

dr. ANJA PIŠLAR, mag. farm.

**URAVNAVANJE NEVROTROFIČNE AKTIVNOSTI Y-ENOLAZE S  
PROTEOLITIČNIMI ENCIMI IN POMEN PRI NEVRODEGENERATIVNIH  
BOLEZNIH**

Mentor: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.  
Somentorica: doc. dr. Nataša Obermajer, mag. farm.

Anja Pišlar je v okviru doktorskega dela preučevala delovanje gama enolaze v nevronskih celicah v odvisnosti od delovanja cisteinske karboksipeptidaze katepsina X. Gama enolaza izkazuje glikolitično aktivnost, v zadnjem času pa je bilo ugotovljeno, da je tudi pomemben neuroprotektivni dejavnik in da vzpodbuja tvorbo nevritov, ki so ključni za delovanje živčnega sistema. Nevrotrofično delovanje izkazuje C-konec molekule, ta pa je lahko tarča katepsina X, ki s proteolizno cepitvijo izniči nevrotrofično delovanje gama enolaze. Anja Pišlar je raziskala molekularne mehanizme te regulacije. Odkrila je, da proteolitska cepitev C konca prepreči vezavo gama enolaze na prenašalni protein gama sintrofin. Na ta način gama enolaza ne preide iz citoplazme na plazemsko membrano in ne ojača signalnih poti, ki jih preko Trk receptorja sprožajo nevrotrofični rastni dejavniki. Neuroprotektivno vlogo gama enolaze je dokazala tudi na in vivo mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni, kjer celice mikroglie v okolici amiloidnih plakov izločajo veliko količino gama enolaze, ki lahko zaščiti še žive nevronske celice pred toksičnim delovanjem amiloid beta peptida, katepsin X pa to zaščitno delovanje izniči. Patološko delovanje katepsina X je dokazala tudi na celičnem modelu Parkinsonove bolezni, kjer je ta encim pomemben v apoptozi dopaminergičnih nevronov. Poznan mehanizem nevrotrofičnega delovanja gama enolaze in pa vloga katepsina X v neurodegenerativnih procesih omogoča uporabo aktivnih peptidov, ki posnemajo C konec gama enolaze in pa inhibitorjev katepsina X pri zaščiti nevronov, to pa predstavlja nov korak v razvoju učinkovin za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni. Dr. Anja Pišlar je rezultate doktorskega dela do sedaj objavila v štirih člankih v revijah z dejavnikom vpliva, tudi v reviji, ki je prva na področju, kar nekaj člankov pa je še v različnih fazah objavljanja.

dr. ROMANA ROŠIČ, mag. farm.

**NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE BIOKOMPATIBILNIH  
NANOVLAKEN Z METODO ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA**

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.  
Somentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Disertacija Romane Rošič predstavlja aktualne vsebine s področja nanoznanosti oz. nanotehnologije, natančneje biokompatibilnih nanovlaken, ki zaradi svoje sestave in strukturne zgradbe posnemajo osnovne gradnike izvenceličnega ogrodja tkiv in so tako potencialno primerna za razvoj dostavnih sistemov učinkovin, tkivnih nadomestkov in oblog za rane. Izdelava nanovlaken zahteva izviren postopek priprave, ki je specifičen za vsak polimer posebej, kot kažejo tudi dosedanji izsledki in dosežki v znanstveni literaturi. Za potrebe raziskovalnega dela je dr. Romana Rošič na UL FFA uvedla napravo in postopek za elektrostatsko sukanje in sicer tako nadzor procesa kot mehanizem nastanka in si tako postavila platformo za lažjo izbiro materialov. Pri delu je uporabljala sodobne metode fizikalnega vrednotenja raztopin in nanovlaken, kot so različne metode vrednotenja reoloških lastnosti polimernih raztopin (rotacijski in oscilacijski testi, reološke meritve na mejnih površinah, kapilarni in vibracijski viskozimetri), določanje specifične električne prevodnosti,

površinske napetosti in gostote raztopin, ozkokotno rentgensko sipanje, vrstični elektronski mikroskop, infrardeča spektroskopija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, statistične in korelacijske metode. Raziskovalno je največ delala v laboratorijih UL FFA, specifične instrumente pa je koristila na FKKT napravo za ozkokotno rentgensko sipanje in SEM na Kemijskem inštitutu.

