, rektalno, vaginalno, parenteralno... Imajo veliko sposobnost solubilizacije tako lipofilnih kot hidrofilnih zdravilnih učinkovin, povečajo njihovo kemijsko stabilnost in omogočajo nadzorovano sproščanje. Bistvenega pomena pri načrtovanju TK kot nosilnih sistemov je pravilna izbira in razmerje komponent, ki omogočajo nastanek TK z želenimi reološkimi lastnostmi, stabilnostjo, sposobnostjo solubilizacije ter ostalimi specifičnimi lastnostmi.

Predvsem kubične faze (faza III) liotropnih TK so primerne tudi za dostavo proteinskih učinkovin. Med ukrivljenimi bikontinuiranimi lipidnimi dvosloji kubične faze III se nahaja mreža vodnih kanalov; s premerom vodnih por 5 nm, kar je primerljivo z velikostjo globularnih proteinov. V kubičnih fazah se nativna konformacija in aktivnost proteinov ohrani, zaščiteni so pred encimsko razgradnjo, zaradi zmanjšane mobilnosti vode je povečana kemijska in fizikalna stabilnost. Povečana kemijska stabilnost cefuroksima v kubičnih fazah je posledica visoke viskoznosti in s tem izključitve kisika in reaktivnih



kisikovih spojin iz sistema. Gel s kubičnimi fazami je zaščilil inzulin pred agregacijo in precipitacijo (izpostavljenost stresnim pogojem: 100 obratov / min, 37 °C, 7 dni) v primerjavi s pufrno raztopino, kjer je prišlo do popolne izgube nativne konformacije (24). Za transdermalno dostavo peptidov in proteinov (ciklosporina A, dezmozpresina in lizocima) so proučevali tudi reverzne heksagonalne faze, ki so se izkazale primerne tako z vidika stabilnosti kot zadržanega sproščanja (25).

## 4.1 Nastanek tekočih kristalov in situ

TK, ki nastanejo *in situ*, so primerni predvsem za intramuskularno, subkutano, oralno, peroralno, rektalno in vaginalno uporabo. Zdravilno učinkovino lahko glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti vgradimo v ustrezno micelarno raztopino ali fazo TK z ustrezno nizko viskoznostjo, ki omogoča enostavno aplikacijo, ob stiku s telesnimi tekočinami ali pri telesni temperaturi pa nastanejo faze TK z bistveno večjo viskoznostjo. Posledično se podaljša čas zadrževanja na mestu vnosa, sproščanje pa je nadzorovano in odvisno od strukture TK (12).

Kubične faze TK, natančneje kubična faza tipa III, so hkrati z reverzno heksagonalno fazo najbolj raziskane za *in situ* dostavo. Bistvene prednosti kubičnih faz so visoka viskoznost in s tem podaljšan čas zadrževanja na mestu vnosa, termodinamska stabilnost in ravnotežje s presežkom vode (pomembno v primeru presežka telesne tekočine). Gliceril monooleat (GMO) je sintezna amfifilna spojina, ki ob prisotnosti vode tvori različne faze liotropnih TK in je najpogosteje uporabljena snov za nastanek kubičnih faz *in situ*. Zaradi lipolize GMO so kubične faze biorazgradljive, predvsem pa je pomembno, da z naraščanjem vsebnosti vode in temperature nastopi fazni prehod sistema GMO / voda preko lamelarne faze v kubično (področje slednje je zelo široko) in reverzno heksagonalno. Zaradi nizke viskoznosti lamelarne faze lahko sistem v taki obliki dostavimo na mesto delovanja (npr. z injekcijo), ob kontaktu s telesnimi tekočinami (slina, prebavni sokovi, solzna in tkivna tekočina...) pa nastopi fazni prehod (24, 26).

*In situ* nastanek kubičnih faz pri peroralnem vnosu se je izkazal kot uporaben pristop za zaščito metaloenzima pred razgradnjo v želodcu. Za GMO sistem z vgrajenim hidrofilnim encimom so s polarizacijskim mikroskopom potrdili lamelarno strukturo (po eni in osmih urah nabrekanja). Slednja je nastala zaradi hitrega privzema vode, hkrati pa je zaradi nizke viskoznosti prišlo do takojšnjega sproščanja encima in njegove razgradnje v kislem mediju (aktivnost se je zmanjšala za 85,3 %). Dodatek hidrofobnega magnezijevega trisilikata (MTS) je omogočil nastanek kubičnih faz, ki so omejile nadaljnjo absorpcijo vode. Volumen vode v vodnih kanalih kubične faze se je zmanjšal in s tem tudi difuzija učinkovine. MTS je še dodatno zaščilil encim, saj so magnezijevi ioni zvišali pH sistema. Po osmih urah je zaradi dodatne vezave vode sistem prešel v heksagonalno fazo, iz katere se je encim hitreje sproščal (27).

GMO sistem so proučevali tudi za peroralen vnos furosemda. Z nastankom kubičnih faz *in situ* so želeli doseči zadržano sproščanje učinkovine in podaljšano zadrževanje GMO sistema na mestu absorpcije (v želodcu) zaradi mukoadhezivnih lastnosti. Furosemid je zmanjšal mukoadhezivne lastnosti GMO sistema, hkrati je bil slabo topen tako v nosilnem sistemu kot v kislem okolju želodca. Obema problemoma so se izognili z dodatkom polietilenglikola 400 in natrijevega fosfata (28).

Z namenom nadzorovanega sproščanja glukoze, modelne hidrofilne učinkovine, so razvili TK s faznim prehodom pri telesni temperaturi. Pod omenjeno temperaturo so s SAXS meritvami potrdili nastanek kubične faze, nad telesno temperaturo pa nastanek reverzne heksagonalne faze. *In vitro* študije sproščanja so nadgradili z *in vivo* študijami na podganah; po subkutanem injiciranju so s segrevanjem kože s toplimi obkladki dosegli nastanek reverzних heksagonalnih faz s počasnejšim sproščanjem in s hladnimi obkladki nastanek kubičnih faz s hitrejšim sproščanjem. Koncentracija učinkovine v plazmi je bila konstantna, kar kaže na potencialno uporabnost omenjenih sistemov za doseganje konstantnih plazemskih koncentracij po enkratnem vnosu učinkovin z daljšim razpolovnim časom (29).

V raziskavi za lokalno zdravljenje vnetih zobnih žepkov pri paradontalni bolezni so proučevali zmes oljne faze (Miglyol 810) in PAS (Cremophor EL:Cremophor RH 40=4:1) z metronidazolom. Nizka viskoznost sistema omogoča dostavo v zobne žepke z injekcijo. S polarizacijskim mikroskopom so potrdili nastanek različnih faz v odvisnosti od vsebnosti vode: lamelarne (10-20 % vode) in heksagonalne faze (do 40 % vode). Sposobnost posamezne faze za vezavo vode in njene reološke lastnosti so pomembno vplivale na sproščanje učinkovine (30).

## 4.2 Tekoči kristali za dermalno in transdermalno uporabo

TK izkazuje veliko prednosti predvsem za dermalno uporabo. Specifična struktura PAS, ki se klasično uporabljajo kot solubilizatorji, emulgatorji ali močljivci v farmacevtskih oblikah za dermalno uporabo, omogoča nastanek TK pri višjih koncentracijah. Za dermalno uporabo so najbolj primerni liotropni TK z lamelarno strukturo. Njihove prednosti so velika sposobnost solubilizacije, enostavna izdelava in termodinamska stabilnost. Strukturna podobnost z medceličnimi lipidi v epidermisu in nizka medfazna napetost TK, ki jo dosežemo z uporabo neionskih PAS, omogočata povečano sproščanje učinkovine brez iritacije kože. Nadalje, lamelarna struktura TK omogoča vključitev vode v hidrofilna področja dvoslojev, zato se v primerjavi s hidrofilnimi emulzijami zmanjša izhlapevanje vode in poveča hidratacija kože. Zaradi tega so pogosto sestavina dermalnih in kozmetičnih izdelkov z vlažilnim delovanjem, saj imajo ugodno konsistenco in puščajo prijeten občutek na koži. Prav tako se uporabljajo za zaščito občutljivih snovi, kot so vitamini in antioksidanti v dermalnih pripravkih (31-33). TK so zelo pomembni tudi za stabilizacijo hidrofilnih emulzij in krem, saj zaradi presežka PAS (pogosto zaradi dodatka maščobnih alkoholov) okrog kapljic notranje faze nastanejo področja TK, kar poveča viskoznost in ovira gibanje kapljic, ter tako poveča fizikalno stabilnost sistema (33, 34).

Nessem je v svoji študiji dokazala, da so TK primeren sistem za dermalno dostavo itrakonazola. Itrakonazol, vgrajen v kremo z lamelarnimi TK, je izkazoval boljšo protimikrobno aktivnost v primerjavi s hidrofilnim gelom (enofazni sistem) ali hidrofilno kremo (dvofazni sistem). Pri metodi difuzije v agarju je bil namreč pas inhibicije najširši pri kremi z lamelarno fazo (32).

Sproščanje klorheksidin diacetata iz lamelarnih in heksagonalnih faz TK za dermalno uporabo so vrednotili s Franz-ovimi difuzijskimi

celicami. Učinkovina se je počasneje sproščala iz lamelarne faze, kar so razložili s hitrim privzemom vode v lamelarno strukturo (35).

### 4.3 Zdravilne učinkovine z lastnostmi tekočih kristalov

Zdravilne učinkovine lahko zaradi svoje specifične strukture tvorijo TK v odvisnosti od temperature ali ob dodatku topila. Zdravilne učinkovine z nizko molekulska masa, ki izkazujejo lastnosti mezogenov, so iz skupine nesteroidnih antirevmatikov (npr. diklofenak), antimikotikov (npr. itrakonazol), antibiotikov (nafcilin), protitumornih učinkovin (metotreksat)... Tudi nekatere makromolekulske učinkovine tvorijo TK, kot npr. nafarelin iz skupine LHRH agonistov, kalcitonin za zdravljenje osteoporoze... Med zdravilnimi učinkovinami v obliki TK in TK kot nosilnimi sistemi ali biološkimi strukturami v obliki TK lahko pride do vzajemnega učinka (4, 7).

Za izboljšanje transdermalne dostave hidrofilnega propranolola so kot predzdravilo sintetizirali propranolol palmitat in propranolol stearat, amfifilna derivata z boljšo permeabilnostjo. Pri hidrolizi pa se sprostijo maščobne kisline, ki delujejo kot pospeševalci absorpcije. Oba derivata tvorita liotropne TK. Kot topilo so uporabili mešanico etanola in vode in nastal je transparenten gel z lamelarno strukturo. Z *in vitro* in *in vivo* študijami so dokazali povečano transdermalno absorpcijo iz gela z lamelarno strukturo v primerjavi s kontrolnim karbomernim gelom kakor tudi nizko stopnjo iritacije (36).

### 4.4 Uporaba tekočih kristalov v kozmetologiji

Liotropni TK se zaradi ustreznih reoloških lastnosti uporabljajo v šamponih, gelih za tuširanje ali za lase, tekočih milih itd., medtem ko se termotropni holesterični TK zaradi spreminjanja barve s temperaturo pogosto uporabljajo v kozmetičnih izdelkih kot so npr. senčila za oči in laki za nohte (4).

## 5 Zaključek

Notranja struktura TK vpliva na njihove lastnosti, natančno poznavanje strukture pa ima pomembno vlogo pri načrtovanju in izdelavi TK kot nosilnih sistemov glede na želen učinek za določen namen uporabe. Za ugotavljanje strukture obstaja določen nabor metod, kot so: polarizacijska mikroskopija, TEM, rentgensko sipanje, NMR, AFM, DSC, reološke meritve, idr. Večinoma se poslužujemo kombinacije metod, da dobimo celovito sliko o strukturi TK, kar nam omogoči ustrezno razlago *in vitro* in *in vivo* rezultatov sproščanja učinkovin, zaščite pred stresnimi dejavniki... Omenjene tehnike so zato nenadomestljivo orodje pri razvoju koloidnih nosilnih sistemov, med katerimi zavzemajo pomembno mesto tudi TK.

## 6 Literatura

- Sluckin TJ, Dunmur DA, Stegemeyer H. Crystals that Flow: Classic Papers from the History of Liquid Crystals. Taylor&Francis, London 2004.
- Lehmann O. Über fließende krystalle. Zeitschrift f Physikl Chemie 1889; 4: 462-472.
- Martin A. Physical pharmacy 4<sup>th</sup> ed. Lea&Febriger, London 1993: 127-128.
- Müller-Goymann CC. Drug Delivery. Liquid crystals. In: Swarbrick J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3<sup>rd</sup> ed. Informa Healthcare, New York 2007, vol.2: 1115-1131.
- Senyuk B. Liquid crystals: A simple view on a complex matter. <http://www.dept.kent.edu/spie/liquidcrystals/>. Dostop: 22-06-2010.
- University of Cambridge. Liquid Crystals. [http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/liquid\\_crystals/index.php](http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/liquid_crystals/index.php). Dostop: 10-06-2010.
- Stevenson CL, Bennett DB, Lechuga-Ballesteros D. Pharmaceutical Liquid Crystals: The Relevance of Partially Ordered Systems. J Pharm Sci 2005; 9: 1861-1880.
- Lisetski L. What was observed by Julius Planer in 1861? Condensed Matter Physics 2010; 13(3): 33604:1-4.
- Müller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. Eur J Pharm and Biopharm 2004; 58: 343-356.
- Burducea G. Lyotropic liquid crystals I. Specific structures. Rom Rep Phys 2004; 56(1): 66-86.
- Harms M, Mackeben S, Müller-Goymann CC. Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/ isopropyl myristate/water. Coll Surf A: Physicochem Eng Asp 2005; 259: 81-87.
- Malmsten M. Surfactants and Polymers in drug delivery. Marcel Dekker, Inc., New York 2002.
- Makai M, Csányi E, Németh ZS, Pálkás J, Er s I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. Int J Pharm 2003; 256: 95-107.
- Libster D, Aserin A, Wachtel E, Shoham G, Garti N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: Physical characterization. J Coll Int Sci 2007; 308: 514-524.
- Črnko B. Topološki defekti. [http://www-f9.ijs.si/~krizan/sola/semopod/0607/crnko\\_seminar.pdf](http://www-f9.ijs.si/~krizan/sola/semopod/0607/crnko_seminar.pdf). Dostop: 28-05-2010.
- Mondain-Monval O. Freeze fracture TEM investigations in liquid crystals. Curr Opin Coll Int Sci 2005; 10: 250-255.
- Podlogar F, Gašperlin M. Izbor metod za določevanje fizikalnih lastnosti koloidnih sistemov v farmaciji. Farm Vestn 2003; 54(1): 47-56.
- Fukada K, Matsuzaka Y, Fujii M, kato T, Seimiya T. Phase behaviour and lyotropic-liquid crystal structure of alkyltrimethylammonium bromide-water mixtures around freezing temperature of water. Therm Acta 1998; 308: 159-164.
- Liu L, Tan G, McPherson G, John VT, Maskos K, Bose A. High-Resolution NMR Characterization of a Gel-Like Surfactant Mesophase. Langmuir 2008; 24: 9286-9294.
- Fung BM. <sup>13</sup>C NMR studies of liquid crystals. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 2002; 41: 171-186.
- Tivadar A, Kočevar K, Muševič I, Srčič S. Mikroskopija na atomsko silo. Farm Vestn 2002; 53: 277-291.
- Garcia-Manyes S, Oncins G, Sanz F. effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. Biophys J 2005; 89: 4261-4274.
- Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007; 21-22.
- Shah JC, Sadhale Y, Chilukuri DM. Cubic phase gels as drug delivery systems. Adv Drug Del Rev 2001; 47: 229-250.
- Libster D, Aserin A, Garti N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: drug delivery and crystallization applications. J Coll Int Sci 2011; 356: 375-386
- Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. Drug Discov Today 2010; 15(23/24): 1032-1040.
- Shah MH, Paradkar A. cubic liquid crystalline glyceryl monooleate matrices for oral delivery of enzyme. Int J Pharm 2005; 294: 161-171.
- Sallam A-S, Khalil E, Ibrahim H, Freij I. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. Eur J Pharm Biopharm 2002; 53: 343-352.
- Fong W-K, Hanley T, Boyd BJ. Stimuli response liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery *in vitro* and *in vivo*. J Control Release 2009; 135: 218-226.

