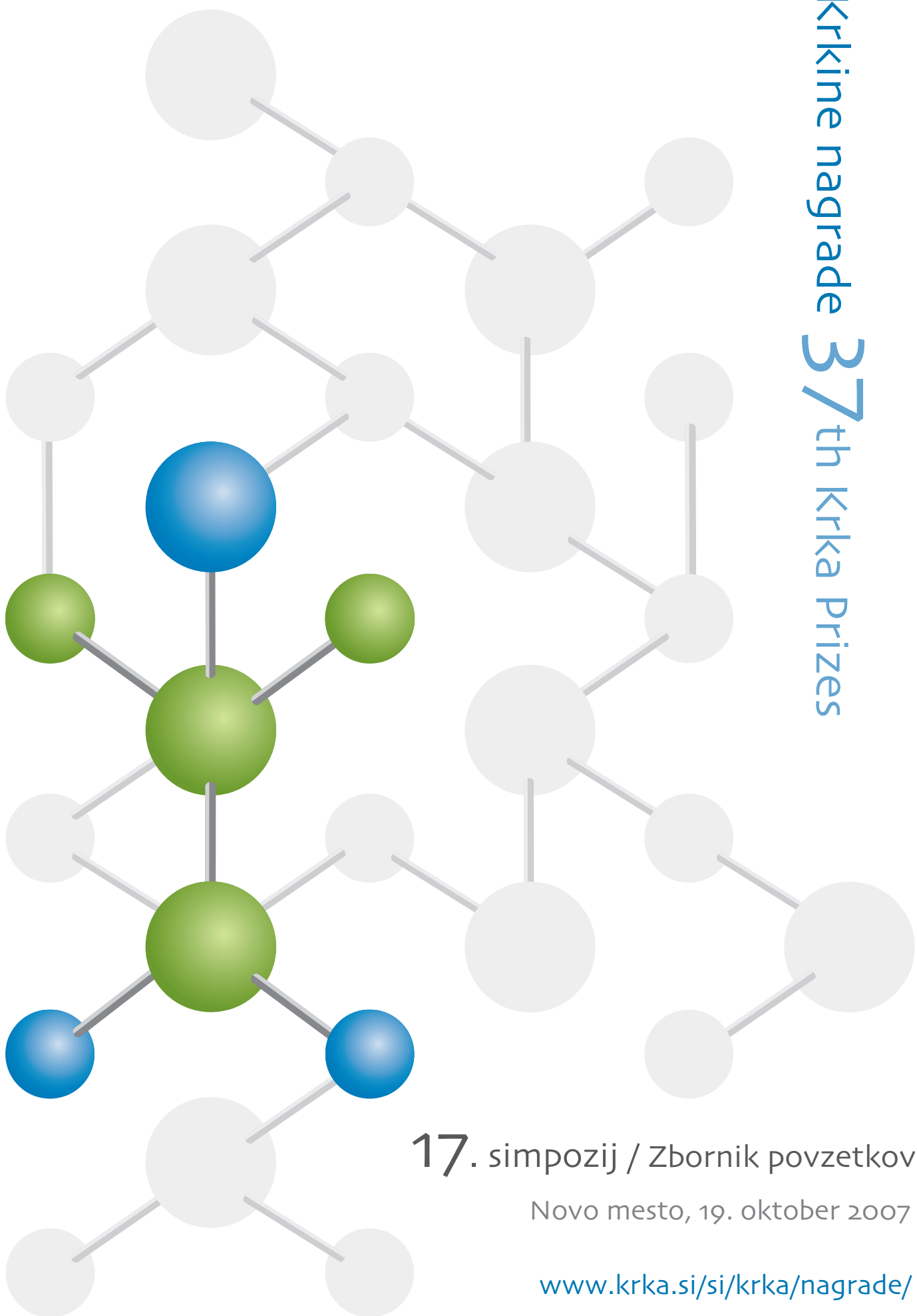


37. krkine nagrade 37th Krka Prizes

17. simpozij / Zbornik povzetkov

Novo mesto, 19. oktober 2007

www.krka.si/si/krka/nagrade/



Častni odbor 37. Krkinih nagrad

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke, predsednik
Akad. prof. dr. Boštjan Žekš, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
Prof. dr. Andreja Kocijančič, rektorica Univerze v Ljubljani
Prof. dr. Ivan Rozman, rektor Univerze v Mariboru
Dr. Gašper Marc, mag. farm., predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
Prof. dr. Venčeslav Kaučič, predsednik Slovenskega kemijskega društva
Prof. dr. Pavel Poredoš, predsednik Zdravniškega društva

Svet Sklada Krkinih nagrad

Častni predsednik: prof. dr. Mihael Japelj

Predsednik: dr. Aleš Rotar

Znanstveni odbor: prof. dr. Jože Drinovec
Duša Oblak Božič
izr. prof. dr. Franc Vrečer
dr. Aleš Gašparič
dr. Silvo Zupančič

Projekt E-Krkine nagrade: dr. Aleš Hvala

Organizacijski odbor: Elvira Medved
dr. Miha Plevnik
mag. Simona Torkar Flajnik
dr. Jernej Zadnik

Recenzenti

Sintija Antončič, mag. Borut Anžič, dr. Primož Benkič, mag. Neda Benički Švagelj, dr. David Bevk, mag. Renata Bibič, dr. Sergeja Bombek, mag. Marjanca Breznik, dr. Nina Cimerman, dr. Irena Čarman, prof. dr. Jože Drinovec, Dušan Dular, dr. Marko Fajdiga, mag. Branko Filipovič, mag. Miha Florjanič, Andrej Gartner, dr. Aleš Gasparič, mag. Mojca Golob, dr. Marija Grčman, Mateja Grošelj, mag. Miran Hvalec, dr. Sandra Javernik Rajh, dr. Davor Kidžemet, Polona Knavs Vrhunec, Samo Komel, mag. Helena Kotnik, mag. Alenka Kramarič, dr. Zdenka Kranjc Gregorčič, Maja Kukec, dr. Roman Lenaršič, Simon Makuc, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateović Rojnik, mag. Mateja Merslavič, dr. Marjo Merslavič, Berta Mešnjak, Mirjam Milharčič Simčič, dr. Anita Mlakar, mag. Damjan Možina, Dušanka Oblak Božič, mag. Vesna Pahor, dr. Anica Pečavar, Mitja Pelko, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, dr. Miha Plevnik, mag. Vladimir Pokorny, mag. Ivan Radež, Vojko Rebolj, dr. Tadej Recelj, Miloš Ružič, mag. Lala Salom, Zvone Simončič, Gordan Sladič, dr. Janez Smodiš, Matej Smrkolj, dr. Polona Smrkolj, Matej Stergar, Tadej Stropnik, dr. Vida Škrabanja, dr. Mojca Štaudohar Kozjan, dr. Mateja Štempelj, dr. Jaroslav Tihi, Sandra Turk, mag. Robert Učman, izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. Tatjana Vrščaj Žunič, dr. Jernej Zadnik, mag. Stane Zalar, dr. Silvo Zupančič, mag. Pavla Zupančič

VSEBINA / CONTENTS

37. Krkine nagrade / 37th Krka Prizes

Znanost povezuje / Science connects

dr. Aleš Rotar, predsednik Sveta sklada Krkinih nagrad / President of the Krka Prizes Foundation 9

Krkini nagrajenci 2007 / Krka Prize Winners 2007 11

17. simpozij / 17th Symposium Zbornik povzetkov / Book of Abstracts

Uvod / Introduction

prof. dr. Jože Drinovec, predsednik Znanstvenega odbora / President of the Scientific Board 15

Krkine nagrade za posebne dosežke na področju raziskovalnega dela / Krka Prizes for Special Achievements in Research

Predstavitev nagrajencev / Presentation of prizewinners

VPLIV AKTINOPORINOV NA PREPUSTNOST MEMBRANE FOSFOLIPIDNEGA MEHURČKA ZA SLADKORJE
THE INFLUENCE OF ACTINOPORINS ON THE PHOSPHOLIPID MEMBRANE PERMEABILITY FOR SUGARS

Mojca Mally

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani 19

INTERAKCIJE SPINSKO OZNAČENIH DERIVATOV PERIFOSINA IN MILTEFOSINA Z MODELNIMI IN CELIČNIMI
MEMBRANAMI
INTERACTIONS OF SPIN-LABELED DERIVATIVES OF PERIFOSINE AND MILTEFOSINE WITH MODEL AND CELL
MEMBRANES

Janez Mravljak

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 24

HETEROLOGNA EKSPRESIJA IZ PROMOTORJA *GAL1* V NAČRTOVANIH MUTANTAH KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

HETEROLOGOUS EXPRESSION IN DESIGNED MUTANT STRAINS OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* USING
THE *GAL1* PROMOTER

Mateja Novak Štagoj

Kemijski inštitut Ljubljana 29

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA IN ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI NEKATERIH *myo*-INOZITOL
FOSFATOV

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND STUDY OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF SOME *myo*-INOSITOL
PHOSPHATES

Martin Šala

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani 32

ŠTUDIJ FIZIKALNIH OBLIK DONEPEZILIJEVEGA KLORIDA IN NJIHOVIH PRETVORB POD VPLIVOM
FARMACEVTSKO-TEHNOLOŠKIH PROCESOV

THE STUDY OF PHYSICAL FORMS OF DONEPEZIL HYDROCHLORIDE AND THEIR TRANSFORMATIONS UNDER
THE INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL-TECHNOLOGICAL PROCESSES

Miha Vrbinc

Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 37



Krkine nagrade / Krka Prize

Povzetki / Abstracts

KRITERIJI ZA PRENOS NOVEGA TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA FARMACEVTSKE UČINKOVINE IZ RAZVOJA NA VEČNAMENSKI PROIZVODNI OBRAT
TECHNOLOGY TRANSFER CRITERIA FOR NEW PRODUCTION PROCESS OF THE PHARMACEUTICAL INGREDIENT FROM PILOT TO MULTIPURPOSE PRODUCTION PLANT

Robert Agnič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

45

RAZGRADNJA AVERMEKTINOV V ŽIVALSKIH IZTREBKIH IN NJIHOV VPLIV NA NEKATERE ORGANIZME V TLEH
DISSIPATION OF AVERMECTINS IN ANIMAL FAECES AND THEIR EFFECTS ON SOME SOIL DWELLING ORGANISMS

Lucija Kolar

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

46

ANALIZA KROMOSOMSKIH NEPRAVILNOSTI PRI ČLOVEŠKIH JAJČNIH CELICAH IZ SPODBUJENIH CIKLUSOV, DOZORELIH V POGOJIH *IN VITRO*
CHROMOSOME ANEUPLOIDY ANALYSIS OF *IN VITRO* MATURED HUMAN OOCYTES FROM STIMULATED CYCLES

Lidija Križančič Bombek

Univerzitetni klinični center Maribor

47

VLOGA ENDOCITOZE IN DIMERIZACIJE PRI ZNOTRAJCELIČNEM PROMETU IN SIGNALIZIRANJU RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI
THE ROLE OF ENDOCYTOSIS AND DIMERIZATION ON THE INTRACELLULAR TRAFFICKING AND SIGNALING OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

Valentina Kubale

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

48

PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA CISTATINA F TER NJEGOVA VLOGA PRI ANTIGENSKI PREDSTAVITVI
EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF CYSTATIN F AND ITS ROLE IN ANTIGEN PRESENTATION

Tomaž Langerholc

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

49

UPORABA SEMIDEFINITNEGA IN KOPOZITIVNEGA PROGRAMIRANJA V KOMBINATORIČNI OPTIMIZACIJI
APPLICATION OF SEMIDEFINITE AND COPOSITIVE PROGRAMMING IN COMBINATORIAL OPTIMIZATION

Janez Povh

Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

50

TERMODINAMIKA IN KINETIKA KONFORMACIJSKIH PREHODOV NEKATERIH BIOLOŠKO POMEMBNIH MAKROMOLEKUL
THERMODYNAMICS AND KINETICS OF CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF SOME IMPORTANT BIOLOGICAL MACROMOLECULES

Iztok Prislan

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

51

S KSENOBIOTIKI POSREDOVANO URAVNAVANJE LANOSTEROL 14 α – DEMETILAZE (CYP₅₁) IN DRUGIH GENOV HOMEOSTAZE HOLESTEROLA PRI MIŠI IN ČLOVEKU
XENOBIOTIC-DEPENDENT REGULATION OF LANOSTEROL 14 α -DEMETHYLASE (CYP₅₁) AND OTHER HOLESTEROL HOMEOSTASIS GENES IN MOUSE AND HUMAN

Tadeja Režen

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

52

POROZNI POLIMERNI NOSILCI IZ O/V EMULZIJ Z VISOKIM DELEŽEM NOTRANJE FAZE
POROUS POLYMER SUPPORTS FROM O/W HIGH INTERNAL PHASE EMULSIONS

Dejan Štefanec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

53

RAZISKAVE METABOLIZMA RALOKSIFENA Z EKSPERIMENTALNIMI MODELI NARAŠČAJOČE KOMPLEKSNOSTI
STUDY OF RALOXIFENE METABOLISM BY EXPERIMENTAL MODELS WITH INCREASING COMPLEXITY

Jurij Trontelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

54

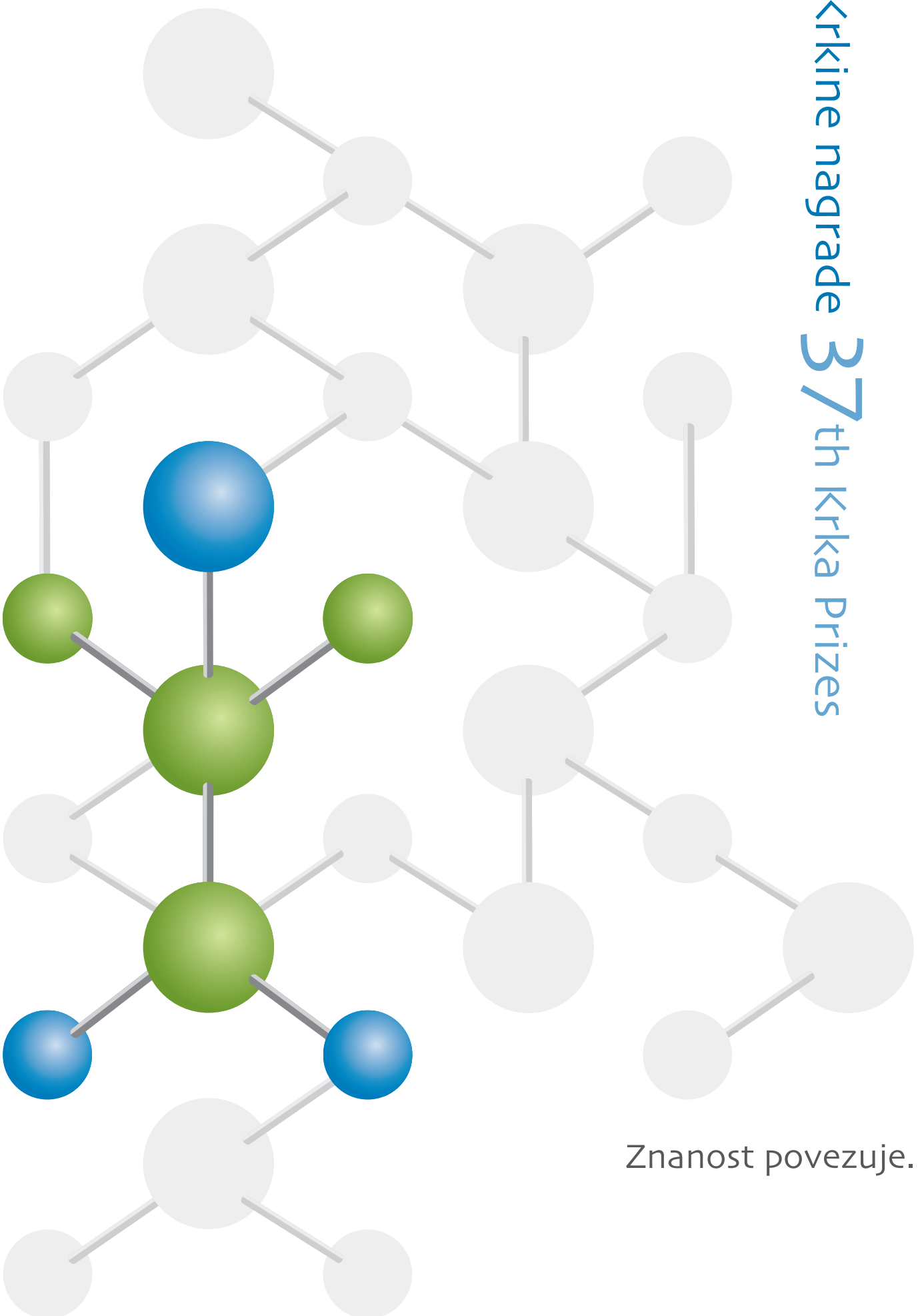
AKTIVNOST BAKTERIOCINSKIH KOMPLEKSOV SEVOV <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 IN <i>Lactobacillus gasseri</i> LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH BACTERIOCIN COMPLEX ACTIVITY OF <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 AND <i>Lactobacillus gasseri</i> LF221 STRAINS IN DIFFERENT EXPRESSION SYSTEMS Metoda Zorič Peternel Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani	55
VEČPARAMETRSKI MODEL ZA OCENO KAKOVOSTI BOLNIŠNIC MULTI-ATTRIBUTE MODEL FOR QUALITY EVALUATION OF HOSPITALS Katarina Čepon Ekonomska fakulteta, Univerza v Ljubljani	56
DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREDPISOVALNE NAVADE ZDRAVNIKOV - PREDPISOVANJE STATINOV MED ZDRAVNIKI SPLOŠNE MEDICINE V SLOVENIJI FACTORS THAT INFLUENCE PHYSICIANS' PRESCRIBING DECISIONS - THE CASE OF STATINS PRESCRIBING AMONG GENERAL PRACTITIONERS IN SLOVENIA Elizabeta Suhadolc IEDC Poslovna šola Bled	57
ACILIRANI TRIAZENI – PRIPRAVA IN LASTNOSTI ACYLATED TRIAZENES - PREPARATION AND PROPERTIES Branko Alič Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	58
POSKUSI PARALELNE SINTEZE HETEROCIKLIČNIH SISTEMOV IZ DIMETILAMINOMETILIDENSKIH DERIVATOV ACETONDIKARBOKSILATOV EXPERIMENTS OF PARALLEL SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC SYSTEMS FROM DIMETHYLAMINOMETHYLIDEN DERIVATES OF ACETONDICARBOXYLATES Jernej Baškovč Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	59
VPLIV SPREMENJAV MYD88 NA SIGNALIZACIJO TOLLU-PODOBNIH RECEPTORJEV THE EFFECT OF MODIFICATION OF PROTEIN MYD88 ON TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING Monika Ciglič Kemijski inštitut Ljubljana	60
ŠTUDIJA GASTROREZISTENTNIH LASTNOSTI OBLOG S HIDROKSIPROPIL METILCELULOZO ACETAT SUKINATOM THE STUDY OF HYPROMELLOSE ACETATE SUCCINATE ENTERIC COATING PROPERTIES Grega Hudovornik Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	61
OKARAKTERIZACIJA EKSTRACELULARNIH ENCIMOV PRI BAKTERIJI <i>Bacillus subtilis</i> CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR ENZYMES FROM BACTERIA <i>Bacillus subtilis</i> Tanja Jordan Krka, d. d., Novo mesto	62
MATRIČNI MODIFIKATORJI V ELEKTROTERMICNI ATOMSKI ABSORPCIJSKI SPEKTROSKOPIJI MATRIX MODIFIERS IN ELECTROTERMIC ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY Slavko Klobčar Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	63
UPORABA MIKROKALORIMETRIJE IN TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE V PREDFORMULACIJSKIH ŠTUDIJAH STABILNOSTI RAMIPRILA USE OF MICROCALORIMETRY AND LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PREFORMULATION STUDIES OF STABILITY OF RAMIPRIL Slavko Kralj Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	64
IZOLACIJA MIKROORGANIZMA Z ESTERAZNO AKTIVNOSTJO IN KARAKTERIZACIJA ESTERAZE ISOLATION OF MICROORGANISM WITH ESTERASE ACTIVITY AND CHARACTERIZATION OF THE ESTERASE Petra Ljubi Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	65