Doktorandka je v celoti uspela raziskati in potrditi hipoteze:

- izbira izhodnih polimernih raztopin in procesnih parametrov elektrostatskega sukanja je ključna za uspešno izdelavo nanovlaken,
- izbor polimera in njegove lastnosti vplivajo na morfologijo nastalih nanovlaken,
- izdelana nanovlakna predstavljajo ustrezno oporo celicam za rast v kroničnih ranah in vzdržujejo vlažno mikrokoolje,
- v nanovlakna lahko vgradimo različne zdravilne učinkovine in tako izdelamo učinkovit dostavni sistem.

Izbrano raziskovalno področje in dobljeni odlični rezultati so zanimivi za širšo raziskovalno skupnost doma in v tujini. Raziskave je dobro načrtovala in opredelila hipoteze in cilje celovito in tehnično natančno izvedla raziskovalno delo, objektivno analizirala in interpretirala podatke in s tem dobila inovativne ugotovitve.

Disertacija predstavlja izviren in pomemben znanstveni prispevek k proučevanju tehnološkega postopka za izdelavo nanovlaken in vrednotenja lastnosti polimernih raztopin za uspešno izvedbo elektrostatskega sukanja. Poleg tega so njeni rezultati neposredno uporabni za gospodarstvo in podajajo smernice za uspešnejši in hitrejši začetek dela na področju izdelave nanovlaken.

Zaenkrat so se kot najodmevnejši izkazali rezultati objavljeni v reviji *European Polymer Journal* (2012, 48: 1374-1384). Predstavljajo namreč izjemne izsledke, ki kažejo, da so polimerne raztopine primerne za elektrostatsko sukanje le takrat, kadar tvorijo prevodne nestrukturirane disperzije, ki izkazujejo bistveno večjo stopnjo plastičnosti kot elastičnosti tako v notranjosti raztopine kot na mejni površini. Doktorandka je kot prva dokazala, da interfacialne reološke lastnosti, v primerjavi z »bulk« reološkimi lastnostmi, izkazujejo bistveno boljše napovedno vrednost za uspešno izvedbo elektrostatskega sukanja. Objava rezultatov je dosegla izjemno odmevnost, saj se je članek že takoj po objavi (julij-september 2012) uvrstil na 7. mesto med najbolj iskanimi članki v reviji *European Polymer Journal* in ostal na elitnem seznamu tudi v naslednjih dveh trimesečjih (vir *Scencedirect Top 25*). Zanimivost in perspektivnost objavljenih rezultatov potrjuje tudi dejstvo, da je bil članek povabljen k objavi na spletni strani *Advances in Engineering* ([www.advancesinengineering.com](http://www.advancesinengineering.com)), saj je uredniški odbor ocenil, da so izsledki raziskave izrednega pomena za področje inženirstva in inovativnih tehnologij. Dr. Romana Rošic ima v Cobiss bazi podatkov bibliografskih enot 7 znanstvenih člankov in sicer 6 v revijah s faktorjem vpliva, od tega 3 v A1 skupini. Rezultate je predstavila tudi na številnih mednarodnih znanstvenih srečanjih in 2 podiplomskih seminarjih za študente (Lyon, francija, Saarbrücken, Nemčija). Odmevnost raziskovalnega dela, izražena s številom citatov v Scopus, je 14 (10. 6. 2013).

dr. MARTINA HRAST, mag. farm.  
**NAČRTOVANJE IN SINTEZA INHIBITORJEV LIGAZ MUR IN  
D-ALANIL-D-ALANIN LIGAZE**

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

Dr. Martina Hrast je zaključila doktorsko disertacijo z naslovom Načrtovanje in sinteza inhibitorjev ligaz Mur in D-alanil-D-alanin ligaze. Prekomerna in nepravilna uporaba protibakterijskih učinkovin je privedla do razvoja številnih rezistentnih oblik bakterijskih sevov, ki predstavljajo vedno večji globalni zdravstveni problem. V zadnjih letih zato poteka intenzivno iskanje novih protibakterijskih učinkovin z novimi, do sedaj neizkoriščenimi mehanizmi delovanja. Ena od pomembnejših tarč za razvoj protibakterijskih učinkovin je bakterijska celična stena oziroma encimi, ki sodelujejo v njeni biosintezi. Martina Hrast se je v svoji doktorski disertaciji osredotočila predvsem na encime, ki katalizirajo znotrajcelične stopnje biosinteze celične stene –ligaze Mur (MurC-MurF) in d-alanin-d-alanin ligazo (Ddl). Kandidatka je v okviru doktorata razvila dve večji seriji biološko aktivnih spojin. S pomočjo sofisticiranih računalniških metod, ki zajemajo kombinacijo virtualnega reševanja in molekulske dinamike, je razvila začetno serijo zaviralcev DdlB. Nekatere spojine zadetki iz te serije so ji služili kot izhodišče za načrtovanje in sintezo serije sorodnih spojin z izboljšanimi lastnostmi. Te spojine so imele zaviralno delovanje na DdlB v mikromolarnem koncentracijskem območju, nekatere med njimi pa tudi *in vitro* protibakterijsko delovanje. Druga serija spojin, ki jih je razvila doktorandka, so derivati cianotiofena, ki delujejo kot zaviralci MurF. Pri tej seriji je potrebno izpostaviti, da gre za zaviralce ligaze MurF iz različnih bakterijskih sevov (MurF iz *S. pneumoniae*, *E. coli* in *S. aureus*), kar do sedaj v literaturi še ni bilo opisano. V okviru sodelovanja z Inštitutom za strukturno biologijo iz Grenobla (Francija) je doktorandka uspela pridobiti kristale MurF iz *S. pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem in uspešno razrešiti kristalno strukturo do resolucije 1,9 Å. Na ta način je neposredno dokazala način vezave inhibitorja v aktivno mesto encima. Poleg omenjenega imajo nekateri zaviralci MurF iz tega razreda tudi *in vitro* protibakterijsko delovanje.