30. Fehér A, Urbán E, Er s I, Szabó-Révész P, Csányi E. Lyotropic liquid crystal preconcentrates for the treatment of periodontal disease. *Int J Pharm* 2008; 358: 23-26.
31. Vyas SP, Jaitely V, Kanaujia P. Self-assembling supramolecular biovectors. a new dimension in a novel drug delivery system. *Pharmazie* 1997; 52: 259-267.
32. Nasseem DI. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26: 387-399.
33. Junginger HE. Ointments and creams as colloidal drug Delivery Systems. In: Kreuter J. *Colloidal drug Delivery Systems*. Marcel dekker, Inc., New York 1994, vol.66: 1-30.
34. Klein K. Liquid Crystals and Emulsions: A Wonderful Marriage. In: Wiechers JW. *Skin Barrier: chemistry of Skin delivery systems*. Allured Publishing Corporation, 265-271.
35. Farkas e, Zelkó R, Németh Zs, Pálincás J, Marton S, Rácz I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *Int J Pharm* 2000; 193: 239-245.
36. Namdeo A, Jain NK. liquid crystalline pharmacogel based enhanced transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *J Control Release* 2002; 82: 223-236.

# Matične celice iz zobnega in obzobnega tkiva ter njihova potencialna uporaba v regenerativnem zobozdravstvu

## Stem cells from dental and periodontal tissue and their possible applications in regenerative dentistry

Maja Marušić, Matjaž Jeras

**Povzetek:** Tako kot v številnih drugih človeških tkivih, so tudi v zobnem in obzobnem tkivu prisotne populacije različnih matičnih in predniških celic. Zaradi njihove dostopnosti ter sposobnosti samoobnavljanja in diferenciacije v določene vrste specifičnih tkivnih celic, postajajo vse pogostejši predmet intenzivnih raziskav v regenerativnem zobozdravstvu. Pri nadomeščanju izgubljenih zob tako vse bolj pridobiva na pomenu možnost njihove naravne regeneracije iz lastnega tkiva, s čimer bi lahko v veliki meri nadomestili klasično uporabo protetičnih nadomestkov. Pri tem gre do prizadevanja raziskovalcev v smer uporabe ustreznih matičnih celic za izdelavo bio-zoba, ki bi imel vse funkcionalne lastnosti naravnega tkiva. Trenutno potekajo intenzivne raziskave predvsem na področju ugotavljanja diferenciacijskega potenciala izbranih populacij matičnih celic, osamljenih bodisi iz zobne pulpe ali obzobnih oziroma paradontalnih tkiv. Ne glede na to, da so obeti, ki jih, tako kot na drugih področjih, ponujajo matične celice tudi v sodobnem zobozdravstvu, izjemni, pa nas do popolne regeneracije zobnega tkiva kot običajnega terapevtskega posega še vedno ločijo številne tehnične in druge ovire.

**Ključne besede:** matične celice, zobna pulpa, paradontalno tkivo, tkivno inženirstvo, bio-zob

**Abstract:** Like in many other human tissues, various populations of stem and precursor cells can be found also in dental and periodontal tissues. Due to their accessibility as well as self-renewing and differentiation potential, they are becoming an attractive and important research subject in regenerative dentistry. When replacing lost teeth, the advantages of natural dental regeneration from patient's own tissue over all kinds of implants are gaining more and more interest, thereby stimulating intensive research and development in the field of bio-tooth engineering, based on the selection and use of appropriate stem cells. An important part of research is currently being carried out in order to determine differentiation potentials of various stem cell populations, isolated from the dental pulp or periodontal tissues. Although stem cells are a promising tool also in modern dentistry, there are many technical obstacles and limitations still to be overcome before a complete tooth tissue regeneration could be clinically applicable.

**Key words:** stem cells, dental pulp, periodontal tissues, tissue engineering, bio-tooth

## 1 Uvod

Poleg tega, da matične celice, osamljene iz nekaterih zobnih in obzobnih tkiv, omogočajo proučevanje specifičnih mehanizmov njihove proliferacije in usmerjene diferenciacije, predstavljajo tudi potencialno osnovo za tkivno inženirstvo oziroma regenerativno zobozdravstvo. Sicer pa imamo danes v splošnem za izdelavo tkivno-inženirskih pripravkov na voljo dve osnovni populaciji matičnih celic, in sicer embrionalne (EMC) in somatske matične celice odraslih tkiv. Za prve je značilna pluripotentnost, kar pomeni, da lahko iz njih v ustreznih pogojih *in vitro* pripravimo katerokoli telesno tkivo, pri čemer pa je njihova uporaba, predvsem zaradi etičnih zadržkov, potencialne tumorigenosti in alogenskega porekla, še vedno omejena le na eksperimentalno področje. Za razliko od EMC pa so somatske matične

celice odraslih, najpogosteje avtolognih, lahko pa tudi tkivno skladnih alogenskih tkiv, lažje dostopne in etično povsem neoporečne ter se zato, ne glede na njihov bolj ali manj omejen diferenciacijski potencial, brez zadržkov uporabljajo v terapevtske namene (1). Med njimi so poleg krvotvornih, najbolj uporabne mezenhimske matične celice (MSC - Mesenchymal Stem Cells), ki so lahko mezodermalnega in neuroektodermalnega izvora. Njihovi pomembni značilnosti sta bistveno manjša tumorigenost v primerjavi z EMC in neimunogenost, kar jim omogoča značilno prednost pred uporabo drugih vrst matičnih celic v tkivnem inženirstvu oziroma regenerativni medicini (2). Po rojstvu in tekom življenja jih najdemo v številnih različnih tkivih, npr.: v popkovnici, kostnem mozgu, maščobnem (adipoznem) tkivu, lasnih mešičkih, zobni pulpi, ... Njihova plastičnost jim omogoča diferenciacijo

v adipocite, hondrocite in osteocite, pod določenimi pogoji pa celo v celične linije nemezodermalnega izvora (3).

## 2 Lastnosti matičnih celic zobnih in obzobnih tkiv

Zobne matične celice so populacija matičnih celic odraslih tkiv z izrazitim proliferacijskim in s tem tudi samoobnovitvenim potencialom, poleg tega pa je zanje značilna tudi sposobnost diferenciacije v več različnih tkivno-specifičnih celičnih linij. Že kar nekaj časa je znano, da lahko matične celice iz zobne pulpe tvorijo temu tkivu podoben kompleks, sestavljen iz mineraliziranega matriksa s tubuli in odontoplasti ter ožiljenega fibroznega tkiva (4). Poleg tega pa lahko, v ustreznih pogojih *in vitro*, diferencirajo tudi v druge celične vrste, kot so naprimer adipociti ali živčne celice (5).

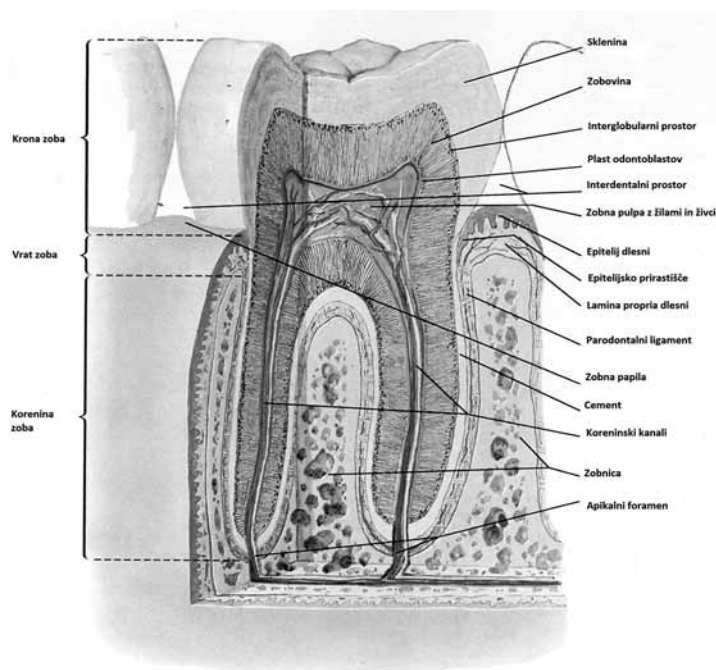
Za vse matične celice je značilen koncept tkivnih celičnih niš, ki predstavljajo specifično tkivno mikrookolje, z vsemi dejavniki, potrebnimi za njihovo proliferacijo in usmerjeno diferenciacijo ter s tem za vzdrževanje njihovega samoobnovitvenega potenciala (6). V zobnih tkivih je prisotnih več različnih vrst takšnih niš, ki jih najdemo večinoma ob krvnih žilah oziroma v perivaskularnem območju. Predvidevajo, da so vpletene v procese obnavljanja zobovine. V središču vsake od njih je materinska matična celica s praktično neomejeno samoobnovitveno sposobnostjo. V prisotnosti ustreznih dražljajev iz nje z mitozo nastajajo hčerinske celice s predniškimi lastnostmi, ki imajo sicer omejen samoobnovitveni, a zato povečan proliferativni potencial. Te nato pod vplivom zunanjih stimulatornih signalov diferencirajo v določene bolj specializirane tkivne celične linije. Tako se pri različnih poškodbah zobnega tkiva sprožijo signalne poti, ki lahko aktivirajo matične in predniške celice ter s tem vplivajo na nastanek in migracijo diferenciranih odontoplastov na mesto poškodbe (7).

Lastnosti različnih tkivnih MSC zelo pogosto primerjamo z zelo dobro raziskanimi fenotipskimi in funkcijskimi značilnostmi mezenhimskih stromalnih matičnih celic iz kostnega mozga (BMSC - Bone -Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells). Ključna razlika med matičnimi celicami, osamljenimi iz zobnih in obzobnih tkiv ter BMSC je v tem, da so prve zadolžene predvsem za razvoj zobnih (odontogenih), druge pa zlasti kostnih (osteogenih) celičnih linij. Čeprav obe populaciji celic zelo podobno uravnavata izražanje skoraj identičnega profila proteinov, pa sta za matične celice iz zobnih in obzobnih tkiv značilna višja stopnja proliferacije ter večji razvojni potencial v smeri nevrogeneze, pri čemer sta njihovi sposobnosti diferenciacije v hrustančno in maščobno tkivo nekoliko manjši, v primerjavi z BMSC (8). Obe skupini matičnih celic izražata vrsto enakih površinskih molekul, med katere sodijo: CD44, CD106, CD146, 3G5 in Stro-1, poleg tega pa tudi proteine, povezane z mineralizacijo tkiv - alkalno fosfatazo, osteokalcin in osteopontin (9).

## 3 Vrste matičnih celic zobnih in obzobnih tkiv

Glede na njihov diferenciacijski potencial lahko matične celice iz zobnih in obzobnih tkiv razdelimo v dve osnovni skupini. V prvo sodijo tiste, osamljene iz zobne pulpe (DPSC - Dental Pulp Stem Cells), iz zobne pulpe izdrtih mlečnih zob (SHED - Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) ter iz zobne papile (SCAP - Stem Cells from Apical Papilla). Drugo skupino pa tvorijo celice obzobnih (parodontalnih) tkiv, in sicer matične celice parodontalnega ligamenta (PDLSC - Periodontal Ligament Stem Cells) ter predniške celice zobnega mešička (DFPC - Dental Follicle Precursor Cells).

Za DPSC je značilno, da imajo v pogojih *in vitro* poleg zobotvornega (odontogenega) tudi adipogeni in nevrogeni rastni potencial. V novejših



Slika 1: Anatomija zoba (14).

Figure 1: Tooth anatomy (14).

raziskavah pa poročajo tudi o njihovi sposobnosti diferenciacije v hrustančno, kostno in celo mišično tkivo (5, 10). Potem, ko so jih, skupaj z nosilcem iz hidroksiapatita/trikalcijevega fosfata vsadili v imunsko oslABLJENE miške, je prišlo do ektopičnega nastanka kompleksa zobna pulpa-zobovina (4). Celice SHED lahko razmeroma enostavno osamijo iz zobne pulpe izpuljenega sekalca. Odvisno od pogojev njihovega gojenja *in vitro*, se lahko razvijejo v fibroblastom podobne adherentne celične kulture ali pa v živčne matične celice, ki v gojilni posodi spontano tvorijo značilne celične skupke, nevrosfere. Poleg tega lahko diferencirajo v odontoblaste, adipocite ali živčne celice, *in vivo* pa spodbujajo tvorbo zobovine in kostnega tkiva. Za razliko od DPSC niso sposobne regenerirati celotnega kompleksa zobovina-pulpa (11). Celice SCAP lahko osamimo iz zobne papile stalnih zob, a le v točno določeni zgodnji fazi njenega razvoja, saj z zorenjem zoba iz tega tkiva nastaja zobna pulpa. Glede na njihove lastnosti, ki so podobne tistim, ki jih izkazujejo celice zarodnega tkiva in se kažejo v obliki manjše diferenciranosti, v primerjavi z DPSC, imajo večjo sposobnost za obnavljanje zobovine (1, 8). Celice PDLSC lahko pridobimo iz površine zobne korenine. V specifičnih pogojih *in vitro* diferencirajo v tkivo, ki je podobno parodontalnemu, pri čemer pa je njihov osteogeni potencial razmeroma majhen (12). Njihova aktivnost *in vivo* je specifično usmerjena v regeneracijo cementno-parodontalne ligamentne strukture (8). Predniške celice parodontalnih tkiv DFPC so prisotne tudi v zobnem mešičku, ki v zobni zasnovi, pred izraščanjem zoba, predstavlja ektomezenhimsko tkivo. Diferencirajo v zreli parodontalni

aparatus, ki ga sestavljajo alveolarna kost, celice parodontalnega ligamenta in cement. Poleg tega pa jih lahko v pogojih *in vitro* diferenciramo tudi v druge celice mezenhimskega izvora, naprimer v hondrocite in adipocite (13).