DIELS-ALDERJEVE REAKCIJE NEKATERIH 2H-PIRAN-2-ONOV IN PRETVORBE NASTALIH ADUKTOV Z DERIVATI HIDRAZINA DIELS-ALDER REACTIONS OF SOME 2H-PIRAN-2-ONES AND TRANSFORMATIONS OF PRODUCED ADUCTS WITH DERIVATES OF HYDRAZINES Mateja Rajer Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	66
STABILNOST DVOVERIŽNIH IN ENOVERIŽNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN PREPOZNAVANJE NJIHOVEGA OŽJEGA KANALA Z ANTIBIOTIKI STABILITY OF DOUBLE- AND SINGLE-STRANDED OLIGONUCLETIDES AND MINOR GROOVE RECOGNITION BY ANTIBIOTICS Mojca Seručnik Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	67
PRODUKCIJA IN IZOLACIJA POLISAHARIDOV GLIVE <i>Grifola frondosa</i> V SUBMERZNI KULTIVACIJI PRODUCTION AND ISOLATION OF POLYSACCHARIDES OF <i>Grifola frondosa</i> IN SUBMERGED CULTIVATION Jerica Staniša Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	68
KINETIČNE ŠTUDIJE HITROSTI RASTI KEFIRNIH ZRN KINETIC STUDIES OF GROWTH RATE OF KEFIR GRAINS Katja Zajšek Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru	69
GRENIVKA IN ZDRAVILA GRAPEFRUIT AND MEDICAMENTS Maja Bregar, Mateja Rapuš, Karmen Hribar Gimnazija Novo mesto	70
SKRIVNOSTNO ŽIVLJENJE TALNE BAKTERIJE MYSTERIOUS LIFE OF FLOOR BACTERIUM Maja Rupertič, Anja Lahne Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma	71
VITAMIN D IN NJEGOV POMEN ZA OPTIMALNO ZDRAVJE LJUDI VITAMIN D AND ITS IMPLICATION FOR OPTIMAL HEALTH OF HUMANS Nina Novak, Špela Rabzelj Gimnazija Novo mesto	72
VPLIV RAZLIČNIH ZELIŠČNIH EKSTRAKTOV NA VONJ ČESNA EFFECT OF VARIOUS HERBAL EXTRACTS ON THE GARLIC ODOUR Maj Valerij, Žaneti Klobučar Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma	73

E - Krkine nagrade / e - Krka Prize Winners

SMERI RAZVOJA ALTERNATIVNIH OBLIK V PREDKLINIČNIH RAZISKAVAH DIRECTIONS OF DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE FORMS IN PRE-CLINICAL RESEARCH Simona Legiša Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani	77
VPLIV PRIPRAVE VZORCA IN POGOJEV SNEMANJA NA RENTGENSKI PRAŠKOVNI DIFRAKTOGRAM FARMACEVTSKIH SUBSTANC INFLUENCE OF SAMPLE PREPARATION AND INSTRUMENT SETTINGS ON X-RAY POWDER DIFFRACTION PATTERN OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCES Matjaž Pajk Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	78
ZAVEDANJE POTROŠNIKOV O VARNOSTI, KAKOVOSTI IN UČINKOVITOSTI ZDRAVIL RASTLINSKEGA IZVORA A CONSCIOUSNESS OF PATIENTS ABOUT QUALITY, EFFICACY AND SAFETY OF HERBAL DRUGS PREPARATIONS Vladimir Vajda Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	79
Seznam avtorjev / Author Index	80
Seznam mentorjev / Supervisor Index	81

37. krkine nagrade 37th Krka Prizes



Znanost povezuje.

ZNANOST POVEZUJE!

Raziskovanje in odkrivanje novega je sicer vedno povezano z znanjem in napori posameznikov, pa vendar hkrati tudi povezuje ljudi. Združuje mlade in starejše, zvedave in izkušene. Dovolj zanimiv cilj in veliki izzivi lahko združijo povsem različne, lahko celo nasprotujoče si raziskovalce.

Povezuje ljudi iz zelo različnih delov sveta, padle so jezikovne in kulturne pregrade, da o tehnoloških ne govorimo. Rezultati znanstvenega dela so danes ena od najbolj globaliziranih dobrin na svetu. Pospešeno se združujejo tudi raziskovalci iz akademskega sveta in gospodarstva. Uspešna podjetja temeljijo na izsledkih raziskav, svoje izdelke in storitve pa snujejo na intenzivnem razvojnem delu. Tudi v Krki se zavedamo, da je naša konkurenčnost odvisna zlasti od inovativnosti in kreativnosti naših raziskovalcev in partnerjev, s katerimi vedno več izdelkov razvijamo skupaj.

Hkrati pa se zavedamo tudi, da je za uspešno učenje in raziskovanje potrebno naprej povezati mladostno zagnanost in izkušnje. Zato naj bodo najtrdnjše vezi med mentorji in mladimi raziskovalci, saj so te najpomembnejši členi verige znanja. Del te verige želimo biti tudi v Krki, naše Krkine nagrade pa so poseben prispevek k povezovanju.



Dr. Aleš Rotar
Predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad



SCIENCE CONNECTS!

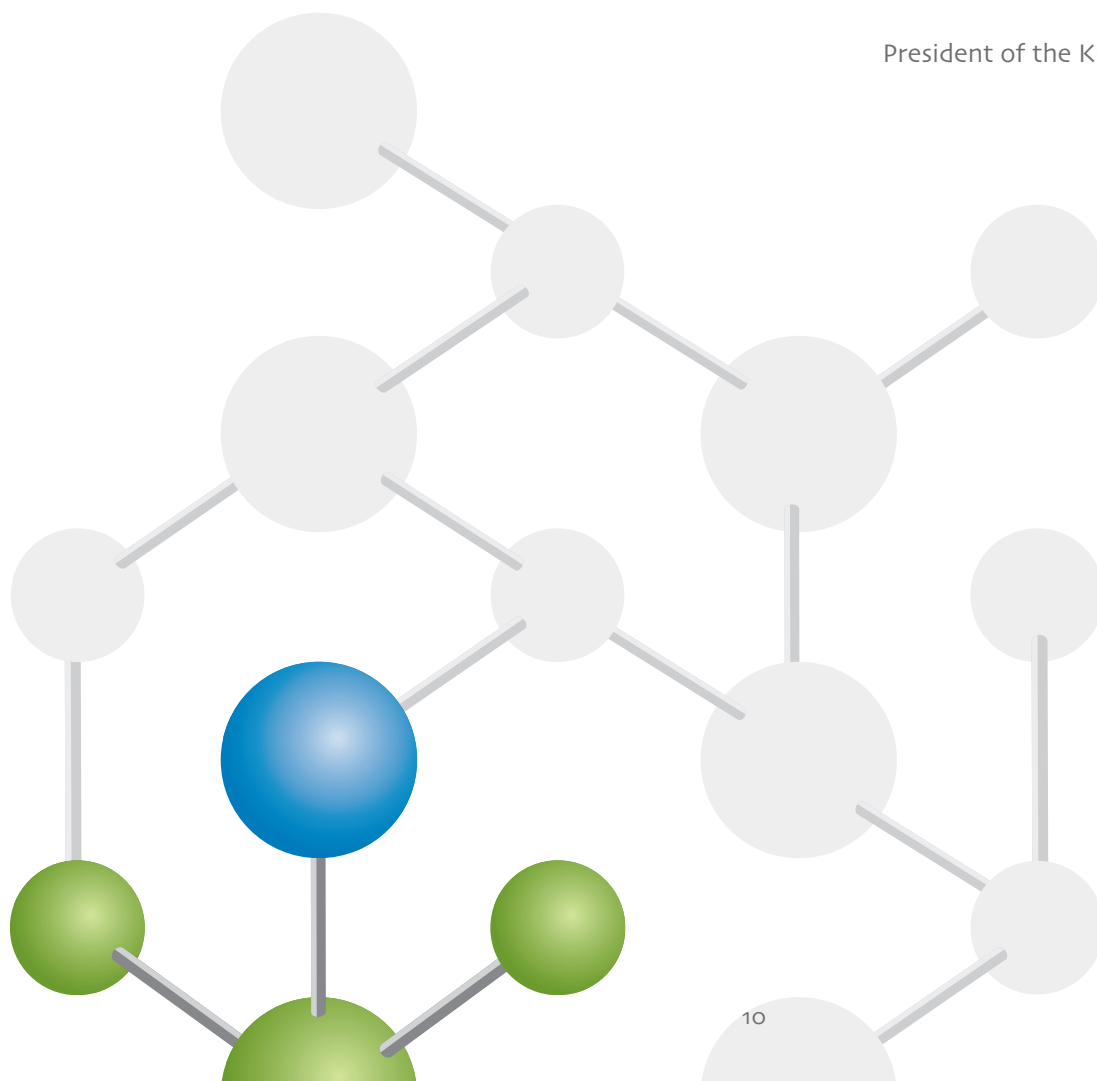
Research and discovery of the new is always connected to the knowledge and efforts of individuals, but at the same time it also connects people. It unites the young and old, the inquisitive and the experienced. An intriguing objective coupled with major challenges can unite completely different, perhaps even researchers who see themselves as opponents.

It connects people from very different parts of the world, breaking down barriers of language and culture, without even speaking of technological barriers. The results of scientific work are today one of the world's most globalised goods. Researchers from the worlds of academia and from business are finding more and more opportunities to collaborate. Successful companies are based on the results of research, their products and services are planned within intense development processes. Here at Krka we are well aware that our competitiveness depends above all on the innovation and creativity of our researchers and the partners with whom we are increasing developing products together with.

At the same time we are well aware that successful teaching and research are vital in connecting youthful enthusiasm with experience. This means that the bonds between mentors and junior researchers should be as strong as possible, as they are the most important links in the chain of knowledge. At Krka we want to be part of that chain, and the Krka Awards make a special contribution to forming those connections.



Dr Aleš Rotar
President of the Krka Awards Council

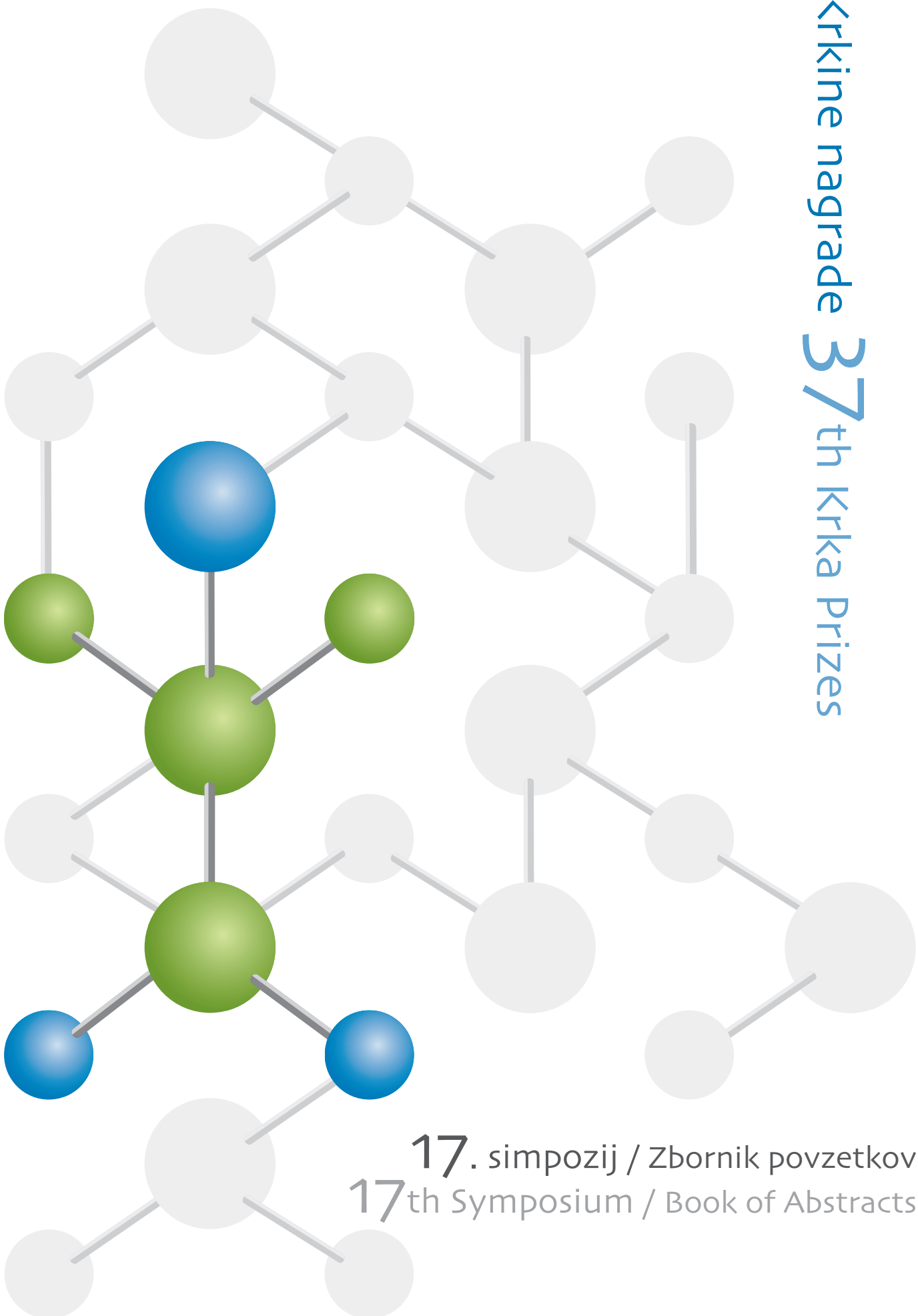


KRKINI NAGRAJENCI 2007 / KRKA PRIZE WINNERS 2007

Št.	Nagrajenci	Status	Mentor / Somentor(ji)
 2148	Robert Agnič	doktor znanosti s področja kemije	Valentin Koloini Miran Mihelčič
 2149	Branko Alič	univerzitetni diplomirani kemik	Slovenko Polanc
 2150	Jernej Baškovč	univerzitetni diplomirani kemik	Branko Stanovnik
 2151	Maja Bregar	dijakinja	Stanka Florijančič
 2152	Monika Ciglič	študentka mikrobiologije	Roman Jerala
 2153	Katarina Čepon	magistrica	Vladislav Rajkovič Borut Rusjan
 2154	Karmen Hribar	dijakinja	Stanka Florijančič
 2155	Grega Hudovornik	magister farmacije	Franc Vrečer Natalija Zajc
 2156	Tanja Jordan	študentka biokemije	Aleš Gasparič Matic Legiša
 2157	Slavko Klobčar	univerzitetni diplomirani kemik	Marjan Veber
 2158	Žaneti Klobučar	dijak	Vojka Zupančič Matej Stergar
 2159	Lucija Kolar	doktorica znanosti s področja veterinarske medicine	Nevenka Kožuh Eržen
 2160	Slavko Kralj	magister farmacije	Vojko Kmetec Robert Rožkar
 2161	Lidija Križančič Bombek	doktorica znanosti s področja medicine	Veljko Vlasisavljevič Nadja Kokalj Vokač
 2162	Valentina Kubale	doktorica znanosti s področja veterinarske medicine	Milka Vrecl
 2163	Anja Lahne	dijakinja	Jana Goršin Fabjan
 2164	Tomaž Langerholc	doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Janko Kos Boris Turk
 2165	Simona Legiša		
 2166	Petra Ljubi	univerzitetni diplomirani kemik	Brigita Lenarčič Gordan Sladič
 2167	Mojca Mally	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Boštjan Žekš Saša Svetina
 2168	Janez Mravljak	doktor znanosti s področja farmacije	Slavko Pečar

	Št.	Nagrajenci	Status	Mentor / Somentor(ji)
	2169	Nina Novak	dijakinja	Eli Rustja Marinka Kovač
	2170	Mateja Novak Štagoj	doktorica znanosti s področja farmacije	Borut Štrukelj Radovan Komel
	2171	Matjaž Pajk		Anton Meden Matej Smrkolj
	2172	Janez Povh	doktor znanost s področja matematike	Franz Rendl Bojan Mohar Martin Juvan
	2173	Iztok Prislan	doktor znanosti s področja kemije	Gorazd Vesnaver
	2174	Špela Rabzelj	dijakinja	Eli Rustja Marinka Kovač
	2175	Mateja Rajer	diplomirana inženirka kemijske tehnologije	Marijan Kočevar
	2176	Mateja Rapuš	dijakinja	Stanka Florijančič
	2177	Tadeja Režen	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Damjana Rozman
	2178	Maja Ruperčič	dijakinja	Jana Goršin Fabjan
	2179	Mojca Seručnik	univerzitetni diplomirani kemik	Jurij Lah
	2180	Jerica Staniša	univerzitetni diplomirani kemik	Marin Berovič Bojana Boh
	2181	Elizabeta Suhadolc	magistrica MBA	Jose Maria Pons Jože Drinovec
	2182	Martin Šala	doktor znanosti s področja kemije	Boris Pihlar Jana Kolar
	2183	Dejan Štefanec	doktor znanosti s področja kemije	Peter Krajnc Aleš Podgornik
	2184	Jurij Trontelj	doktor znanosti s področja farmacije	Aleš Mrhar
	2185	Vladimir Vajda		
	2186	Maj Valerij	dijak	Vojka Zupančič Matej Stergar
	2187	Miha Vrbinc	doktor znanosti s področja farmacije	Franc Vrečer
	2188	Katja Zajšek	univerzitetna diplomirana inženirka kemije in kemijske tehnologije	Andreja Goršek Peter Glavič
	2189	Metoda Zorič Peternel	doktorica znanosti s področja biotehnologije	Irena Rogelj

37. krkine nagrade 37th Krka Prizes



17. simpozij / Zbornik povzetkov
17th Symposium / Book of Abstracts

UVODNIK PREDSEDNIKA ZNANSTVENEGA ODBORA

**Ruši smelo vse ograde,
če za svoje sile mlade
nimaš več dovolj prostora.
A ograda je opora
za snovanje in posest:
zopet druge si postavi,
samo v večji še širjavi,
da še več bo k tebi cest
in še več nad tabo zvezd.**

(A. Gradnik)

Farmakoterapija in z njo farmacevtska industrija imata danes dva najpomembnejša stebra. Prvi je molekularna biologija, ki išče, oblikuje in raziskuje nove molekule – učinkovine predvidljivega in usmerjenega delovanja. Drugi steber pa so velike multicentrične klinične raziskave, s katerimi se dokumentira učinkovitost in varnost novih molekul pri ljudeh.

