

dr. SIMONA JURKOVIČ MLAKAR, mag. farm.

Vpliv izpostavljenosti ionom kadmija in vloga genov za antioksidativne encime pri razvoju osteoporoze

Mentorica: prof. dr. Janja Marc
Somentor: prof.dr. Joško Osredkar

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 Jurkovič Mlakar, mag.farm. preverjala osteocitotoksičnost ionov kadmija *in vitro*. Klinično dobro opoznan zaplet pri zastrupitvah 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 Jurkovič 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.

dr. MAJA FLORJANIČ, mag. farm.

Raziskave zagotavljanja kakovosti prečiščene vode z ozoniranjem shranjevalno-distribucijskega sistema

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Raziskovalno delo je opravljala predvsem v laboratorijih tovarne zdravil KRKA d.d. Novo mesto, kjer je tudi zaposlena.

Disertacija Maje Florjanic sodi na področje farmacevtskih znanosti in osvetljuje nekatere ključne principe za vzdrževanje ustrezne mikrobiološke kakovosti prečiščene

vode v vsakodnevni proizvodnji. Vsaka plavajoča bakterijska celica se lahko prilepi na površino shranjevalno/distribucijskega sistema, kjer začne izločati v okolico polisaharide, ki jo povežejo s površino in z drugimi bakterijskimi celicami v zapleten ekosistem MO različnih rodov in vrst im.biofilm. Biofilm jim nudi zaščito pred stresnimi pogoji okolja, pospeši privzem hranljivih snovi in predstavlja zaradi občasnega odtrganja posameznih celic ali skupkov stalen vir okužb.

Maja Florjanič je v doktorski disertaciji preučila ustreznost razkužilnega učinka ozona in hidrodinamskih pogojev za vzdrževanje predpisane mikrobiološke kakovosti prečiščene vode. V vsakem vodnem sistemu nastane biofilm kljub izredno nizkemu številu planktonskih bakterij in nizkih vrednosti celokupnega organskega ogljika (TOC), iz filma odpuščeni mikroorganizmi (MO) pa zato nepredvideno poslabšajo mikrobiološko kakovost vode. V ta namen se je doktorandka več kot 5 let spremljala število planktonskih MO ter TOC v rezervoarju in iztopni vodi, razvila metode za ugotavljanje in napoved prisotnosti biofilma, ter korelirala med številom MO v biofilmu in številom planktonskih MO v iztopni vodi v laboratorijskem modelu. Nekateri pristopi izmed vključenih v te namene doslej še niso bili uporabljeni in tudi ne raziskovani za sisteme prečiščene vode.

V zagovoru disertacije je obranila teoretične osnove za nastanek biofilma in njegov obstoj, možnosti za obvladovanje biofilmov v farmacevtskih vodnih sistemih ter metode za ugotavljanje njihove prisotnosti v obliki 4 sklopov, in sicer:

- Uvodni,
- Zagotavljanje mikrobiološke kakovosti vode z ozonom,
- Vpliv ozona na razvoj planktonskih ali biofilmskih MO v prečiščeni vodi (nizko MO, TOC
- Vpliv hidrodinamskih pogojev na nastanek biofilma v krožnem sistemu.

Razkrila je, da kritično vplivajo na MO kakovost vode odvzemna mesta in cevi za dovajanje vode do opreme, kar je spodbudilo ustrezno ukrepanje. Ozon učinkovito odstrani planktonske MO, za biofilmske pa je manj učinkovit. Dobre mikrobiološke rezultate gre pripisati kroženju vode skozi rezervoar s 70 ppb ozona, ki jih učinkovito uniči. Dokazala je, da sta stalen pretok vode in nizko število planktonski MO odločilna za razvoj biofilma pri nizki vsebnosti TOC.

Maja Florjanič je med študijem razvila kompetence, ki ji omogočajo uspešno redno načrtovanje in izvajanje proizvodnje prečiščene vode in servisiranje številnih tujih inspekcij. Objavila je 4 članke, predstavila raziskovalno delo na 3 mednarodnih konferencah.

Spoštovani, ker je doktorandka MAJA FLORJANIČ z uspešnim zagovorom doktorskega dela izpolnil vse pogoje za pridobitev akademskega naslova »doktor znanosti«, vas prosim g. (pro)rektor prof. Miha Juhart, da jo svečano promovirate.

dr. JASNA OMERSEL, mag. farm.

Posttranslacijske spremembe imunoglobulinov kot vzrok avtoimunosti

Mentor: prof. dr. Borut Božič

Avtoimunost je odziv imunskega sistema proti lastnemu organizmu. Če je obseg avtoimunskih reakcij velik, vodi v okvaro tkiv in nastanek avtoimunskih bolezni. Med vzroke, ki vodijo do nastanka preko 100 tovrstnih bolezni, uvrščamo genetske in imunološke faktorje, hormonsko stanje in vplive iz okolja. Večinoma so študije usmerjene v iskanje sprememb v regulaciji imunskega sistema ali v spremenjenih lastnih antigenih; šele v zadnjih letih so se odprla vprašanja o spremembah naravnih in antimikrobnih protiteles, ki vodijo v avtoimunost.

Omersel Jasna je v svojem delu dokazala, da lahko delna oksidacija protiteles, oziroma njihovih vezišč, vodi do spremenjenih vezavnih sposobnosti, kar se kaže kot sprememba v specifičnosti protiteles do molekul lastnega organizma. Na molekulskem nivoju je to posledica kemijske spremembe, kar je dokazala s povečano vsebnostjo karbonilnih skupin v protitelesih, ki je korelirala z dvigom imunoreaktivnosti. Spremembe imunoreaktivnosti oz. specifičnosti so odvisne od razreda protiteles, časa oksidacije in sredstva oksidacije. S specifičnimi encimsko-immunskimi metodami je dokazala, da pridobijo protitelesa zdravih ljudi po delni oksidaciji lastnosti diagnostično pomembnih avtoprotiteles. V biološkem sistemu je dokazala, da oksidirana protitelesa povzročijo izražanje provnetnega interleukina IL-6, kar potrjuje predpostavljeno patogeno vlogo redoks-reaktivnih protiteles. Omersel Jasna je s svojim delom vplivala na razumevanje možnih mehanizmov avtoimunosti, kar je pomembno tudi z vidika potencialnih modelov zdravljenja ali preventive.

Spoštovani gospod rektor, ker je doktorandka Jasna Omersel z uspešnim zagovorom svojega dela izpolnila pogoje za pridobitev akademskega naslova »doktorica znanosti«, vas prosim, da jo svečano promovirate.

dr. SAMO TURK, mag. farm.

Odkrivanje novih inhibitorjev biosinteze bakterijskega peptidoglikana z računalniškimi metodami

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec

Biosinteza peptidoglikana vključuje okrog 20 reakcij, ki potekajo tako v citoplazmi, kot na zunanji strani celične stene. Te reakcije katalizirajo tako encimi, ki so že znane tarče, kot tudi encimi, katerih inhibitorji še niso v klinični rabi. Ker je peptidoglikan ključnega pomena za preživetje bakterij, lahko inhibicija katerega koli od teh encimov pomeni smrt bakterije ali zmanjšanje virulence.

Samo Turk je opravil iskanje novih inhibitorjev encimov, udeleženih v sintezi peptidoglikana, z modernimi metodami računalniško podprtega načrtovanja in rešetanja spojin. Pri tem je uporabili različne metode filtriranja in načrtovanja virtualnih knjižnic spojin, rešetanje na osnovi liganda in sidranje. Pri svojem delu je bil uspešen in je v sodelovanju s sodelavci na fakulteti, kot tudi z različnimi partnerji iz tujine v okviru mednarodnega projekta v 6. OP »EUR-INTAFAR«, odkril vrsto inhibitorjev encimov, udeleženih v biosintezi peptidoglikana. Tako je sodeloval pri odkritju novih inhibitorjev ligaz MurD in MurF, novih hidrosietilenskih inhibitorjev ligaze VanA, in tudi novih inhibitorjev glikoziltransferaz z zanimivim mehanizmom delovanja. Za en inhibitor glikoziltransferaz so namreč dokazali, da deluje preko vezave na substrat lipid II. Sodeloval je pri odkritju novih nekovalentnih inhibitorjev različnih transpeptidaz iz rezistentnih bakterijskih sevov, ki imajo tudi dobro protibakterijsko aktivnost. Njegovo virtualno rešetanje visoke zmogljivosti je bilo

osnova za odkritje prvih znanih inhibitorjev encima PgdA, ki bi lahko potencialno zmanjšali bakterijsko virulenco. Ker gre v vseh naštetih primerih za nove tarče ali pa nov mehanizem delovanja na že znane tarče, predstavljajo vsi odkriti inhibitorji dobro izhodišče za optimizacijo in nadaljnji razvoj protimikrobnih učinkovin.

Samo Turk je v svoji dosedanji karieri v soavtorstvu objavil 13 člankov v revijah z dejavnikom vpliva, dva članka sta v tisku, vloženi pa sta tudi dve mednarodni patentni prijavi.

dr. BOJANA MIRKOVIĆ, mag. farm.

Regulacija endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina b

Mentor: prof. dr. Janko Kos

Bojana Mirković je v doktorskem delu raziskovala proteolitično delovanje cisteinske proteaze katepsina B in njegovih eksogenih inhibitorjev. Tako je za nevtralizacijsko protitelo 2A2 dokazala, da se epitop nahaja v bližini zaporne zanke, to je strukture, ki določa endo ali ekso peptidazno aktivnost katepsina B. Protitelo inhibira endopeptidazno aktivnost katepsina B, hkrati pa aktivira njegovo eksopeptidazno aktivnost. Glede specifičnosti bi bilo nevtralizacijsko protitelo primerno za inaktivacijo katepsina B v patoloških procesih, problem pa je lahko njegova biološka uporabnost. Zato se je kandidatka v nadaljevanju usmerila v pripravo majhnih sinteznih inhibitorjev katepsina B, ki bi imeli podobne inhibitorne lastnosti kot monoklonsko protitelo 2A2. S pomočjo virtualnega rešetanja se je kot tak kandidat izkazal nitroksolin, ki je že uveljavljen antibiotik za zdravljenje urinarnih infekcij. Nitroksolin je značilno zavrl invazijo tumorskih celic *in vitro* ter *in vivo*. S pomočjo določene kristalne strukture kompleksa katepsin B/nitroksolin, pridobljene z rentgensko spektroskopijo, je bil razložen tudi mehanizem vezave inhibitorja z encimom. V okviru doktorskega dela je kot inhibitorje katepsina B okarakterizirala tudi 4,6-bis(benziltio)-1,3,5-triazin-2(1H)-one in dokazala, da spojine, ki vsebujejo 4-aminofenol, delujejo kot lažni pozitivni inhibitorji katepsina B. Bojana Mirković je rezultate doktorskega dela objavila v šestih člankih v revijah z dejavnikom vpliva in je tudi avtorica mednarodne patentne prijave.

dr. SAŠA HABERL, univ. dipl. mikrobiol.

Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in v *in vitro* modelu tkiva

Mentorica: doc. dr. Mojca Pavlin
Somentorica: izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Doktorska disertacija Saše Haberl z naslovom **Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in v *in vitro* modelu tkiva** je osredotočena na področje analize in optimizacije elektrotransfekcije. Le-ta omogoča preprost in varen način vnosa genetskega materiala v celice *in vitro* in *in vivo* in ima številne prednosti pred ostalimi metodami. Vendar pa mehanizmi genske elektrotransfekcije še niso popolnoma pojasnjeni, raziskave *in vitro* pa ne omogočajo analize v razmerah podobnih v tkivih, kjer je mobilnost DNA omejena z zunajceličnim matriksom. Glavni cilji naloge so bili boljše razumevanje mehanizmov elektrotransfekcije ter razvoj preprostega *in vitro* modela tkiva, ki bi omogočal analizo mobilnosti DNA v razmerah podobnim v tkivu.

Doktorandka je v svoji doktorski disertaciji analizirala vpliv koncentracija Mg^{2+} ionov v elektroporacijskem mediju na različne korake elektrotransfekcije, od elektropermeabilizacije membrane, vezave DNA na membrani do učinkovitosti vnosa. Potrdila je hipotezo, da je sam proces sestavljen iz več korakov ter pokazala da večja vezava DNA na membrane ne vodi nujno do bolj uspešne transfekcije ter, da ionska sestava vpliva tudi na prehod DNA preko membrane in prenos do celičnega jedra.

Nadalje je kandidatka razvila postopek, ki omogoča gojenje celic v 3-D kolagenskem modelu tkiva ter uspešen vnos DNA z električnimi pulzi, primerljiv z rezultati dobljenimi *in vivo*. Model omogoča preučevanje in napovedovanje mehanizmov genske elektrotransfekcije v bolj realnem *in vivo* okolju, kandidatka pa je izvedla analizo vpliva mobilnosti DNA v tovrstnem 3-D gelu na učinkovitost transfekcije.

Doktorska disertacija predstavlja izvirne prispevke k znanosti, rezultati pa so bili predstavljeni v treh člankih s faktorjem vpliva, v pripravi pa so tudi nove publikacije. Njeno delo omogoča zasnovo novih študij optimizacije vnosa v 3-D gelih, njeni rezultati pa lahko v prihodnosti pripomorejo k izboljšanju učinkovitosti genske elektrotransfekcije v biomedicinskih aplikacijah kot sta genska terapija ter genska vakcinacija.

dr. NACE ZIDAR, mag. farm.

Načrtovanje in sinteza heterocikličnih inhibitorjev ligaz murc–E

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj

Encimi udeleženi v zapletenem in za bakterijo značilnem procesu sinteze peptidoglikanske stene so odlična tarča za razvoj protibakterijskih učinkovin. V citoplazemskih stopnjah njegove biosinteze sodeluje skupina ligaz Mur (MurC–MurF), ki katalizirajo zaporedje štirih reakcij, pri katerih pride do pretvorbe UDP-*N*-acetilmuraminske kisline do UDP-*N*-

acetilmuramoil-pentapeptida. Kljub številnim raziskavam trenutno na tržišču še ni terapevtsko uporabnega inhibitorja ligaz Mur. V okviru doktorskega dela se je doktorand ukvarjal z načrtovanjem, sintezo in biološkim vrednotenjem novih nizkomolekularnih inhibitorjev encimov MurC–E. Kot osnova pri načrtovanju so mu služile strukture naravnih substratov in produktov ter tridimenzionalne zgradbe aktivnih mest encimov. Izhajajoč iz spojine kinazolinskega tipa dobljene z virtualnim rešetanjem je pripravil več strukturnih analogov, v katerih je kinazolinski obroč nadomestili z (*Z*)-5-benzilidenrodaninskim ali (*Z*)-5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskim fragmentom in na ta način prišel do inhibitorja z IC₅₀ vrednostjo 174 μM na encim MurD iz *E. coli*. S sistematičnim uvajanjem strukturnih sprememb je pripravil izboljšane serije inhibitorjev z IC₅₀ vrednostmi do 28 μM. Poleg tega je za tri spojine iz serije pridobil kristalne strukture kompleksov z encimom MurD iz *E. coli*. Kristalne strukture so razkrile položaj vezave inhibitorjev v aktivnem mestu in predstavljajo dobro osnovo za nadaljnjo optimizacijo. Eni spojini iz serije so izmerili šibko protibakterijsko delovanje na seva *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 z MIK vrednostma 128 μg/mL. V okviru svojega dela je razvil tudi več originalnih sinteznih metod za pripravo omenjenih spojin. Rezultati dobljeni v okviru doktorske disertacije Naceta Zidarja so bili objavljeni v 9 znanstvenih člankih v mednarodnih revijah.

dr. STANE PAJK, mag. farm.

Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran

Mentor: prof. dr. Slavko Pečar

Somentor: izr. prof. dr. Janez Štamcar

Spoznavanje vplivov produktov radikalskih oksidacij fiziološko pomembnih snovi postaja vse aktualnejše. To so snovi, ki nastajajo mimo ustaljenih encimsko kataliziranih reakcij, v njih pa je udeležen kisik oziroma reaktivne kisikove zvrsti. Čeprav so omenjeni produkti količinsko prisotni v komaj še zaznavnih koncentracijah pa lahko skozi daljši čas povzročijo spremembe, ki pomenijo začetek degenerativnega obolenja.

V procesih lipidne peroksidacije in širše, oksidativnega stresa, se v membranah prisoten holesterol v radikalsko sproženih reakcijah oksidira. Nastajajo različni oksisteroli. Stane Pajka je v okviru svoje doktorske naloge raziskoval vplive nekaterih oksisterolov na strukturiranost modelnih membran. Zakaj ravno na strukturiranost membran? Transmembransko signaliziranje kot ustaljen tok informacij med celicami je odvisno od dinamičnih lastnosti biološke membrane, te pa so odvisne od membranskih sestavin. S spreminjanjem posameznih sestavin (prisotnost oksisterolov) se spreminja tudi membranska strukturiranost in s tem povezano signaliziranje. Kot metodo za proučevanje vpliva oksisterolov na membransko strukturiranost je izbral metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR), kot objekt proučevanja pa membrane liposomov.

Ugotovil je, da je vpliv oksisterola odvisen tako od koncentracije le-tega kot od vrste oksisterola. Oksisteroli z več polarnimi skupinami v drugem obroču steroidnega skeleta, imajo večji vpliv na strukturiranost modelne membrane, še več, rezultati kažejo, da večja polarnost drugega obroča v primerjavi s holesterolom, povzroči drugačno interakcijo oksisterola z liposomsko membrano in posledično tudi drugačno strukturiranost. Omenjene ugotovitve so temeljnega pomena za nadaljnje raziskave na realnih bioloških membranah. Stane Pajk je tudi v tej smeri storil prve korake z razvojem novih molekularnih orodij za proučevanje strukturiranosti bioloških membran in vplivov na to strukturiranost. Sintetiziral je nove dvojne probe, ki se vgrajujejo v biološko membrano, imajo fluoroforno in hkrati paramagnetno nitroksidno skupino. Omenjene probe omogočajo, da hkrati pridobimo informacijo, kje v biološkem vzorcu je proba (fluorescentna mikroskopija) in kakšna je

dinamika v njeni neposredni okolici (EPR spektroskopija). S tem je kot prvi odprl pot tovrstnim raziskavam membranskih domen.

Stane Pajk je iz področja doktorskega dela že objavil 3 članke v mednarodnih revijah z visokim faktorjem vpliva. S svojim znanjem (razvoj fluorescentne probe s selektivnim porazdeljevanjem v izbrano fazo) pa je sodeloval v skupini na IJS, ki je svoje rezultate objavila v *Nature photonics*.

dr. LJUBA KRNJAK, prof. kem. in biol. spec. med. biok.

Prognostični pomen proteina s100b in njegove podenote s100bb kot kazalca za oceno okvare možganov pri poškodbah glave

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar
Somentor: doc. dr. Marjan Koršič

Poškodba glave je eden od največjih zdravstveno socialnih problemov v razvitih državah in predstavlja glavni vzrok dela nezmožnosti prebivalstva. Ob sprejemu v bolnišnico je 10% vseh poškodb glave opredeljenih kot huda nezgodna poškodba glave, nadaljnjih 10% je opredeljenih kot srednje huda, 80% pa kot blaga poškodba glave. Mortaliteta po hudi nezgodni poškodbi glave je ocenjena na 20 do 30%, invalidnost preživelih pa na 50%. Zato je iskanje zanesljivega biokemičnega označevalca možganske poškodbe smiselno in predstavlja znanstveni izziv že 30 let. Rutinsko določanje koncentracij S100B v serumu poškodovancev bi predstavljalo velik pozitiven premik pri obravnavi poškodovancev s sumom na poškodbo možganov.

S100B in S100BB sta povišana pri vseh nezgodnih poškodbah glave. Obseg in teža poškodbe vplivata na koncentracijo proteina S100B in njegove podenote S100BB. Protein S100B ima visoko negativno napovedno vrednost poškodbe možganov in je zato uporaben pri odločanju za nadaljnje spremljanje poškodovanca s CT. Mejna vrednost, ki smo jo postavili za S100B je 0,15 µg/L.

Bolniki z nižjimi koncentracijami proteina S100B so imeli krajšo ležalno dobo kot bolniki z višjimi koncentracijami. Visoke serumske koncentracije 24 ur po poškodbi pomenijo slabo prognozo. Dinamika naraščanja koncentracij v prvih 24 urah je večja pri tistih, ki niso preživel. Rezultati kažejo, da je poleg kliničnega in radiološkega pregleda smiselno redno spremljanje koncentracije proteina S100B za napoved diagnoze in prognoze poškodovancev po nezgodnih poškodbah glave.

dr. TIHOMIR TOMAŠIČ, mag. farm.

