

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 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: 1.) zaradi okvar v encimskem sistemu za presnovo galaktoze 2.) zaradi povečanega vnosa galaktoze ob ohranjeni aktivnosti intestinalne laktaze ter 3.) zaradi uživanja večjih količin mleka in mlečnih izdelkov. Pot za preverjanje domneve, ki si jo je Irena Prodan Žitnik 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 tveganja je 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-13910 v bližini gena za LPH. Pri preiskovankah z znižano aktivnostjo GALT ali GALE je z DNA sekvenčno analizo iskala morebitne še neodkrite 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 na kontrolno skupino. V genu za GALT ni odkrila novih mutacij. Pogostosti mutacij v genu za GALT in polimorfizma C/T-13910 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. Ti testi 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.

Nina Kočever Glavač je doktorsko disertacijo napisala z neposredno vključitvijo 9 objavljenih znanstvenih člankov.

V prvem delu doktorata 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 aciliran cistatin učinkovito vstopa v celice, medtem ko neaciliran praktično ne vstopa vanje.

V drugem delu doktorata se je Nina Kočever Glavač posvetila kapilarni elektroforezi, kot analitski metodi za karakterizacijo aciliranega cistatina. 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.

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 ligandi apoliproteini 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 doktorand 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 bolezni 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 Alenke Zvonar 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 farmacevtskih dostavnih sistemov.

Kandidatka je v S(M)ES vgradila dve modelni učinkovini – celekoksib in furosemid. Ovrednotila je njihovo solubilizacijsko kapaciteto, kinetiko sproščanja ter preučevala vpliv na permeabilnost furosemida skozi različne segmente tankega črevesja podgane in monosloj Caco-2 celične linije. Za ugotovljeno povečano permeabilnost predpostavlja, da je posledica manjših reverzibilnih sprememb tesnih stikov, predvsem pa povečane fluidnosti membran ter inhibicije sekretornih 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 ko-ekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane, kar predstavlja glavnino raziskovalnega dela Alenke Zvonar. Glede na učinkovitost vgradnje, morfološke lastnosti mikrokapsul ter profil sproščanja furosemida 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 5 člankih; od tega v štirih s faktorjem 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.

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, izzване 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 cisteinska proteaza katepsin 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- γ v visokih odmerkih povzroči pridobitev tolerogenih lastnosti DC.

Doktorand 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 Andreja Dolenca 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 in homogeniziranje 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 analize 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.

Andrej Dolenc 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 raziskovalnega dela na aplikativnih projektih. Objavil je 5 člankov, tudi v revijah s faktorjem vpliva, predstavil raziskovalno delo na 6 mednarodnih konferencah, delal timsko pri treh domačih in 2 tujih projektih in vodil vaje iz farmacevtske in industrijske tehnologije. Po podatkih Scencedirect Top 25 je bil članek s celekoksibom pol leta na 8. mestu med najbolj iskanimi članki v International Journal of Pharmaceutics. Andrej Dolenc se je zaposlil v Lek-u takoj po doktoratu.

dr. Vinko Zupančič, mag. farm.

KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH POLIMORFNIH OBLIK, HIDRATOV IN SOLI NEKATERIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

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

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

Doktorand Vinko Zupančič si je za izhodišče svojega raziskovalnega dela postavil željo po čimbolj podrobni karakterizaciji dveh sodobnih zdravilnih učinkovin natrijevega pantoprazolata in klopidogrela, za kateri je bilo v znanstveni literaturi na voljo zelo malo podatkov ter uporabo pridobljenih spoznanj v razvojno-raziskovalnem delu pri obeh zdravilnih učinkovinah ter iz njiju 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 kislinami v primeru klopidogrela 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 doktorand izvedel predformulacijske raziskave adicijskih soli klopidogrela z izbranimi kislinami. Na podlagi rezultatov je prikazal omejitve uporabe posameznih soli v formulacijskem razvoju ter dokazal podobnost kristalnih struktur farmakološko neaktivne R enantiomere in polimorfne oblike 1 S enantiomere klopidogreljevega hidrogensulfata. Ugotovil je, da lahko v prisotnosti nizkih koncentracij R izomere vodimo kristalizacijo iz nasičene raztopine S izomere polimorfno obliko 1.

Doktorsko delo Vinka Zupančiča 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 zelo uspešnih proizvodih. Rezultate svojega raziskovalnega dela v okviru doktorata je oz. bo doktorand objavil v petih izvirnih raziskovalnih člankih v revijah s faktorjem vpliva ter o njih poročal na mednarodnih znanstvenih konferencah.

dr. Žiga Jakopin, mag.farm.