## 4 Uporaba matičnih celic v regenerativnem zobozdravstvu

Zanesljiva identifikacija in karakterizacija matičnih in predniških celic v zobnem in obzobnem tkivu postajata vse pomembnejši s stališča njihove potencialne uporabe za klinično zdravljenje oziroma za regeneracijo poškodovanih zob. V regenerativnem zobozdravstvu bi načeloma poleg somatskih matičnih celic odraslih tkiv lahko uporabljali tudi pluripotentne EMC, a kot smo že omenili, je njihova uporaba zaradi različnih vzrokov trenutno močno vprašljiva, zato pa se morda odpirajo nove potencialne možnosti, ki temeljijo na možnosti priprave induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC – induced Pluripotent Stem Cells), ki nastanejo z reprogramiranjem zgodnjih embrionalnih genov v odraslih somatskih celicah, naprimer kožnih fibroblastih, *in vitro* (15).

Za regeneracijo celega zoba je zelo uporaben zobni brstič, ki izrašča iz zobne zasnove, nujno potrebne za nastanek zob, sestavljene iz dentalne lamine ter pod njo zgoščenega mezenhimskega tkiva, in ki vsebuje vse potrebne vrste celic, medtem ko za obnovo posameznega zobnega tkiva zadostuje že nekaj osnovnih vrst matičnih celic (8). Trenutno proučujejo uporabo kombinacije mezenhimskih (MSC) in epitelijskih zobnih celic *in vitro*, ki omogoča nastanek zobne zasnove, iz katere bi se lahko razvil funkcionalen zrel zob. Epitelijske matične celice v ustreznih pogojih diferencirajo v ameloblaste, ki začnejo proizvajati sklenino, njihova pomanjkljivost pa je v tem, da po izraščanju zoba izginejo oziroma se njihovo število tako zelo zmanjša,

da jih je zelo težko najti in osamiti. Za razliko od njih pa so MSC veliko lažje dostopne. Sodelujejo pri regeneraciji zobovine, zobne pulpe in obzobnih oziroma parodontalnih tkiv (16). Ker so zobne epitelijske matične celice težko dostopne, intenzivno raziskujejo uporabnost epitelijskih matičnih celic, osamljenih iz drugih tkiv, naprimer iz kostnega mozga ali kože, ki naj bi imele sposobnost diferenciranja v ameloblastno celično linijo (17). Za obnovo zobovine in zobne pulpe lahko uporabimo celice DPSC, SHED ali SCAP, in sicer v kombinaciji z umetnimi nosilnimi ogrodji in rastnimi dejavniki, ki vzpodbujajo njihovo diferenciacijo in s tem rekonstrukcijo želenega tkiva (16). Celice PDLSC in DFPC pa so, kot smo že omenili, primerne predvsem za regeneracijo parodontalnega aparata.

Po drugi strani pa bi lahko plastičnost oziroma diferenciacijski potencial matičnih celic iz zobnega in obzobnega tkiva izkoristili tudi za pripravo drugih vrst tkivnih celic, naprimer osteoblastov (18). Iz parodontalnega ligamenta so osamili tudi živčne matične celice, ki bi jih morda lahko uporabili za celično inženirske pripravke, namenjene zdravljenju nevrodegenerativnih motenj, kot so Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen ter multipla skleroza (19).

## 5 Tkivno-inženirski pristopi pri pripravi bio-zoba

V zadnjem desetletju je reparativno zobozdravstvo temeljilo na uporabi zobnih vsadkov, ki seveda niso proizvod naravnega razvoja zoba in zato nimajo prave strukturne povezave z alveolarno kostjo (8). Trenutna prizadevanja so zato usmerjena k pripravi takega bio-zoba, ki bi se lahko v celoti integriral v čeljust in vršil vse funkcije naravnega zoba. Pri tem je zelo pomembno dobro poznavanje in izkoriščanje mehanizmov naravne regeneracije zobnih in obzobnih tkiv, predvsem načinov povečanja celične migracije in proliferacije na mesto poškodbe ter vplivanja na lastnosti celičnih populacij, ki v tem procesu sodelujejo. Slednje lahko dosežemo z uporabo specifičnih kemotaktičnih in rastnih signalov, ki jih posredujejo predvsem topni biogeni dejavniki. Prav tako je za učinkovito celjenje in regeneracijo bistvena zadostna prekrvljenost poškodovanega mesta, kar je naloga angiogenih (žilnih) rastnih dejavnikov, npr. rastnega dejavnika žilnega endotelija VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (7).

Za tkivno-inženirsko pripravo bio-zoba moramo najprej zagotoviti dovolj velik vir ustreznih matičnih celic, ki bi morale načeloma biti dostopne tudi v zobnem in obzobnem tkivu starejših bolnikov. Takšne celice je nato potrebno namnožiti *in vitro* ter jim zagotoviti ustrezno nosilno ogrodje in mikrookolje, ki bosta omogočala nadzorovan tridimenzionalni razvoj bio-zoba v pogojih *ex vivo*. Novonastalo zobno tkivo mora imeti sposobnost za nadaljno rast po implantaciji, preko katere bo prišlo do tvorbe stabilnega kompleksa korenina-parodontalni aparat ter s tem do pravega izraščanja zoba na točno določenem mestu v čeljusti. Zato je zelo pomemben tudi natančen nadzor oblike in velikosti takega novo nastajajočega zoba (17).

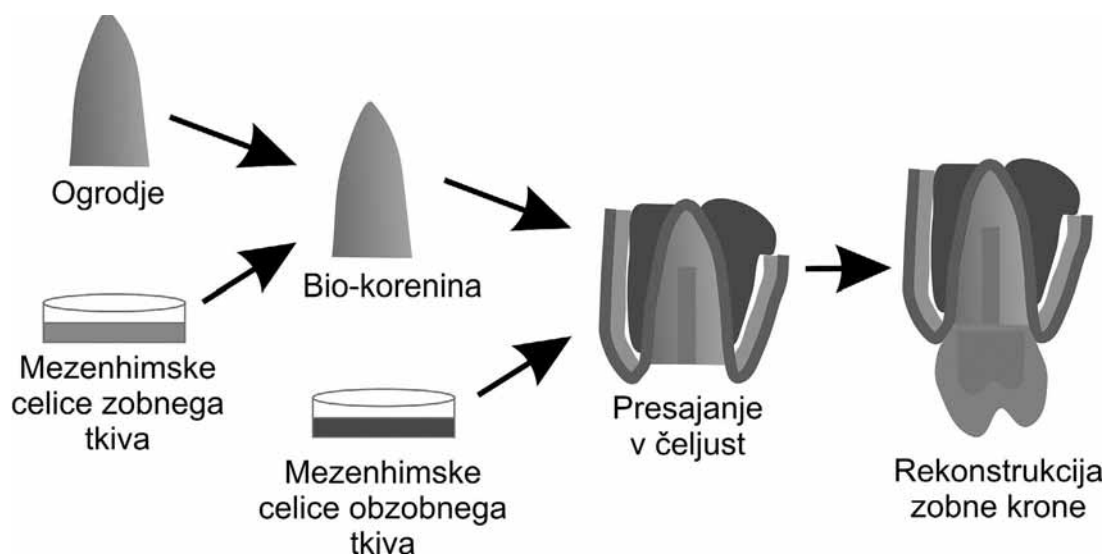
V številnih eksperimentih razvoja bio-zoba so v živalskih modelih in v modelih *in vitro* preizkusili več različnih pristopov. Eden od njih temelji na rekombinaciji epitelijskih in mezenhimskih komponent, interakcije med njimi pa lahko vzpostavijo na relaciji tkivo-tkivo, tkivo-celica ali celica-celica (20). Poleg naravnih, zelo pogosto uporabljajo tudi umetna nosilna ogrodja, ki posnemajo naravno tkivno okolje oziroma

medceličnino, in sicer z zagotavljanjem ustreznih lastnosti, kot so: biokompatibilnost, mehanska trdnost, sposobnost celične adhezije in proliferacije ter nadzorovana biološka razgradnja nosilnega materiala (21). V ta namen uporabljajo hidroksiapatit, kolagen, hitosan, ter polimere, pripravljene na osnovi glikolne in/ali mlečne kisline. Eden izmed možnih pristopov je tudi sočasna uporaba matičnih celic, naseljenih na tridimenzionalne nosilce z dodanimi rastnimi dejavniki, naprimer: fibroblastnim rastnim dejavnikom FGF (Fibroblast Growth Factor), kostnim morfogenetnim proteinom BMP (Bone Morphogenetic Protein) in rastnim dejavnikom iz trombocitov PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), ki vsi pospešujejo uspešno transplantacijo in diferenciacijo matičnih celic (22). Žal pa se pri uporabi nosilcev, predvsem tistih, izdelanih iz umetnih materialov, še vedno srečujemo s številnimi pomanjkljivostimi, saj nekateri med njimi med biološko razgradnjo sproščajo kisle produkte, ki povzročajo neželene učinke na zobnem tkivu, lahko pa izzovejo tudi neželene imunске reakcije. Poleg tega nosilci omejujejo signalizacijo med celicami in zunajceličnino ter dostavo hranilnih snovi in odstranjevanje presnovkov, kar oboje ovira pravilno diferenciacijo in morfogenezo zobnega tkiva (17). Ena izmed možnih rešitev je uporaba takšnih nosilnih materialov, ki vsebujejo naravne proteine zunajceličnine (21). Alternativen pristop za pripravo bio-zoba predstavlja uporaba celičnega skupka, v katerem se v veliki gostoti nahajajo različne matične celice, predhodno osamljene iz zobnih in obzobnih tkiv, med katerimi lahko intenzivno potekajo naravne medcelične interakcije ter adhezijski in migracijski procesi (17). Skupki raznovrstnih zobnih celic v takšni prostorsko omejeni tridimenzionalni kulturi imajo sposobnost izločanja nove zunajceličnine, ki nato predstavlja naravno ogrodje zoba (23). Eden od možnih načinov izdelave bio-zoba temelji na himernem inženirstvu, ko z uporabo raznovrstnih epitelijskih in mezenhimskih matičnih celic različnih darovalcev zagotovimo njihovo hitro pomnoževanje in rekonstituiranje v himerni tkivni konstrukt (17). Preizkušajo tudi postopke, ki temeljijo na genskem inženirstvu in pri katerih izvedejo dostavo specifičnih

diferencijskih genov v sprejemne celice tako, da se te nato preobrazijo v zelene celične linije (24). Vse opisane metode lahko medsebojno kombiniramo oziroma jih na različne načine dopolnjujemo. Takšen primer je naprimer naselitev mezenhimskih matičnih celic iz zobne papile na umetno, biorazgradljivo nosilno ogrodje, pri čemer nastane bio – zobna korenina, tej pa nato dodajo še matične celice parodontalnega ligamenta in pripravek vsadijo v čeljust, čemur sledi še rekonstruiranje zobne krone (25).

## 6 Izzivi prihodnosti in ovire sedanjosti

Čeprav so novejši izsledki raziskav na področju regenerativnega zobozdravstva zelo obetavni, pa bo za njihovo klinično uporabo potrebno premostiti kar nekaj ključnih ovir. Ena od teh je imunogenost alogenskih zobnih matičnih celic na imunski sistem prejemnika oziroma ugotavljanje pod kakšnimi pogoji le-te ne bi mogle več izzvati škodljivih imunskih odzivov, ki lahko pripeljejo do zavrnitve presadka (8). Znano je dejstvo, da MSC, osamljene iz kostnega mozga alogenskega darovalca aktivno zavirajo alogenske imunске odzive prejemnika, vendar pa sta pri njihovi uporabi nujno potrebna skrben nadzor in preprečevanje morebitnih neželenih celičnih transformacij. V nekaterih raziskavah so namreč ugotovili, da so lahko posamezne MSC genetsko nestabilne, to pa pomeni, da bi se lahko preobrazile tako, da bi v prejemniku nastalo tumorsko tkivo (26). Poleg samih matičnih celic igrajo v tkivnem inženirstvu izjemno pomembno vlogo tudi številne specifične signalne molekule in rastni dejavniki, zato moramo v procesu odontogeneze *in vitro* zagotoviti njihovo prisotnost ter tako omogočiti ustrezno uravnavanje zaporednih razvojnih stopenj na novo nastajajočega zobnega tkiva (17). Dodatna težava, s katero se soočamo pri pripravi bio-zoba, je zagotavljanje ustrezne oblike in velikosti takega tkivno-inženirskega pripravka. Glede na to, da je v človeškem zobovju prisotnih najmanj 8 različnih oblik zob, je nujno



Slika 2: Primer tkivno-inženirske priprave bio-zoba s kombinacijo več različnih postopkov (17, 25).

Figure 2: An example of tooth tissue engineering, combining different approaches (17, 25).

potrebno, da zaradi funkcionalnih in estetskih razlogov oba omenjena parametra uspešno nadzorujemo in obvladujemo. V ta namen lahko uporabimo kombinacijo mezenhimskih in epitelijskih matičnih celic, v točno določenem razmerju ali pa skušamo na to vplivati z različnimi nosilnimi ogrodji, ki pa se žal še vedno prevečkrat izkažejo kot za neustrezna (27, 28). Zelo pomembna sta tudi položaj in celovita vgradnja oziroma integracija bio-zoba v čeljust, za kar moramo zagotoviti ustrezno prekrvljenost tkiva in takšno mikrookolje, ki bo omogočalo popolno vraščanje in nadaljnji razvoj implantata. Ena od privlačnih možnosti bi bila priprava takšnega bio-zoba, ki bi imel sposobnost samostojnega izraščanja na točno določenem mestu v čeljusti, kar pa je trenutno izjemno zahtevna naloga, ki naj bi bila odvisna od priprave in uporabe zobnega mešička (29). Omejena dostopnost in število matičnih celic, prisotnih v zobnih in obzobnih tkivih odraslih ljudi, predstavljata pomembni oviri pri njihovi uporabi. Njihova osamitev je namreč možna le v točno določeni fazi razvoja zobnega tkiva, njihovo celokupno število pa se s staranjem izrazito zmanjšuje, zato bo v prihodnosti potrebno najti alternativne vire primernih matičnih celic oziroma razviti tehnike učinkovitega gojenja majhnega izhodnega števila teh dragocenih gradnikov človeškega organizma (1, 7).