Računalniško podprto načrtovanje in sinteza novih heterocikličnih zaviralcev ligaz Mur

Mentorica: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič

Pojav multirezistentnih bakterij predstavlja vedno večji problem pri zdravljenju infekcijskih okužb, saj nam v boju proti nekaterim rezistentnim sevom že primanjkuje učinkovitih zdravilnih učinkovin. Zaradi tega je Tihomir Tomašič v luči nujnega razvoja in odkrivanja

novih protibakterijskih učinkovin v svojem doktorskem delu iskal nove protibakterijske učinkovine z novimi mehanizmi delovanja. Z uporabo molekulskega modeliranja je na osnovi znanih tridimenzionalnih struktur encimov (»structure based drug design«) sintetiziral nove zaviralce ligaz MurC, MurD in MurE, ki so udeleženi v znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, gradnika bakterijske celične stene, pomembne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Velik izziv mu je predstavljalo načrtovanje zaviralcev ligaz Mur z multiplim mehanizmom delovanja, saj bi na ta način lažje dosegli protibakterijsko delovanje in se borili proti bakterijski rezistenci. Da bi se izpopolnil v novih metodah molekulskega modeliranja je v letu 2008 štiri mesece gostoval v laboratoriju prof. dr. Gerharda Klebeja v Marburgu v Nemčiji, na Institut für Pharmaceutische Chemie, Philipps Universität Marburg. Tihomir Tomašič je svoje znanstvene dosežke objavil v 10 člankih v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva ter predstavil na številnih mednarodnih konferencah. V zaključku doktorskega usposabljanja je prejel enoletno štipendijo Svetovne federacije znanstvenikov pri Slovenski znanstveni fundaciji. Poleg tega mu bo za znanstvene dosežke podeljena Krkina nagrada za leto 2011.

Spoštovani g. rektor, ker je doktorand Tihomir Tomašič z uspešnim zagovorom svojega doktorskega dela izpolnil pogoje za pridobitev akademskega naslova »doktor znanosti«, vas prosim, da ga svečano promovirate.

dr. ILIJA ILIĆ, mag. farm.

Študij kompresibilnosti in kompaktilnosti izbranih farmacevtskih ekscipientov

Mentor: prof. dr. Stane Srčič

Ilija Ilić je maja tega leta predstavil in zagovarjal doktorsko disertacijo z naslovom **Študij kompresibilnosti in kompaktilnosti izbranih farmacevtskih ekscipientov**. Nalogo je izdelal na Fakulteti za farmacijo na Univerzi v Ljubljani, delno tudi na Univerzi v Szegedu, Madžarska. Tematika disertacije je deformacija farmacevtskih snovi med procesom stiskanja tablet, kjer se glavni deformacijski procesi – elastična in plastična deformacija ter fragmentacija – praviloma prekrivajo. Doktorand je v nalogi uporabil različne modele, npr. Heckelov in Walkerjev in različne metodologije določanja tehnološko relevantnih mehanskih lastnosti nekaterih farmacevtskih ekscipientov: t.j. pri laktozah, mikrokristalni celulozi, koruznem škrobu, kalcijevem hidrogenfosfatu in izomaltu. V nadaljevanju je doktorand podrobno študiral vpliv granulacije teh ekscipientov na mehanske lastnosti izdelanih granul. Pri tem posebej izpostavljam originalni prispevek naloge, ki uvaja proučevanje mehanskih lastnosti na nivoju enega delca z uporabo nanoindentacije in te rezultate primerja s tistimi na makro skali. Ti podatki in povezave so izjemnega pomena in aktualna raziskovalna novost na farmacevtsko tehnološkem področju.

Znanja in podatke o deformacijskih lastnosti farmacevtskih snovi je doktorand tudi aplikativno uporabil za razvoj večnotne farmacevtske oblike – t.j. tablete sestavljene iz

filmsko obloženih pelet. Tudi to je področje izjemnega zanimanja v farmacevtski industriji, tako originatorski kot generični.

dr. NIKOLA MINOVSKI, mag. farm.

Uporaba kemometričnih pristopov za QSAR študije fluorokinolonov kot protituberkuloznih učinkovin

Mentor: prof. dr. Tomaž Šolmajer

Somentor: doc. dr. Marjan Vračko Grobelšek

Dr. Nikola Minovski je v svoji doktorski disertaciji uvodoma predstavil protituberkulozne učinkovine, 6-fluorokinolone, ki delujejo kot zaviralci encima DNA giraze A. To je bakterijski encim, ki kontrolira proces topoloških sprememb bakterijske DNA (cepitev in ponovno povezavo verige). Fluorokinoloni zavirajo girazno aktivnost s stabilizacijo kompleksa med girazo A in cepljeno DNA. Klinične raziskave so pokazale, da imajo znane kinolonske učinkovine tudi nezaželene stranske učinke, zato so novejša raziskava usmerjene v iskanje kinolonskih analogov z izboljšano biološko učinkovitostjo in zmanjšano toksičnostjo.

Za načrtovanje novih 6-fluorokinolonov kot potencialnih novih zaviralcev DNA giraz, je izdelal kompleksen pristop na treh nivojih: na prvi ravni je na osnovi znanih 6-fluorokinolonov, za katere so bile vrednosti biološke aktivnosti eksperimentalno določene, na treh nizih molekul ugotovil kvantitativno razmerje med strukturo in aktivnostjo (QSAR modele). Ti modeli, ki so bili razviti z uporabo multiple linearne regresije (MLR), nato pa validirani še z uporabo nelinearnih pristopov - Kohonenove umetne nevronske mreže (KANN) in protitočne umetne nevronske mreže (CP ANN), omogočajo napoved biološke aktivnosti za nove analoge s 6-fluorokinolonsko strukturo. Na drugi ravni je na osnovi sintezne poti za klasične zaviralce DNA giraze ciprofloksacina, moksifloksacina in ofloksacina generiral virtualno kombinatorično knjižnico (skupaj 53.871 spojin) vseh možnih R1, R7 in R1,R7 substituiranih analogov s 6-fluorokinolonskim skeletom. Iz te knjižnice je z uporabo filtrov, s katerimi izberemo spojine z zdravilni učinkovini podobno strukturo, izbral niz 427 spojin, ki jim je s poprej razvitimi QSAR modeli določil virtualno biološko aktivnost. Na tretjem nivoju je nato te spojine sidral v (i) eksperimentalno določeno strukturo kompleksa DNA giraza-DNA-levofloksacin in (ii) pripravil več farmakofornih modelov na osnovi strukture ligandov in na osnovi eksperimentalno določene strukture aktivnega mesta encima tarče. Položaj v aktivnem mestu giraze A vseh spojin, ki so bile izbrane na osnovi teh modelov, je analiziral in njihove interakcije z okolico v aktivnem mestu ovrednotil s primerjavo z znanimi, klinično uporabljanimi 6-fluorokinoloni. Na ta način je z uporabo razpoložljivih kemometričnih pristopov in sodobnih metod molekulskega modeliranja izbral serijo šestih novih 6-fluorokinolonskih analogov z visoko predvideno biološko aktivnostjo ($0.0021 < MIC[\mu\text{g}/\text{mL}] < 0.1$).

Dr. Minovski je z uporabo široke palete sodobnih metod kemometrije in molekulskega modeliranja zgradil modele kvantitativnega razmerja med strukturo in aktivnostjo (QSAR) in na osnovi dostopnih eksperimentalnih podatkov iz kristalnih struktur kompleksov encim-zaviralec povečal razumevanje zaviranja encima na atomskem nivoju. Ti rezultati omogočajo tako optimizacijo do sedaj znanih spojin vodnic kot identifikacijo novih razredov potencialnih inhibitorjev z uporabo virtualnega reševanja knjižnic dosegljivih spojin. Disertacija predstavlja pomembno izhodišče za načrtovanje novih antimikrobnih učinkovin

6-fluorokinolonskega tipa in je tudi prispevek k razumevanju mehanizma inhibicije DNA giraz A.

dr. ŠTEFAN STARČEVIĆ, mag. farm.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec

Somentorica: izr. prof. dr. Tea Lanišnik Rižner

V svoji doktorski disertaciji je Štefan Starčević načrtoval, sintetiziral in biokemijsko vrednotil nove inhibitorje 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1 (17 β -HSD1) kot potencialne protitumorne učinkovine. 17 β -HSD1 katalizira redukcijo estrona do najmočnejšega estrogena estradiola in tako predstavlja pomembno tarčo za razvoj novih učinkovin za zdravljenje hormonsko odvisnih oblik raka. Kljub intenzivnemu načrtovanju in iskanju inhibitorjev 17 β -HSD1, ki potekata že vse od odkritja encima konec petdesetih let dvajsetega stoletja, ter kljub razrešeni kristalni strukturi encima, klinično uporabnega zdravila še ni. Nekateri inhibitorji 17 β -HSD1 so pomembno vplivali na zmanjšanje tumorske mase pri živalskih modelih, vendar niso uspeli preiti v klinične faze razvoja novih zdravil. V zadnjem času pospešeno iščemo predvsem nesteroidne inhibitorje 17 β -HSD1, ki bi imeli boljše farmakološke in farmakokinetične lastnosti od steroidnih učinkovin.

Ker sta oblika in struktura aktivnega mesta encima visoko komplementarni s ploščato strukturo estrogenskega substrata, je Štefan Starčević uporabili steroidomimetični pristop načrtovanja novih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1. Poleg planarne hidrofobne steroidne strukture je pri načrtovanju spojin upošteval še razporeditev in medsebojno oddaljenost polarnih skupin na steroidnem substratu. S sintezo je pripravil knjižnico različnih derivatov kumarina in indola, ki oponašajo steroidni skelet, ter z njimi razložil povezavo med strukturo in delovanjem (SAR) za inhibicijo 17 β -HSD1 .

Štefan Starčević je pokazal, da 7-fenilni derivati kumarinov, ki imajo na mestu 3 kumarinskega skeleta še acetilno skupino, dobro in selektivno (v primerjavi s 17 β -HSD2) inhibirajo 17 β -HSD1. Potrdil je tudi, da je njihova afiniteta do receptorjev za estrogene zanemarljiva, kar nakazuje na njihovo neestrogeno delovanje. Najmočnejši kumarinski inhibitor 17 β -HSD1 kompetitivno in reverzibilno inhibira tarčni encim z vrednostjo K_i 53 nM. Poleg tega je za to spojino uspel dokazati tudi njeno znotrajcelično delovanje na tarčo, kar je privedlo do zmanjšanja od estrona odvisne proliferacije celic T-47D. Te človeške rakave celice endogeno izražajo 17 β -HSD1 in jih uporabljamo kot enega od celičnih modelov za

proučevanje od estrogenov odvisnega raka dojke. V nasprotju s kumarinskimi derivati se derivati indola niso izkazali kot dobri inhibitorji 17 β -HSD1.