Načrtovanje in sinteza derivatov substituiranih 1,2,4-oksadiazolov in saharinov kot gradnikov potencialnih biološko aktivnih spojin

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

Raziskovalno delo, ki ga je Žiga Jakopin predstavil v svojem doktorskem delu, posega na področje 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.

Žiga Jakopin 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 mimetikov dipeptidnega dela MDP. Na drugi strani pa je predlagal razvoj novih postopkov za uvedbo saharinskega fragmenta kot mimetika N-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 Žiga Jakopin 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).

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 popolnoma nov pristop k obravnavi infekcijskih obolenj.

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 Mateja Pavlija sodi na področje farmacevtske tehnologije. Glavni cilj naloge je bil izkoriščanje naravnih, predvsem anionskih polimerov za izdelavo hidrofилnih ogrodnih tablet z namenom podaljšanega sproščanja modelnih vodotopnih zdravilnih učinkovin, saj je peroralni, po možnosti 1x dnevni vnos zdravil, še vedno med najbolj željenimi. Tako je pri proučevanju gelske strukture ogrodnih tablet na osnovi ksantana ugotovil, da prisotnost dvovalentnih Ca²⁺ 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 ι , κ , in λ , ki se med seboj razlikujejo v naboju ter v različnih sekundarnih molekularnih strukturah, ki jih tvorijo. V karagenanske tablete je vgradil kationsko zdravilno učinkovino doksazosinijev mesilat ter z uporabo diferenčne dinamične 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 nadzorovanja: 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. Matej Pavli je svoje raziskovalno delo predstavil v do sedaj objavljenih 5-ih člankih, od tega so štiri objavljeni v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva, eden pa je še v postopku. Matej Pavli 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 limfociteB.

Avtor 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.fram.

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.

Doktorandka Katja Berginc 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 Katje Berginc so objavljeni v sedmih člankih v priznanih revijah s faktorjem 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 učinkovim obvladljiva, vendar postaja z razvojem bakterijskih sevov, odpornih na 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 Matej Živec 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 nadaljni 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 β -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 β -laktamskih antibiotikov. Razvoj inhibitorjev z drugačnim načinom delovanja je zato zanimiv pristop k razvoju novih protimikrobnih učinkovin. V doktorski dizertaciji je Matej Živec 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.

Matej Živec je do sedaj objavil ali ima sprejete v objavo v revijah z IF 5 znanstvenih člankov, ima tudi en podeljen slovenski patent in vloženo eno mednarodno patentno prijavo.

dr. Nataša Radič, 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 Nataša Radič, 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 zraščenke, 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 lepolutnjačarja, pridobljen s submerzno kultivacijo, za pridobitev biološko aktivnih polisaharidov. S sodobnimi ekstrakcijskimi metodami je izolirala heterogen polisaharid, ki ga je poimenovala Las ICP in določila njegovo sestavo (α -D-glukoza, β -D-manoza, β -D-fukoza in β -D-galaktoza). Ugotovila je, da Las ICP stimulira makrofage k izražanju pro-vnetnih citokinov IL-1 β , IL-6 in TNF- α . 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 doktorantka kot cilj zastavila ugotoviti mehanizem potencialnega protitumornega delovanja izvlečka lesa kvazije. S pomočjo dvodimenzionalne elektroforeze je detektirala kot 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 onkogene *c-myc*. Izkazalo se je, da ima zaradi tega izvleček lesa kvazije inhibitorni vpliv na invazivnost celic. Rezultate doktorskega dela je doktorantka 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.

Doktorand Roman Šink 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 Roman Šink 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

Špela Irman je opravljala raziskave na področju motenj imunskega sistema, ko se leta 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 bolezni 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 avtoprotiteles proti aneksinu. Dokazala je tudi stabilnejšo vezavo β 2-glikoproteina I na membrano ob prisotnosti avtoprotiteles, kar se ujema s kliničnimi opažanji o večji patogenosti protitelesih proti β 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 genetskem nivoju. Preverjala je dve hipotezi:

1. Spremembe v genih za antioksidativne encime in vivo povečajo tveganje za razvoj osteoporoze in vplivajo na potek zdravljenja.
2. 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 vpivajo 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 bolezni 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 antioksidantnih encimov.

V drugem delu raziskave je asist. 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 asist. Simone Jurković Mlakar, mag.farm. so originalni in predstavljajo nov doprinos k znanosti, kar dokazujeta 2 že objavljena članka v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva in 5 rokopisov člankov, ki so pripravljeni za objavo.