dr. ZORAN HAM, mag. farm.  
**RAZISKAVE IN PRIPRAVA NOVIH TRDNIH OBLIK ZDRAVILNIH UČINKOVIN**

Mentor: prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm.

Polimorfizem učinkovin je zelo pomemben za biološko uporabnost in zagotavljanje učinkovitosti, varnosti in kakovosti zdravil. Proces kristalizacije ima na koncu sintezne poti ključno vlogo pri kontroli kristalne oblike, distribucije velikosti delcev, oblike in morfologije kristalov in kristalitov. Kandidat je pripravil nove trdne oblike več zdravilnih učinkovin, definiral sintezne postopke in ključne parametre, ki vplivajo na njihovo pripravo in jih ovrednotil z različnimi fizikalno kemijskimi tehnikami. Za določitev kristalnih oblik vseh zdravilnih učinkovin je uporabili rentgensko praškovo difrakcijo. Termodinamske lastnosti trdnih oblik učinkovin je ovrednotil z diferenčno dinamično kalorimetrijo, z infrardečo in Ramansko spektroskopijo je pokazal razlike med trdnimi oblikami na molekularnem nivoju, z elektronsko mikroskopijo, dinamično sorpcijo vlage in določitvijo velikosti delcev je za različne učinkovine natančno določil morfološke značilnosti delcev in pokazal, da so nove trdne oblike učinkovin fizikalno stabilne in primerne za vgradnjo v končne farmacevtske oblike. Potrdil je, da na osnovi novih kristalnih struktur dobimo natančnejši vpogled v

lastnosti spojine v trdnem stanju in v kemizem specifične spojine. Rezultate dela s področja teme doktorske disertacije je dr. Zoran Ham objavil v dveh znanstvenih člankih, pri katerih je prvi avtor, rezultati raziskav so opisani tudi v dveh podeljenih mednarodnih patentih.

**dr. UROŠ TRSTENJAK, mag. farm.**  
**NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH INHIBITORJEV  
FAKTORJA Xa IN ANTAGONISTOV GPIIb/IIIa KOT POTENCIALNIH  
DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN**

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.  
Sommentor: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