V naslednji fazi svojega dela je z uporabo strukturno podprtega virtualnega reševanja visoke zmogljivosti odkril nove derivate auronov, ki izjemno učinkovito inhibirajo 17 β -HSD1. S pomočjo računalniških metod je razložil tudi povezavo med strukturo in delovanjem za inhibitorno delovanje auronov na 17 β -HSD1. Najmočnejši auronski inhibitor je inhibiral tarčni encim z IC₅₀ vrednostjo 45 nM..

Z doktorskim delom je Štefan Starčević uspel razkriti strukturne elemente, ki so pomembni za učinkovito načrtovanje selektivnih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1 (v primerjavi s 17 β -HSD2 in vezavo na receptorje za estrogene). Uspelo mu je tudi potrditi uspešnost strukturno podprtega virtualnega reševanja visoke zmogljivosti pri iskanju in načrtovanju novih inhibitorjev 17 β -HSD1. Dognanja njegovega raziskovalnega dela bodo pomembno pripomogla k uspešnemu preboju nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1 v klinične faze razvoja. Iz svoje doktorske disertacije je Štefan Stačević objavil 4 članke v mednarodnih revijah, enega tudi v *Journal of Medicinal Chemistry* (IF=5,2), ki je najpomembnejša revija v polju farmacevtske kemije.

dr. DANIJELA FURLAN, uni. dipl. kem. spec. med. biokem.

Nekonjugirana hiperbilirubinemija novorojenčkov in spremembe v genu za UDP-glukuronil transferazo 1A1 (UGT1A1)

Mentorica: zasl. prof. dr. Jana Lukač Bajalo

Danijela Furlan je v svoji doktorski disertaciji z naslovom **Nekonjugirana hiperbilirubinemija novorojenčkov in spremembe v genu za UDP-glukuronil transferazo 1A1 (UGT1A1)** preučevala povezanost polimorfizmov A(TA)₅₋₈TAA v območju TATA ponavljajočega zaporedja v promotorski regiji gena UGT1A s pojavom hiperbilirubinemije novorojencev. Bilirubin je do neke meje zaščita pred singletnim kisikom in drugimi radikali, vendar pa je pri vrednostih, ki presežejo fiziološke meje, nevrotoksičen in zahteva niz ukrepov in kot skrajni, zamenjava krvi z izmenjalno transfuzijo. Omenjene polimorfizme poznamo pod klinično oznako Gilbertov sindrom (GS), ki se v kavkaški populaciji pojavlja v okoli 15% in se deduje avtosomno recesivno. Ugotovljeno je tudi, da imajo osebe z GS lahko moteno tudi glukuronizacijo zdravil, ki zaradi tega lahko delujejo toksično.

V raziskavo je vključila skupno 335 novorojenčkov (dve skupini) in 236 odraslih prostovoljcev. V prvi preiskovani skupini 147 novorojenčkov je ugotavljala razlike med donošenimi in nedonošenimi novorojenčki z nepojasnjeno patološko hiperbilirubinemijo, v drugo preiskovano skupino je vključila 188 zdravih zaporedno rojenih donošenih novorojenčkov, ki jim je bila odvzeta popkovnična kri in 3.dan ter kasneje venska kri.

Za izvedbo raziskave je uporabila sodobne tehnike in metode molekularne genetike in laboratorijske medicine, za vrednotenje rezultatov pa ustrezne statistične analize.

Ključne ugotovitve raziskave so naslednje:

- dokazala je, da je patološka nekonjugirana hiperbilirubinemija novorojenčkov povezana s polimorfizmom A(TA)₇TAA v promotorski regiji gena *UGT1A1*,
- da se tako akutna kot prolongirana hiperbilirubinemija, pogosteje pojavlja pri dečkih kot pri deklicah,
- da sta genotip (TA)_{7/7}, značilen za Gilbertov sindrom in alel (TA)₇ pogostejša pri dečkih z akutno in prolongirano nekonjugirano hiperbilirubinemijo,
- da je z merjenjem koncentracije bilirubina v popkovnični krvi možno napovedati patološko nekonjugirano hiperbilirubinemijo,
- na osnovi te zadnje ugotovitve je podala predlog, da se pri vseh novorojenčkih uvede merjenje koncentracije bilirubina v neinvazivno odvzeti popkovnični krvi in se tistim s preseženo mejno koncentracijo izvede tudi genotipizacija, kar omogoča v kasnejšem obdobju farmakogenetsko svetovanje za ustrezen izbor zdravil pri zdravljenju kasnejših bolezni vsem posameznikom z odkritim polimorfizmom (TA)_{7/7}.

Z rezultati raziskave so potrjene vse postavljene hipoteze in disertacija asist.mag. Danijele Furlan predstavlja izviren doprinos k znanosti na področju klinične biokemije pa tudi širše.

dr. ZORAN BUBNIČ, uni. dipl. ing. kem.

Razvoj in validacija metod atomske absorpcijske spektrometrije in njihova uporaba v kontrolnih laboratorijih v proizvodnji zdravilnih učinkovin

Mentor: prof. dr. Marjan Veber

Somentor: prof. dr. Uroš Urleb

Kovine so v zdravilnih učinkovinah lahko prisotne tudi kot nečistot zaradi uporabe kovinskih katalizatorjev, zaradi surovin, ki vsebujejo kovinske ione ali zaradi izločanja kovin s površin opreme. Zaradi možnih toksičnih učinkov kovin postaja njihovo določanje in spremljanje njihovih koncentracij v vseh stopnjah sinteze vse pomembnejše.

Kandidat je razvil metodo za določanje niklja v učinkovinah z ETAAS. Kot testni substanci je izbral tamsulozinijev klorid in lizinopril, pri sintezi katerih se uporablja nikelj kot katalizator. Izdelana metoda je visoko specifična in ima zelo nizko mejo določljivosti. Za pripravo vzorcev je uporabil mikrovalovni razkroj pri povišanem tlaku in uporabo mešanice HNO₃ in H₂O₂. Posebno pozornost je posvetil izbiri in optimizaciji temperaturnega programa za ETAAS. Pravilnost metode je potrdil s tehniko standardnega dodatka in primerjavo rezultatov dobljenih z elementno masno spektrometrijo (ICP-MS).

V nadaljevanju je potrdil, da je mogoče AAS uporabiti tudi za določanje sledov učinkovin v izpiralnih medijih. V te namene je razvil postopka za določanje magnezija z elektrotermično atomizacijo v vodnem in etanolnem mediju in litija v vodnem mediju. Prednost razvitih postopkov glede na do sedaj uporabljene je nizka meja določljivosti in

boljša specifičnost, ostanke učinkovin pa je možno določati tudi v organskih topilih, ki se poleg vode najpogosteje uporabljajo za čiščenje opreme.

Rezultate dela s področja teme doktorske disertacije je objavil v dveh znanstvenih člankih, pri katerih je kandidat prvi avtor.

dr. KARMEN TESKAČ PLAJSŠEK, mag. farm.

Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odzivom

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Karmen TESKAČ - PLANJSŠEK, mag farm, MR je zaključila interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl z doktorsko nalogo **POVEZAVA MED POVRŠINSKIMI LASTNOSTMI NANODELCEV, CELIČNIM PRIVZEMOM IN BIOLOŠKIM ODZIVOM** na UL - Fakulteti za farmacijo.

Karmen Teskač Planjšek je vpisala doktorski študijski program Biomedicina v šolskem letu 2007/08, prijavila temo doktorske naloge 15. 9. 2009 in javno zagovarjala disertacijo 23. junija 2011. Doktorsko delo je izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl. Raziskovalno je največ delala v laboratorijih UL FFA, specifične instrumente pa je koristila v Laboratoriju za biofiziko, IJS, SEM na UL MF in Kemijskem inštitutu, TEM na UL BF.

Disertacija Karmen Teskač Planjšek sodi na področje nanotehnologije. V celoti je uspela raziskati in potrditi tri hipoteze, ki jih je navedla v predlogu teme:

- samo nanodelci z ustrezno sestavo nimajo toksičnih posledic na celicah,
- biološka uporabnost dostavljene učinkovine je odvisna od načina in hitrosti prehajanja in porazdeljevanja po citosolu ter od pozicije nanodelcev v celicah, in
- trdni lipidni nanodelci s primerno sestavo so uporabni kot dostavni sistemi za resveratrol, ki naj bi v mitohondrijih uravnaval številne procese, povezane z nastankom radikalov in sprožanjem encimskih procesov.

Upošteva *prvo hipotezo* – citotoksičnost- je opredelila *in vitro* varnostni profil nanodelcev (ND) ZnO in TiO₂ in biološko najbolj sprejemljivo sestavo trdnih lipidnih nanodelcev (SLN).

Drugo hipotezo – porazdeljevanje ND v celičnem okolju – je potrdila s proučevanjem načina in hitrosti prehoda ND v celice, citosolnem porazdeljevanju ter njihovi končni poziciji v celicah, katera je zaželeno enaka tarčnemu mestu za delovanje učinkovine. Sledenje SLN na njihovi poti v znotrajcelično področje je dosegla z učinkovitim fluorescenčnim označevanjem SLN z novo sintetizirano spojino na FFA (S. Pajk, S. Pečar), ter celičnih struktur in napredno tehniko mikroskopiranja.

S tretjo hipotezo je dokazala, da so ND sprejemljivi nosilci učinkovin. Proučevala je resveratrol (RSV), kot obetajoča naravna spojina za bolezenska stanja z visoko radikalsko gostoto, ki je velikokrat iniciator rakavih obolenj. Intrinzične lastnosti RSV, ki slabijo njegovo biološko razpoložljivost, je možno obiti z vgrajevanjem v lipofilne ND (npr. SLN,

liposome). Preučevala je celični odziv v prisotnosti samega RSV in dostavljenega s pomočjo ND.

Karmen Teskač je med študijem razvila kompetence, ki ji omogočajo uspešno načrtovanje in izvajanje raziskovalnih nalog tudi v kompleksnih situacijah. Naj navedem le nekatere: samostojnost, kreativnost, vztrajnost in delavnost. Ni se zbala raziskovalnega dela na aplikativnih projektih. Objavila je 12 člankov, 8 v revijah s faktorjem vpliva, predstavila raziskovalno delo na 26 mednarodnih konferencah, delala timsko pri domačih in tujih projektih in vodila vaje iz farmacevtske in nano- tehnologije. Odmevnost raziskovalnega dela, izražena s številom citatov, je več kot 20 (18.10.2011). Članek z resveratrolom je bil pol leta na 8. mestu med najbolj iskanimi člankov v International Journal of Pharmaceutics (vir Sciencedirect Top 25). Takoj po doktoratu se je zaposlila v gospodarstvu kot samostojna raziskovalka (Vitaval).

dr. IRMA ŠTERN, mag. farm.