Zavzetost, usmerjenost k cilju, pragmatičnost, pa tudi človeška in družbena odgovornost, so vrednote, ki vodijo do rezultatov, tako znanstvenih, tehnoloških in ekonomskih. Pragmatičnost, povezana z inovativnostjo, svobodo in odgovornostjo.

Znanost in celo filozofija sta si vedno zastavljali le naloge, ki jih je bilo mogoče tudi rešiti.

V najboljši generični farmacevtski industriji je vgrajenega mnogo znanja, ki je hkrati tudi trdo delo. Izkoreninjamo, zadržujemo in blažimo bolezni, krepimo zdravje in s tem blaginjo družbe.

Ne priznavamo majhnosti, dosegljive cilje pa si postavljamo visoko, čeprav je pot zahtevna.



Prof. dr. Jože Drinovec, dr. med.



INTRODUCTION – President of the Scientific Committee

Bravely bring down all boundaries,
If your youthful powers
Have not room enough.
Yet boundaries offer succour
for plans and for new lands:
So draw up new boundaries
Only over greater expanses,
So that more paths may lead to you
And more stars shine above you.

(A. Gradnik)

Pharmacotherapy and the pharmaceutical industry are today based on two pillars. First, molecular biology, which aims to find, create and research new molecules – effective ingredients with a predictable and controlled function. The second pillar is large-scale multi-centred clinical research, which documents the effectiveness and safety of new molecules for people that will use them.

The values that bring scientific, technological and economic results are commitment, clear focus on objectives, and pragmatism, as well as human and social responsibility. Here one intends a pragmatism based on innovation, freedom and responsibility.

Science and even philosophy have always set objectives that are also achievable.

The best generic pharmaceutical companies boast a wealth of knowledge, which also reflects a significant amount of hard work. We work to eradicate, prevent and mitigate disease, improve health and therefore increase the wellbeing of society.

We do not work on a small-scale, but set our goals very high, however difficult the path may be.



Prof Dr Jože Drinovec, MD





Krkinge nagrade za posebne doseške na podrođu raziskovalnega dela

Krka Prizes for Special Achievements in Research

Predstavitev nagrajencev
Presentation of prizewinners



Dr. Mojca Mally

Mojca Mally je asistentka in raziskovalka na Inštitutu za biofiziko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Kljub temu, da je v Ljubljani obiskovala družboslovno gimnazijo, se je odločila za študij fizike, predvsem iz nekoliko romantično obarvanih vzrokov: »Da bi dobila odgovore na tista pomembna, osnovna vprašanja. Fizika je temeljna znanost in daje odgovore oz. pomaga razumeti svet – od tega, kako nastane mavrica, kako delujeta televizija ali mikrovalovka pa do življenja zvezd, delovanja sončne celice ali celičnih procesov v živih organizmih, ki jih s fizikalnega stališča obravnava biofizika«. Fascinirajo jo majhne stvari, kot na primer, kako vzkaliijo žitna zrna, kako milni mehurčki spreminjajo barve, kako med plavanjem pod vodo naprej iztegnjene roke odsevajo od gladine morja kot v zrcalu... Vse to fizika kot veda o naravnih zakonih obravnava in pomaga razložiti. Očarali so jo delfini, socialna bitja z dodelano komunikacijo in igrivim pristopom k življenju. Njena družinica – tudi dobri dve leti star sin Maks – jim sledi po širnih svetovnih morjih.

Ob vsem tem pa je njeno delo, ki ga ima rada, tako kot kolektiv, v katerem ustvarja. »V okviru doktorskega dela sem preučevala, kako se z vgradnjo poro-tvornih toksinov poveča prepustnost membrane lipidnih mehurčkov, ki so model za celične membrane. S tem se omogoči izmenjavo snovi (hranil, zdravilnih učinkovin ...) med mehurčki in okolico. Razvili smo metodologijo, s katero smo lahko kontinuirano, pod optičnim mikroskopom spremljali odziv posameznega mehurčka na delovanje toksina; izdelali smo model, ki opaženo dogajanje konsistentno popiše in na podlagi katerega lahko določamo spremenjene prepustnosti membran v odvisnosti od koncentracije toksina.« Za svoje delo pravi, da je včasih občutek pri pridobivanju in interpretaciji rezultatov tak, kot bi sestavljal veliko sestavljanko iz puzzlov, pri čemer ne poznaš njihovega končnega števila, kaj šele končne slike. Prav v tem pa je čar raziskovanja.

VPLIV AKTINOPORINOV NA PREPUSTNOST MEMBRANE FOSFOLIPIDNEGA MEHURČKA ZA SLADKORJE

M. Mally

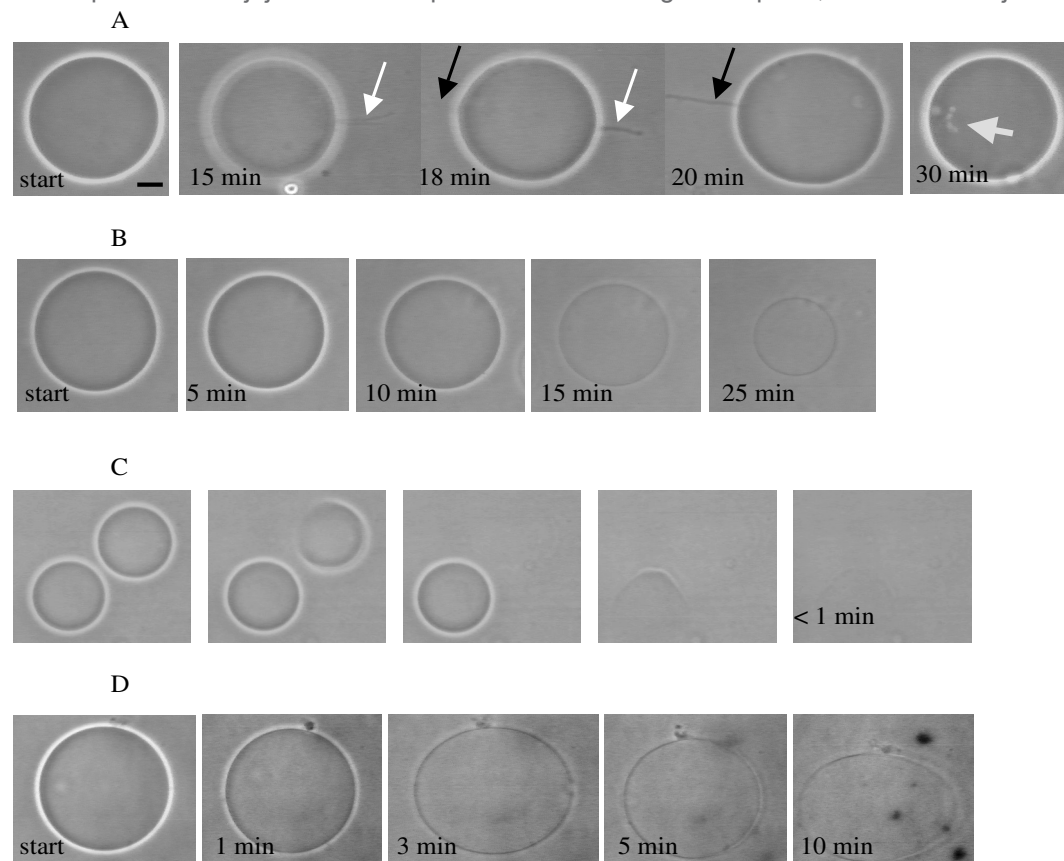
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: B. Žekš

Somentor: S. Svetina

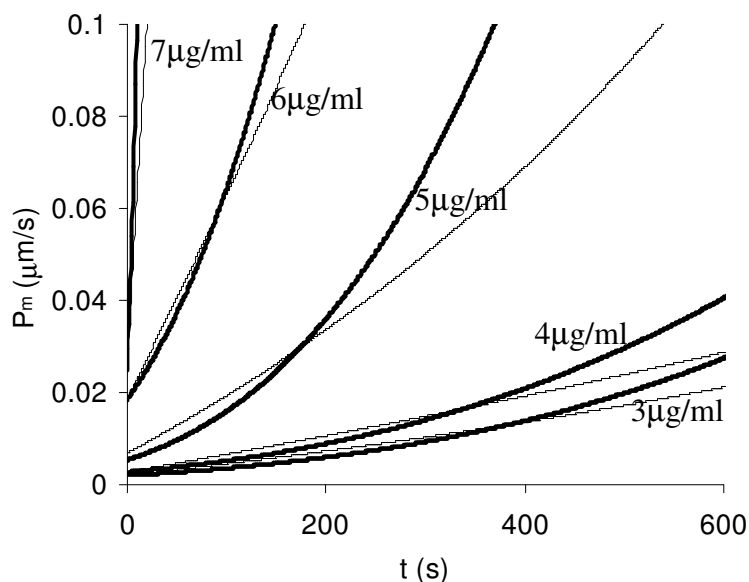
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Fosfolipidni mehurčki so vaze zaključeni lipidni dvosloji v vodnem okolju in so zaradi svoje enostavnosti primeren model za študij lastnosti celičnih membran. Ker pa so fosfolipidne membrane neprepustne za molekule, ki so večje kot molekule vode, fosfolipidni mehurčki ne morejo izmenjevati snovi z okolico. Z vgradnjo por v fosfolipidne membrane želimo omogočiti spreminjanje sestave vsebine mehurčka in razumeti mehanizme nastanka por in preko-membranskega transporta. Kot primerno orodje za povečevanje prepustnosti membrane so se izkazali proteini in peptidi, ki se vgrajujejo v celične in modelske membrane in v lipidnem okolju tvorijo oligomerne pore. Lastnosti in učinki različnih poro-tvornih toksinov, ki smo ju uporabili v raziskavi (ekvinatoksin II, melitin), so bili že podrobno proučevani in dokumentirani v literaturi, vendar so bile študije v vseh primerih izvedene na vzorcih mehurčkov in zato podajajo povprečne prepustnosti membran. Mi smo opazovali obnašanje posameznih mehurčkov neposredno pod fazno-kontrastnim mikroskopom (slika 1), ker se pri tem razkrijejo mehanizmi preko-membranskega transporta, ki sicer ostanejo skriti.



Slika 1: Odziv posameznega mehurčka na delovanje melitina (MLT) v odvisnosti od časa. (A) Koncentracija MLT je 1 $\mu\text{g/ml}$. Bele in črne puščice prikazujejo izrastke, ki se s časom krajšajo, medtem ko kratka siva puščica kaže na majhne kroglice na notranji strani mehurčka ob koncu eksperimenta. (B) Koncentracija MLT je 4 $\mu\text{g/ml}$. Mehurček periodično poka, radij se zmanjšuje, sij okrog mehurčka pa izginja. (C) Koncentracija MLT je 10 $\mu\text{g/ml}$. V manj kot minuti po prenosu mehurčka v okolje z MLT mehurčki razpadejo. (D) Koncentracija MLT je 40 $\mu\text{g/ml}$. Sij okrog mehurčka izgine hitro po prenosu, površina mehurčka s časom narašča.

Razvili smo metodologijo, ki nam omogoča prenos posameznega fosfolipidnega mehurčka v dobro definirano okolje (mikropipetiranje), kontinuirano opazovanje posameznega mehurčka pod optičnim mikroskopom in analizo sprememb membrane ter vsebine mehurčka na podlagi analize fazno-kontrastne slike (Mally in sod., 2002). Podali smo konsistentno razlago opaženih pojavov ter ugotovili, kakšne strategije »razvije« mehurček ob različnih koncentracijah uporabljenih toksinov. Z ustreznim modelom smo obnašanje mehurčka popisali in pridobili orodje za napovedovanje dinamike izmenjave snovi med mehurčkom in okolico ter za določanje spremenjene prepustnosti membrane (slika 2).



Slika 2: Naraščanje prepustnosti membrane (P_m) s časom pri različnih koncentracijah MLT za dve različici modela: prva povzema predpostavko, da radij por narašča pri konstantnem številu por (debela črta), druga pa predpostavko, da število por narašča, pri čemer je njihova velikost stalna (tanka črta). Predstavljena časovna odvisnost P_m omogoča najboljše prilaganje napovedi modela (o manjšanju deleža saharoze v mehurčku in hkrati o krajšanju časovnih intervalov med zaporednimi poki) merskim podatkom.

Deducirali smo lahko mehanizme transporta snovi čez membrano (difuzija molekul sladkorja skozi inducirane pore, periodični poki kot posledica izravnavanja osmotskih tlakov) in na podlagi analize morfoloških sprememb membrane tudi mehanizme delovanja posameznega toksina (za melitin pri nizkih koncentracijah npr. vezava v zunanji sloj membrane, prehajanje melitinskih parov na notranjo stran membrane, induciranje toka lipidnih molekul z zunanjega na notranji sloj membrane (Mally in sod., 2007)).

Reference

- M. Mally, J. Majhenc, S. Svetina in B. Žekš. **2002.** Mechanisms of equinatoxin II induced transport through the membrane of a giant phospholipid vesicle. *Biophys. J.* 83: 944-953.
M. Mally, J. Majhenc, S. Svetina in B. Žekš. **2007.** The response of giant phospholipid vesicles to pore-forming peptide melittin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768: 1179-1189.

THE INFLUENCE OF ACTINOPORINS ON THE PHOSPHOLIPID MEMBRANE PERMEABILITY FOR SUGARS

M. Mally

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: B. Žekš

Co-supervisor: S. Svetina

Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Phospholipid vesicles are formed in aqueous environment when phospholipid molecules aggregate and reorganize according to hydrophobic interactions. Due to their simplicity the vesicles are a suitable model for studying the properties of cell membranes. But as phospholipid membranes are impermeable for molecules larger than the molecules of water, such vesicles can not exchange the solutes with the surroundings. With permeabilization of the membranes we want to enable the changing of the composition of the vesicle interior solution. Numerous proteins and peptides are known for their ability to form oligomeric pores in lipid membranes and are thus a suitable tool for membrane permeabilization. The studies of the interactions between the pore-forming toxins and lipid vesicle membranes have in most cases been performed on samples of small vesicles, meaning that the results on different parameters describing membrane permeabilization are averaged. We based our experimental exploration of the vesicle response to the toxin action on direct optical monitoring of single giant vesicles (Fig. 1) and were able to observe phenomena that were previously not described in the literature.