V okviru doktorskega dela je Uroš Trstenjak načrtoval, sintetiziral in biološko ovrednotil prve nizkomolekularne potencialne antitrombotične učinkovine z direktnim inhibitornim delovanjem na faktor Xa in antagonističnim delovanjem na fibrinogeni receptor s Ki oziroma IC<sub>50</sub> vrednostmi v mikromolarnem območju. Spojini z najbolj uravnoteženo aktivnostjo na obeh tarčah sta izkazovali Ki (fXa) = 25.6 μM in IC<sub>50</sub> (GPIIb/IIIa) = 35.0 μM ter Ki (fXa) = 37.0 μM in IC<sub>50</sub> (GPIIb/IIIa) = 25.8 μM. Pripravil je tudi strukturno povsem nove submikromolarne antagoniste fibrinogenskega receptorja z 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-onskim obročem. Primerjava enantiomernih parov aktivnih spojin je pokazala, da so (*R*)-enantiomeri kot antagonisti fibrinogenskega receptorja učinkovitejši od (*S*)-enantiomerov. Z zamenjavo morfolin-3-ona z 2-etoksikarbonilpiperidinom je selektivni direktni inhibitor faktorja Xa rivaroksaban pretvoril v dualni inhibitor faktorja Xa in trombina z razmeroma uravnoteženo nanomolarno aktivnostjo na obeh tarčah, dualno aktivnost pa je smiselno razložil s sidranjem v aktivni mesti obeh encimov. Dr. Uroš Trstenjak je v disertaciji razvil tudi sintezni poti za pripravo metil *N*-(4-nitrofenil)-3-oksomorfolin-2-karboksilata in izomernega etil *N*-(4-nitrofenil)-2-oksomorfolin-3-karboksilata, pri čemer je bila v obeh primerih ključni korak z rodijevim(II) acetatom katalizirana reakcija intermolekularne vstavitve karbenskega intermedata v O-H oziroma N-H vez. Na podlagi izoliranega stranskega produkta pri sintezi omenjenih spojin je uspešno razvili še sintezno pot za pripravo novih cikličnih aminokislin z *N,O*-acetalnim strukturnim motivom, pomembnih za pripravo peptidomimetikov. Doktorska disertacija Uroša Trstenjaka, ki je napisana v obliki poglavij, poleg dveh objavljenih odmevnih preglednih člankov s področja disertacije vsebuje tri objavljene oz. v objavo sprejete originalne znanstvene članke v uglednih mednarodnih znanstvenih revijah in dva rokopisa člankov poslana v objavo v mednarodne znanstvene časopise.

**dr. UROŠ KLANČAR, mag. farm.**  
**RAZVOJ FIZIOLOŠKO RELEVANTNIH METOD PRESKUSA RAZTAPLJANJA  
HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET Z UPORABO FARMAKOPEJSKIH NAPRAV  
TER NJIHOVIH MODIFIKACIJ**

Mentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.  
Sommentor: viš. razv. sod. dr. Igor Legen, mag. farm.

Doktorska disertacija Uroša Klančarja sodi na področje farmacevtske tehnologije in je primer dobrega sodelovanja med Univerzo in gospodarstvom. Glavni cilj naloge je bil s pomočjo različnih farmakopejskih naprav za preskuse sproščanja ter njihovih modifikacij ponazarjati

različne vplive prebavnega trakta na hidrofилne ogrodne tablete s podaljšanim časom sproščanja zdravilne učinkovine. Tablete je preskušal v različnih *in vitro* preskusih, dobljene rezultate pa je primerjal z *in vivo* podatki izvedenih farmakokinetičnih študij bioekvivalence. Kandidat je v svojem delu postavil 4 hipoteze, na katere je odgovoril z raziskavami, objavljenimi v dveh znanstvenih člankih ter enem, ki je poslan v objavo.

V prvi študiji objavljeni v reviji s faktorjem vpliva nad 5 je kandidat na primeru ogrodnih tablet na osnovi hidroksipropilmetil celuloze predstavil razvoj fiziološko relevantne in diskriminatorne metode preskusa sproščanja modelne učinkovine s slabšo topnostjo. Ugotovil je, da je mehanizem sproščanja pretežno erozijsko nadzorovan, zato na profil sproščanja v tem primeru vplivajo predvsem mehanske obremenitve v okolici tablete. V ta namen je razvil novo *in vitro* metodo, kjer je združil uporabo plastičnih kroglic z napravo 3 po USP. *In vivo* relevantnost nove metode je potrdil tudi z uporabo koncepta *in vitro* - *in vivo* korelacije, kjer je dokazal najvišjo stopnjo korelacije A. Svojo inovacijo ima zaščiteno tudi z mednarodnim podeljenim patentom.

Dr. Uroš Klančar se je tudi v drugi študiji ukvarjal s posnemanjem mehanskih obremenitev na tableto pri potovanju skozi prebavni trakt in z načrtovanjem robustnih tablet. Pri tem je robustnost ogrodnih tablet povezal z intrinzično viskoznostjo uporabljenega polimera ter jo koreliral z mehansko občutljivostjo. Slednjo je vrednotil med samim preskusom sproščanja tako, da je ob določenem času tablete dodatno obremenil s steklenimi kroglicami in s tem ponazoril prehod tablete iz želodca v dvanajstnik, za kar so značilne močne mehanske obremenitve. Tudi rezultati te raziskave so že objavljeni v reviji s faktorjem vpliva.

Doktorand Uroš Klančar ima v Cobiss bazi podatkov bibliografskih enot 2 izvorna znanstvena članka, eden je poslan v objavo, poleg tega ima objavljena 2 pregledna in en strokovni članek. Svoj originalni in inovativni pristop k delu pa kandidat dokazuje tudi kot soavtor dveh že podeljenih mednarodnih patentov in treh patentnih prijav.