Proučevanje diagnostične uporabnosti analize zunajcelične mRNA genov odgovornih za razvoj nestabilne lehe v plazmi bolnikov s koronarno aterosklerozo

Mentor: izr. prof. dr. Darko Černe

V raziskovalnem delu je doktorandka Irma Štern preučevala zunajcelične mRNA (mRNA, ki se nahajajo zunaj celic) v plazmi bolnikov s koronarno aterosklerozo. Najprej je razvila zanesljive postopke merjenja nivoja mRNA v plazmi in sicer tistih genov, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremljajo ali aktivno sodelujejo v razvoju in destabilizaciji koronarne aterosklerotične lehe. S tem je potrdila domnevo o obstoju omenjenih mRNA v plazmi in o možnosti njihove zanesljive kvantifikacije. V drugem delu eksperimentalnega dela je potrdila domnevo, da imajo bolniki s koronarno aterosklerozo zvišan plazemski nivo mRNA genov, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremljajo ali aktivno sodelujejo v razvoju in destabilizaciji koronarne aterosklerotične lehe. Odnosi med plazemskimi nivoji mRNA različnih genov so skladni trenutnemu poznavanju aterogeneze, nekatere nepričakovane povezave pa nakazujejo na povsem nove patobiokemične mehanizme, med katerimi velja izpostaviti predvsem vpetost katepsina S v vnetno in imunsko komponento aterogeneze. Razvite analitske metode trenutno predstavljajo predvsem novo raziskovalno orodje in zanimiv strokovni izziv. Omogočajo neinvazivno *in vivo* analizo izražanja genov v žilni steni ter zaznavo in oceno intenzivnosti aterosklerotičnega procesa. Omogočajo neinvazivno *in vivo* preučevanje patofizioloških procesov in preučevanje novih načinov zdravljenja bolezni. So alternativa ali dopolnilo analitiki proteinov.

dr. UROŠ MAVER, mag. farm.

Funkcionalizacija površin za razvoj dostavnih sistemov učinkovin za ciljno zdravljenje

Mentor: izr. prof. dr. Odon Planinšek

Somentor: prof. dr. Janko Jamnik

V svojem doktorskem delu je Uroš Maver proučeval uporabnost mikroskopije na atomsko silo na področju biomedicinskih znanosti in razvijal modelne terapevtske sisteme z nanometrskimi velikostmi.

V ta namen je razvil večstopenjsko metodologijo, ki temelji na zelo natančni pripravi vseh stopenj razvoja terapevtskega sistema. Kot prvo je razvil postopek ponovljive in zanesljive priprave atomsko ravne površine zlata in dokazal, da ta zagotavlja pridobivanje slik in nedvoumno merjenje z molekulsko ločljivostjo ob uporabi mikroskopa na atomsko silo.

Za potrebe določanja interakcij med posameznimi deli terapevtskih sistemov, je predstavil metodologijo za pripravo funkcionaliziranih konic, ki jih uporabljamo pri meritvah z mikroskopom na atomsko silo. Dokazal je, da je izbran postopek primeren za vrednotenje reverzibilnih interakcij s poenostavljenimi deli terapevtskega sistema.

Za preverjanje delovanja pripravljenih modelnih terapevtskih sistemov je izvedel meritve z mikroskopom na atomsko silo pri simuliranih fizioloških pogojih in razvil postopek za vrednotenje sprememb po nastopu izbranih fizioloških dejavnikov. Z razvojem nove metodologije, ki zajema statistično obdelavo velikega števila meritev sil, izmerjenih z mikroskopom na atomsko silo, je pokazal, da lahko tudi za relativno kompleksne polimerne molekule dokažemo vrsto vezi z modelno površino.

V nadaljevanju je izdelal tudi nanokompozit z vgrajenimi superparamagnetnimi nanodelci in fluorescenčnim barvilom rodaminom. Dokazal je, da so takšni delci primerni za sledenje modelnega terapevtskega sistema v in vitro raziskavah ter da izkazujejo lastnosti, ki bi lahko omogočile dostavo izbrane zdravilne učinkovine na terapevtsko zanimivo mesto v telesu.

Za potrditev hipoteze, da je reverzibilna vezava zdravilne učinkovine na nanodelce pomembna za njeno delovanje na ciljanem mestu je opisal pripravo nanodelcev cinkovega fosfata s koordinativno pripetimi proteinskimi zdravilnimi učinkovinami. Njihovo učinkovitost je dokazal s testi sproščanja in z *in vitro* raziskavami biološke aktivnosti pred in po vezavi na mišjih fibroblastnih celičnih linijah.

Doktorand je na koncu disertacije predstavil tudi nov dostavni sistem sestavljen iz superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida, obloženih s tanko plastjo silicijevega dioksida. V to oblogo je vgradil zdravilno učinkovino in pokazal, da se iz nje sprošča z difuzijo. Karakterizacija novo razvitega dostavnega sistema kaže potencialno uporabo v terapevtske namene.

Rezultate svojega dela je Uroš Maver že objavil v sedmih izvirnih znanstvenih člankih s faktorjem vpliva, en članek iz doktorske disertacije pa je še recenziji.

dr. TINA UKMAR, mag. farm.

Proučevanje mehanizmov vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine iz urejenih mezoporoznih silikatov

Mentor: izr. prof. dr. Odon Planinšek

Somentor: doc. dr. Gregor Mali

Tina Ukmar je v svojem doktorskem delu proučevala mehanizem vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine indometacina iz urejenih mezoporoznih silikatov ter identifikacijo kritičnih parametrov, ki vplivajo na oba procesa. Za doseg omenjenega cilja je najprej podrobno načrtovala in pripravila urejene mezoporozne silikate, postavila in razvila metodologijo za njihovo vrednotenje ter za vgradnjo modelne učinkovine, podrobno analizirala strukturo učinkovine v porah modelnih ogrodij ter proučevala dinamiko sproščanja učinkovine. Eksperimentalne ugotovitve je teoretično podkrepila z matematičnim modeliranjem faznih sprememb ter transporta učinkovine iz ogrodij.

Doktorandka je z rezultati raziskav potrdila hipoteze, in sicer da imajo prostorske omejitve ogrodja, lastnosti topila in koncentracija raztopine modelne učinkovine pri polnjenju ogrodja izredno pomembno vlogo pri vgradnji učinkovine in poleg tega vplivajo na to, katera faza učinkovine pri vgradnji nastane. Vplivajo torej tako na strukturo vgrajene

učinkovine, kot tudi na fizikalno-kemijske lastnosti in celo stabilnost vgrajene snovi. Teoretični rezultati molekularnega transporta so razkrili obrat odvisnosti kinetike transporta topljenca od velikosti por ogrodja ob postopnem povečanju privlaka s stenami. Skupaj z eksperimentalnimi študijami sproščanja pa je doktorandka podprla hipotezo, da jakost interakcij učinkovine s steno ogrodja odločilno vpliva na kinetiko sproščanja in ne nazadnje, da interakcije določijo tudi celokupni delež sproščene učinkovine. Prav vključitev interakcij s stenami v opis transporta pa je podala razlago izmerjene odvisnosti kinetike sproščanja od velikosti por. Odkritje, da je sproščanje iz mezoporoznih silikatov interakcijsko nadzorovano vsekakor predstavlja preboj v bazični znanosti. Razlaga mehanizma vgrajevanja ter strukturnih lastnosti učinkovine skupaj s poglobljenim vpogledom v procese sproščanja omogoča ciljano uravnavanje kinetike sproščanja. Doktorsko delo predstavlja celostni prispevek k znanstvenemu napredku na področju razvoja sodobnih dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin. Rezultate svojega dela je Tina Ukmar objavila v osmih člankih v mednarodno priznanih znanstvenih revijah s faktorjem vpliva.

dr. URŠKA ŽAGER, mag. farm.

Značilnosti vezave protiteles proti $\beta 2$ glikoproteinu I na antigen

Mentor: prof. dr. Borut Božič
Somentorica: doc. dr. Mojca Lunder

Avtoimunost je odziv imunskega sistema proti lastnemu organizmu. Če je obseg avtoimunskih reakcij velik, vodi v okvaro tkiv in nastanek avtoimunskih bolezni. Ena od njih je antifosfolipidni sindrom, ki se klinično kaže skozi venske in arterijske tromboze, zastoje rasti plodu in splave, laboratorijsko pa s prisotnostjo specifičnih avtoimunskih protiteles.

Urška Žager je s pomočjo površinske plazmonske resonance, rešetanja bakteriofagnih peptidnih knjižnic, različnih encimskoimunskih tehnik in seveda s svojimi lastnimi kognitivnimi sposobnostmi odkrila nekatere pomembne lastnosti medmolekulskih interakcij, ki so osnova bolezni. Dokazala je, da so za vezavo teh protiteles na epitope tarčnega antigena ključne aminokisliline s stranskimi skupinami, ki omogočajo nastanek vodikovih ali ionskih vezi, oziroma tiste aminokisliline, ki to možnost pridobijo s tautomerijo. Ugotovila je aminokislinski zaporedji, ki posnemata vezišča na tarčnem antigenu, na katera se veže več kot 60% patogenih protiteles bolnikov z antifosfolipidnim sindromom. Hkrati je dokazala, da izkazujejo oksidativno spremenjena naravna ali protimikrobna protitelesa v *in vitro* sistemu podobne vezavne značilnosti kot patogena avtoprotitelesa. To nakazuje, da lahko oksidacija že prisotnih naravnih protiteles spremeni njihovo specifičnost vezave in jih pretvori v avtoimunska protitelesa.

Urška Žager je s svojim delom pridobila znanja, ki so pomembna za razumevanje mehanizmov nastanka bolezni, za učinkovito diferencialno diagnostiko, pa tudi za razvoj morebitne tarčne terapije imunsko pogojene tromboze in antifosfolipidnega sindroma.

Spoštovani gospod rektor, ker je doktorandka Urška Žager z uspešnim zagovorom svojega dela izpolnila pogoje za pridobitev akademskega naslova »doktorica znanosti«, vas prosim, da jo svečano promovirate.

dr. MIHAEL SIMČIČ, uni. dipl. mikrobiol.

Določitev načina vezave novih inhibitorjev MurD ligaze

Mentor: prof. dr. Uroš Urleb
Somentorica: doc. dr. Simona Golib

Komisija za oceno doktorske disertacije Mihaela Simčiča je ugotovila, da njegova doktorska disertacija predstavlja samostojen in izviren prispevek k znanosti na področju farmacije in Senatu Fakultete za farmacijo podala pozitivno oceno.