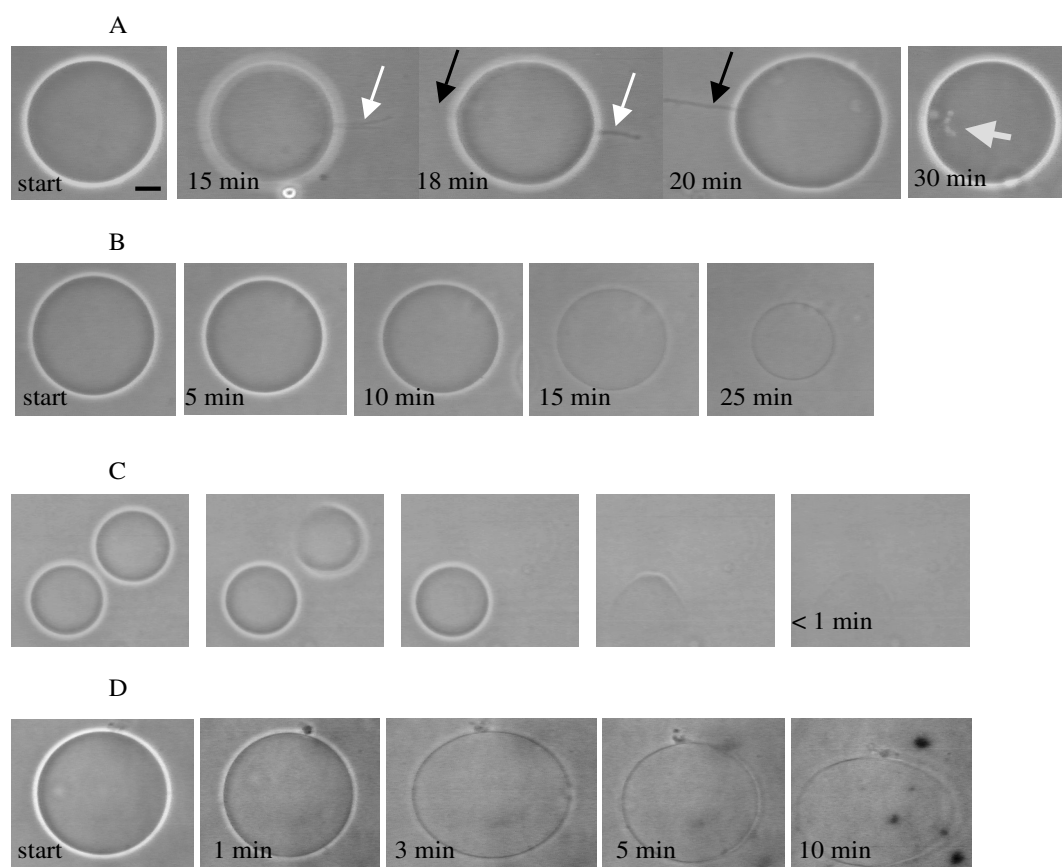


Figure 1: The time dependence of the vesicle response to the action of different concentrations of MLT. (A) Concentration of MLT is 1 $\mu\text{g/ml}$. Black and white arrows show the protuberances that are shortening with time, while the short gray arrow points to the beads inside the vesicle at the end of the experiment. (B) Concentration of MLT is 4 $\mu\text{g/ml}$. The vesicle is bursting periodically and diminishing in size, and the vesicle

halo is disappearing. (C) Concentration of MLT is 10 $\mu\text{g/ml}$. In less than a minute after the transfer into the environment with MLT the vesicles disintegrate completely. (D) The concentration of MLT is 40 $\mu\text{g/ml}$. The vesicle halo fades rapidly after the transfer, and afterwards the surface area increases with time

The methodology was introduced that enabled the transfer of single vesicles to the environment with a well defined conditions (micromanipulation), a continuous optical observation of the vesicles subjected to the toxins and the phase-contrast image analysis of the morphological changes of the membranes and as well of the changes in the vesicle interior solution composition (Mally et al., 2002). The analysis of the data led to a qualitative understanding of the mechanisms of the toxin-membrane interaction; we constructed a model presenting a consistent explanation of the observed events. The model provides the tools to predict the dynamics of the changing of the inner vesicle solution composition and for determining the permeability of the membrane (Fig. 2).

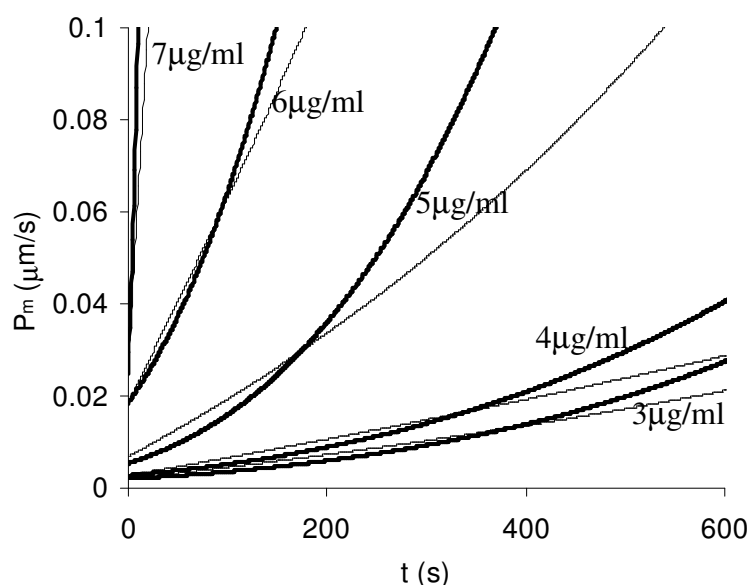
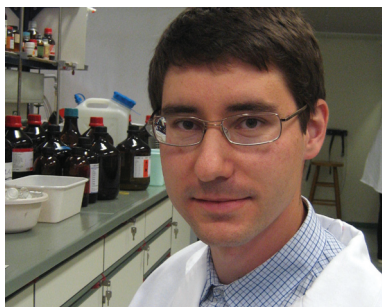


Figure 2: The increasing of the membrane permeability (P_m) with time for different MLT concentrations for two model variants: one assuming the increasing radii of the pores (at constant number of pores, thick line) and the other assuming the increasing number of the pores (at constant pore size, thin line). The presented time dependence of P_m enables the best fit of model predictions (on the decreasing of the sucrose fraction inside the vesicle and at the same time on the time intervals between the bursts) to the measured data.

We were able to deduce the mechanisms of the trans-membrane transport (diffusion through the induced pores, periodical bursts due to the osmotic pressure) and also the mechanisms of the toxin action (for melittin at low concentrations for example the binding to the outer membrane leaflet, translocation of melittin pairs and the induced flow of lipid molecules from the outer to the inner membrane leaflet (Mally et al., 2007)).

References

- M. Mally, J. Majhenc, S. Svetina and B. Žekš. **2002**. Mechanisms of equinatoxin II induced transport through the membrane of a giant phospholipid vesicle. *Biophys. J.* 83: 944-953.
- M. Mally, J. Majhenc, S. Svetina and B. Žekš. **2007**. The response of giant phospholipid vesicles to pore-forming peptide melittin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768: 1179-1189.



Dr. Janez Mravljak

Dr. Janez Mravljak se je za študij farmacije odločil že kot otrok. »Doma sem s Sv. Primoža na Pohorju, in sicer z gorske kmetije. Tam sem zgodaj spoznal zdravilne rastline in zanimala me je njihova učinkovitost, njihova moč,« pripoveduje. Gimnazijo je obiskoval na Ravnah na Koroškem in takrat je še kolebal med kemijo ali farmacijo. Njegovo današnje delo pa združuje oboje, saj je zaposlen na fakulteti za farmacijo, natančneje na katedri za farmacevtsko kemijo. Pravi, da njegovo življenje poteka med fakulteto in domom, kamor se rad vrača in z veseljem pomaga pri kmetovanju. Vmes pa je veliko razmišljanja, tudi filozofske narave – o etiki, plemenitosti, odgovornosti, dolžnostih, skrivnostih ... Pravi, da je bil nekoč študij naravoslovja tudi del filozofske fakultete (ali splošneje: del filozofije). Postavil si je okvir, znotraj katerega je lahko svoboden – človek potrebuje meje, da se njegovo delovanje ne razblini na vse strani. Razveseljuje ga raziskovalno delo, ki je usmerjeno v zdravilne učinkovine. In temu je bila namenjena tudi njegova doktorska disertacija. »Namen moje naloge je bil osvetliti mehanizem delovanja določenih učinkovin, ki jih uporabljamo pri zdravljenju raka na dojkah in nekaterih vrst kožnega raka.« Sintezo spinsko označenih molekul perifosina in miltefosina je opravljal na katedri, kjer je zaposlen, in sicer pod mentorstvom prof. dr. Slavka Pečarja, biološka testiranja spojin na rakavih celičnih linijah pa so potekala na Max Delbrück centru za molekularno medicino v Berlinu. Sledile so simulacije molekulske dinamike v Laboratoriju za molekularno modeliranje in NMR spektroskopijo na kemijskem inštitutu, elektronsko paramagnetno resonančno (EPR) spektroskopijo pa je opravljal na Centru za elektronsko paramagnetno resonanco na Inštitutu Jožef Stefan. Ob tem s hvaležnostjo našteva mentorje in skromno dodaja, da je njegovo delo, na katerega je ponosen, vendarle le kamenček v mozaiku iskanj najboljših rešitev za zdravljenje raka.

INTERAKCIJE SPINSKO OZNAČENIH DERIVATOV PERIFOSINA IN MILTEFOSINA Z MODELNIMI IN CELIČNIMI MEMBRANAMI

J. Mravljak

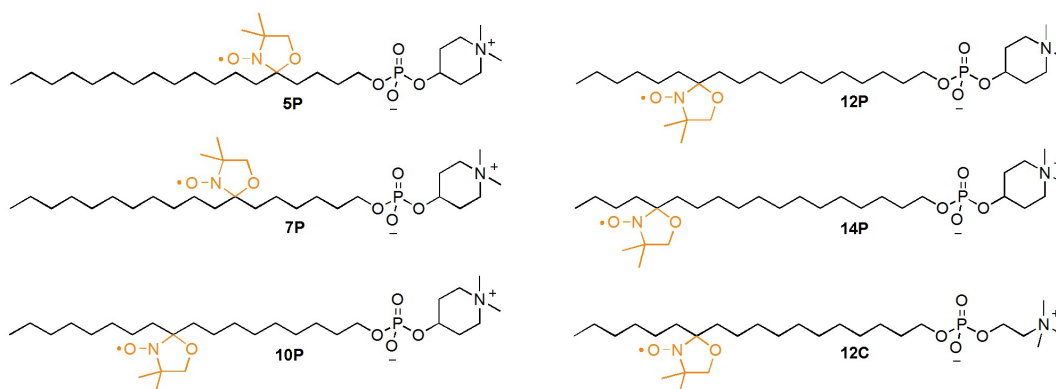
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: S. Pečar

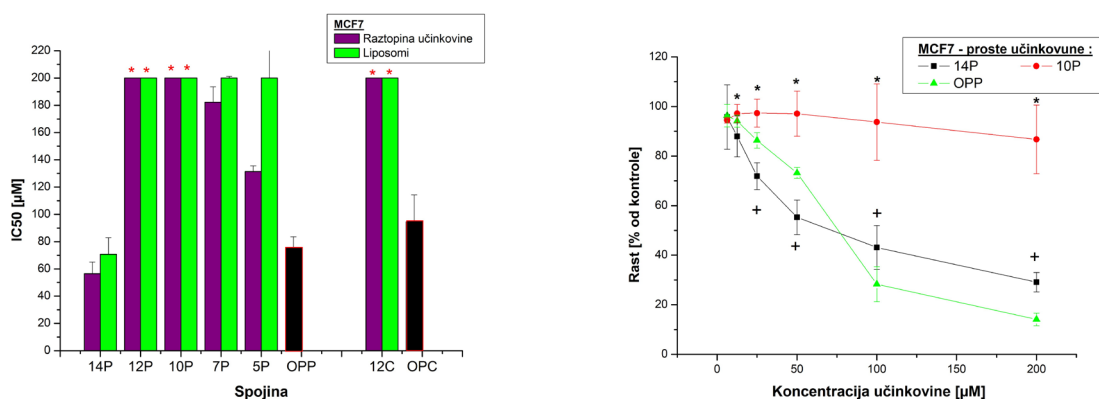
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Fosfolipidne protitumorne učinkovine predstavljajo heterogeno skupino sinteznih lipidov z obetavnim protirakavim delovanjem, ki za razliko od klasičnih ne ciljajo neposredno DNA, pač pa celično membrano. Ključno za njihovo uporabnost in razumevanje citotoksičnega delovanja je odkritje, da so selektivno toksične za rakave celice in da v njih sprožijo apoptozo. Kot površinsko aktivne snovi (surfaktanti) imajo pogosto še različne nespecifične učinke, ki lahko prekrijejo njihovo specifično delovanje.

Z namenom proučevanja interakcij izbranih alkilfosfolipidov z modelnimi in celičnimi membranami z elektronsko paramagnetno resonančno (EPR) spektroskopijo, smo pripravili spinsko označene analoge (SI-APL) miltefosina (OPP) in perifosina (OPC) (slika 1).^{1,2} Doksilno skupino (*N*-oksil-4',4'-dimetiloksazolidin) z nesparjenim elektronom smo kot spinski označevalec uvedli na različna mesta na alkilni verigi APL. Uvedba te skupine je povzročila strukturno motnjo v amfifilni molekuli SI-APL, ki se odraža v spremenjenih fizikalno-kemičnih lastnostih in biološki aktivnosti v primerjavi z neoznačeno učinkovino.



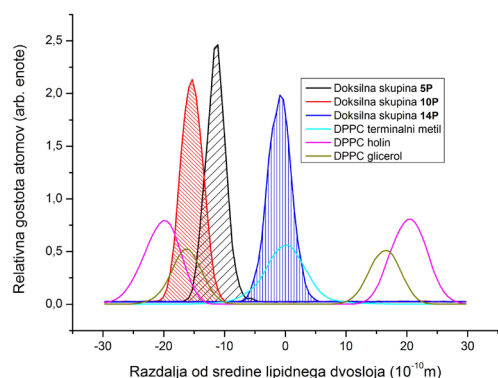
Slika 1. Strukture spinsko označenih analogov perifosina (5P – 14P) in miltefosina (12C).



Slika 2. Inhibicija rasti MCF7 tumorskih celic s SI-APL izražena kot IC₅₀ (levo) in inhibicijski krivulji raztopin 14P, 10P za MCF7 celice v primerjavi s perifosinom (OPP) (desno).²

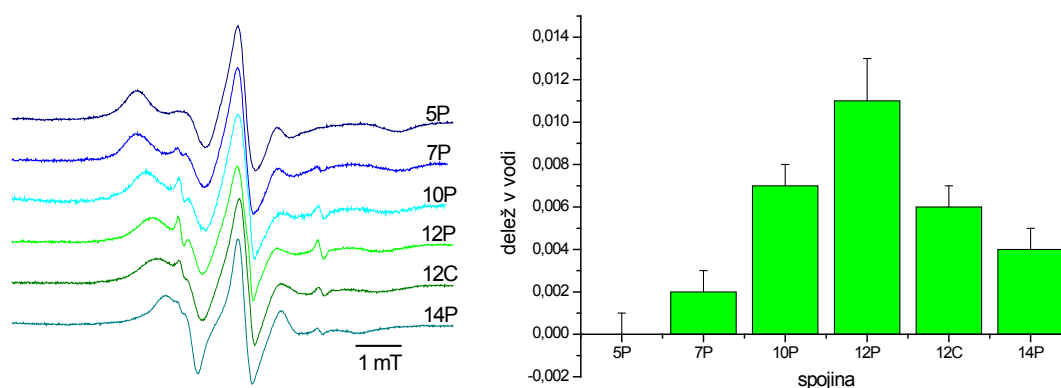
Citotoksičnost SI-APL smo določili na treh rakavih celičnih linijah MT-1, MT-3 in MCF-7 in dobljene rezultate primerjali z rezultati neoznačenih učinkovin (slika 2). SI-APL imajo na splošno manj izražene citotoksične učinke kot neoznačene učinkovine, razen **14P** z doksilno skupino na koncu alkilne verige, ki ima citotoksičnost primerljivo neoznačenemu perifosinu.²

S simulacijo molekulske dinamike v vodi in v lipidnem dvosloju smo na molekularnem nivoju proučili vpliv doksilne skupine na prevladujočo konformacijo treh izbranih molekul SI-APL (slika 3).³ Ravnotežne konformacije in sposobnosti sidranja SI-APL v lipidni dvosloj so pogojene s prisotnostjo in lego doksilne skupine na alkilni verigi.



Slika 3. Razporeditev doksilnih skupin za spojine **5P**, **10P** in **14P**, vstavljene v spodnji lipidni monosloj DPPC, v primerjavi z nekaterimi deli molekul DPPC. Gostote so v razmerju s številom molekul in so povprečje zadnjih nanosekund 6ns-simulacij molekulske dinamike v lipidnem dvosloju.³

Z EPR spektroskopijo smo ocenili sposobnost sidranja SI-APL v membrane liposomov, eritrocitov in celic ter posredno iz urejenosti in polarnosti okolice sklepali na lego doksilne skupine v membrani (slika 4). Iz kinetike redukcije nitroksidov z askorbinsko kislino, natrijevim askorbatom ali s celičnim redoks sistemom, smo ocenili dostopnost/mobilnost vgrajenega SI-APL v različnih membranskih sistemih. V luči teh rezultatov razlagamo razlike v biološki aktivnosti SI-APL.



Slika 4. EPR spektri SI-APL (levo) in deleži SI-APL v vodi (desno), izmerjeni v sedimentu celic MCF7 pri 20°C.

Ob upoštevanju navedenih razlik med SI-APL, ki so posledica uvedbe doksilne skupine na različna mesta na alkilni verigi, so sintetizirani SI-APL lahko primerna molekularna orodja za študij interakcij APL z biološkimi membranami z EPR spektroskopijo, še zlasti **14P**, ki ima nizko hemolitično aktivnost in neoznačeni učinkovini primerljiv biološki učinek.

INTERACTIONS OF SPIN-LABELED DERIVATIVES OF PERIFOSINE AND MILTEFOSINE WITH MODEL AND CELL MEMBRANES

J. Mravljak

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: S. Pečar

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Antitumor phospholipids are a heterogeneous group of synthetic lipids with promising anticancer activity, targeting directly the cell membrane but not the DNA. Their selectivity against cancer cells and their ability to trigger apoptosis in cancer cells are crucial in understanding their cytotoxic activity. As surfactants, they can also give rise to non-specific effects that may interfere with their specific biological properties.

We have prepared spin-labeled analogs of miltefosine and perifosine to study the interactions of spin-labeled alkylphospholipids (SI-APL) with model and cell membranes using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy (figure 1).^{1,2} The spin-label doxyl group (*N*-oxyl-4',4'-dimethyloxazolidine) containing unpaired electron was introduced to different positions on the alkyl chain of APL. Introduction of the doxyl group causes structural perturbation of the amphiphilic SI-APL which is reflected in changed physical-chemical properties and biological activity of the drug.