## 7 Sklep

Na področju regenerativne medicine potekajo intenzivne raziskave različnih vrst matičnih celic ter razvoj z njihovo uporabo povezanih terapij. Tudi v okviru zobozdravstva se matične celice sicer počasi, a zanesljivo uveljavljajo kot privlačna alternativa obstoječim reparativnim metodam, ki trenutno še vedno temeljijo na uporabi umetnih vsadkov. Njihovo potencialno uporabnost podpirajo nova spoznanja na področju razumevanja zapletenih procesov razvoja in regeneracije zobnega tkiva ter razvoj tkivnega inženirstva z možnostjo uporabe naravnih nosilnih materialov za pripravo tkivnih nadomestkov. Kljub temu pa moramo biti glede uporabe različnih matičnih celic in z njimi povezanih pričakovanj še vedno previdni, saj je izdelava bio-zob zaradi številnih tehničnih omejitev in trenutnih ovir še precej daleč od rutinske klinične prakse. Seveda pa se lahko že v tem trenutku strinjamo, da omenjene celice predstavljajo izjemno obetavno orodje za izboljšanje kakovosti človeškega življenja v bližnji prihodnosti. Z nekaj optimizma lahko torej pričakujemo, da bosta vse boljše poznavanje in obvladovanje njihovih lastnosti razmeroma kmalu privedla do pomembnega preboja tudi na tem področju.

## 8 Literatura

1. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 113-118.
2. Zeidán-Chuliá F, Noda M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool box. *Eur J Dent* 2009; 3: 240-249.
3. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119: 2204-2213.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97: 13625-13630.
5. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Gehron Robey P, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
6. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 11-21.
7. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paed Dent* 2009; 19: 61-70.
8. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.
9. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-199.
10. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006; 12: 2813-2823.
11. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807-5812.
12. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
13. Morsczeck C, Moehl C, Gotz W, Heredia A, Schaffer TE, Eckstein N, Sippel C, Hoffman KH. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int* 2005a; 50: 255-258.
14. Netter F.H. Atlas anatomije človeka. Data status, Beograd 2005.
15. Hacking SA, Khademhosseini Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *J Dent Res* 2009; 88(5): 409-421.
16. Morsczeck C, Frerich B, Driemel O. Dental stem cell patents. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2009; 3: 39-43.
17. Yu J, Shi J, Jin Y. Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Eng* 2008; 14(3): 307-319.
18. D'Aquino R, Pappaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 21-26.
19. Kaldtschmidt B, Widera D, Grimm WD, Kaldtschmidt C. WO2008031451A1 (2008).
20. Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng* 2006; 12(8): 2069-2075.
21. Taylor PM. Biological matrices and bionanotechnology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 362: 1313-1320.
22. Bluteau G, Luder H-U, De Bari C, Mitsiadis T. A. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 16: 1-9.
23. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004; 83: 590-595.
24. Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (1) overview and practical considerations. *Head Face Med* 2006; 2: 12.
25. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *PLoS ONE* 2006; 1: e79.
26. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-3039.
27. Yu JH, Jin F, Deng ZH, Li YF, Tang L, Shi JN, Jin Y. Epithelial-mesenchymal cell ratios can determine the crown morphogenesis of dental pulp stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(3): 472-482.
28. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; 81(10), 695-700.
29. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol.* 1980; 9(4): 189-200.



# Novosti iz sveta farmacije

## Evropska agencija za zdravila in Ameriška agencija za hrano in zdravila pripravljata pilotni program sočasne evaluacije vlog za t.i. »Quality by design«

dr. Petra Slanc Može

Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) sta v fazi začetka triletnega, pilotnega programa, ki bo omogočal sočasno evaluacijo relevantnih podatkovnih komponent kakovosti poznanih pod t.i. »Quality by design« (QbD), ki so predmet novih vlog na obeh agencijah hkrati. Začetek pilotnega programa je bil načrtovan za 1. april 2011.

QbD v farmaciji vključuje sistematično in znanstveno utemeljen pristop k razvoju in proizvodnji zdravil z namenom zagotoviti čim boljšo kakovost izdelkov. Številne smernice in dokumenti v smislu »vprašanja in odgovori« so bili na omenjeno temo izoblikovani iz strani *International Conference on Harmonisation* (ICH) z namenom čim lažje implementacije QbD v prakso. Ob upoštevanju globalne perspektive za farmacevtsko proizvodnjo in z namenom usklajenega izvajanja konceptov, ki jih je postavila ICH, so se strokovnjaki iz obeh agencij zedinili, da bi morali izmenjati menja na realnih vlogah. V okviru omenjenega pilotnega programa, bosta obe agenciji neodvisno ocenili posamezne dele vlog, primernih za QbD (npr. razvoj). Po pregledu pa se bosta nato posvetovali z namenom, skupnega seznama vprašanj in usklajenega ocenjevanja odgovorov vlagateljev.

V Evropi bodo predmet programa nove vloge za pridobitev dovoljenja za promet, spremembe tip II pa bodo vključene na osnovi posameznega primera. V Ameriki pa bodo v program vključene nove vloge za odobritev (NDA) oz. dopolnitve pred odobritvijo (*prior-approval supplements* (sNDA)). Pilotni program bo zaenkrat zajemal le kemijske entitete. Kljub temu pa bo samo sodelovanje in izoblikovanje skupnega pogleda na izvajanje QbD segal tudi na druga področja. Sodelovanje v programu je iz strani vlagateljev zaenkrat prostovoljno. Predviden zaključek pilotnega programa je načrtovan za 31. marca 2014.

Vir: EMA Press release 16/03/2011

## Uporaba medicinskih pripravkov naravnega izvora, ki vsebujejo tujon

dr. Petra Slanc Može

Med pregledom EMA (Evropska agencija za zdravila) monografije pravega pelina - *Artemisia absinthium* L. (EMA/HMPC/234463/2008) in žajblja *Salvia officinalis* L. (EMA/HMPC/331653/2008), je postalo očitno,

da se vsi ocenjevalci niso strinjali z oceno tveganja uporabe pripravkov, ki so vsebovali zdravilne rastline, ki vsebujejo tujon. Tujon je tradicionalno obravnavan kot hud nevrotoksin. Mehanizem delovanja je vezan na modulacijo GABA-receptorjev. Tujon se v rastlinah pojavlja kot mešanica dveh oblik  $\alpha$  in  $\beta$ . Od obeh oblik je  $\alpha$ -oblika 2 do 3-krat bolj aktivna v primerjavi z obliko  $\beta$ . Tujon je prisoten v eteričnih oljih številnih zdravilnih rastlin (Preglednica spodaj). Prisoten pa je tudi v vrstah *Juniperus* spp in *Cedrus* spp, vendar pa podatkov o vsebnosti še ni navoljo.

### Vsebnost tujona v zdravilnih rastlinah in njihovih eteričnih oljih (objavljeno iz strani The Scientific Committee on Food, 2002)

Vsebnost tujona v eteričnih oljih (%)

Eterično olje	$\alpha$ -tujon	$\beta$ -tujon	Skupaj ( $\alpha+\beta$ )	Referenca
Ameriški klek ( <i>Thuja occidentalis</i> )	55,0	9,5	64,5	Pinto-Scognamiglio, 1967
Žajbelj ( <i>Salvia officinalis</i> )	28,3	14,5	42,5	Pinto-Scognamiglio, 1967
	ND	ND	55,2	Farag et al., 1986
Navadni vratič ( <i>Tanacetum vulgare</i> )	19,4	58,0	77,4	Pinto-Scognamiglio, 1967
Pelin ( <i>Artemisia absinthium</i> )	0,53-1,22	17,5-42,3	ND	Lawrence, 1995
Timijan ( <i>Thymus vulgaris</i> )	ND	ND	0,2	Farag et al., 1986
Rožmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	ND	ND	4,2	Farag et al., 1986
ND-ne določeno				

Jabolko spora ocenjevalcev je bila določitev zgornje meje dnevnega vnosa, ki je bila v primeru pelina določena na 3,5 mg/osebo, pri žajblju pa 5,0 mg/osebo pri dvotedenski uporabi. Po pregledu vseh do sedaj objavljenih študijah je preliminarno uradno stališče EMA da:

Študije na živalskih modelih popisujejo zastrupitve in da so relevantne tudi za ljudi, vendar pa je odnos med odmerkom in učinkom negotov. Glede na študije nizki odmerki (1,5-3,85 mg) nimajo oziroma imajo malo izražen učinek, v nasprotju z višjimi odmerki (15 mg), ki imajo očitni vpliv na centralno živčevje. Priporočeno je, da se vsebnost tujona v pripravkih jasno določi in da odmerki med 3-7 mg/dan ne predstavljajo večjega tveganja. Za višje koncentracije pa je potrebna določitev/ocenitev tveganja za vsak pripravek posebej. Dnevni vnos tujona s hrano do 1 mg v povprečju naj ne bi predstavljal povečanje tveganja. V primeru dodatnega vnosa tujona pri uporabi pripravkov z zdravilnimi rastlinami, ki vsebujejo tujon pa je bil dnevni dovoljeni vnos za slednje znižan na 6 mg/dan na račun možnega vnosa s hrano.

Viri:

- Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone - 27 January 2011
- EMA/HMPC/732886/2010, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)
- SCF (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out162\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out162_en.pdf)

## Roflumilast, novo zdravilo za zdravljenje kronične obstruktivne pljučne bolezni, tudi v ZDA

Prof. dr. Borut Štrukelj

Kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) je bolezen dihal, za katero je značilen vztrajen kašelj, omejen pretok zraka v dihalnih poteh in povečano nastajanje sluzi. Prizadane v večini moške, belce, s starostjo bolezen napreduje, vzrok pa je največkrat kajenje. Razvije se tudi pri bolnikih, ki so bili kronično v stiku z drobnimi praškastimi delci. Glede na pogostnost je KOPB peti najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu. Pri določeni podskupini bolnikov s KOPB so zasledili pomanjkanje inhibitorjev alfa-1 proteaze, ki delujejo zaščitno na razgradnjo beljakovin v pljuči. Čeprav si simptomatsko pri boleznih lahko pomagamo z bronhodilatatorji, pa osnovnega vzroka ne odpravimo. En od novejših pristopov k lažšanju bronhialnih težav pri KOPB je uvedba zdravilne protivnetne učinkovine roflumilast, ki jo uvrščamo med zaviralce fosfodiesteraz tipa 4 (PDE-4). Učinkovit je pri zmanjševanju napadov kašlja in pri zmanjševanju nastanka sluzi. Uporabljali bi ga naj za napredovano KOPB, ko se prostornina izdihanega zraka kljub uporabi bronhodilatatorjev poveča manj kot 50% pričakovane vrednosti. Ne smemo ga predpisovati otrokom in mladostnikom, kakor tudi ne bolnikom z obširnejšo jetrno okvaro. Med neželenimi učinki so najpogostejši izguba telesne mase, zato se priporoča bolnikom, ki jemljejo roflumilast, kontrolo telesne mase. Prav tako se lahko nekoliko poveča nespečnost, nevoljnost in depresija, predvsem velja povečana pozornost pri bolnikih z samomorilskimi nagnjenji. V obširni klinični študiji na 1500 bolnikih nad štiridesetim letom so ugotovili njegovo učinkovitost in varnost, zato ga je junija 2010 odobrila EMA, marca 2011 pa tudi FDA.

Vir: FDA drugs: For Immediate Release: March 1, 2011

## Za grenak okus v ustih niso vedno kriva le zdravila!

Prof. dr. Borut Štrukelj

V lekarnah se bolniki velikokrat pritožujejo, da imajo po določenih zdravilih v ustih grenak okus, ki se pri nekaterih kaže tudi v grenkovinski različici. Na osnovi preiskave, ki jo je pričela FDA, pa kaže, da so v veliko primerih za grenak okus odgovorna semena pinije (*Pinus pinea L.*). FDA je v zadnjih dveh letih dobila kar 54 pritožb uporabnikov semen pinije, zaradi nastanka izrazito grenkega, tudi kovinskega okusa v ustih. Neprijeten okus, ki so ga poimenovali »pinjolina usta«, se pojavi od 12 do 48 ur po zaužitju semen pinij in traja nekaj dni, popolnoma pa izzveni v tednu do dveh in ne pušča nobenega kliničnega neželenega učinka. V tem času je zaradi grenkega okusa tudi apetit nekoliko manjši. Grenkega okusa se ne moremo znebiti z nobeno hrano ali pijačo. Na osnovi pritožb je FDA pričela z obširno preiskavo, ki še traja, znanih pa je nekaj preliminarnih rezultatov, ki nakazujejo, da se neželen okus pojavi, če uživamo sveža semena, v sladica, solatah ali polivkah. Ker se neželeni učinki kažejo predvsem pri semenih pinij, uvoženih iz Kitajske, se pojavlja sum, da je za grenak okus mogoče odgovorna glivica, ki se rada naseli na semenih in je največkrat prisotna prav v pošiljkah iz Kitajske.

Vir: FDA Food Safety 14.3.2011

## Bevacizumab za zdravljenje napredovanega raka dojke le skupaj s paklitakselom

Prof. dr. Borut Štrukelj

Bevacizumab je biološko zdravilo iz skupine monoklonskih protiteles, ki se uporablja skupaj z ostalimi zdravili proti napredovanemu raku debelega črevesa, pljuč, ledvic ali prsi. Doslej se je bevacizumab uporabljal pri metastazirajočem raku skupaj z paklitakselom ali docetakselom. Bevacizumab je usmerjen proti proteinu, ki pospešuje razrast žilnega sistema (endotelijski vaskularni rastni dejavnik, VEGF). Znano namreč je, da vsidranju metastaze sledi hitra in obširna vaskularizacija, ki omogoča hiter razrast sekundarnega rakavega tkiva. Z blokado dejavnika VEGF se rakavo tkivo ne more oskrbovati z krvjo in napredovanje rasti je bistveno manjše. Leta 2009 je farmacevtska družba, ki je nosilec dovoljenja za promet za zdravilo bevacizumab, prosila za razširitev indikacije za zdravljenje metastazirajočega raka dojke, v kombinaciji s kapecitabinom. Pri predložitvi dokumentacije smo na delovni skupini za biološka zdravila pri EMA ugotovili, da je bil del študije delan tudi z bevacizumabom v kombinaciji s taksani (paklitakselom in docetakselom). Medtem, ko se je izkazala kombinacija s paklitakselom smiselna in je pozitivno vplivala na preživetje bolnic, pa se je kombinacija z docetakselom ali kapecitabinom izkazala kot statistično neznačilna, zato je Odbor za humana zdravila (CHMP) pri EMA odobril za zdravljenje metastazirajoč rak dojke le bevacizumab z paklitakselom.