Mihael Simčič je določil način vezave več vrst novih inhibitorjev encima, ligaza MurD, ki sodeluje pri znotrajceličnih citoplazemskih fazah biosinteze peptidoglikana in je pomembna tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Razvoj novih antibiotikov z novimi mehanizmi delovanja je ena od ključnih strategij v boju proti naraščajoči bakterijski rezistenci. V Evropski uniji se v bolnišnicah vsako leto okuži dva milijona ljudi z bakterijskimi infekcijami, od tega jih več kot stosedemdesttisoč umre.

Mihael Simčič je z uporabo modernih metod NMR spektroskopije in molekularnega modeliranja določil interakcije ligand-encim na atomskem nivoju in ugotovil več vrst dinamičnih procesov v kompleksih ligand-encim, kot so rotacije posameznih segmentov vezanih ligandov in nihanja domen ligaze MurD, ki vplivajo na vezavne afinitete in inhibitorne aktivnosti novih ligandov. Podal je smernice za načrtovanje aktivnejših analogov in prispeval k novim aspektom racionalnega načrtovanja učinkovin. Dosedanje neuspehe pri razvoju učinkovitih inhibitorjev muramilnih ligaz je mogoče pripisati tudi nepoznavanju dinamičnih procesov pri interakciji biološko aktivnih molekul s proteinskimi tarčami.

Rezultati raziskovalnega dela v okviru njegove doktorske disertacije so bili objavljeni v štirih izvirnih člankih in enem preglednem članku v mednarodnih revijah z dejavnikom vpliva, dva izvorna članka sta poslana v objavo.

dr. PETRA KOLENC PEITL, mag. farm.

Radiooznačeni analogi gastrina kot ligandi za holecistokinin-B (CCK-B/gastrinski) receptor

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc
Somentor: prof. dr. Helmut Maecke

Analogi minigastrina, označeni s pozitronskimi ali gama sevalci se uporabljajo za prikazovanje tumorjev, ki imajo na svoji površini visoko izražene receptorje za CCK-B/gastrinski receptor. Kot poglobitvi razlogi, da se radiooznačeni analogi gastrina ne uporabljajo v terapiji tumorjev z izraženimi CCK-B/gastrinskimi receptorji, so relativna nizka serumska stabilnost obstoječih analogov in neugodno razmerje njihovega kopičenja tumor-proti-ledvicam.

V doktorski disertaciji je doktorandka sintetizirala vrsto analogov minigastrina, kjer je obdržala C-terminalni del minigastrina, ki je odgovoren za vezavo na receptor in spreminjala distančnik do bifunkcionalnega kelatorja DOTA, ki ga je konjugirala na N-terminalni del minigastrinskega analoga in je kot tak služil za kompleksiranje kovinskih

ionov. Z uvedbo neionskih distančnikov, kot so dPEG_n, ki so se izkazali kot dobri stabilizatorji v primeru analogov bombezina in D-izomerov različnih aminokislin, za katere je prav tako znano, da v izbranih primerih zvišajo metabolično stabilnost, je sintetizirala spojine, ki so primerne za označevanje z različnimi radioizotopi (¹¹¹In kot primerom gama sevalca, ⁹⁰Y in ¹⁷⁷Lu kot beta sevalcema in ⁶⁸Ga kot primerom pozitronskega sevalca) in jih evaluirala na različnih *in-vitro* in *in-vivo* modelih. Kot nadaljevanje osnovne strategije uvajanja neionskih distančnikov je sintetizirala in biološko ovrednotila še spojini z ionskima distančnikoma in razliko v stereoizomeriji (L-Glu vs. D-Glu).

Dva sintetizirana analoga minigastrina (z D-Gln₆ in D-Glu₆ distančnikom) izkazujeta visoko metabolično stabilnost v humanem serumu in ugodno razmerje njihovega kopičenja tumor-proti-ledvicam. V primerjalni »Minigastrin« študiji, ki je potekala v okviru COST BM0607 Action, kjer so se primerjali najboljši izbrani analogi iz posameznih evropskih laboratorijev, je bil minigastrinski analog z D-Glu₆ distančnikom ocenjen kot najbolj obetajoč in se z njim načrtuje multicentrična klinična študija, ki bo pokazala, če je ta spojina dejansko primerna tudi za peptidno-receptorsko radionuklidno terapijo.

dr. MIHA VIVODA, mag. farm.

Kvantifikacija amorfnosti substanc za farmacevtsko rabo na primeru nifedipina

Mentor: doc. dr. Robert Roškar
Somentor: prof. dr. Vojko Kmetec

Doktorska disertacija Mihe Vivoda sodi na področje obstojnosti zdravil t.j. na področje farmacevtskih raziskav, ki preverjajo in zagotavljajo, da bolnik znotraj predvidenih časovnih okvirov prejme zdravilo deklarirane učinkovitosti, varnosti in kakovosti. Zaradi velika pomena amorfnosti v farmaciji, je tako z vidika njihove potencialne terapevtske uporabe, kot tudi z vidika obvladovanja proizvodnje trdnih farmacevtskih izdelkov izrednega pomena sposobnost vrednotenja že manjšega deleža amorfnih oblik učinkovin v vseh fazah razvoja zdravila. Zaradi kompleksne in heterogene strukture amorfnih oblik se za celovito obravnavo amorfnosti danes še vedno uporablja več komplementarnih analiznih metod hkrati.

Ravno zato je doktorand v prvi fazi raziskav preveril uporabnost nekaterih že uveljavljenih analiznih metod na tem področju kot so diferenčna dinamična kalorimetrija, rentgenska difrakcija, infrardeča spektroskopija. Dokazal je, da lahko z optimizacijo pogojev testiranja in z ustreznim pristopom vrednotenja podatkov izboljša uporabnost posameznih metod v smislu kvantitativnega vrednotenja amorfnosti nifedipina. Da bi omogočil še širši vpogled v obravnavano tematiko, je vpeljal v prakso še dve relativno novi in neuveljavljeni analizni metodi na tem področju: jedrsko kvadrupolno resonanco in mikrokolorimetrijo. Še zlasti pri slednji je s sistematičnim pristopom optimizacije pogojev testiranja značilno skrajšal (več kot deset krat) čas testiranja amorfnosti, kar bo v prihodnje nedvomno prispevalo k večji uporabnosti te termoanalizne metode.

V drugi fazi raziskav je Miha Vivoda proučeval različne načine pridobivanja amorfnih oblik nifedipina, s čimer je ocenil tako vpliv različnih tehnoloških procesov (npr. mletja) na nastanek amorfna kot tudi ustrezen način za pridobivanje terapevtsko uporabne oblike

amorfni učinkovin. Z namenom opredelitve morebitne terapevtske uporabnosti, je bil zadnji del raziskav namenjen preizkušanju stabilnosti amorfnega nifedipina. Kljub temu, da kandidat ni potrdil uporabnosti amorfnega nifedipina v terapevtske namene, je stabilnostna študija jasno pokazala, da je potrebno vsebnost amorfnega nifedipina skrbno spremljati v vseh fazah proizvodnje, saj lahko le tako zagotovimo ponovljivo in ustrezno kakovost končnih farmacevtskih izdelkov. Inovativnost in aktualnost obravnavane tematike potrjuje tudi dejstvo, da je kandidat s področja omenjenih raziskav objavil oz. je v fazi objavljanja več člankov v revijah s faktorjem vpliva.

Ugotovitve, predstavljene v disertaciji in utemeljene na znanstveno sistematičen način, predstavljajo nov pristop pri reševanju problematike stabilnosti zdravil. S tem pomenijo hkrati tudi izhodišče za načrtovanje tovrstnih študij na bolj racionalen način, kar je danes še zlasti pomembno zaradi omejitev povezanih z industrijsko lastnino in strogih regulatornih zahtev.

dr. MOHAMMAD MEHDI SAGHAFI, mag. farm.

Donepezil in galantamin kot preventivna zaščita pred zastrupitvijo z diizopropilfluorofosfatnim zaviralcem encima AChE

Mentor: izr. prof. dr. Fajko Bajrović
Somentor: prof. dr. Borut Strukelj

Doktorska naloga doktoranda Mehdiya Mohammada Saghafija, mag. farm., z naslovom donepezil in galantamin kot preventivna zaščita pred zastrupitvijo z diizopropilfluorofosfatnim zaviralcem encima AChE zadeva področje patofiziologije in farmacije holinergičnega sistema v živčevju.

Glavni namen dela je bil ugotoviti, ali lahko reverzibilna inhibitorja AChE – galantamin in donepezil - poskusne živali zaščitita pred holinergičnim toksičnim sindromom, povzročenim z ireverzibilnimi inhibitorji AChE - DFP. Poleg tega je doktoranda zanimala uporabna vrednost sinaptotagmina 4, kot nevrokemičnega kazalca učinkovitosti predlagane profilaktične terapije učinkov organofosfatnih inhibitorjev AChE v možganih podgan.

Poskusi so bili narejeni na podganah soja Wistar. Znake holinergičnega toksičnega sindroma je ugotavljal s spremljanjem telesne temperature, mišičnih fascikulacij, orofacialnih diskinezij, lokomotorne aktivnosti in epileptičnih napadov. Vpliv apliciranih učinkovin na aktivnost AChE je ugotavljal s histokemično metodo barvanja možganskih rezin po Koelleju, izražanje mRNA za AChE, Fos, Jun in Syn 4 pa z metodo hibridizacije in situ.

V svojem delu skladno z zastavljenimi hipotezami ugotavlja, da pretretiranje podgan z reverzibilnima inhibitorjema AChE povzroči povečanje izražanja mRNA za AChE in povečanje aktivnosti AChE ter posledično zmanjšanje znakov holinergičnega toksičnega sindroma povzročene z ireverzibilnim inhibitorjem AChE - DFP.

Originalni prispevek doktorske disertacije k znanosti je ugotovitev, da donepezil lahko zaščiti možgane pred učinki DFP in da povečanje izražanja mRNA za Syt 4 lahko štejemo za nov marker epileptičnih napadov, povzročenih z organofosfatnimi inhibitorji AChE, kar so kandidat in sodelavci nedavno objavili (Saghafi MM, Pregelj P, Zivin M. Donepezil inhibits diisopropylfluorophosphate-induced seizures and up-regulation of synaptotagmin 4 mRNA. Folia Biol (Praha), 2010; 56(6):256-62).

dr. MILOŠ ILIĆ, mag. farm.

Strukturna optimizacija novih antitrombotičnih učinkovin z dvojnim delovanjem in njihov vpliv na angiogenezo

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj
Somentor: doc. dr. Janez Ilaš

Srčnožilne bolezni so vodilni vzrok obolenja in smrti v razvitih družbah. Kombinacija antikoagulantnega in antiagregatornega delovanja v eni sami molekuli predstavlja nov pristop k razvoju antitrombotičnih učinkovin, s katerim bi lahko izboljšali pomanjkljivosti obstoječega zdravljenja, ki vključuje kombinacijo antikoagulantnih in antiagregatornih učinkovin.