The cytotoxicity of SI-APL has been determined on three different cancer cell lines, MT-1, MT-3 and MCF-7, and compared with that of the unlabeled drugs (figure 2). In general, SI-APL are less markedly cytotoxic, with the exception of the **14P**-compound with the doxyl group at the end of the alkyl chain, which has comparable activity to the unlabeled perifosine.²

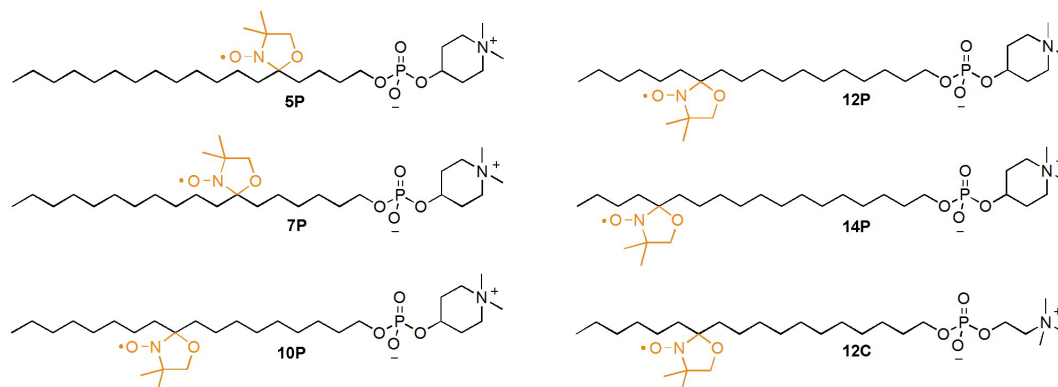


Figure 1. Structures of spin-labeled analogs of perifosine (5P – 14P) and miltefosine (12C).

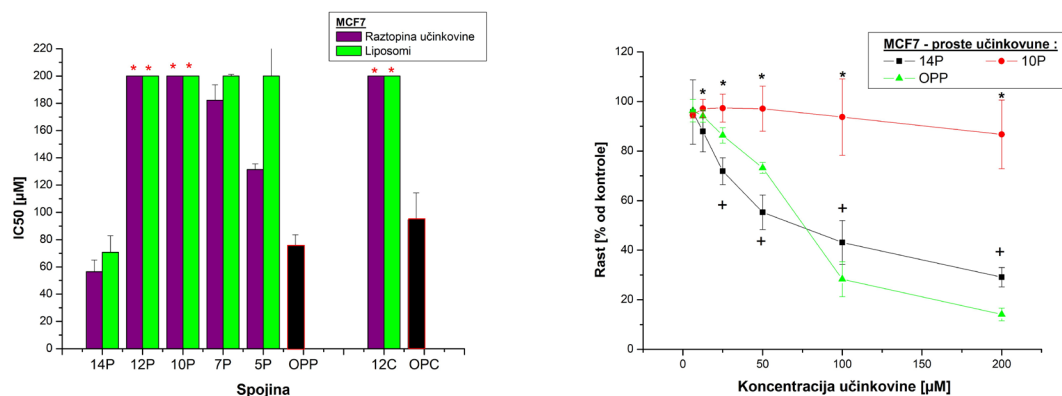


Figure 2. Growth inhibition of MCF7 tumor cells by SI-APL expressed as IC₅₀ (left) and inhibition curves of solutions of **14P**, **10P** for MCF7 cell line compared to perifosine (**OPP**) (right).²

The influence of the doxyl group on the predominant conformation of three selected SI-APL has been investigated by molecular dynamics simulation in water and in lipid bilayers (figure 3).³ The equilibrium conformations and anchoring abilities of SI-APL in the phospholipid bilayer depend on the presence and position of the doxyl group on the alkyl chain.

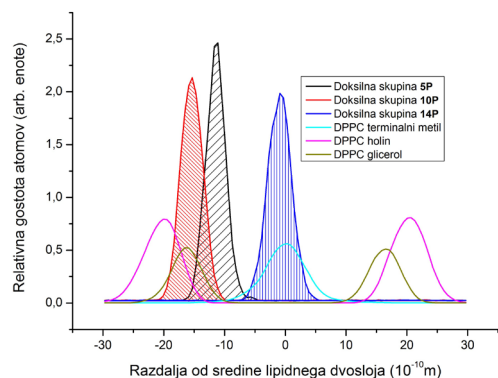


Figure 3. Doxyl group distributions for compounds **5P**, **10P** and **14P** embedded into the lower monolayer of DPPC compared to various DPPC moieties. Densities are scaled to the number of molecules and averaged over the last nanoseconds of the 6ns-molecular dynamics simulations in a lipid bilayer.³

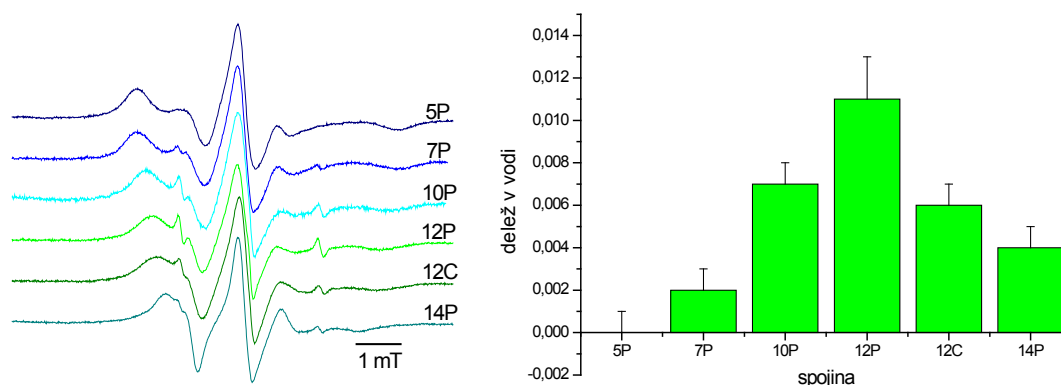


Figure 4. EPR spectra of SI-APL (left) and portions of SI-APL in water (right) measured in sediment of MCF7 cells at 20°C.

The anchoring ability of SI-APL in liposome, erythrocyte and cell membranes has been determined by EPR spectroscopy, and the position of the doxyl group in the membrane has been deduced indirectly from the order and polarity of the surroundings (figure 4). The accessibility and mobility of the SI-APL incorporated into different membranes has been estimated from the kinetics of reduction of nitroxides by ascorbic acid, sodium ascorbate and cell redox-systems. Differences in the biological activities of SI-APL can be explained in the light of these results.

Synthetic SI-APL could be used as molecular tools for investigating APL interactions with biological membranes by EPR spectroscopy, by taking into account their different properties. The **14P** compound, which possesses comparable biological activity to the unlabeled compound and low haemolytic activity, could be especially useful.

1. Mravljak, J.; Pečar, S. *Synth. Commun.*, **2004**, 34, 3763-3771.
2. Mravljak, J.; Zeisig, R.; Pečar, S. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 6393-6399.
3. Mravljak, J.; Konc, J.; Hodošek, M.; Šolmajer, T.; Pečar, S. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 25559-25561.



Dr. Mateja Novak Štagoj

Dr. Mateja Novak Štagoj je trenutno predvsem mamica dveh majhnih otrok – dve leti in pol stare Lane in 6-mesečnega Bora – zanj je še na porodniškem dopustu. Vendar so vezi s stroko in kemijskim inštitutom, na katerem je zaposlena, kljub temu stalne in žive; izmenjava informacij, posvetovanja, novosti... to so vsebine, iz katerih ne smeš in ne moreš izstopiti.

Na prvem mestu pa je seveda družina, ki živi z naravo in s športom. »Oba z mojem tečeva, ponavadi pa je moja proga dolga 21 kilometrov. Včasih tečem tudi z vozičkom, in to našemu sinčku zelo paše ...« Tek je sprostitev in hkrati vir novih moči za celo njihovo družino. Vikendi pa so pogosto namenjeni za pot k njenim staršem v Prlekijo, saj je zelo navezana na dom.

Že kot gimnazijka v Ljutomeru je vedela, da bo farmacevtka, ni pa takrat še razmišljala o akademski karieri. K raziskovalnemu delu so jo spodbujali profesorji pa tudi njen mož, ki ji trdno stoji ob strani in jo podpira v vseh njenih projektih. »Ključen je cilj, tega si moraš jasno zastaviti, hkrati pa je seveda izjemnega pomena odgovoren odnos do sebe in do področja svojega dela.« Tudi v prihodnje se vidi predvsem v raziskovalnem delu, v delu, ki je ustvarjalno in koristno. Je odprta do številnih področij; končno pa se tako rekoč dnevno odpirajo nova in nova vprašanja.

»Moje doktorsko delo spada na področje sodobne biotehnologije, ki je v zadnjem desetletju bistveno prispevala k izboljšanju zdravja ljudi. Raziskave v mojem delu so izjemnega pomena za farmacevtsko industrijo, kajti rezultati omogočajo razvoj gensko spremenjenih kvasovk za pridobivanje rekombinantnih proteinov, kar bo nenazadnje lahko vodilo v generacijo bolj dostopnih bioloških zdravil.« Gensko spremenjene kvasovke, ki se uporabljajo za izražanje heterolognih (tujih) beljakovin, so že patentirane pri nas, postopka za EU in ZDA pa še potekata.

HETEROLOGNA EKSPRESIJA IZ PROMOTORJA *GAL1* V NAČRTOVANIH MUTANTAH KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

M. Novak Štagoj

Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: B. Štrukelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: R. Komel

Kemijski inštitut Ljubljana

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, bolj poznana kot pekovska ali pivska kvasovka, že tisočletja igra pomembno vlogo pri pripravi hrane. Najbolje proučeni evkariontski mikroorganizem pa je zaradi svojih lastnosti tudi pomembno orodje za pridobivanje rekombinantnih proteinov. *S. cerevisiae* je odličen gostiteljski organizem za visoko produkcijo številnih proteinov: protiteles, hormonov, rastnih dejavnikov ter drugih farmacevtsko pomembnih makromolekul.

Preiskovanje velikega števila različnih sevov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* zahteva hitro, zanesljivo in natančno določitev gostote celic. Kvantifikacija celic z barvanjem s kalkofluorjem je odlična izbira pri visoko procesivnih metodah, ki temeljijo na merjenju fluorescence v mikrotitrski ploščici. Ugotovili smo visoko stopnjo korelacije med optično gostoto, merjeno pri 600 nm (A_{600}), in fluorescenco barvila Kalkofluor belo M2R, vezanega na celično površino kvasovk, pri čemer smo z enotno količino barvila izmerili od $1,5 \times 10^5$ do $1,0 \times 10^8$ celic v mikrotitrski luknjici. Dokazali smo, da je metoda hitra, enostavna in natančna ter uporabna za številne seve v različnih rastnih fazah in metabolnih okoliščinah.

Z namenom izboljšanja rekombinantne produkcije, smo nadalje razvili fluorescentno metodo za spremljanje in ovrednotenje prispevkov različnih genskih delecij na ekspresijo proteina iz promotorja *GAL1*. Z uporabo mikrotitrskega čitalca smo neposredno izmerili fluorescenco v živih celicah in določili raven sinteze poročevalske molekule v 28 izbranih mutantih. V mutiranem sevu *gal1* smo opazili najvišje, 2,4-kratno povečanje produkcije zeleno-fluorescirajočega proteina (GFP). Izbitje gena *GAL80* je v primerjavi z izogenim sevom povzročilo 1,3-kratno povišanje fluorescence. Sintezo GFP pa je popolnoma izničilo izbitje genov *GAL3*, *GAL4* in *MTH1*. Zmanjšano rast v gojišču z galaktozo so poleg tega pokazale še mutante *gal7*, *gal10* in *gal3*. Druge genetske perturbacije so raven heterologne sinteze le malo zmanjšale. Dokazali smo, da je fluorescenčna metoda uporabna za spremljanje vpliva genov, ki so vključeni v uravnavanje promotorja *GAL1*. Rezultati preiskovanja so prispevek k poznavanju uravnavanja promotorja *GAL1*, obenem pa nudijo tudi možnost učinkovitejših manipulacij sistema *GAL*.

Nadalje smo pripravili nov sev *S. cerevisiae*, v katerem smo gen za galaktokinazo *GAL1* zamenjali z genom za transkripcijski aktivator *GAL4*. *GAL*-rekombinantni sev poleg konstitutivno izražajočega gena vsebuje še dodaten gen, *GAL4*, spojen z naravnim promotorjem *GAL1*. Da bi preučili, ali 'gratuirana' indukcija kot tudi uravnavana prekomerna ekspresija pozitivnega regulatorja izboljša produkcijo proteina, smo v divji tip, v *gal1* in v *GAL*-rekombinantni sev vnesli "low-" in "multi-copy" vektorje, ki vsebujejo gen za GFP. V mutanti *gal1*, ki je nosila v celici več kopij vektorja, smo opazili 3,3-kratno zvišanje produkcije GFP. Fluorescenca v *GAL*-rekombinantnem sevu je bila v primerjavi z divjim tipom višja za kar 4,6-krat. Opisani sev tako lahko uporabimo za visoko ekspresijo heterolognih genov, ki so uravnavani z galaktozo – inducibilnim promotorjem.

Nazadnje smo se osredotočili na vlogo galaktokinaze, Gal1p, prvega encima Leloirjeve metabolne poti, pri izražanju genov, ki so uravnavani s promotorji *GAL*. Pokazali smo, da sta za encimsko aktivnost v III. konzervativni regiji GLSSSAAF nujna dva aminokislinska preostanka, S171 in A172. Transkripcijsko aktivacijo genov *GAL* smo v celicah, ki ne izkoriščajo galaktoze, ovrednotili z merjenjem intenzitete fluorescence in z metodo pretočne citometrije. Dokazali smo, da upadanje induktorja – galaktoze ni glavni omejitveni dejavnik ravni izražanja genov *GAL*.

HETEROLOGOUS EXPRESSION IN DESIGNED MUTANT STRAINS OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* USING THE *GAL1* PROMOTER

M. Novak Štajoj

National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: B. Štrukelj

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: R. Komel

National Institute of Chemistry Ljubljana

Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, also known as a baker's or brewer's yeast, has played a considerable role in food production for several thousand years. The best characterized eukaryotic microorganism has several properties which have also established it as an important tool in expression of recombinant proteins. It is an excellent host organism for high level production of numerous proteins including hormones, growth factors, antibodies and other pharmaceutically important macromolecules.

High-throughput screening of various *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains demands fast, reliable and accurate determination of the cell number. Cell quantitation by calcofluor staining is an excellent alternative for high-throughput fluorescence-based methods in microtiter plate. A high degree of correlation between optical density at 600 nm (OD_{600}) and fluorescence of Calcofluor White M2R dye binding to the cell surface of budding yeast was found, detecting as few as 1.5×10^5 cells per well and as many as 1.0×10^8 cells per well with a single dye concentration. We proved that the method is fast, simple and accurate, and applicable to different yeast strains at various growth stages and metabolic conditions.

In order to improve recombinant protein production we have also developed a fluorescence based method for screening and evaluating the contribution of various gene deletions on protein expression from *GAL1* promoter. The level of reporter synthesis was determined in 28 selected mutant strains simultaneously, by direct measurement of fluorescence in living cells using a microplate reader. The highest 2.4-fold increase of green fluorescent protein (GFP) production was observed in *gal1* mutant strain. Deletion of *GAL80* caused 1.3-fold increase of fluorescence with regarding to the isogenic strain. *GAL3*, *GAL4* and *MTH1* gene deletion completely abrogated GFP synthesis. Growth of *gal7*, *gal10* and *gal3* also exhibited reduced fitness in galactose medium. Other genetic perturbations affected GFP expression level only moderately. We proved that the established fluorescence based method is useful for screening of genes involved in *GAL1* promoter regulation. The presented results contributed to the knowledge of *GAL1* promoter regulation and offer better insights for more efficient manipulation of *GAL* system.

Further, a novel strain of *Saccharomyces cerevisiae* in which the *GAL1* gene encoding galactokinase was replaced with the gene for transcriptional activator *GAL4* has been designed. A *GAL* recombinant strain that contains the *GAL4* gene fused to the natural *GAL1* promoter in addition to the normal, constitutively expressed chromosomal *GAL4* gene. To evaluate whether both gratuitous induction and regulated overexpression of the positive regulator are improving protein production, low- and multi-copy expression vectors, containing the *GAL1* promoter fused to the structural gene for GFP, were introduced into wild-type, *gal1* and *GAL* recombinant strains. In yeast containing the multi-copy plasmid there was an approximately 3.3-fold increase in GFP production in the *gal1* mutant strain. Moreover, in the resulting *GAL* recombinant cells a 4.6-fold increase in fluorescence relative to the wild-type was observed. The *GAL* recombinant strain should therefore prove useful for maximal expression of heterologous genes driven by a galactose-inducible promoter.

At last, we were focused on galactokinase, Gal1p, the first enzyme of Leloir pathway and its role on *GAL* expression level. We demonstrated that S171 and A172, in conserved region III with GLSSSAAF consensus, are required for catabolic activity of Gal1p. Using fluorescence and flow-cytometry assays we evaluated transcriptional activation of *GAL* genes under condition in which the galactose utilization was limited. We presented evidence that depletion of inducer galactose is not the main limiting factor affecting *GAL* expression level.



Dr. Martin Šala

Dr. Martin Šala ima veliko talentov in veliko interesov, nad vsemi pa je vendarle kemija. Kot gimnazijec je hodil tudi v srednjo glasbeno šolo; trobenta je bila njegov inštrument, ki pa je zahteval veliko časa. Tri ure vaj na dan je kar precej, zato se je po srednji šoli odrekel trobenti in se posvetil predvsem študiju, oboje bi bilo težko izvedljivo. «Temu, kar ne more obvladati do popolnosti, se raje odpove. Rad ima plezanje, pohode po gorah, veliko potuje, smuča, teče... Pravi, da so ga vzgajali z zgledom; ima izostren občutek za samodisciplino in organizacijo življenja, zato je pri njem dovolj prostora za vse te dejavnosti.

Zaposlen je na fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, njegovo področje pa je organska in analitna kemija. Raziskovalno delo mu omogoča, da »ubere svojo pot« k cilju, ki je vedno zanimiv. Njegovo doktorsko delo je bilo namenjeno iskanju spojin za zaščito starih rokopisov: »Železo-galno črnilo je bilo zaradi svoje obstojnosti, saj ga praktično ni mogoče izbrisati, eno najpomembnejših črnih v zgodovini zahodne civilizacije. Uporabljali so ga že Rimljani in do srednjega veka je postalo splošno uporabljano. Muzeji in arhivi po celem svetu hranijo impresivno zbirko dokumentov, zapisanih s tem črnilom (na primer J. W. V. Gorthejevega Fausta, W. A. Mozartove notne zapise Čarobne piščali, mnoge kompozicije J. S. Bacha). V 15. stoletju se je uveljavilo tudi kot črnilo za risanje, pogosto so ga uporabljali Rembrandt, Guercino in Lorrain. Težave, povezane s tem črnilom, opazimo po določenem času hranjenja gradiva, saj je to črnilo izjemno korozivno,« pojasnjuje.