Vir: EMA/CHMP Press release December 2010

# Novi doktorji znanosti v letu 2010

**dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.**

## **PROUČEVANJE VPLIVA MOTENJ V PRESNOVI GALAKTOZE IN LAKTAZNE PERSISTENCE NA RAZVOJ RAKA JAJČNIKOV**

**Mentorica: prof. dr. Jana Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.**

*dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.* je v svoji doktorski disertaciji raziskala več dejavnikov, ki lahko prispevajo k nastanku raka jajčnikov. Skupni imenovalec teh dejavnikov je povečana količina galaktoze v organizmu:

- zaradi okvar v encimskem sistemu za presnovo galaktoze
- zaradi povečanega vnosa galaktoze ob ohranjeni aktivnosti intestinalnelaktaze ter
- zaradi uživanja večjih količin mleka in mlečnih izdelkov.

Pot za preverjanje domneve, ki si jo je *dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.* izbrala, temelji na najsodobnejših dognanjih tujih raziskovalcev, kakor tudi na izsledkih, do katerih je prišla skupaj z raziskovalci v raziskovalni skupini, v kateri raziskuje genetiko galaktozemije in z njo povezanih bolezni.

Omenjene dejavnike tveganjaje proučevala pri 60 bolnicah z rakom jajčnikov in 79 zdravih preiskovankah. V obeh skupinah je določila povprečno aktivnost GALT in GALE ter pogostost glavnih mutacij v genu za GALT (N314D, Q188R, K285N, intronsko mutacijo IVS5-24G>A in tiho mutacijo L218L) in polimorfizem C/T<sub>-13910</sub> v bližini gena za LPH. Pri preiskovankah z znižano aktivnostjo GALT ali GALE je z DNA sekvenčno analizo iskala morebitne še neodkrita mutacije v obeh genih. Pogostost uživanja mleka in mlečnih izdelkov je pri preiskovankah ugotavljala z vprašalnikom.

Ugotovila je, da sta bili povprečni aktivnosti GALT in GALE v skupini bolnic statistično značilno nižji glede nakontrolno skupino. V genu za

GALT ni odkrila novih mutacij. Pogostosti mutacij v genu za GALT in polimorfizma C/T<sub>-13910</sub> v bližini gena za LPH se med skupinama niso razlikovale. V genu za GALE je odkrila naslednje 11 do zdaj še neodkritih mutacij: eno mutacijo v 5' UTR (g.404C>T), 4 intronske mutacije (IVS4+168C>A, IVS4+186G>C, IVS6+118C>G in IVS10+13G>A), 4 mutacije, ki spremenijo aminokislinsko zaporedje v encimu (A84S, A89S, A254T in S312N) in dve mutaciji v 3'UTR (g.5034G>A in g.5185-5187insTAA). Vse odkrite mutacije bi lahko bile vzrok za ugotovljene znižane aktivnosti encima GALE. Bolnice z rakom jajčnikom so statistično značilno pogosteje uživale polnomastno mleko, kot preiskovanke v kontrolni skupini.

Prišla je do zaključka, da tveganje za razvoj raka jajčnikov povečujejo okvare encimov GALT in GALE v presnovi galaktoze ter pogosto uživanje polnomastnega mleka, še posebej v skupini oseb z ohranjeno visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi.

Z ustreznimi preventivnimi ukrepi (opustitev uživanja mleka in mlečnih izdelkov ter druge, z laktozo oziroma galaktozo bogate hrane), bi lahko pri ženskah z ugotovljeno nizko aktivnostjo encimov GALT in/ali GALE in ohranjeno visoko aktivnostjo laktaze, zmanjšali tveganje za nastanek raka jajčnikov. Poleg navedenega bi bili rezultati teh raziskav ter razvite in preverjene eksperimentalne metode lahko tudi temelj za uvedbo presejalnih in potrditvenih testov novorojencev za GALT in GALE galaktozemijo tudi v Sloveniji. Titesti se že desetletja uspešno izvajajo v zahodnoevropskih državah in v ZDA.

**dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.**

## **RAZVOJ METOD ZA ACILIRANJE PROTEINOV IN NJIHOVO ANALIZO TER VREDNOTENJE NJIHOVIH BIOLOŠKIH LASTNOSTI**

**Mentor: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.**

*dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.* je doktorsko disertacijo napisala z neposredno vključitvijo 9 objavljenih znanstvenih člankov.

V prvem delu disertacije je v celice dostavljala proteine, ki bi lahko služili kot zdravilne učinkovine. Kot modelni protein je izbrala cistatin,

njegovo vstopanje v celice pa je povečevala s pripenjanjem različno dolgih maščobnih kislin. V ta namen je razvila originalno metodo, pri kateri je uporabila in situ nastalo suspenzijo, s čimer je premostila težavo, da so proteini topni predvsem v vodnih medijih, derivati

maščobnih kislin pa predvsem v nevodnih medijih. Na celičnih kulturah je dokazala, da acilirancistatin učinkovito vstopa v celice, medtem ko neaciliran praktično ne vstopa vanje.

V drugem delu disertacije se je *dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.* posvetila kapilarni elektroforezi, kot analitski metodi za karakterizacijo

aciliranegacistatina. Ker je to zaradi omejene topnosti v vodi težaven vzorec, se je dela lotila s poglobljenim študijem različnih drugih modelnih vzorcev. S tem je, poleg doseganja prvotno zastavljenega cilja, razvila še vrsto metod, ki so že same po sebi uporabne za ugotavljanje npr. antibiotikov v živalskih krmilih, flavonoidov v rmanu in proteinov v urinu.

**dr. Dominik Gaser, mag. farm.**

## **NAČRTOVANJE IN RAZVOJ PEPTIDNIH LIGANDOV LIPAZ Z METODO BAKTERIOFAGNEGA PRIKAZA**

**Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.**

**Somentorica: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.**

*dr. Dominik Gaser, mag. farm.* je svoje doktorsko delo posvetil načrtovanju in razvoju peptidnih ligandov osrednjega encima v presnovi lipidov, lipoprotein lipaze, ki je posredno ali neposredno vpletena v nekatera patofiziološka stanja, kot so hipertrigliceridemija, hilomikronemija, debelost, sladkorna bolezen in druga. Pri tem je uporabil tehnologijo bioloških peptidnih knjižnic, in sicer knjižnici naključnih cikličnih in linearnih peptidov, izraženih na površini bakteriofagov. Na osnovi afinitete do lipoprotein lipaze je izoliral nabor bakteriofagnih klonov in njihove vezavne lastnosti ovrednotil z encimsko imunskimi testi in površinsko plazmonsko resonanco. Proces selekcije je usmeril tako, da je iskal na bakteriofagih predstavljene peptide, ki onemogočijo interakcijo med lipoprotein lipazo in njenimi

endogenimi ligandipoliproteini C1, C2 in C3. Izbranim bakteriofagnim klonom je določil aminokislinska zaporedja peptidov, ki so predstavljeni na njihovi površini. Pri primerjavi peptidnih zaporedij so se pojavili ponavljajoči motivi, ki so pokazatelj specifičnosti vezave na tarčno molekulo in so služili za načrtovanje sinteznih peptidov. Največjo afiniteto do encima je določil peptidu z motivom levcin-lizin-izolevcin-triptofan.

Svoje izsledke je *dr. Dominik Gaser, mag. farm.* natančno opisal v obširnem doktorskem delu, rezultate pa objavil tudi v dveh znanstvenih prispevkih. Njegovi dosežki predstavljajo izviren prispevek k znanosti na področju razvoja učinkovin za zdravljenje številnih boleznih sodobnega sveta, povezanih s presnovo maščob.

**dr. Alenka Zvonar, mag.farm.**

## **OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA IZDELAVE TER VREDNOTENJE MIKROKAPSUL S SAMOMIKROEMULGIRAJOČIM JEDROM**

**Mentor: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.**

Doktorska disertacija *dr. Alenke Zvonar, mag. farm.* sodi na področje farmacevtske tehnologije. Glavni cilj naloge je bil razvoj in optimizacija tehnologije izdelave mikrokapsul s samo(mikro)emulgirajočimi jedri za izboljšanje raztapljanja in biofarmacevtskih lastnosti izbranih modelnih učinkovin. Nizka topnost učinkovin je pogosto povezana z nizko in zelo variabilno biološko uporabnostjo, kar omejuje možnost peroralne aplikacije. Med novejšje pristope za reševanje tega problema sodijo samo(mikro)emulgirajoči lipidni sistemi, sestavljeni iz zmesi lipofilnih in površinsko aktivnih snovi, ki pod fiziološkimi pogoji *in vivo* spontano tvorijo (mikro)emulzije. Doktorska disertacija sodi po aktualnosti med področja, ki so danes v svetu predmet intenzivnih raziskav in bodo glede na število učinkovin z nizko topnostjo tudi v prihodnje eden ključnih stebrov razvoja fdarmacevtskih dostavnih sistemov.

*dr. Alenka Zvonar, mag. farm.* je v S(M)ES vgradila dve modelni učinkovini – celekoksib in furosemid. Ovrednotila je njihovo solubilizacijsko kapaciteto, kinetiko sproščanja ter preučevala vpliv na permeabilnostfurosemida skozi različne segmente tankega črevesja podgane in monoslojCaco-2 celične linije. Za ugotovljenopovečano permeabilnost predpostavlja, da je posledica manjših reverzibilnih sprememb tesnih stikov, predvsem pa povečane fluidnosti membran ter inhibicijesekretornih prenašalcev (P-glikoprotein in MRP2).

Komercialno dostopni samomikroemulgirajoči sistemi so običajno v obliki tekočin ali mehkih želatinskih kapsul. Ker se pri izdelavi slednjih soočamo s številnimi težavami (visoki proizvodni stroški in nekompatibilnost nekaterih sestavin z ovojnico kapsul) intenzivno iščemo nove tehnološke rešitve za razvoj trdnih oblik, ki bi združevale tako prednosti lipidnih S(M)ES (povečanje topnosti in permeabilnosti)

kot trdnih farmacevtskih oblik, kar bi močno povečalo uporabnost S(M)ES kot peroralnih dostavnih sistemov tudi v industrijskem merilu. Eno od možnih rešitev predstavlja mikrokapsuliranje tekočega S(M)ES jedra v polimerno ogrodje iz Ca-alginata in/ali pektinata z metodo koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane, kar predstavlja glavno raziskovalnega dela *dr. Alenke Zvonar, mag. farm.*

Glede na učinkovitost vgradnje, morfološke lastnosti mikrokapsul ter profil sproščanja furosemda iz mikrokapsul je identificirala in optimizirala kritične procesne parametre kot tudi sestavo S(M)ES jedra in ovojnice. Svoje dosedanje raziskovalno delo je doktorandka že objavila v petih člankih; od tega v štirih z dejavnikom vpliva, še dva pa sta v postopku objave. Je soavtorica patentne prijave.

## **dr. Urban Švajger, mag. farm.**

### **INDUKCIJA TOLEROGENIH DENDRITIČNIH CELIC TER REGULATORNIH LIMFOCITOV T IN VITRO**

**Mentor: doc. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.**

*dr. Urban Švajger, mag. farm.* je svoje doktorsko delo posvetil odkrivanju in raziskovanju novih načinov priprave tolerogenih dendritičnih celic (DC) iz človeških monocitov *in vitro*. Pri tem mu je uspelo pojasniti tudi nekatere ključne mehanizme, ki vplivajo na nastanek tolerance DC, izzvane na različne načine med njihovo diferenciacijo. Med drugim je ugotovil:

- da med različnimi nesteroidnimi protivnetnimi učinkovinami in antioksidanti lahko najdemo take, ki omogočajo pripravo stabilnih tolerogenih DC *in vitro*, s katerimi lahko nato v laboratorijskih pogojih povzročimo nastanek imunosupresivnih regulatornih limfocitov Tr1;
- da cisteinskaproteazakatepsin X pomembno vpliva na dozorevanje DC *in vitro*, s tem pa, glede na njeno aktivacijo ali zaviranje, tudi na njihove imunostimulatorne ali tolerogene funkcijske lastnosti;
- da z aktivacijo lektinskega receptorja DC-SIGN, ki je izražen le na DC, lahko že med diferenciacijo človeških monocitov *in vitro*, izzovemo nastanek DC s tolerogenimi lastnostmi;

da interferon- v visokih odmerkih povzroči pridobitev tolerogenih lastnosti DC.

*dr. Urban Švajger, mag. farm.* je izsledke svojega doktorskega dela smiselno uredil v 5 poglavij, ki temeljijo na 3 že objavljenih znanstvenih prispevkih (SCI) in 2, poslanih v recenzijo. Objavljeni rezultati njegovih raziskav na področju celične imunologije so mednarodno pomembni, saj so bili v kratkem času že citirani v ugledni strokovni literaturi. Njegovi dosežki predstavljajo izviren prispevek k znanosti na področju priprave tolerogenih imunskih celic *in vitro* ter k razumevanju in izkoriščanju signalizacijskih mehanizmov, ki spremljajo tolerogeno pretvorbo DC. S tem je Urban Švajger prispeval pomemben delež k znanju, ki bo v prihodnosti omogočilo pripravo in uporabo tovrstnih celic za terapijo bolnikov z avtoimunskimi boleznimi in drugimi patološkimi stanji.