Z namenom povečanja učinkovitosti predhodno razvitih spojin s potencialnim dvojnimi antitrombotičnim delovanjem in pridobitve boljšega vpogleda v odnos med strukturo in delovanjem, je doktorand z uvajanjem fluora v molekulo izvedel strukturno optimizacijo že znanih 1,4-benzoksazinov z dvojnimi delovanjem, ki hkrati zavirajo trombin in delujejo antagonistično na fibrinogeni receptor. Tako pripravljena najbolj učinkovita spojina z uravnoteženim dualnim antitrombotičnim delovanjem je imela 330 nM konstanto inhibicije trombina in in 1,1 μM IC_{50} za zaviranje vezave fibrinogena na fibrinogeni receptor. Z namenom izboljšanja dvojnega antitrombotičnega delovanja je pripravil serijo enantiomerno čistih analogov z 1,4-benzodioksinskim ogrodjem namesto 1,4-benzoksazinskega skeleta, ki so prav tako izkazovali submikromolarno konstanto inhibicije trombina in vezave fibrinogena na fibrinogeni receptor.

Vaskularni oksidativni stres, endotelijske poškodbe in tromboza so prepletajoči se procesi, ki sodelujejo pri številnih boleznih srca in ožilja, zato je doktorand v okviru sodelovanja z raziskovalno skupino univerze v Solunu (Grčija) raziskoval tudi antioksidativni in protivnetni potencial pripravljenih fluoriranih 1,4-benzoksazinskih derivatov. Štiri spojine so se izkazale kot lovilci radikalov, tri spojine so pokazale zaviralno delovanje na peroksidacijo linolne kisline, za dve spojini pa so ugotovili, da zavirajo sojino lipooksigenazo. Zaradi opažene kombinacije inhibicije trombina z inhibicijo peroksidacije lipidov in/ali z zaviralnim delovanjem na lipooksigenazo so pripravljene spojine zanimive za nadaljnje preiskave v smeri mutiplih antitrombotičnih učinkovin.

Trombin igra pomembno vlogo pri spodbujanju tumorske angiogeneze, rasti rakavih celic in metastaziranju. Integrin GPIIa/IIIb potreben za adhezijo tumorskih celic na trombocite, kar je eden od ključnih procesov pri metastaziranju. Zato je doktorand želel tudi raziskati, ali imajo pripravljene potencialne dualne antitrombotične spojine z zaviralnim delovanjem na trombin in antagonističnim delovanjem na fibrinogeni receptor, zaviralno delovanje na angiogenezo. Spojine benzoksazinske in benzodioksinske serije je testiral na inhibicijo proliferacije in migracije normalnih endotelijskih in rakastih celic. Izvedel je tudi test vpliva pripravljenih spojin na zaviranje tvorbe tubulov iz endotelijskih celic v matrigelu in *in vivo* test zaviranja angiogeneze na piščančji embrionalni horioalantoidni membrani. Na osnovi izvedenih standardnih *in vitro* in *in vivo* testov za ugotavljanje antiangiogenega delovanja je ugotovil, da so pripravljene estri benzoksazinske in benzodioksinske serije močni inhibitorji angiogeneze. Zaviralnega delovanja na tumorsko rast in zaviranja metastaziranja

ni uspel dokazati, verjetno zaradi neugodnih farmakokinetičnih lastnosti spojin. Ta del raziskav je opravil na Rega inštitutu univerze v Leuvnu v Belgiji.

Iz doktorskega dela Miloša Iliča so bili doslej objavljeni štiri znanstveni članki v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva, dva članka pa bosta v kratkem poslana v objavo.

dr. BILJANA GOVEDARICA, mag. farm.

Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo

Mentor: prof. dr. Stane Srčič
Somentor: doc. dr. Miha Škarabot

Biljana Govedarica, mag. farm., je novembra 2011 zagovarjala doktorsko disertacijo z naslovom »***Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo***«.

Disertacijo je izdelala ob mentorstvu prof. Staneta Srčiča in somentorstvu doc. Mihe Škarabota. Eksperimentalno delo je opravila na Inštitutu Jožef Stefan, na Fakulteti za farmacijo ter v švicarskem podjetju CSM, Laboratoriju za mehansko testiranje materialov. Doktorska disertacija Biljane Govedarica je osredotočena na področje proučevanja elastičnosti in plastičnosti farmacevtskih materialov na nivoju osnovnih delcev. Kot glavni orodji je uporabljala mikroskop na atomsko silo in nanoindenter, ki je standard za testiranje mehanskih lastnosti, predvsem trših in ne-farmacevtskih materialov. Originalni znanstveni prispevek disertacije predstavlja ugotovitev, da mehanske lastnosti posameznih delcev snovi izjemno in odločilno kontrolirajo obnašanje snovi v farmacevtsko tehnoloških procesih, med drugim tudi v procesu stiskanja teh materialov pri izdelavi tablet. To je potrdila z rezultati korelacijskih študij, pri katerih je ugotovila visoko korelacijo med parametroma elastičnosti na osnovni in na razsežnosti (bulk) ravni. Uporabljeni raziskovalni pristop odpira možnost napovedovanja poteka stiskanja ustreznih farmacevtskih materialov, kakor tudi razumevanje in odpravljanje številnih težav, ki se ob tem pojavljajo.

Nadaljnji prispevek izdelane doktorske disertacije je potrditev, da je gelska plast ksantanskih polimerov v ogrodnih tabletah tista, ki kontrolira hitrost sproščanja zdravilne učinkovine, lastnosti teh plasti pa so vezane in odvisne od fleksibilnosti posameznih ksantanskih verig ter načina urejanja v prostoru. Rezultate svojega raziskovalnega dela je objavila v štirih vrhunskih evropskih revijah z visokimi faktorji citiranosti. Za svoje delo je

doktorandka na Fakulteti za farmacijo prejela posebno dekanovo nagrado, ki se podeljuje v okviru raziskovalnega dneva Fakultete za izjemne dosežke.

dr. ALENKA KUŽNIK KRAJNIK, mag. farm.

Mehanizem aktivacije in inhibicije endosomalnih Tollu-podobnih receptorjev

Mentor: prof. dr. Roman Jerala

Somentor: prof. dr. Janko Kos

Imunski sistem nam omogoča preživetje v okolju s patogenimi organizmi ter obnovitev tkiva po poškodbah.

Pomembna sestavina naravnega imunskega odziva so receptorji, ki prepoznajo sestavine patogenov, kot so Tollu podobni receptorji. V svojem doktorskem delu je Alenka raziskala delovanje in inhibicijo TLR, ki prepoznajo nukleinske kisline, še posebej TLR9, ki prepoznava nemetilirano enoverižno DNK. Oligodeoksinukleotidi, ki vsebujejo zaporedje CpG so agonisti TLR9 in so vključeni v klinične raziskave za zdravljenje infekcij, rakastih obolenj, astme in alergije. Aktivacija endosomalnih TLR je povezana z avtoimunimi boleznimi kot sta sistemski eritematozni lupus in revmatoidni artritis, kjer že dlje časa v terapiji uporabljajo klorokin in druge antimalarike.

V doktorskem delu je potrdila hipotezo, da antimalariki, kot so klorokin delujejo preko vezave na nukleinske kisline, s čimer preprečijo aktivacijo receptorjev. Gre za nov mehanizem inhibicije, ki se razlikuje od splošno sprejetega modela. Pokazala je, da druge spojine, ki se vežejo na nukleinske kisline inhibirajo aktivacijo TLR9 ter da rezikvimod, ki je agonist TLR7 prav tako inhibira aktivacijo TLR9 preko vezave na DNK. Rezultate je potrdila tudi na vzorcih pacientov s sistemskim eritematoznim lupusom.

V drugem delu doktorata je raziskala mehanizem aktivacije TLR9 z DNK. Ugotovila je, da delecija amino-končnega segmenta receptorja bistveno zmanjša učinkovitost aktivacije, identificirala aminokislinske -ostanke ki so pomembni za aktivacijo ter s serijo ODN različnih zaporedij pokazala vpliv stabilnega dupleksa ter bistveno izboljšala aktivnost ODN v primerjavi s standardnimi zaporedji.

Rezultati njenega doktorata pomembno prispevajo k razumevanju aktivacije ter inhibicije aktivacije receptorja TLR9 ter omogočajo načrtovanje bolj učinkovitih imunomodulatorjev. Rezultate dela je objavila v treh člankih, med drugim v članku v ugledni reviji Journal of immunology, kjer je bil v letu dni od objave citiran že 13x.

Ker so izpolnjeni vsi pogoji za podelitev časti doktorice znanosti, vas prosim, spoštovani gospod rektor, da opravite svečani akt promocije.

dr. MATEVŽ PRIJATELJ, mag. farm.

Prostaglandinski receptor EP4 regulira delovanje limfocitov B

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan

Poglavitni namen doktorske disertacije je bil doprinesiti k razumevanju molekularnih mehanizmov kancerogeneze in avtoimunosti, in sicer z ovrednotenjem vloge prostaglandinskega receptorja EP4 v limfocitih B.

Doktorand je zagovarjala hipotezo, da ima receptor EP4 pomembno vlogo pri apoptozi nezrelih limfocitov B oz. proliferaciji zrelih limfocitov B in da je dobra tarča za razvoj novih terapevtskih pristopov.

Raziskovalne rezultate predstavi v petih poglavjih, pisanih v obliki originalnih znanstvenih člankov.

V prvem poglavju predstavi študij signalne poti *receptorja EP4 v nezrelih limfocitih B* in dokaže, da posreduje prostaglandin E2 inhibitorne učinke na proliferacijo nezrelih limfocitov B preko receptorja EP4. Rezultati so objavljeni v reviji *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

V drugem poglavju predstavi interakcijo med *receptorjem EP4 in B- celičnim receptorjem* in dokaže, da vodi sočasna aktivacija receptorjev EP4 in BCR v povečan obseg apoptoze nezrelih limfocitov B. Rezultati so objavljeni v reviji *Prostaglandins and other lipid mediators*.

V nadaljnjih poglavjih naslovi vlogo *receptorja EP4 pri uravnavanju odzivov limfocitov B na z lipopolisaharidom posredovani odzivi*, kar nakazuje pomembno vlogo receptorja EP4 pri uravnavanju imunskega odziva sproženega po bakterijskih infekcijah, kot je lahko primer sepse.