Občutki, ko vidiš dokument, pomemben za človeštvo, ali ko zreš v Prešernov rokopis, so posebni, prav veličastni. Tudi iskanja najboljših poti za zaščito teh mogočnih, a hkrati krhkih dokumentov, je bilo prav posebno delo. Hvaležen je mentorju dr. Borisu Pihlarju in somentorici dr. Jani Kolar.

Zdaj pa Martina Šalo čakajo že novi izzivi – za eno leto se bo na Japonskem posvetil popolnoma drugemu kemijskemu področju.

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA IN ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI NEKATERIH *myo*-INOZITOL FOSFATOV

M. Šala

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Ljubljana, Univerza v Ljubljani

Mentor: B. Pihlar

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Ljubljana, Univerza v Ljubljani

Somentorica: J. Kolar

Narodna in univerzitetna knjižnica

V svojem raziskovalnem delu sem proučeval antioksidativne in vezavne lastnosti nekaterih inozitol fosfatov. Glede na današnje potrebe po zaščiti arhiviranega gradiva na papirnih nosilcih sem se odločil poiskati primerne spojine z antioksidativnimi lastnostmi, ki bi se lahko uporabljale tudi v nevodnih medijih. Primer poškodb rokopisa zaradi korozije železo-galnega črnila je prikazan na Sliki 1.



Slika 1: Galileo Galilei, rokopis, poškodovan zaradi korozije železo-galnega črnila.

Prek ortoformatnih derivatov *myo*-inozitola sem sintetiziral $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ in $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$. Čeprav sta bila oba derivata InsP_6 pripravljena že prej, sem ju sintetiziral po drugi sintezni poti ter tako dosegel večji izkoristek. V primeru $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ sem izkoristek izboljšal s 4 na 25 odstotkov, pri spojini $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ pa sem izkoristek popravil z 42 na 44 odstotkov. Priprava obeh derivatov je potekala po enaki reakcijski shemi, pri predhodnih sintezah pa sta bili ti shemi različni. Obema spojinama sem preveril njuno sposobnost inhibicije razpada celuloze. Po Ekenstamu sem določil konstante hitrosti razgradnje celuloze, iz katerih je razvidno, da obe spojini stabilizirata celulozo v enaki meri kot InsP_6 , najpogostejši do zdaj uporabljeni antioksidant v konservatorstvu. Ta derivata verjetno omogočata nadaljnje modifikacije do derivatov topnih v nepolarnih topilih, ki bi se lahko uporabljali pri razkisljevanju v nevodnih topilih, kar ima velik pomen za masovno razkisljevanje in obdelavo gradiva, ki je občutljivo na vodo. Prav tako sta spojini zanimivi za farmacevtsko industrijo, saj vemo, da se kot pomožne snovi v tabletah uporabljajo celulozi sorodne spojine.

Po uspešni sintezi in oceni antioksidativnih lastnostih sem se usmeril na preučevanje interakcij med InsP_6 , $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ in $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ ter železovimi(III) ioni. Z uporabo ^{31}P NMR v raztopinah sem izvedel pH titracije vseh treh spojin v pD območju od 2 do 14. Kemijski premiki ^{31}P resonanc so se pri titracijah ob majhnih dodatkih železovih(III) ionov malo spremenili, razmerje Fe^{3+} /inozitol fosfat je bilo 0,01. Titracijske krivulje pa niso znatno spremenile svoje oblike. Največje spremembe kemijskih premikov je bilo opaziti v pD območju od 5 do 10, zaradi česar sklepam, da so interakcije med kovino in ligandi v tem območju največje.

Z meritvami T_1 relaksacijskih časov ^{31}P sem, ob predpostavki, da se bodo ti najbolj spremenili za fosforjeve atome v bližini železa, ocenil preferenčne interakcije pri InsP_6 in $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$. Glede na pričakovane razmere pri staranju, hranjenju in konservaciji papirja v arhivih sem izbral tri pD vrednosti. V nevtralnem pD območju se pri obeh spojinah največje interakcije kažejo med železovimi(III) ioni in fosfatnimi skupinami na mestih 1, 2 in 3. Pri ostalih dveh pD območjih so bile razlike pri InsP_6 v okviru eksperimentalne napake, medtem ko se pri $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ v kislem pokaže preferenčna interakcija s fosfatno skupino na mestu 5, v bazičnem pa s fosfatnima skupinama na mestih 2 in 5.

Zavedati se je treba, da je kemizem interakcij povsem različen glede na razmerje $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$; pri nizkih razmerjih sem uporabil prej opisano metodo ^{31}P NMR v raztopinah, kjer so kompleksi topni. V mejnem področju sem uporabil tehnike potenciometrije, konduktometrije in voltometrije. S potenciometričnimi in konduktometričnimi titracijami sem določil, da se ob vezavi dveh atomov železa na molekulo InsP_6 sprostijo trije protoni in da to število ni odvisno od množine dodanih železovih(III) ionov. Voltametrične meritve kažejo, da železovi(III) ioni tvorijo komplekse z InsP_6 , njihova stabilnost in hitrost nastanka pa sta zelo odvisni od razmerja $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$ in pH medija. Raziskave v kislem otežuje nastanek netopnih Fe-InsP_6 spojin, pri višjih pH vrednostih pa se ob nezadostnem presežku InsP_6 tvorijo hidratizirani železovi oksidi. Poleg tega sem dokazal, da so reakcije kompleksiranja počasne, oksidacije in redukcije $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redoks para so difuzijsko kontrolirane.

Pri visokih razmerjih $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$, kjer se iz raztopine oborijo trdni amorfni železovi fitati, sem za študij uporabil ^{31}P NMR tehniko v trdnem in rentgensko absorpcijsko spektrometrijo. Z ^{31}P NMR v trdnem sem ugotovil, da z višanjem koncentracije železovih(III) ionov v začetni raztopini narašča število fosfatnih skupin z dvema vezanima železovima atomoma, število fosfatnih skupin z enim ali brez vezanih železovih atomov ali brez njega pa pada. Zanimivo je, da število vezi med železom in fosfatnimi skupinami ostaja enako in se giblje okoli 3. S XANES eksperimenti sem dokazal, da je vse železo v pripravljenih oborinah trivalentno in je oktaedrično koordinirano. EXAFS eksperimenti pojasnijo lokalno strukturo okoli železa; v prvi koordinacijski lupini se nahaja 6 kisikovih atomov, v drugi pa se nahajajo po 3 fosforjevi atomi in približno 0,5 železovih atomov. S kombinacijo obeh eksperimentalnih tehnik sem ugotovil, da so železovi atomi povezani s fosfatnimi skupinami z monodentatnimi vezmi.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND STUDY OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF SOME *myo*-INOSITOL PHOSPHATES

M. Šala

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: B. Pihlar

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: J. Kolar

National and University Library, Ljubljana

In my research work I have investigated antioxidative and binding properties of some inositol phosphates. In perspective of nowadays needs of protection of archival objects on paper I have decided to seek for compounds with appropriate antioxidative properties, that could be used in non-aqueous media. An example of iron-gall ink corrosion is shown on Figure 1.



Figure 1: Manuscript by Galileo Galilei, damaged by iron-gall ink corrosion.

I have synthesised $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ and $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ from *myo*-inositol orthoformate derivatives. Although both derivatives of InsP_6 were prepared before, I have synthesised them in a different way to achieve better yield. In the case of $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ I have achieved 25% yield, the known yield for this compound was only 4%. In the case of $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ I have achieved 44% yield, the known yield for this compound was 42%. The synthesis of the compounds was performed in a single reaction pathway, whereas in the previous attempts, the authors have used two different reaction pathways. Inhibition of cellulose degradation was evaluated for both of the compounds. The rate constants were determined according to Ekenstam, these results show that both of the compounds stabilise the cellulose in same extent as InsP_6 , which is the most commonly used antioxidant agent in the conservation of archival items. But these compounds also allow us to further modify them, which would make derivatives soluble in non-polar solvents, that could be used in deacidification in non-aqueous solvents, which has a great significance for deacidification and treatment of water sensitive items. These compound are interesting also for pharmaceutical industry because of the use of cellulose-like compounds as excipients in production of pharmaceutical products.

After the successful synthesis and evaluation of antioxidative properties, I have focused my studies to interaction between InsP_6 , $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ and $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ and iron(III) ions. With ^{31}P NMR in solution I have conducted pH titration of all three compounds in the pD range from 2 to 14. Chemical shifts of ^{31}P resonances didn't show major changes in the presence of small amounts of iron(III) ions, the Fe^{3+} /inositol phosphate was kept at 0,01. Titration curves did not change the shape significantly. The biggest changes in chemical shifts were in the pD range from 5 to 10, therefore it can be presumed that the interactions between metal in the ligands are the strongest in this pD range.

The measurements of T_1 relaxation times of ^{31}P give us the preferential interactions in InsP_6 in $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$, if we presume that the relaxation times would change the most for the phosphorus atoms the closest to iron. Three pD values have been chosen accordingly to expected circumstances in ageing, safekeeping and conservation of paper items in archives. At neutral pD both of the compounds exhibit the biggest interactions

between iron(III) ions and phosphate groups at positions 1, 2 and 3. Whereas the differences in T_1 for InsP_6 relaxation times are within the experimental error at the other two pD values. For $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ in the acidic media prevails the interaction between iron and phosphate group at the position 5, in alkaline media the strongest interaction is observed with phosphate groups at the positions 2 and 5.

We have to be aware the chemistry of interaction is completely different depending on the $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$ ratio; at low ratios ^{31}P NMR in solutions was used, where the adducts are soluble. In the middle range I have used techniques of potentiometry, voltammetry and conductometry. It can be seen by potentiometry and conductometry that by binding of every two iron(III) ions on the molecule of InsP_6 three protons are released, and this does not change with the amount of iron(III) ions added.

Voltammetric measurements show that iron(III) ions form complex adducts with InsP_6 , their stability and speed of formation is strongly dependent on the $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$ ratio and pH of the media. Problem arise in acidic media, because of the formation of non-soluble compounds Fe-InsP_6 , while at higher pH values hydrated iron oxides are formed if the concentration of InsP_6 is too low. During the course of the work has been also shown that formation of the complex compounds are slow, and that oxidations and reductions of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redox couple are diffusion controlled.

At high ratios $\text{Fe}^{3+}/\text{InsP}_6$, where solid amorphous iron phytates are precipitated, the techniques of solid state ^{31}P NMR and Fe X-ray absorption spectroscopy were used. Results of solid state ^{31}P NMR show that with the increase of iron(III) ions in the starting solution results in increase of number of phosphate groups that bind two iron atoms and consequently the number of iron atoms binding one or none iron atoms is decreased. It is interesting that the number of bonds between iron and a single phosphate group remains constant and is estimated around 3 in all cases studied. XANES demonstrate that all of the iron in iron phytates is octahedrally coordinated and is in the trivalent state. EXAFS experiments explain us the local structure around iron atom, in the first coordination sphere 6 oxygen atoms are found, in the second 3 phosphorus and approximately 0,5 iron atoms are found. By combination of experimental techniques can be seen that iron atoms are monodentately bound to phosphate groups.



Dr. Miha Vrbinc

Novomeščan dr. Miha Vrbinc je zaposlen v Krki, in sicer na Oddelku za farmacevtsko tehnologijo v Sektorju za raziskave. Ves čas dela na razvoju novih trdnih farmacevtskih oblik – tablet in kapsul – čemur je bilo namenjeno tudi njegovo doktorsko delo.

Raziskovanje ga je od nekdaj privlačilo – že kot gimnazijec je z raziskovalno nalogo s področja farmacije sodeloval v projektu Krkinih nagrad. Zanimivo področje in odlična izkušnja ob prvih raziskovalnih korakih ga je pripeljala tudi do študija farmacije

Podiplomski študij je opravljal ob svojem delu, ki se je prepletalo in dopolnjevalo s širšim projektom doktorske disertacije. »V Krki je izobraževanje stalnica – formalne in neformalne oblike študija, izpopolnjevanja, nadgradnje znanja ... so naš imperativ.«

Poleg dela ga izpolnjujejo in razveseljujejo predvsem njegova družina – ima hčeri Metko in Petro – ter planinarjenje in kolesarjenje. Ni bilo treba veliko truda, da je Dolenjec vzljubil gore, saj ga je za to navdušila njegova žena, ki je po rodu Gorenjka. Planinarjenje je družinski šport, kolesarjenje po mehki dolenski pokrajini pa ima dr. Miha Vrbinc za svojo rekreacijo.

Veliko tudi bere, od strokovnih del do leposlovja; seveda pa pozna tudi vse otroške pravljice in pesmice, kar od njega pričakujeta hčeri. Žal mu je, da je po končani nižji glasbeni šoli opustil učenje kitare, saj ima rad glasbo. Sicer pa pravi, da se v življenju vse zgodi z razlogom in da dan ni popoln, če se ne naučimo česa novega.

V svojem raziskovalnem delu se je ukvarjal s pripravo in vrednotenjem različnih, v strokovni literaturi že opisanih pa tudi novih fizikalnih oblik donepezilijevega klorida, ki je vgrajen v tablete, namenjene terapiji pacientov z Alzheimerjevo boleznijo. Hidratno in amorfno obliko zdravilne učinkovine je vgradil v tablete in z natančno določitvijo parametrov izbranega tehnološkega postopka pripravil tablete, v katerih sta obe obliki fizikalno stabilizirani v celotnem roku uporabnosti. Cilj raziskovalnega dela je jasen – učinkovito, varno in kakovostno zdravilo, ki ga lahko pripravljamo v industrijskem merilu. »Rezultati tega dela niso le moji rezultati, ampak je to dosežek mnogih, ki so bili vključeni v ta projekt in sem jim hvaležen za njihov prispevek,« še dodaja dr. Miha Vrbinc.

ŠTUDIJ FIZIKALNIH OBLIK DONEPEZILIJEVEGA KLORIDA IN NJIHOVIH PRETVORB POD VPLIVOM FARMACEVTSKO-TEHNOLOŠKIH PROCESOV

M. Vrbcinc

Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: F. Vrečer

Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti trdnih snovi, zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi predstavlja pomemben del predformulacijskih in formulacijskih študij. Definiranje dejavnikov (ne)stabilnosti in njihovo obvladovanje omogoča pripravo učinkovitega, varnega in kakovostnega zdravila.

Donepezil v obliki donepezilijevega klorida je sintezni, centralno delujoči zaviralec acetilholinesteraze z relativno visoko selektivnostjo za nevronalno acetilholinesterazo. Uporablja se v terapiji blage do zmerne oblike Alzheimerjeve bolezni, katere pogostnost se zaradi vedno večjega deleža starostnikov v celotnem svetovnem prebivalstvu hitro povečuje.

V literaturi smo zasledili opisan način priprave amorfnе in različnih kristalnih oblik donepezilijevega klorida, med katerimi sta dva hidrata, monohidrat I in trihidrat IV. Glede na preverjeno kemijsko stabilnost pri neposredni izpostavitvi povišani temperaturi in vlagi smo proučevali zgolj fizikalno stabilnost posameznih fizikalnih oblik in le-teh v formulaciji.

Pri pripravi posameznih fizikalnih oblik je potrebno natančno definirati pogoje priprave, saj le tako lahko pripravimo čiste kristalne oblike brez primesi drugih kristalnih oblik. V literaturi je opisana le ena oblika trihidrata, kristalna oblika IV, pri pripravi katere smo ugotovili nastanek treh različno stabilnih oblik, ki smo jih označili s IV-1, IV-2 in IV-3, zato lahko govorimo o hidratomorfizmu trihidratov donepezilijevega klorida. Z analizami smo ugotovili, da je termodinamsko najbolj stabilna oblika IV-1 podobna v literaturi opisanemu trihidratu IV, v to obliko pa sčasoma preideta obliki IV-2 in IV-3, ki sta glede na hidrat IV-1 manj stabilni. S segrevanjem hidratov IV-1 in IV-2 na 150°C pripravljamo polimorfno obliko V. Polimorfna oblika II nastane pri segrevanju hidrata IV-3 in ostane nespremenjena do temperature 170°C, pri nadaljnjem segrevanju pa s faznim prehodom trdno-trdno prehaja v polimorfno obliko V.

Kot najprimernejša metoda za ločevanje posameznih oblik se je izkazala rentgenska praškovna analiza, razlike med posameznimi hidrati IV pa smo ugotovili tudi s termično analizo in dinamično sorpcijo vode. Srednjo infrardečo spektroskopijo smo uporabili za spremljanje dehidracije hidratov IV pri pripravi polimorfnih oblik. Pri spremljanju prehoda hidratov I in IV-1 smo ugotovili nastanek dveh novih oblik, ki smo ju označili s VII in VIII. Kristalna oblika VII je v čisti obliki prisotna pri segrevanju hidrata I pri 90-120°C, nato pa prehaja v termodinamsko stabilno obliko III. Kristalna oblika VIII nastaja pri segrevanju hidrata IV-1 na 90°C, nato pa začne prek polimorfne oblike II prehajati v polimorfno obliko V.

Pri spremljanju fizikalne stabilnosti posameznih fizikalnih oblik smo po izpostavitvi povišani temperaturi (40°C) in relativni zračni vlagi (75%) fazni prehod ugotovili le pri amorfnih oblikah in amorfnih oblikah z dodatkom povidona kot potencialnega zaviralca kristalizacije, medtem ko prehodov med kristalnimi oblikami, tj. polimorfi in hidrati, nismo ugotovili.

Amorfno obliko donepezilijevega klorida v formulaciji smo pripravili *in situ* iz vodne raztopine donepezila in klorovodikove kisline ali z raztapljanjem donepezilijevega klorida v prečiščeni vodi, ki smo jo med granuliranjem dodajali zmesi pomožnih snovi. Kot se je izkazalo že pri spremljanju fizikalne stabilnosti same amorfnе oblike, je kritični proces vlažno vodno granuliranje, pri katerem je amorfnа oblika učinkovine izpostavljena stresom kot sta povišana temperatura in relativna zračna vlaga ter mehanska obremenitev. Ključna je čim hitrejša odstranitev vode iz vseh procesov, predvsem med sušenjem granulata, kar smo dosegli z definiranjem parametrov posameznih farmacevtsko tehnoloških procesov in potrdili z DSC analizo.