## **dr. Andrej Dolenc, mag. farm.**

### **PREDNOSTI NANOOBLOG IN NANODELCEV V NAČRTOVNAJU SODOBNIH SISTEMOV ZA DOSTAVO UČINKOVIN**

**Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.**

Disertacija *dr. Andreja Dolenca, mag. farm.* sodi na področje nanotehnologije in osvetljuje nekatere ključne principe za spremembo površinskih lastnosti oblagancev in pripravo nanodelcev za peroralno dajanje težko topnih učinkovin. Doktorand se je usmeril v inovativno oblikovanje nanooblog in nanodelcev same učinkovine z različnimi tehnologijami (emulgiranje inhomogeniziranje z visokim tlakom ali z ultrazvokom, sušenje z liofiliziranjem in razprševanjem). Materiali, ki jih je uporabljal v raziskovalnem delu so aktualni in vključujejo težko topne učinkovine (ibuprofen, celekoksib in orlistat), polielektrolita (hitosan, alginat), stabilizatorje (PVP, Tween 80, SDS), polnila (karboksimetil celulozo, HPMC, laktozo) in druge. Nekatere izmed njih v te namene

doslej še niso bile raziskovane. Za vrednotenje je uporabljal sodobne analizne metode (SEM, AFM, DSC, X-RD, PCS, LD, HPLC idr.). V zagovoru disertacije je obranil teoretične osnove nanoplastenja s polielektroliti (nanooblaganja) in priprave nanosuspenzij učinkovin v obliki petih sklopov, in sicer:

- Razvoj polielektrolitne obloge na mikro- in nanodelcih učinkovine
- Z nanooblaganjem do izboljšanja biokompatibilnosti vsadkov
- Izdelava nanosuspenzij celekoksiba in tablet ter prednosti
- Načrtovanje nanodelcev orlistata in ugotavljanje hitrosti raztapljanja in inhibicije lipaz *in vitro*

- Vpliv teksture nabrekajočega polimernega ogrodja na sproščanje učinkovine iz tablet.

*dr. Andrej Dolenc, mag. farm.* je med študijem razvil kompetence, ki mu bodo omogočale uspešno načrtovanje in izvajanje raziskovalnih nalog tudi v kompleksnih situacijah. Naj navedem le nekatere: samostojnost, kreativnost, vztrajnost in delavnost. Ni se zbal raziskovalnegadela na aplikativnih projektih. Objavil je pet člankov, tudi

v revijah zdejavnikom vpliva, predstavil raziskovalno delo na šestih mednarodnih konferencah, delal timsko pri treh domačih in dveh tujih projektih in vodil vaje iz farmacevtske in industrijske tehnologije. Po podatkih *ScienceDirect Top 25* podatkovne baze je bil članek s celekoksibom pol letana osmem mestu med najboljiskanimi članki v *International Journal of Pharmaceutics*. *dr. Andrej Dolenc, mag. farm.* se je takoj po doktoratu zaposlil v Lek farmacevtski družbi.

## **dr. Vinko Zupančič, mag. farm.**

### **KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH POLIMORFNIH OBLIK, HIDRATOV IN SOLI NEKATERIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN**

**Mentor: izr. prof. dr. Franci Vrečer, mag. farm.**

**Somentor: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.**

*dr. Vinko Zupančič, mag. farm.* si je za izhodišče svojega raziskovalnega dela postavil željo po čimbolj podrobni karakterizaciji dveh sodobnih zdravilnih učinkovin natrijevega pantoprazolata in klopidozola, za kateri je bilo v znanstveni literaturi na voljo zelo malo podatkovter uporabo pridobljenih spoznanj v razvojno-raziskovalnem delu pri obeh zdravilnih učinkovinah ter iz njih izhajajočih izdelkov.

Eksperimentalni načrt doktorandovega raziskovalnega dela je vključeval pomembne dele predformulacijskih študij obeh zdravilnih učinkovin, t.j. izolacijo in karakterizacijo različnih pojavnih oblik obeh ter študij lastnosti različnih adicijskih soli s kisljinami v primeru klopidozola z namenom ugotoviti, katera oz. katere oblike obeh zdravilnih učinkovin so najprimernejše za razvoj trdnih farmacevtskih oblik oz. farmacevtskih izdelkov.

Doktorand je s svojim raziskovalnim delom izoliral in okarakteriziral dve novi hidratni obliki natrijevega pantoprazolata ter predlagal mehanizem fizikalne stabilizacije seskvihidratne oblike.

V drugem delu naloge je *dr. Vinko Zupančič, mag. farm.* izvedel predformulacijske raziskave adicijskih soli klopidozola z izbranimi kisljinami. Na podlagirezultatov je prikazal omejitve uporabe posameznih soli v formulacijskem razvoju ter dokazal podobnost kristalnih struktur farmakološko neaktivne R enantiomere in polimorfne oblike 1 S enantiomereklopidozola. Ugotovil je, da lahko v prisotnosti nizkih koncentracij R izomere vodimo kristalizacijo iz nasičene raztopine S izomere polimorfno obliko 1.

Doktorsko delo *dr. Vinka Zupančiča, mag. farm.* predstavlja primer združitve raziskovalnega in razvojnega dela, pri čemer so številne ugotovitve iz njegovega raziskovalnega dela uspešno uporabljene v razvojnem delu na dveh za podjetje Krka d. d. zelo uspešnih proizvodih. Rezultate svojega raziskovalnega dela v okviru doktorskega dela je oz. bo *dr. Vinko Zupančič, mag. farm.* objavil v petih izvirnih raziskovalnih člankih v revijah z dejavnikom vpliva ter o njih poročal na mednarodnih znanstvenih konferencah.

## **dr. Žiga Jakopin, mag. farm.**

### **NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV SUBSTITUIRANIH 1,2,4-OXSADIAZOLOV IN SAHARINOV KOT GRADNIKOV POTENCIALNIH BIOLOŠKO AKTIVNIH SPOJIN**

**Mentor: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.**

Raziskovalno delo, ki ga je *dr. Žiga Jakopin, mag. farm.* predstavil v svojem doktorskem delu, posega napodročje načrtovanja in sinteze biološko aktivnih spojin na osnovi naravne spojine vodnice N-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamina (MDP). MDP je najmanjši fragment bakterijske stene, ki še ima izrazito imunomodulatorno delovanje in je že tri desetletja predmet raziskav.

*dr. Žiga Jakopin, mag. farm.* je v svojem raziskovalnem delu skušal izkoristiti princip oponašanja aktivnosti biološko aktivne spojine –MDP

s spojinami, ki imajo popolnoma drugačno strukturo, ali povedano drugače, odločil se je za raziskave načrtovanja in sinteze mimetikov tako sladkornega (N-acetilmuraminskega) kot dipeptidnega (L-alanil-D-izoglutamin) dela MDP. Jedro njegovega dela je bilo načrtovanje, sinteza in optimiranje novih postopkov za pripravo ustrezno substituiranih 1,2,4-oksadiazolov kot mimetikovdipeptidnega dela MDP. Na drugi strani pa je predlagal razvoj novih postopkov za uvedbo saharinskega fragmenta kot mimetikaN-acetilmuramilnega dela MDP.

Ker so vse izmed sintetiziranih končnih spojin strukturno sorodne *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamatu, ki vezan na uridindifosfat (UDP) sodeluje pri biosintezi bakterijskega peptidoglikana kot substrat za encim ligaza MurE, je dr. Žiga Jakopin, mag. farm. predvideval in tudi dokazal, da pripravljene spojine lahko zavirajo tudi omenjene encime. Hkrati je predvideval, da bo strukturna sorodnost sintetiziranih spojin z muramil dipeptidom omogočila tudi njihovo moduliranje odzivnosti imunskega sistema, kar je preizkusiti na rakavi monocitni liniji THP-1 in na primarnih humanih mononuklearnih celicah (PBMC).

**dr. Matej Pavli, mag. farm.**

## **NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET S PRIREJENIM SPROŠČANJEM NA OSNOVI NARAVNIH POLIMEROV**

**Mentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.**

**Somentor: izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.**

Doktorska disertacija dr. Mateja Pavlija, mag. farm. sodi na področje farmacevtske tehnologije. Glavni cilj naloge je bil izkoriščanje naravnih, predvsem anionskih polimerov za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet z namenom podaljšanega sproščanja modelnih vodotopnih zdravilnih učinkovin, saj je peroralni, po možnosti enkratni dnevni vnos zdravil, še vedno med najbolj želenimi. Tako je pri proučevanju gelske strukture ogrodnih tablet na osnovi ksantana ugotovil, da prisotnost dvovalentnih  $Ca^{2+}$  ionov v mediju povzroči tvorbo čvrstejšega gela, vendar pa je šele z reološkimi meritvami dokazal, da pri tem ne pride do pričakovanega premreženja ksantanskih verig, pač pa so zaradi senčenja naboja ioniziranih skupin prisotne manjše intermolekularne odbojne sile ter spremenjena urejenost vodnih molekul. Pri tem se sproščanje pentoksifilina pospeši. V nadaljevanju je k ogrodnim tabletam iz ksantana za učvrstitev gelske strukture dodal še neionogeni polimer - semensko sluz rožičevca in ugotovil, da čvrstejša gelska plast še ni zagotovilo za želeno kinetiko sproščanja.

Velik del njegovih raziskav pa je bil posvečen proučevanju uporabnosti naravnih polimerov karagenanov  $\iota$ ,  $\kappa$ , in  $\lambda$ , ki se med seboj razlikujejo v naboju ter v različnih sekundarnih molekularnih strukturah, ki jih tvorijo. V karagenanske tablete je vgradil kationsko zdravilno učinkovino doksazosinijevmesilat ter z uporabo diferenčne dinamične

Večina biološko ovrednotenih spojin ima imunomodulatorno delovanje, nekatere pa so hkrati tudi inhibitorji ligaze MurE. Te spojine tako predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje raziskave terapevtsko uporabnih učinkovin z dualnim delovanjem na prej omenjene tarče in s tem omogočajo popolnomanov pristop k obravnavi infekcijskih obolenj.

kalorimetrije dokazal, da do interakcij prihaja le v prisotnosti medija. Tovrstne interakcije je kandidat proučil tudi v smislu dodatne možnosti za nadzorovano sproščanje DM iz teh tablet. Ugotovil je, da je možno izdelati tablete, iz katerih se učinkovina DM sprošča z dvema vzporedno potekajočima mehanizmoma nadzora: nabrekanjem v povezavi z erozijo ter z *in situ* kompleksacijo. Dognanje, da lahko z enostavnim postopkom direktnega tabletiranja tablete, kjer sproščanje nadzirata dva med seboj neodvisna procesa, predstavlja povsem inovativen pristop k načrtovanju tablet s podaljšanim sproščanjem.

Komplekse med karagenani in doksazosinom je nadalje kvantitativno proučil s pomočjo potenciometričnih meritev, za kar je izdelal posebej v ta namen izdelano membransko ionoselektivno elektrodo. Ugotovil je, da je poleg elektrostatskih interakcije med  $DM^{+}$  in karagenanom prisoten še hidrofobni efekt med samimi molekulami zdravilne učinkovine, kar prispeva k večjemu obsegu vezave učinkovine na polimer. Na ta način je bistveno prispeval k boljšemu razumevanju in načrtovanju tablet s podaljšanim sproščanjem. dr. Matej Pavli, mag. farm. je svoje raziskovalno delo predstavil v do sedaj objavljenih petih člankih, od tega so štiri objavljeni v mednarodnih revijah z dejavnikom vpliva, eden pa je še v postopku. dr. Matej Pavli, mag. farm. je tudi soavtor treh mednarodnih patentnih prijav.

**dr. Tadej Pajič, univ. kem. tehnol., spec. med. biokem.**

## **AKTIVNOST GLUTAMAT-DEHIDROGENAZE V LIMFOCITIH BOLNIKOV S KRONIČNO LIMFOCITNO LEVKEMIJO**

**Mentor: doc. Ivan Malešič, mag. farm., spec. med. biokem.**

**Somentor: prof. dr. Peter Černelč, dr. med.**

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša oblika levkemije v zahodnem svetu. Vzroka za nastanek te bolezni še ne poznamo. V zadnjih letih potekajo intenzivne raziskave na proučevanju možnih kliničnih in bioloških dejavnikov, ki bi imele prognostičen pomen.

Glutamat-dehidrogenaza (GLDH) je pomemben encim v telesu, ki povezuje v večini celic presnovo ogljikovih hidratov in beljakovin. Zelo

malo je objav o presnovi v levkocitih, o sami vlogi GLDH v tej presnovi pa ničesar. Relativno star je podatek, da so levkociti bogati na tem encimu in da so vrednosti encimske aktivnosti pri levkemijah zvišane, ki pa ni vzbudil posebne pozornosti. Avtor je s preliminarnimi izsledki merjenja aktivnosti GLDH v levkocitih bolnikov z mieloproliferativnimi boleznimi ugotovil zvečane vrednosti predvsem pri KLL. Zato se je odločil

nadaljevati raziskavo merjenja aktivnosti GLDH in izražanja genov GLUD1 in GLUD2 v limfocitih periferne krvi pri bolnikih s KLL in izsledke primerjati s skupino zdravih prostovoljcev in primerjalno skupino bolnikov z infektivno mononukleozo (IF), ki imajo v krvi prisotne aktivirane limfocite B.

*dr. Tadej Pajič, univ. kem. tehnol., spec. med. biokem.* je v svoji doktorski disertaciji ugotovil, da je povečana aktivnost GLDH v limfocitih B specifična za bolnike s KLL, v primerjavi z limfociti B

bolnikov z IM, kjer je aktivnost znižana. Prvi je z analizo genskega izražanja na nivoju mRNA potrdil obstoj dveh izoencimov GLDH v levkocitih. Ugotovil je tudi, da je med aktiviranimi limfociti in limfociti pri KLL razlika v vzorcu izražanja genov, kar kaže na različen metabolizem teh celic.

To doktorsko delo, s številnimi novimi ugotovitvami, predstavlja pomemben prispevek k znanosti na področju diagnostike in napovedi poteka bolezni KLL.

**dr. Katja Berginc, mag. farm.**

### **VPLIV STARANEGA ETANOLNO-VODNEGA ČESNOVEGA EKSTRAKTA NA INTESTINALNE IN JETRNE PRENAŠALCE TER NA JETRNI ENCIM CITOKROM 3A4**

**Mentor: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.**

Zdravilni učinki česna so že dolgo znani. Tako kot po svetu tudi v Sloveniji uporaba zeliščnih (in s tem tudi česnovih) pripravkov v obliki prehrane in prehranskih dopolnil nenehno narašča. Iz literature je znano, da imajo česnovi pripravki oz. njihove posamezne komponente različne farmakodinamske in farmakokinetične vplive na encimske in transportne sisteme. Prav tako je znano, da česnove pripravke uporabljajo mnogi kardiovaskularni, diabetični, rakasti in tudi drugi bolniki.

*dr. Katja Berginc, mag. farm.* je v svoji doktorski nalogi, želela pojasniti mehanizme interakcij med sestavinami česna in učinkovinami, ki jih bolnik jemlje skupaj s česnovimi prehranskimi dodatki. Tako je s pomočjo različnih pristopov (kot so permeabilnost skozi izoliran

segment podganjega črevesa oz. monosloj Caco2 celic, uporabo različnih jetrnih modelov – od hepatocitov, HepG2 celic ali jetrnih rezin idr) preučevala interakcije med staranim etanolno-vodnim česnovim ekstraktom in učinkovinami pri procesih permeabilnosti oz. absorpcije ter metabolizma.