V zadnjem petem poglavju dokazuje na modelu Burkittovega limfoma, da aktivacija receptorja EP4 poveča občutljivost celic na toksične učinke bortezomiba in doksorubicina. In razkrije do sedaj še neprepoznavno potencialno uporabo agonistov receptorja EP4, kot novih učinkovin pri izboljšanju terapije B celičnih levkemij in limfomov.

Izvirnost raziskovalnega dela Matevža Prijatelja je v odkrivanju in vrednotenju novih tarčnih molekul, ki služijo za ciljan razvoj učinkovin – modulatorjev apoptoze in s tem novih pristopov pri zdravljenju malignih in avtoimunih obeolenj.

dr. BORUT KOVAČIČ, mag. farm.

Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov

Mentor:izr. prof. dr. Odon Planinšek

Somentor:izr. prof. dr. Franc Vrečer

V doktorski disertaciji je Borut Kovačič ovrednotil nekatere industrijsko uporabne možnosti za izboljšanje lastnosti modelne učinkovine, ki so povezane predvsem z njenim sproščanjem iz farmacevtske oblike v gastrointestinalnih tekočinah. Kot modelno učinkovino je uporabil karvedilol, za katerega je značilna slaba topnost in nizka hitrost

raztapljanja ter dobra permeabilnost skozi biološke membrane. V prvem delu naloge je izdeloval trdne disperzije karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom. Uporabljal je različne metode izdelovanja trdnih disperzij, s pomočjo katerih je proučevali mehanizme nalaganja karvedilola na površino in v pore poroznega nosilca ter vpliv na kristalno obliko učinkovine. Ugotovil je, da način nalaganja karvedilola v porozni nosilec pri izdelavi trdnih disperzij vpliva na pojavno obliko, močljivost in hitrost raztapljanja te zdravilne učinkovine v vodnem mediju. Ugotovil je, da je amorfna oblika karvedilola izkazuje v primeru trdnih disperzij letga na poroznem nosilcu zadovoljivo fizikalno stabilnost.

V nadaljevanju je kandidat razvijal dostavni sistema z dvopolznim sproščanjem zdravilne učinkovine iz katerega se prvi del učinkovine sprosti v želodcu, drugi del pa v distalnem delu prebavnega trakta. Za osnovo takšnega dostavnega sistema je izbral trdno disperzijo karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom. Z granuliranjem trdne disperzije z disperzijo gastrorezistentnega polimera je dosegel hitro sproščanje dela odmerka v kislem mediju in hitro sproščanje preostalega dela odmerka v alkalnem mediju.

Kandidat se je v svojem delu ukvarjal tudi z možnostjo izdelave kokristalov karvedilola in različnih pomožnih snovi. Gre za novejšo metodo za izboljšanje topnosti ali hitrosti raztapljanja s spremembo pojavne oblike zdravilne učinkovine. Izdelal je kokristal karvedilola in salicilne kisline v razmerju 1:1. Kandidat je kokristalizacijo izvedel z mletjem obeh komponent z dodatkom majhne količine organskega topila, s katerim je pospešil mehanokemijsko reakcijo. Pokazal je, da se karvedilol iz kokristalne strukture hitreje raztaplja kot mleti karvedilol ali fizikalna zmes s salicilno kislino.

Rezultate svojega dela je Borut Kovačič objavil v petih člankih med katerimi imajo štiri faktorji vpliva.

dr. MIRJAM GOSENCA, mag. farm.

Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Doktorska disertacija Mirjam Gosence sodi na področje farmacevtske tehnologije. Glavni cilj naloge je bil razvoj biokompatibilnih nosilnih sistemov za dermalno dostavo antioksidantov za preprečevanje posledic oksidativnega stresa na koži, pri kateri glavno oviro za optimalno terapijo predstavljajo neustrezne fizikalno-kemijske in biofarmacevtske lastnosti teh spojin ter velik barierni upor kože.

Doktorantka je v svoji disertaciji predlagala inovativen pristop za povečanje stabilnosti askorbilpalmitata, derivata vitamina C, v mikroemulzijskem sistemu z vključitvijo dodatnega antioksidanta iz skupine lipofilnih oksimov, načrtno sintetiziranega na podlagi strukturne podobnosti z askorbilpalmitatom. Potrdila je njegovo antioksidativno delovanje, ki temelji na sposobnosti lovljenja radikalov in necitotoksičnost.

Naslednji sklop doktorskega dela predstavlja razvoj biokompatibilnega nosilnega sistema s strukturo lamelarnih tekočih kristalov na osnovi lecitina. Izdelala je psevdotrikomponentni fazni diagram z emulgatorsko zmesjo lecitin/Tween 80 = 1/1, izopropilmiristatom in vodo in določila široko področje nastanka lamelarnih tekočih kristalov, ki jih je primarno identificirala s polarizacijsko mikroskopijo. Vpliv kvantitativne sestave na notranjo strukturo sistemov je natančneje proučila z ozkokošnim rentgenskim sipanjem in diferenčno dinamično kalorimetrijo. Temeljnemu fizikalno-kemijskem sklopu vrednotenja je sledil osrednji del raziskav, usmerjen v proučevanje citotoksičnosti tekočih

kristalov na celični liniji keratinocitov, s katerim je potrdila signifikantno večjo celično proliferacijo v primerjavi s pozitivno kontrolo (natrijev lavrilsulfat). Biološki test je nadgradila z vrednotenjem vpliva tekočih kristalov na morfologijo celic, kjer je kot inovativno tehniko uporabila mikroskop na atomsko silo. Z metodo nanoindentacije je ugotovila je izrazit vpliv tekočih kristalov na zmanjšano rigidnost celične membrane zaradi fluidizacije le-te. Učinek tekočih kristalov na povečanje elastičnosti keratinocitov potrjuje njihovo primernost v terapiji zmanjšane elastičnosti kože kot posledice (foto)-staranja.

Svoje dosedanje raziskovalno delo je doktorandka že objavila v 5 znanstvenih člankih; še dva pa sta v postopku objave..

dr. DARKO URŠIČ, mag. farm.

Vpliv luminalnih in humoralnih dejavnikov na intestinalno sekrecijo učinkovin

Mentor: prof. dr. Albin Kristl
Somentor: izr. prof. dr. Franc Vrečer

Osnovna naloga sekretornih prenašalcev je zaščita organizma pred škodljivimi vplivi telesu tujih snovi. Najbolj znana skupina sekretornih prenašalcev so ABC (ATP Binding Cassete) prenašalci, kamor poleg MDR (multi drug resistance protein) P-glikoproteina sodijo še MRP (multi drug resistance associated protein) in BCRP (breast cancer resistance protein) prenašalci. Črevo je med absorpcijo hrane izpostavljeno različnim toksinom in potencialno škodljivim dejavnikom. Zato obstajajo v intestinalnem epiteliju regulatorni mehanizmi, ki zaznajo in se hitro odzovejo na spremenjene pogoje.

Tako je kandidat Darko Uršič v svoji doktorski nalogi z naslovom 'Vpliv luminalnih in humoralnih dejavnikov na intestinalno sekrecijo učinkovin' raziskal, kako vplivajo luminalni in humoralni dejavniki na aktivnost sekretornih prenašalcev v intestinalnem epiteliju. Preučeval je vpliv prisotnosti parakrinih hormonov ter hranil kot so sladkorji, beljakovine, aminokisljine in kratko ter dolgoverižne maščobe v GIT, kakor tudi vpliv ostalih dejavnikov, kot sta npr. sprememba osmolarnosti oz. kislosti vsebine GIT.

Z rezultati te doktorske naloge je kandidat pojasnil fiziološki pomen regulacije prenašalcev v GIT kot tudi interakcij teh prenašalcev med seboj in z drugimi dejavniki. Na ta način lahko obrazložimo tudi marsikatero razlike in nedoslednosti pri interpretaciji farmakokinetičnih študij po aplikaciji zdravil na tešče oziroma po obroku.

Kandidat je prvi avtor pri enem in soavtor pri treh znanstvenih raziskovalnih člankih s področja preučevanja permeabilnosti v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva.

dr. MATEVŽ LUŠTRIK, mag. farm.

Razvoj metod in vrednotenje lokalnih karakteristik toka trdnih delcev v vrtinčnoslojnih napravah za oblaganje ter njihov vpliv na enakomernost obloge delcev

Mentor: prof. dr. Stane Srčič

Doktorsko delo z naslovom: »Razvoj metod in vrednotenje lokalnih karakteristik toka trdnih delcev v vrtinčnoslojnih napravah za oblaganje ter njihov vpliv na enakoemrnost obloge

delcev« je Matevž Luštrik, mag. farm., zagovarjal decembra l. 2011, izdelal pa ga je pod mentorstvom prof. S. Srčiča. Raziskave je opravil v laboratorijih Fakultete za farmacijo in deloma v podjetju za izdelavo procesne opreme Brinox d.o.o., iz Medvod.

V okviru svojega doktorskega dela je Matevž Luštrik ovrednotil nekatere možnosti za izboljšanje postopka oblaganja delcev s stališča konstrukcijskih modifikacij že obstoječe in v farmacevtski industriji uporabljane procesne opreme. Strukturne elemente, s katerimi je mogoče spreminjati tok zraka in delcev, je ovrednotil s stališča enakomernosti nanosa polimerne obloge po površini delcev (pelet), izkoristka oblaganja in deleža aglomeratov, ki v procesu oblaganja nastanejo. Z vgradnjo novo razvitega in izdelanega generatorja vrtinčastega toka je v novi napravi za oblaganje v primerjavi z nemodificirano napravo dosegel mnogo bolj enakomeren nanos polimernega filma, izboljšanje izkoristka procesa in zmanjšal stopnjo tvorbe aglomeratov. Dodatno zmanjšanje variabilnosti nanosa obloge med delci je dosegel tudi z drugo modifikacijo, t.j. vgradnjo posebnega nastavka z režami za dodatno vpihovanje zraka.

Da bi detajlno preučil tok trdnih delcev znotraj oblagalnega valja že obstoječe komore in nove komore z generatorjem vrtinčastega toka, je razvil in izdelal sondo, katere princip delovanja temelji na piezoelektričnem efektu. S tako izdelano sondo je določil območja značilnih frekvenc trkov pelet v sondo in ovrednotil porazdelitev gostote delcev v obliki profilov časovno povprečnega števila trkov. Potrdil je, da do odstopanj v porazdelitvi količine obloge med isto količino enako velikih delcev pride zaradi lokalnih razlik v gibanju delcev znotraj območja razprševanja.

Rezultate svojega dela je objavil v dveh visoko kotiranih revijah s faktorjem vpliva, tretji prispevek pa je v fazi objave. Rezultate svojega dela je s soavtorji zaščitil v SI patentu, dodatno pa ima vložene še prijave na Evropskem patentnem uradu ter v ZDA in v Indiji.