Pri terapevtski formulaciji s hidratom I donepezilijevega klorida smo zagotovili podobno celokupno količino vode kot pri samem hidratu I (4,15%), saj le tako preprečimo premik vodnega gradienta v formulaciji med shranjevanjem.

Poznavanje parametrov nestabilnosti pri različnih fizikalnih oblikah omogoča izbor najustreznejše oblike za vgrajevanje v terapevtsko formulacijo, s čimer zagotavljamo nespremenjeno obliko zdravilne učinkovine v celotnem roku uporabnosti.

THE STUDY OF PHYSICAL FORMS OF DONEPEZIL HYDROCHLORIDE AND THEIR TRANSFORMATIONS UNDER THE INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL-TECHNOLOGICAL PROCESSES

M. Vrbinc

Krka, d. d., Novo mesto, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: F. Vrečer

Krka, d. d., Novo mesto, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Knowledge about physico-chemical properties of solids, both active ingredients and excipients, is a very important part of the preformulation and formulation studies. The definition of (non)stability factors and their control can assure activity, safety and quality of the final dosage form.

Donepezil in the form of donepezil hydrochloride is a synthetic, central active inhibitor of acetylcholinesterase with relatively high selectivity for neuronal acetylcholinesterase. It is used in the therapy of mild to moderate Alzheimer's disease, which frequency increases due to a growing number of older people in world's population.

In literature, the preparation of amorphous and crystal forms of donepezil hydrochloride has been described, including two hydrates, i.e. monohydrate I and trihydrate IV. Because of known chemical stability, by exposure to increased both temperature and humidity, only the physical stability of physical forms alone, and in formulation was outlined.

In preparation of physical forms, the preparation conditions have to be exactly defined, which is crucial for the preparation of pure crystal forms without admixture of other crystal forms. In literature, only one form of trihydrate, crystal form IV was described. However, during hydrate IV preparation, three forms with differences in analytical parameters were obtained, which were assigned as hydrates IV-1, IV-2 and IV-3. Therefore, we used the term »hydratemorphism« of trihydrates of donepezil hydrochloride for this phenomenon. The most thermodynamically stable form among them, form IV-1, is most similar to trihydrate IV described in literature and to which less stable forms IV-2 and IV-3 transform by phase transition. By heating of hydrates IV-1 and IV-2 to 150°C, polymorphic form V was prepared. Polymorphic form II was obtained by heating of hydrate IV-3 and it remains unchanged up to 170°C. By further heating, polymorphic form V appeared through solid-solid transition of polymorphic form II.

X-ray powder diffraction method was established as the most useful analytic method for differentiation between physical forms of donepezil hydrochloride. The differences between hydrates IV were detected by thermal analysis and dynamic vapour sorption. Mid-infrared spectroscopy was used for the detection of dehydration of hydrates IV in the preparation of polymorphic forms.

Upon heating of hydrates I and IV-1, two novel crystal forms were identified, assigned as forms VII and VIII. Pure crystal form VII yielded after heating of hydrate I to 90-120°C, while thermodynamically stable form III appeared after further heating. By heating of hydrate IV-1 to 90°C, crystal form VIII was identified, which transforms through polymorphic form II to final form V.

The physical stability of physical forms was tracked after their exposure to increased temperature (40°C) and relative humidity (75%). Phase transition was identified only at amorphous form and at amorphous form with potential crystallization inhibitor povidone, while at crystal forms, i.e. polymorphs and hydrates, no change in the physical form was observed.

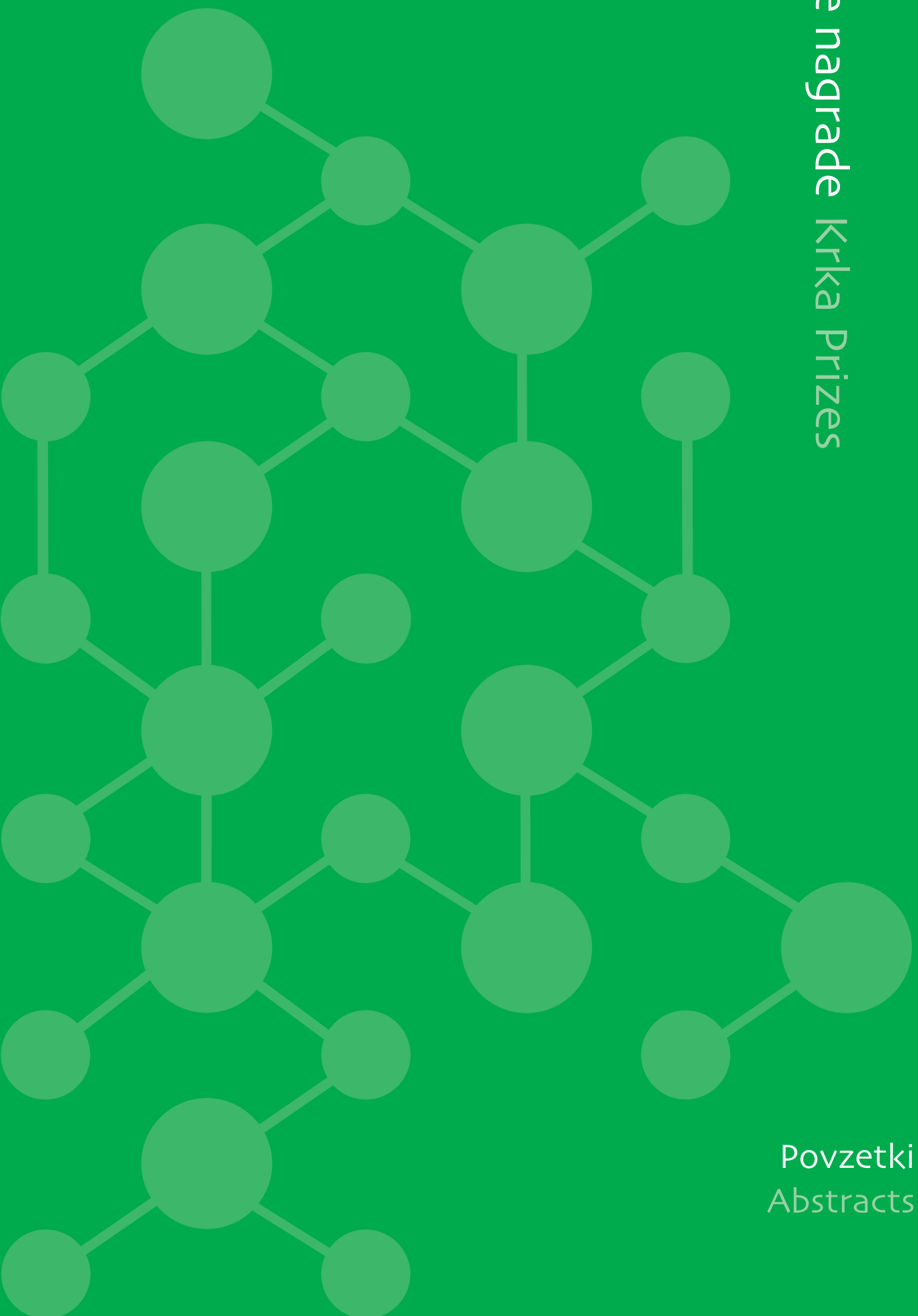
The amorphous form of donepezil hydrochloride in formulation was prepared *in situ* from water solution of donepezil and hydrochloric acid, or by dissolution of donepezil hydrochloride in purified water, which was added to a mixture of excipients during the granulation process. Similar to the physical stability of the amorphous form, wet water granulation of amorphous form was identified as the most critical. In this process, the amorphous form of active ingredient is exposed to different stresses, e.g. increased both temperature and relative humidity, and mechanical stress. Fast removal of water from all processes, especially during granulate drying, which was achieved by precise definition of parameters, was found to be crucial for assuring the quality and stability of the product, i.e. no crystallization during the manufacturing process and storage occurred.

In therapeutic formulation with hydrate I of donepezil hydrochloride, we assured a similar total water content as in hydrate I itself (4.15%). Only in that way, we can prohibit the movement of water gradient in the formulation during shelf-life.

Regarding the instability factors of different physical forms, one can choose the most suitable form for incorporation into the therapeutic formulation, which assures physical stability of the active ingredient's form during shelf-life.

Krkrine nagrade Krka Prizes

Povzetki
Abstracts



KRITERIJI ZA PRENOS NOVEGA TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA FARMACEVTSKE UČINKOVINE IZ RAZVOJA V VEČNAMENSKI PROIZVODNI OBRAT

R. Agnič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: V. Koloini

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: M. Mihelčič

Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani

Glavni namen disertacije je ob negotovosti in velikemu tveganju pri prenosu izdelka določitev ključnih kriterijev za oceno utemeljenosti prenosa procesa ustvarjanja izdelka iz razvoja v redno proizvodnjo. Izvedene so bile ciljne meritve izbranih spremenljivk v stvarnih proizvodnih razmerah na večnamenskih linijah za več izdelkov. S pomočjo regresijske analize so določene regresijske funkcijske enačbe z zadovoljivo ravno natančnosti, ki opisujejo odvisno spremenljivko "celotni proizvodni stroški" (TPC – *total production costs*) s pomočjo neodvisnih spremenljivk. Z izračunanimi vrednostmi TPC se lahko preko diagrama oziroma odločitvenega drevesa odločamo o smotrnosti proizvodnje izdelka, ki ga prenašamo iz razvojne stopnje na večnamensko proizvodno linijo. Z uporabo regresijskih enačb in diagrama lahko torej z boljšimi informacijami za odločitve zmanjšamo tveganje ter preprečimo morebitno izgubo vloženih sredstev v proces prenosa novega izdelka iz razvoja na večnamensko proizvodno linijo. Z določenimi stroškovnimi podatki se tako lahko odločamo o tipu prenosa, t.j. ali na lastno proizvodno linijo ali na pogodbeno najeto proizvodno linijo.

TECHNOLOGY TRANSFER CRITERIA FOR NEW PRODUCTION PROCESS OF THE PHARMACEUTICAL INGREDIENT FROM PILOT TO MULTIPURPOSE PRODUCTION PLANT

R. Agnič

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: V. Koloini

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: M. Mihelčič

Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana

Taking into account the uncertainties and high risks involved with the transfer of products into production, this work aims at determining the key decision criteria during the evaluation of the level of justification of transferring a developed product from the research phase into final production. The evaluation and measurements of these variables have been carried out during full-scale production situations in a multipurpose plant. With the help of regression analysis, functional equations have been developed, which describe the dependent variable termed "total production cost (TPC)" through the use of independent variables with acceptable accuracy. With the use of calculated values for TPC and a decision diagram a final estimation regarding the economical feasibility of transfer of a developed product from the research phase to final production can be made. The use of the developed equations and the diagram enable one to operate with more precise information during decisions to reduce the risk and prevents possible investment losses during transfer process by introducing of new product from development into an existing multipurpose production line. Defined cost data enable to determine the type of transfer, whether on own production line or contract manufacturing line.

RAZGRADNJA AVERMEKTINOV V ŽIVALSKIH IZTREBKIH IN NJIHOV VPLIV NA NEKATERE ORGANIZME V TLEH

L. Kolar

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: N. Kožuh Eržen

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Avermektini so antihelmintiki, ki se v aktivni obliki izločajo v okolje z živalskimi iztrebki. V študijo je bila vključena avtohtona slovenska pasma ovc istrska pramenka, tretirana s terapevtskim odmerkom (0.2 mg/kg t.m.) abamektina in doramektina. Analitska metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), je bila vpeljana za preučevanje koncentracije in časovnega profila izločanja avermektinov z ovčjimi iztrebki. Večina odmerka obeh substanc se je izločila v prvih 9-ih dneh po vnosu. Hitrostna konstanta izločanja zdravilne učinkovine (k) je bila podobna pri obeh avermektinih ($k = 0,23/\text{dan}$ za abamektin; $0,19/\text{dan}$ za doramektin). Pod zunanjimi pogoji na pašniku je bil polovični čas razgradnje v iztrebkih za abamektin 23, za doramektin pa 22 dni. Pod laboratorijskimi pogoji (UV svetloba), je bil polovični čas razgradnje homogeniziranih iztrebkov za abamektin 1 dan, za doramektin pa 4 dni. Ob izpostavitvi homogeniziranih ovčjih iztrebkov zunanjim pogojem je koncentracija avermektinov hitro upadla, a ob padavinah se je pojavil ponovni porast koncentracije. Določena je bila tudi toksičnost za neciljne organizme. V zemlji Lufa 2.2 so bile LC_{50} vrednosti abamektina za deževnike, skakače, valjaste črve in izopodne rake naslednje: 67, 111, 69 in 18 mg/kg suhe zemlje ter nad 300 mg/kg suhe zemlje za doramektin, razen za deževnike, kjer je bil LC_{50} 228 mg/kg suhe zemlje. V iztrebkih tretiranih ovc so bile LC_{50} vrednosti za abamektin 1,00 mg/kg suhih iztrebkov za skakače in 1,10 mg/kg suhih iztrebkov za valjaste črve, medtem ko je doramektin imel učinek na valjaste črve pri koncentraciji nad 2,46 mg/kg suhih iztrebkov. Pri deževnikih so bile vrednosti LC_{50} za abamektin $>1,40$ mg/kg suhih iztrebkov in za doramektin $>2,46$ mg/kg suhih iztrebkov. Na osnovi pridobljenih podatkov je bila izdelana ocena tveganja za okolje.

DISSIPATION OF AVERMECTINS IN ANIMAL FAECES AND THEIR EFFECTS ON SOME SOIL DWELLING ORGANISMS

L. Kolar

Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: N. Kožuh Eržen

Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Avermectins are anthelmintics that may enter the terrestrial environment with faeces of treated animals. Indigenous sheep breed Istrian Pramenka treated with therapeutic dosages (0.2 mg/kg b.w.) were used to establish time profiles of excretion and concentration of abamectin and doramectin in faeces, employing a validated HPLC analytical method for determination of the avermectins. Most of the dose was excreted in the first 9 days after treatment. The excretion rate was similar for both substances: ($k=0.23/\text{day}$ for abamectin; $0.19/\text{day}$ for doramectin). Under field conditions, half-lives for dissipation from sheep faeces were 23 (abamectin) and 22 (doramectin) days. Under laboratory conditions (UV light) homogenized faeces samples of abamectin and doramectin had $t_{1/2}$ of less than 1 and 4 days, respectively. When faeces samples were exposed under field conditions, concentrations of avermectins decreased fast but precipitation strongly influenced the concentration. Toxicity to non-target species was also investigated. In Lufa 2.2 soil, LC_{50} values for the effect of abamectin and doramectin on survival of springtails, enchytraeids, isopods and earthworms were 18-111 and 228- >300 mg/kg dry soil. In faeces from sheep treated subcutaneously, estimated LC_{50} values for the effect of abamectin to springtails and enchytraeids were 1.0 and 1.1 mg/kg dry faeces, and above 2.46 for doramectin, whereas earthworms were not sensitive. All data were used to assess the potential ecological risk of avermectins in the soil.

ANALIZA KROMOSOMSKIH NEPRAVILNOSTI PRI ČLOVEŠKIH JAJČNIH CELICAH IZ SPODBUJENIH CIKLUSOV, DOZORELIH V POGOJIH *IN VITRO*

L. Križančič Bombek

Univerzitetni klinični center Maribor

Mentor: V. Vlasisavljevič

Somentorica: N. Kokalj Vokač

Univerzitetni klinični center Maribor

Hkratno zorenje večjega števila jajčnih celic v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo dosežemo s hormonskim spodbujanjem jajčnikov. Kljub temu dobimo v nekaterih ciklih nezrele jajčne celice. Razvoj metode zorenja jajčnih celic v pogojih *in vitro* (IVM-*in vitro maturation*) ponuja možnost dozorevanja nezrelih jajčnih celic in njihove uporabe v kliničnih postopkih, vendar je morfološka in genetska kakovost teh celic slabo raziskana.

V študiji smo z metodo fluorescentne *in situ* hibridizacije analizirali pogostost pojavljanja aneuploidij kromosomov 13, 16, 18, 21 in 22 pri jajčnih celicah, ki so v pogojih *in vitro* dozorele v 24 ali 36 urah. Ugotavljali smo tudi pogostost pojavljanja morfoloških nepravilnosti citoplazme, prvega polarnega telesa in perivitelinskega prostora ter morebitno povezavo le-teh s pogostostjo aneuploidij.

Skupno je dozorelo 64,7% jajčnih celic, od tega 40,1% v prvih 24 urah in 24,6% v 25-36 urah. Morfološko normalnih je bilo 55,7% jajčnih celic. Med kromosomsko normalnimi in aneuploidnimi jajčnimi celicami iz obeh skupin ni bilo statistično pomembnih razlik v pogostosti pojavljanja morfoloških nepravilnosti. V skupini jajčnih celic, ki so dozorele v 36 urah, je bil delež aneuploidnih kromosomov višji kot v skupini s 24-urnim zorenjem (17,30% proti 10,15%; $p < 0,05$). Podaljšano zorenje je močno povečalo pogostost aneuploidij kromosomov 18 in 22 (6- in 4,4-krat; $p < 0,05$). IVM je obetavna metoda za pridobitev zrelih jajčnih celic, vendar je pojavljanje aneuploidij pogostejše pri podaljšanem času zorenja.

CHROMOSOME ANEUPLOIDY ANALYSIS OF *IN VITRO* MATURED HUMAN OOCYTES FROM STIMULATED CYCLES

L. Križančič Bombek

University Medical Center Maribor

Supervisor: V. Vlasisavljevič

Co-supervisor: N. Kokalj Vokač

University Medical Center Maribor

Despite the ovarian hormonal stimulation in *in vitro* fertilization (IVF) cycles which enables simultaneous oocyte maturation, some oocytes are aspirated immature. The development of *in vitro* maturation method (IVM) can provide additional mature oocytes, however the morphological and chromosomal quality of these oocytes is poorly understood.