S pomočjo pridobljenih rezultatov je opredelila mehanizme interakcij med sestavinami česna oz. staranega česnovega ekstrakta in nekaterimi učinkovinami, ki jih bolniku predpiše zdravnik in jih bolnik jemlje skupaj s česnovimi prehranskimi dodatki.

Izsledki doktorske disertacije *dr. Katje Berginc, mag. farm.* so objavljeni v sedmih člankih v priznanih revijah z vpliva.

**dr. Matej Živec, mag. farm.**

### **NAČRTOVANJE IN SINTEZA PEPTIDOMIMETIČNIH INHIBITORJEV BIOSINTEZE PEPTIDOGLIKANA**

**Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.**

Rezistenca na protimikrobne učinkovine se je začela pojavljati skoraj sočasno z njihovo uvedbo. Sprva je bila zaradi širokega nabora protimikrobnih učinkovin obvladljiva, vendar postaja z razvojem bakterijskih sevov, odpornihna več protimikrobnih učinkovin hkrati, resen zdravstveni problem, ki ga lahko rešimo samo z razvojem novih protibakterijskih učinkovin.

Ena od najpomembnejših tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin je peptidoglikan. V biosintezi peptidoglikana sodelujejo številni encimi, ki predstavljajo potencialna tarčna mesta za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Ena od teh tarč je tudi ligaza MurE, ki v naraščajočo verigo peptidoglikana pripenja L-lizin ali mezo-diaminopimelinsko kislino. V okviru doktorskega dela je *dr. Matej Živec, mag. farm.* z uporabo peptidomimetičnega pristopa načrtoval in

sintetiziral nove peptidomimetične spojine kot potencialne inhibitorje ligaze MurE. Dve spojini z metilenaminskim fragmentom sta pokazali zmerno inhibitorno aktivnost in predstavljata izhodišče za nadaljnji razvoj novih peptidomimetičnih inhibitorjev MurE.

Med možnimi postopki za sintezo metilenaminskih derivatov, kot tudi sekundarnih aminov na sploh, je tudi Fukuyama-Mitsunobujev postopek. Na podlagi tega postopka je Matej Živec razvili nov, industrijsko uporaben sintezni postopek za pripravo pramipeksola, učinkovine, ki se uporablja pri terapiji Parkinsonove bolezni in sindroma nemirnih nog.

Zunajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana katalizirajo penicilin vezoči proteini (PBP). PBP so tarče  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, ki so eno



najpomembnejših orožij v boju z bakterijskimi infekcijami. Pod selekcijskim pritiskom zaradi njihove dolgoletne uporabe so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti, ki resno ogrožajo terapevtsko uporabnost  $\beta$ -laktamskih antibiotikov. Razvoj inhibitorjev z drugačnim načinom delovanja je zato zanimiv pristop k razvoju novih protimikrobnih učinkovin. V doktorski dizertaciji je *dr. Matej Živec, mag. farm.* predstavil načrtovanje in sintezo aminoalkilfosfonatov kot potencialnih mimetikov prehodnega stanja reakcije, ki jo katalizirajo

PBP. Aminoalkilfosfonati niso zavirali PBP encimov, kar je pripomoglo k razjasnitvi povezave med strukturo in delovanjem večje serije inhibitorjev PBP, med katerimi so bili najboljši inhibitorji aminoalkilboronske kisline.

*dr. Matej Živec, mag. farm.* je do sedaj objavil ali ima sprejete v objavo v revijah z dejavnikom vplivapet znanstvenih člankov, ima tudi en podeljen slovenski patent in vloženo eno mednarodno patentno prijavo.

**dr. Nataša Radić, mag. farm.**

## VPLIV IZVLEČKOV MEDICINSKIH GOB IN RASTLIN NA IZRAŽANJE GENOV V MODELNIH CELIČNIH LINIJAH

**Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.**

V svoji doktorski disertaciji je *dr. Nataša Radić, mag. farm.*, podrobno preučila delovanje polisaharidov, pridobljenih iz medicinsko pomembnih gob *Grifola frondosa* in *Laetiporus sulphureus*. Po tretiranju Jurkat celic s tržno dostopnimi polisaharidi iz velike zraščenske, je določila osemnajst diferencialno izraženih genov. Glede na tarče, dobljene z diferencialnim prikazom je ugotovila, da pride do zmanjšanja izražanja genov, ki nosijo zapis za dve E3 ligazi (Itch in UBR1), encima ubikvitinskega sistema. Spremembe v procesu ubikvitinacije proteinov so prisotne v večini tumorskih celic, zaradi česar so encimi vključeni v proces ubikvitinacije zelo zanimivi kot molekularne tarče v razvoju novih učinkovin za zdravljenje raka. V nadaljevanju študije je kot prva uporabila micelij žveplenega lepoluknjičarja, pridobljen s submerznokultivacijo, za pridobitev biološko aktivnih polisaharidov. S sodobnimi ekstrakcijskimi metodami je izolirala heterogen polisaharid, ki ga je poimenovala Las ICP in določila njegovo sestavo ( $\alpha$ -D-glukoza,  $\beta$ -D-manoza,  $\beta$ -D-fukoza in  $\alpha$ -D-galaktoza). Ugotovila je, da Las ICP stimulira makrofage k izražanju prvnetnih citokinov IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\beta$ . Vpliv Las ICP na aktivacijo makrofagov je nadalje dokazala tudi s spremljanjem morfoloških lastnosti tretiranih celic. Njene ugotovitve s tem odpirajo možnost

izkoriščanja *L.sulphureus*, saj nadzorovani submerzni postopek gojenja lahko nadomesti uporabo gob iz narave in omogoči gojenje večjih količin biomase, torej biosintezo aktivnih polisaharidov v industrijskem merilu.

V drugem delu doktorske disertacije si je *dr. Nataša Radić, mag. farm.* kot cilj zastavila ugotoviti mehanizem potencialnega protitumornega delovanja izvlečka lesa kvazije. S pomočjo dvodimenzionalne elektroforeze je detektiralakot tarčno molekulo delovanja izvlečka encim alfa enolazo. Presenetljivo je ugotovila, da pride do povečanega izražanja tega encima v citoplazmi ter v jedru tretiranih celic. Translokacija alfa-enolaze v jedro je verjetno povezana z njenim delovanjem kot inhibitorjem transkripcije onkogenega c-myc. Izkazalo se je, da ima zaradi tega izvleček lesa kvazijeinhibitorni vpliv na invazivnost celic. Rezultate doktorskega dela je *dr. Nataša Radić, mag. farm.* objavila v štirih priznanih znanstvenih publikacijah z dejavnikom vpliva. Rezultati raziskovalnega dela potrjujejo zastavljene hipoteze, hkrati pa nakazujejo nove smeri raziskav delovanja produktov metabolizma medicinskih gob in rastlin v fizioloških in patoloških pogojih.

**dr. Roman Šink, mag. farm.**

## NAČRTOVANJE, SINTEZA IN KRISTALOGRAFSKE ŠTUDIJE INHIBITORJEV LIGAZ MUR

**Mentorica: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.**

Iskanje in preučevanje novih tarč in načrtovanje protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja je pomembno orožje v boju z bakterijsko rezistenco, ki predstavlja vedno večji problem v sodobnem zdravstvu. Bakterijski peptidoglikan je eno pomembnejših tarčnih mest za razvoj novih protibakterijskih učinkovin saj zaviranje njegove biosinteze vodi do lize celice in do bakterijske smrti.

*dr. Roman Šink, mag. farm.* se je tekom svojega doktorskega dela ukvarjal z encimi, iz družine Mur ligaz, ki sodelujejo v znotrajceličnih fazah biosinteze peptidoglikana in katalizirajo zaporedno pripenjanje

aminokislinskih ostankov na rastočo makromolekulo. V okviru doktorske disertacije je načrtoval in sintetiziral nove inhibitorje teh encimov ter s kristalografskimi študijami preučeval katalitični mehanizem ligaze MurD in način vezave inhibitorjev v aktivno mesto encima.

Uspel je sintetizirati nove inhibitorje ligaz MurC oz MurD z *N*-acilhidrazonskim ter aminosulfonilsečnskim skeletom ter pripraviti spojino, ki je hkrati inhibitor obeh omenjenih ligaz in je v poskusih pokazala tudi protibakterijsko učinkovitost.

Del svojega doktorskega dela je *dr. Roman Šink, mag. farm.* posvetil strukturnim študijam ligaze MurD. S sodelovanjem s partnerji iz inštituta IBS v Grenoblu je razrešil sedem kristalnih struktur visoke ločljivosti ligaze MurD v kompleksu z nizkomolekularnim inhibitorji. Z razrešitvijo teh kristalnih struktur je ugotovil način vezave inhibitorjev v aktivno mesto ligaze MurD in tako pridobil nove informacije, ki so pomembno izhodišče za optimizacijo in nadaljni razvoj inhibitorjev encima MurD.

V procesu kristalizacije ligaze MurD je doktorand preizkusil mnogo različnih pogojev in pri tem odkril dve novi konformaciji ligaze MurD, ki še nista opisani v literaturi. S tem je pridobil nove podatke o katalitičnemu mehanizmu celotne družine ligaz Mur.

**dr. Špela Irman, mag. farm.**

### **VPLIV PODSKUPIN ANTIFOSFOLIPIDNIH PROTITELES NA KRISTALIZACIJO ANEKSINA A5 NA FOSFOLIPIDNEM DVOSLOJU**

**Mentor: prof. dr. Borut Božič, mag. farm.**

**Somentor: doc. dr. Miha Škarabot, univ. dipl. fiz.**

*dr. Špela Irman, mag. farm.* je opravljala raziskave na področju motenj imunskega sistema, ko se le-ta aktivira proti svojemu nosilcu v obliki avtoimunosti. Obravnavani antifosfolipidni sindrom je avtoimunska bolezen, ki jo opredeljujejo klinični in laboratorijski kriteriji. V prvo skupino spadajo žilne tromboze ter nosečniški zapleti, v drugo pa prisotnost tako imenovanih antifosfolipidnih protiteles. Etiogeneza boleznij je še nejasna, eden od predlaganih mehanizmov pa vključuje poškodbo kristalne strukture aneksina na aktiviranem endoteliju, ki naj bi predstavljal zaščito pred trombozami. Špela Irman je s pomočjo mikroskopije na atomsko silo dokazala v fizioloških pogojih, da imajo podskupine antifosfolipidnih protiteles različno delovanje na nastanek in obstoj zaščitne kristalne strukture aneksina. Prva je opisala

razgrajevanje nepopolno skristaliziranega aneksinskega kristalnega ščita, ter upočasnitev kristalizacije aneksina ob prisotnosti avtoproteles proti aneksinu. Dokazala je tudi stabilnejšo vezavo  $\beta$ 2-glikoproteina I na membrano ob prisotnosti avtoproteles, kar se ujema s kliničnimi opažanji o večji patogenosti protitelesih proti  $\beta$ 2-glikoproteinu I z višjo avidnostjo. Dokaz heterogenega delovanja podskupin tako imenovanih antifosfolipidnih protiteles izkazuje potrebo po drugačnem pristopu pri diferencialni laboratorijski diagnostiki antifosfolipidnemu sindromu pridruženih motenj. Rezultati so že objavljeni v petih člankih, štirih v revijah z dejavnikom vpliva, pri čemer bi izpostavil *Autoimmunity Reviews* z dejavnikov vpliva 6,4 in *Journal of Autoimmunity* z dejavnikom vpliva 7,2.

**dr. Simona Jurković Mlakar, mag. farm.**

### **VPLIV IZPOSTAVLJENOSTI IONOM KADMIJA IN VLOGA GENOV ZA ANTIOKSIDATIVNE ENCIME PRI RAZVOJU OSTEOPOROZE**

**Mentorica: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.**

**Somentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.**

S starostjo naraščajo oksidativne poškodbe celic oziroma tkiv, še posebej pri ljudeh, ki so izpostavljeni večjim obremenitvam z ioni težkih kovin. Kandidatka je v doktorski nalogi proučevala vpliv oksidativnega stresa oziroma okrnjene antioksidativne obrambe in izpostavljenosti ionom kadmija na kvaliteto kostnega tkiva in razvoj osteoporoze na genskem nivoju. Preverjala je dve hipotezi:

Spremembe v genih za antioksidativne encime *in vivo* povečajo tveganje za razvoj osteoporoze in vplivajo na potek zdravljenja.

Akutna in dolgotrajna izpostavljenost osteoblastov ionom kadmija *in vitro* spremeni izražanje genov za antioksidativne encime in vpliva na razvoj osteoporoze, ker spreminja izražanje genov, odgovornih za nastanek in aktivnost osteoblastov.

Da bi potrdila prvo hipotezo je kandidatka ugotavljala povezanost mineralne kostne gostote (MKG) in biokemičnih markerjev kostne

remodelacije z 16 genskimi polimorfizmi v genih 11 antioksidativnih encimov, in ugotovila, da spremembe v genih glutationske poti vplivajo na razvoj osteoporoze saj so bili polimorfizmi v vseh 6 genih te poti (GPX1, GSR, GSTM3, GSTM1, GSTT1 in GSTP1) značilno povezani z mineralno kostno gostoto in ali BK kostne remodelacije. Povezanost s razvojem boleznij je dokazala tudi za gene tioredoksinske poti, medtem ko je za genske spremembe v SOD in CAT zaključila, da zelo verjetno ne sodelujejo v patogenezi osteoporoze. Ob tem se je izkazalo, da nobeden od polimorfizmov ne vpliva na uspešnost zdravljenja z bisfosfonati, pri zdravljenju s SERM pa je potrebno upoštevati farmakogenetske vplive večine antioksidativnih encimov.

V drugem delu raziskave je *dr. Simona Jurković Mlakar, mag. farm.* preverjala osteocitotoksičnost ionov kadmija *in vitro*. Klinično dobro opoznan zaplet pri zastupitvah s Cd je proučevala z vidika možnih mehanizmov toksičnega delovanja Cd na osteoblaste. Uporabila je

vsegenomski pristop z analizo genskih mikromrež in dokazala pomemben vpliv genov oksidativnega stresa, apoptoze in vnetja, celičnega Wnt signaliziranja, metabolizma lipidov in adhezijskih molekul (integrini). Na ta način je kandidatka postavila dobre temelje za nadaljevanje raziskav na tem področju. Rezultati in iz njih izvedeni

zaključki doktorske disertacije *dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm.* so originalni in predstavljajo nov doprinos k znanosti, kar dokazujeta dva že objavljena članka v mednarodnih revijah s dejavnikom vpliva in pet rokopisov člankov, ki so pripravljene za objavo.



STROKOVNO IZOBRAŽEVANJE S PODROČJA FARMACIJE

KOZMETOLOGIJA I

TRENDI NA PODROČJU KOZMETIČNIH IZDELKOV

UČINKOVITOST IN VARNOST SESTAVIN

Spoštovani!

S tematiko strokovnega izobraževanja s področja farmacije v letu 2011 vstopamo na nekoliko novejšo in manj poznano, a izjemno hitro razvijajoče se področje kozmetologije. V nasprotju s splošno predstavo, ki kozmetične izdelke še vedno povezuje predvsem z njihovo estetsko vrednostjo, je znanost z intenzivnimi raziskavami v zadnjih letih izpostavila drugi, še pomembnejši vidik njihove uporabe – učinkovitost in varnost. In prav učinkovitost in varnost sestavin bosta postavljeni v ospredje vsebin letošnjega izobraževanja, saj sta temelj kakovostnih kozmetičnih izdelkov ter s tem eno od zelo pomembnih znanj tako zaposlenih v lekarni kot tudi širši farmacevtski stroki.

Zaradi velike razsežnosti področja smo oblikovali dva tematska sklopa. V prvem bomo predstavili sodobne trende na področju sestave kozmetičnih izdelkov. Obravnavali bomo kožo kot glavno tarčo uporabe kozmetičnih izdelkov ter tri pomembne skupine kozmetičnih sestavin, sestavine rastlinskega in biotehnološkega izvora ter konzervanse. V sklopu širše vsebine pa se bomo dotaknili pravil in novosti na področju regulative kozmetičnih izdelkov, si pogledali razvojne dosežke kozmetologije s tehnološkega vidika, kritično ovrednotili naravno kozmetiko ter izpostavili lekarniške poglede in izkušnje s tega področja. Našteta predavanja bodo služila kot dobra in zanimiva podlaga za nadaljevanje izobraževanja v letu 2012, ki bo obsegalo pregled posameznih skupin kozmetičnih izdelkov za različne namene uporabe, od izdelkov proti celulitu in staranju do izdelkov za otroke. Celoten sklop izobraževanja podaja znanja, ki so primerna tako za magistre farmacije kot tudi za farmacevtske tehnike.

Verjameva, da vas bodo k udeležbi na izobraževanju pritegnile tako aktualnost in uporabnost tematike kot tudi strokovnost uglednih gostujočih predavateljev ter predavateljev s Fakultete za farmacijo. Vljudno vabljeni!

Asist. dr. Alenka Zvonar, mag. farm., in asist. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

KOZMETOLOGIJA I  
TRENDI NA PODROČJU KOZMETIČNIH IZDELKOV  
UČINKOVITOST IN VARNOST SESTAVIN

PROGRAM IZOBRAŽEVANJA

- 8.00–8.30 **Registracija udeležencev**
- 8.30–8.40 **Pozdrav udeležencem in uvodne besede**  
Prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.; dekan Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 8.40–9.10 **Zgradba in funkcija kože**  
Prof. dr. Igor Bartenjev, dr. med., spec., in asist. Mirjam Rogl Butina, dr. med., spec.;  
Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani in Dermatologija Bartenjev-Rogl, d. o. o.
- 9.15 –9.45 **Uredba o kozmetičnih izdelkih**  
Anja Menard, univ. dipl. kem.; Urad Republike Slovenije za kemikalije
- 9.50–10.20 **Kozmetične sestavine rastlinskega izvora – dosežki in smernice**  
Doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 10.20–10.50 **Odmor**
- 10.50–11.20 **Biotehnologija v kozmetiki**  
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 11.25–12.10 **Varnost in učinkovitost konzervansov v kozmetičnih izdelkih**  
Izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 12.15–12.45 **Naravna kozmetika: kdaj, zakaj, čemu?**  
Prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 12.50–13.20 **Tehnološki vidik oblikovanja kozmetičnih izdelkov: od raztopin do inovativnih dostavnih sistemov**  
Asist. Mirjam Gosenca, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
- 13.25–13.55 **Lekarniški pogled na kozmetične izdelke**  
Polonca Fiala, mag. farm.; Javni zavod Pomurske lekarne
- 14.00–15.30 **Okrogla miza**
- 15.30 **Sklepne misli**  
Asist. dr. Alenka Zvonar, mag. farm.; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

# 10. Farmaceutski ples - Ples v maskah

Matjaž Tuš

Na pustno soboto, 5. marca 2011, smo se po sedmih letih ponovno zavrteli na petah. Večerne toalete smo zamenjali s pustnimi maskami, eleganca in omikanost pa sta medse sprejeli šegavost pustnega časa.

Organizacijo desetega, jubilejnega Farmaceutskega plesa je na pobudo Anite Vrabič prevzela Mariborska podružnica SFD. Člane društva, njihove partnerje in prijatelje smo povabili v hotel Habakuk, kjer nismo uživali samo v izbrani hrani in pijači, prijetni družbi in plesnih ritmih skupine Black&White, ampak tudi v nastopu plesalk flamenka in dovtipih Vinka Šimeka, ki je povezoval program. Pri preganjanju zime so nam pomagali koranti iz Spuhlje, ki jih vodi naš član Marko Šamperl. Za pospešen srčni utrip več kot 120

udeležencev pa je v poznih večernih urah poskrbela trebušna plesalka Tjaša Vandur s pitonom Ramzesom.

Ob tej priložnosti bi se želel zahvaliti vsem, ki ste se odzvali našemu povabilu v Maribor. Posebna zahvala gre tudi podjetjem (Farmadent, Bayer Health Care, Medis, Lek in Krka), ki so omogočila, da se je vložen trud Anite Vrabič, Ljubice Lovišček, Brigite Korpar in moje malenkosti obrestoval v dogodku, na katerega smo v Mariborski podružnici ponosni. Hvala tudi Jelki Dolinar in Nataliji Gerbič, zaradi katerih je bilo vse lažje.

Matjaž Tuš, mag. farm.  
predsednik Mariborske podružnice SFD



Organizatorji Plesa v maskah



Sončnice iz Mariborskih lekarn in Farmadenta



Magistra Anita Vrabič je nagovorila udeležence jubilejnega 10. Farmaceutskega plesa



Obiskali so nas koranti iz Spuhlje

# Navodila avtorjem

**Spodnja poglavja podajajo pomembne informacije za avtorje. Priporočamo, da si avtorji vzamejo čas in preberejo navodila preden prispevek pošljejo v uredništvo Farmacevtskega vestnika.**

Strokovne članke in druge prispevke objavljamo v slovenskem, po dogovoru z uredništvom pa tudi v angleškem jeziku. Vsi poslani rokopisi morajo biti jezikovno in slogovno neoporečni. Uporabljena terminologija mora biti ustrezna, s poslušom za uveljavljanje ustreznih strokovnih izrazov v slovenskem jeziku. **Navajanje zaščitenih imen zdravil in drugih izdelkov ali imen proizvajalcev je nedopustno.** Dovoljeno je le v poglavju *Materiali in metode*, izjemoma pa še v primeru, če se objavi popoln seznam vseh na tržišču dostopnih izdelkov.

**Strokovni članki so recenzirani.** Uredništvo pošlje vsak strokovni članek najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevtskem vestniku je zagotovljena tajnost.

## Sprejem prispevka v uredništvo

Prispevek je sprejet v uredništvo, kadar v uredništvo poleg rokopisa, v elektronski obliki vloga vsebuje tudi:

### 1 Spremni dopis:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe.

### 2 Izjava:

Lastnoročno podpisana izjava, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji. V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice.

## Prva verzija rokopisa

Prav verzija rokopisa je poslana v uredništvo v elektronski obliki v kateri:

- avtorji niso imenovani,
- slike in preglednice so vključene v besedilo,
- obsega največ **20.000** znakov, vključno s presledki.

## 1 Oblika rokopisa

### Naslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak naslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

### Podnaslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak podnaslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

### Besedilo rokopisa

Times New Roman 12 pt, navadno, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

## 2 Vsebina rokopisa

Rokopis naj bo sistematično strukturno urejen in razdeljena na poglavja.

**Izvirni znanstveni članki** naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Sklep,
- Literatura.

**Pregledni članki** pa

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Poglavja in podpoglavja, ki si smiselno sledijo,
- Sklep,
- Literatura.



**Vsako trditev**

je potrebno potrditi z literaturnim virom, zaporedno številko literaturnega vira pa navesti na koncu trditve, v oklepaju pred piko. Če je referenc več, so številke ločene z vejicami in presledki, npr. (1, 3, 8). Na koncu prispevka naj bo navedenih največ 30 literaturnih virov, po vrstnem redu, kot se pojavljajo v besedilu.

**3 Slike, preglednice in grafikoni**

Slike preglednice in grafikoni morajo biti opremljene s pripadajočim besedilom v slovenskem in angleškem jeziku.

**3.1 Slike**

Slike naj merijo v širino in višino največ 18 cm. Dimenzijsko naj se slika čimbolj približa dejanski velikosti v tiskani verziji. Velikost besedila na sliki pa je lahko med 8 in 12 pt. (*opomba*: največkrat v tisku naletimo na velikost črk 10 pt).

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika\_1, slika\_2, itd).

Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk!

Vsaka slika mora biti ustrezno označena z zaporedno številko slike in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor lastnik slike. Pripadajoče besedilo se mora navajati pod sliko.

Primer:



**Slika 1.** Logo Slovenskega Farmacevtskega društva (1).

**Figure 1.** Logo of Slovenian Pharmaceutical Society (1).

Objava slik je v črno-beli tehniki, kar naj avtorji upoštevajo pri pripravi slik. Objava barvnih slik je možna samo v primeru, da avtor zagotovi pokritje dodatnih stroškov barvnega tiska.

**3.2 Preglednice**

Vsaka preglednica mora biti ustrezno označena z zaporedno številko preglednice in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor preglednico pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad preglednico.

Primer:

**Preglednica 1.** Število objav v Farmacevtskem vestniku v letu 2009 (1).

**Table 1.** Number of publication in Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1).

Tip objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

**3.3 Grafikoni**

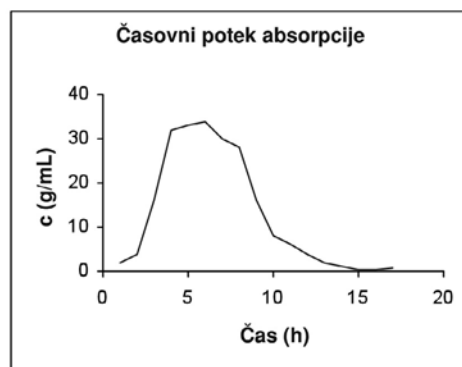
Vsaka grafikon mora biti ustrezno označen z zaporedno številko grafikona in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bil povzet, razen v primeru kadar je avtor grafikon pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad grafikonom.

Grafikoni iz Excela naj bodo uvoženi v besedilo kot »enhance metafile« z velikostjo teksta med 8 in 12 pt. Velikost pa naj ne presega v širino in višino 18 cm.

Primer:

**Grafikon 1.** Časovni potek absorpcije (1).

**Graph 1.** The time-course of absorption (1).

**4 Poimenovanja in okrajšave**

Poimenovanja in okrajšave je potrebno navajati skladno IUPAC, IUBMB in HUGO. Terminologijo izrazov pa tudi skladno s uveljavljenimi slovenskimi terminološkimi izrazi ter skladno s Formularium Slovenicum in SBD terminološkim slovarjem.

**5 Primer navajanja literature**

1. Obreza A. Vanadij v živem organizmu in farmaciji. Farm Vestn 2003; 54: 713–718.
2. Danesh A, Chen X, Davies MC et al. The discrimination of drug polymorphic forms from single crystals using atomic force microscopy. Pharm Res 2000; 17 (7): 887–890.
3. Doekler E. Cellulose derivatives. In: Peppas NA, Langer RS. Advances in polymer science 107; Biopolymers I. Springer-Verlag, 1993: 200–262.

4. Slovensko Farmacevtsko Društvo. <http://www.sfd.si/>. Dostop: 10-12-2008. (avtor spletne strani. Naslov prispevka. Spletni naslov. Dostopano: datum dostopa.)

### Končna verzija prispevka

Avtor strokovnega članka prejme po opravljenem recenzijskem postopku obvestilo o sprejemu članka oz. navodila glede potrebnih popravkih. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** poslal popravljen prispevek v elektronski obliki na naslov glavne urednice.

### Končna verzija rokopisa

**1 Naslovna stran prispevka** (prva stran rokopisa) mora vsebovati:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni
- Korespondenčnega avtorja z njegovimi kontakti

**2 Rokopis** (druga stran rokopisa) naj v nadaljevanju vsebuje:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev *brez z nazivov, imen in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni*, v pravilnem vrstnem redu
- Poglavlja rokopisa v vrstnem redu in obliki kot je navedeno zgoraj v katerih so razporejene slike, preglednice in grafikoni.

### 3 Spremljajoče slike

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika\_1, slika\_2, itd). Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk.

### Ostali prispevki

Prispevki za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja imajo praviloma lahko največ **6.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presežati **3.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

### Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v elektronski obliki korespondenčni avtorji pošljejo na naslov:

#### Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo

Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana

T.: 01 569 26 01, Fax: 01 569 26 02

e-pošta:

glavna urednica: [urednica-fv@sfd.si](mailto:urednica-fv@sfd.si)

tajništvo: [tajnistvo-fv@sfd.si](mailto:tajnistvo-fv@sfd.si)

### Korekture

Krtačne odtise prispevka je avtor dolžan natančno pregledati in označiti nujne popravke (tiskarske škrate), s katerimi ne sme posegati v vsebino prispevka. Korekture pošlje avtor v treh delovnih dneh izključno elektronski obliki na zgoraj navedeni naslov.

Prvi avtor prejme tri izvode Farmacevtskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletnem mestu v pdf obliki.

*"Iz Creda Johnson & Johnson, 1943:*

*Menimo, da smo najprej odgovorni zdravnikom, sestram in bolnikom, materam in očetom ter vsem drugim, ki uporabljajo naše izdelke in storitve.*

*Ko poskušamo zadostiti njihovim potrebam, mora biti zelo kakovostno vse, kar naredimo ..."*

*Sledimo poslanstvu Creda in z inovativnimi zdravili ustvarjamo boljšo prihodnost.*

Psihiatrija

Nevrologija

Onkologija

Bolečina

Dermatologija

Ginekologija

Virologija

Nefrologija

Janssen

PHARMACEUTICAL COMPANIES

OF *Johnson & Johnson*

Janssen, farmacevtski del Johnson & Johnson d.o.o., Šmartinska 53, 1000 Ljubljana, tel: 01 401 18 00