In our research, aneuploidy frequency of chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22 of oocytes matured *in vitro* for 24 or 36 hours was analyzed by fluorescent *in situ* hybridization. Furthermore, the rate of morphological abnormalities of the cytoplasm, first polar body and perivitelline space and their possible correlation with aneuploidy occurrence were determined.

The overall maturation rate was 64.7%, with 40.9% of the oocytes maturing in 24 hours and 24.2% in 25-36 hours. In total, 55.7% of oocytes were morphologically normal. There was no statistical difference between chromosomally normal and aneuploid oocytes regarding the occurrence of different morphological abnormalities. The frequency of aneuploid chromosomes in the group maturing for 36 hours was statistically higher than in the group with 24 hour maturation period (17.30% vs. 10.15%; $p < 0.05$). Longer maturation period greatly increased the aneuploidy frequency of chromosomes 18 and 22 (6- and 4.4-times; $p < 0.05$).

IVM is a promising method for obtaining mature oocytes, however the aneuploidy frequency increases with prolonged maturation time.

VLOGA ENDOCITOZE IN DIMERIZACIJE PRI ZNOTRAJCELIČNEM PROMETU IN SIGNALIZIRANJU RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI

V. Kubale

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: M. Vrecl

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Naša raziskava obravnava dva pomembna vidika regulacije receptorjev, sklopljenih z G-proteini (GPCR), in sicer endocitozo receptorjev in njihovo dimerizacijo. Pri študiju receptorske endocitoze smo opisali različne poti endocitoze nevrokininskega receptorja tipa 1 (NK₁-R) in njegovo razporejenost v celični membrani. V ta namen smo opravili klasične teste internalizacije, v kombinaciji z metodo bioluminescenčnega prenosa resonančne energije (BRET) in metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR). Dobljeni rezultati kažejo, da internalizacija NK₁-R poteka predvsem prek mešičkov, obloženih s klatrinom, in da je receptor razporejen v zelo urejenem območju celične membrane celic HEK-293, ki verjetno predstavlja z lipidi obogatena območja celične membrane, t. i. lipidne splave in kaveole. Pri funkcionalni okrnjenosti kaveol se razporejenost NK₁-R v celični membrani spremeni, kar povzroči spremembe v signalizaciji receptorja in interakciji receptorja z β-arr2. Drugi del naloge je osredotočen na dimerizacijo GPCR-jev. Najprej smo uporabili model konstitutivnih heterodimerov, fenomen članov družine C GPCR-jev, tako da smo pripravili himerne konstrukte receptorja za ghrelin (ghR) z dodanimi znotrajceličnimi C-terminalnimi repki receptorjev za GABA_B, ki naj bi omogočili selektivno oblikovanje heterodimerov. Uporabili smo še tehniko konstruktov, imenovanih konkatamere, pri katerih smo dva divja tipa oz. mutirane oblike ghR med seboj umetno povezali z osmo transmembransko zanko. Pridobili smo podatke za transaktivacijo ghR in asimetrijo v dimeru, ki kažejo, da je ghR homodimer.

THE ROLE OF ENDOCYTOSIS AND DIMERIZATION ON THE INTRACELLULAR TRAFFICKING AND SIGNALING OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

V. Kubale

Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: M. Vrecl

Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Our study deals with important aspects of G protein-coupled receptor (GPCR) regulation, including receptor endocytosis and dimerization. To study receptor endocytosis, we delineated the neurokinin-1 receptor (NK₁-R) endocytotic pathways and its plasma membrane localization. For this purpose, we employed classical internalization assays combined with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) method and electron paramagnetic resonance (EPR) technique. We provided evidence for a main endocytotic route of NK₁-R through clathrin-coated pits and the location of NK₁-R in a well ordered domain of HEK-293 cells that could represent lipid rafts/caveolae microdomains. Impairment of caveolae caused a change in plasma membrane distribution of NK₁-R that probably resulted in impairment of signaling and receptor/β-arr2 interaction. The second part of the thesis is focused on GPCR dimerization. Initially we employed phenomenon of constitutive heterodimers of family C GPCRs, by engineering chimeric ghrelin receptor (ghR) constructs with swapped GABA receptors C-terminal tails. Furthermore we created receptor concatamers by connecting two either WT or mutated ghR with an artificial transmembrane segment. We provided evidence for ghR transactivation and dimer asymmetry that is highly indicative of ghR homodimerization.

PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA CISTATINA F TER NJEGOVA VLOGA PRI ANTIGENSKI PREDSTAVITVI

T. Langerholc

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Mentor: J. Kos

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: B. Turk

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

V našem delu smo raziskali lastnosti in vlogo človeškega cistatina F, slabo znanega inhibitorja cisteinskih proteaz. Cistatin F se od ostalih članov družine cistatinov razlikuje zaradi glikozilacije, delne lokalizacije v veziklih endosomsko-lizosomskega sistema ter izključnega izražanja v imunskih celicah. Z namenom opredelitve proteina smo pripravili rekombinantni divji tip in nekatere mutante cistatina F v insektnih celicah. Cistatin F v disulfidno vezanem dimeru je neaktiven, kot monomer pa je močan inhibitor legumaina in cisteinskih katepsinov z endopeptidazno aktivnostjo, razen katepsina S. V sesalskih celicah se aktivnost cistatina F regulira z razmerjem med monomeri in dimeri, razmerje med oblikama pa določa glikozilacija na mestu Asn62 (številčenje zaporedja precistatina F). V celični liniji U937 se monomerni cistatin F nahaja v lizosomskih frakcijah, kjer bi lahko reguliral aktivnost katepsina H, ščitil katepsin X pred aktivacijo, hkrati pa ščitil vezikle te lizosomske subpopulacije pred aktivnostjo katepsinov F, K, L in V. Z metodo ELISPOT smo pokazali, da lahko cistatin F vpliva na citokinski profil imunskih celic.

Naše delo predstavlja osnovo za razumevanje vloge cistatina F v celicah. Pričakujemo, da bodo nadaljnje raziskave pokazale pomembno vlogo inhibitorja pri homeostazi imunskih celic ter pri antigeni predstavitvi peptidov na molekulah HLA II. razreda.

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF CYSTATIN F AND ITS ROLE IN ANTIGEN PRESENTATION

T. Langerholc

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Supervisor: J. Kos

Faculty of Pharmacy, University in Ljubljana

Co-supervisor: B. Turk

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

In our work we researched properties and the role of human cystatin F, a poorly characterized inhibitor of cysteine proteases. In contrast to other cystatins, it is glycosylated, it partially localizes in the vesicles of endosomal/lysosomal system and its expression is restricted to immune cells. To better characterize the protein we recombinantly expressed wild type and mutant forms of cystatin F in insect cells. Cystatin F has a tendency to form inactive disulfide-linked dimers. Monomeric cystatin F is a strong inhibitor of legumain and cysteine cathepsins with endopeptolytic activity, except of cathepsin S. Activity of cystatin F in mammalian cells is regulated by monomer to dimer ratio and the ratio between the two forms is controlled by glycosylation of Asn62 (precystatin F numbering). In the U937 cell line monomeric cystatin F can be found in the lysosomal fractions, where it might regulate proteolytic activity of cathepsin H, protect cathepsin X from activation and protect this lysosomal subpopulation environment from activity of cathepsins F, K, L and V. Results of ELISPOT showed that cystatin F could influence the cytokine profile of the immune cells.

Our work forms a basis for understanding the role of cystatin F. We expect future studies to show an important role of cystatin F for the immune cell homeostasis and class II MHC molecules antigen presentation.

UPORABA SEMIDEFINITNEGA IN KOPOZITIVNEGA PROGRAMIRANJA V KOMBINATORIČNI OPTIMIZACIJI

J. Povh

Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

Mentor: F. Rendl

Univerza v Celovcu, Celovec, Avstrija

Somentorja:

B. Mohar, Univerza Simona Fraserja, Burnaby, Kanada

M. Juvan, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

Semidefinitno in kopozitivno programiranje se ukvarja z reševanjem linearnih optimizacijskih problemov nad stožcem semidefinitnih oz. kopozitivnih matrik. V prvem delu disertacije smo predstavili novo metodo za reševanje semidefinitnih programov, ki smo jo poimenovali Metoda robnih točk. Z njo lahko rešimo probleme, ki so zaradi svoje velikosti nerešljivi z drugimi metodami. V drugem delu disertacije prikažemo uporabo semidefinitnega in kopozitivnega programiranja pri reševanju naslednjih NP-težkih problemov iz kombinatorične optimizacije: problem pasovne širine grafa, problem kvadratičnega prirejanja, problem minimalnega prereza in problem delitve grafa. Najprej smo predstavili učinkovit način za približno reševanje problema pasovnosti grafa, nato pa postopek, kako zapisati omenjene probleme kot kopozitiven program v ustreznem višje dimenzionalnem prostoru. S tem smo dobili zaporedja semidefinitnih aproksimacijskih modelov za te probleme. Za vsak problem smo dokazali, da so že prvi modeli iz omenjenega zaporedja vsaj tako dobri kot najboljši doslej znani semidefinitni modeli.

APPLICATION OF SEMIDEFINITE AND COPOSITIVE PROGRAMMING IN COMBINATORIAL OPTIMIZATION

J. Povh

Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana

Supervisor: F. Rendl

Alpen-Adria Universität Klagenfurt, Austria

Co-supervisors:

B. Mohar, Simon Fraser University, Burnaby, Canada

M. Juvan, Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana

Semidefinite and copositive programming concerns linear optimization problems over the cone of semidefinite and copositive matrices, respectively. In the first part of the dissertation we present a new method to solve semidefinite programs, which we named The boundary point method. It is capable to solve problems, which are far beyond the reach of other methods. In the second part we demonstrate an application of semidefinite and copositive programming to the following NP-hard problems from combinatorial optimization: the bandwidth problem, the quadratic assignment problem, the min-cut problem and the general graph partitioning problem. First we present an efficient way to approximate the bandwidth of a graph. Then we present how to rewrite other problems as copositive programs in a higher dimensional space. This gives us sequences of semidefinite approximation models, for we proved that they are at least as tight as other known semidefinite models.

TERMODINAMIKA IN KINETIKA KONFORMACIJSKIH PREHODOV NEKATERIH BIOLOŠKO POMEMBNIH MAKROMOLEKUL

I. Prislan

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: G. Vesnaver

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Človeški eritropoetin (EPO) je glikoprotein, ki skrbi za uravnavanje nastanka rdečih krvničk. Rekombinantna oblika eritropoetina (rEPO) se uporablja za zdravljenje slabokrvnosti in čeprav so biološki učinki dobro poznani, so biofizikalne lastnosti proteina še precej neznane. Da bi pridobili večje razumevanje strukturnih in funkcionalnih lastnosti rEPO na molekularnem nivoju, smo pri različnih vrednostih pH izvedli toplotno denaturacijo in denaturacijo s sečnino. Spremembe smo zasledovali z UV spektroskopijo, fluorescenco in diferenčno dinamično kalorimetrijo. Naši rezultati so pokazali, da lahko toplotno denaturacijo in denaturacijo s sečnino obravnavamo kot reverzibilna procesa, ki vključujeta le dve stanji.

Nekatere sekvence DNK, ki so bogate s purinom in vsebujejo nize gvaninov (G), lahko tvorijo štiri med seboj povezane nize. Takšne strukture se imenujejo G-kvadrupleksi. Pri merjenju UV-talilnih in ohlajevalnih krivulj smo za $d(G_4T_4G_3)_2$ in $d(G_4T_4G_4)_2$ kvadruplekse v prisotnosti Na^+ ionov ugotovili, da le te tvorijo histerezne zanke, kar jasno kaže na to, da sta toplotno inducirano razvijanje ter tvorba kvadrupleksov določena kinetično. To spoznanje smo potrdili tudi s spektropolarimetrijo ter diferenčno dinamično kalorimetrijo. Za opis merjenih kinetično vodenih strukturnih prehodov $d(G_4T_4G_3)_2$ in $d(G_4T_4G_4)_2$ kvadrupleksov, stabiliziranih z Na^+ ioni in K^+ ioni, smo razvili lasten kinetičen model, v katerem nastopajo le elementarne reakcije.

THERMODYNAMICS AND KINETICS OF CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF SOME IMPORTANT BIOLOGICAL MACROMOLECULES

I. Prislan

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: G. Vesnaver

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Human erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone considered to be the principal regulator of red blood cell formation. Although its recombinant version (rEPO) has been widely used for treatment of various anemias and its biological effects are relatively well-known, we know little about its biophysical properties. To gain a better understanding of the structural and functional properties of rEPO on the molecular level we followed its thermal and urea-induced unfolding at different pH and urea concentrations using spectropolarimetry, UV absorption, intrinsic emission fluorescence, and differential scanning calorimetry. Our results show that under a variety of conditions rEPO undergoes thermal or urea-induced denaturation that may be considered as a reversible two-state process.

Certain DNA sequences that are purine rich and contain runs of guanines can form four-stranded structures that are called G-quadruplexes. When performing UV melting and cooling experiments with $d(G_4T_4G_3)_2$ and $d(G_4T_4G_4)_2$ quadruplex solutions it has been noticed that curves obtained from such experiments form hysteresis loops, a clear sign that thermally induced unfolding and formation of quadruplexes are kinetically determined. Spectropolarimetry and differential scanning calorimetry were also used to verify our observations. To describe the observed kinetically driven structural transitions of $d(G_4T_4G_3)_2$ and $d(G_4T_4G_4)_2$ quadruplexes stabilized with Na^+ and K^+ ions a model involving only elementary reactions has been developed.

S KSENOBIOTIKI POSREDOVANO URAVNAVANJE LANOSTEROL 14 α -DEMETILAZE (CYP51) IN DRUGIH GENOV HOMEOSTAZE HOLESTEROLA PRI MIŠI IN ČLOVEKU

T. Režen

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: D. Rozman

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Bolezni srca in ožilja so eden glavnih vzrokov smrti v zahodnem svetu. Razvoj novih zdravil za zdravljenje teh bolezni je v porastu, vendar kljub vsemu še vedno ne razumemo dovolj, kako je homeostaza holesterola v telesu uravnava in kaj vodi k razvoju bolezni. Namen tega dela je bil razvoj novega orodja, mikromreže Steroltalk, ki omogoča študije homeostaze holesterola pri miši in pri človeku. Z mikromrežami Steroltalk smo tako lahko študirali doslej še nepojasnjene stranske učinke nekaterih zdravil, ki spremenijo raven holesterola v plazmi. Ta zdravila so aktivatorji jedrnih receptorjev CAR (stalni androstani receptor) in PXR (pregnanski X receptor), ki uravnavata presnovo ksenobiotikov. Zato je bil namen dela tudi študij vpliva jedrnih receptorjev na homeostazo holesterola pri miši in človeku. Pokazali smo, da je aktivator mišjega CAR znižal raven jetrnega holesterola tudi v pogojih, ko je bil le-ta zaradi z lipidi bogate prehrane povišan. Poleg tega pa je vplival na izražanje številnih genov, ki sodelujejo v homeostazi holesterola in je spremenil tako sintezo holesterola, žolčnih kislin kot tudi izmenjavo med jetri, plazmo in žolčem. Na drugi strani pa aktivator mišjega PXR ni imel učinka na jetrni holesterol in je vplival le na iztok holesterola in žolčnih kislin v žolč. Naše raziskave so pokazale, da jemanje zdravil, ki so aktivatorji presnove zdravil preko z receptorji posredovanih mehanizmov, spremenijo homeostazo holesterola pri sesalcih in da je najverjetnejši mehanizem vpliv na prenos holesterola iz jeter.

XENOBIOTIC-DEPENDENT REGULATION OF LANOSTEROL 14 α -DEMETHYLASE (CYP51) AND OTHER HOLESTEROL HOMEOSTASIS GENES IN MOUSE AND HUMAN

T. Režen

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: D. Rozman

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Cardiovascular diseases remain a leading cause of death in the developed world. Development of new drugs for treatment of these diseases is increasing, but recent failure of one of the new drugs show that our understanding of the cholesterol homeostasis regulation and disease development is still limited. Purpose of this study was to develop Steroltalk microarrays, an original tool for the studies of cholesterol homeostasis in mouse and human. Using Steroltalk microarrays we have studied yet unexplained side effect of certain drugs, which elevate serum cholesterol levels. These drugs are CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) activators, which regulate drug metabolism. Purpose of this work was also to demonstrate how nuclear receptors, which act as "xenosensors" in the liver, affect cholesterol homeostasis in mouse and human. We show that CAR activator lowers liver cholesterol levels also under conditions of high liver cholesterol. Furthermore, CAR changed expression of several genes involved in cholesterol homeostasis, resulting in higher cholesterol and bile acids biosynthesis, and altered exchange between liver, plasma and bile. On the other hand, PXR activator had no effect on liver cholesterol and changed only cholesterol and bile acid efflux from liver to bile. This study shows that taking drugs, which are inducers of drug metabolism, change cholesterol homeostasis in mammals, and that mechanism is likely through altered efflux of liver cholesterol.

POROZNI POLIMERNI NOSILCI IZ O/V EMULZIJ Z VISOKIM DELEŽEM NOTRANJE FAZE

D. Štefanec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentor: P. Krajnc

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentor: A. Podgornik

BIA Separations, Ljubljana

Potrebe po poroznih polimernih nosilcih se zaradi naraščajočega spektra uporabnosti neprestano povečujejo. Polimerizacija emulzij z visokim deležem notranje faze (HIPE) je ena od možnosti sinteze poroznih monolitnih materialov. Medtem ko so hidrofozni porozni polimeri, pripravljeni z emulzijsko polimerizacijo, relativno dobro raziskani, je malo znanega o hidrofilnih poroznih polimerih. Ker obstaja velika perspektivna aplikativnost hidrofilnih materialov v sintezni kemiji, kromatografiji in biomedicini, smo pripravili hidrofilne, zamrežene monolitne polimere na osnovi akrilne kisline, akrilamida ter 2-hidroksietil metakrilata. Raziskali smo vpliv sestave emulzij in reakcijskih pogojev na samo stabilnost emulzij ter na morfologijo končnih monolitnih nosilcev. Z različno hitrostjo polimerizacije, z dodatki hidrofilnih topil in s časom mirovanja emulzije smo nadzirali koalescenco emulzij ter s tem vplivali na zgradbo materiala. V odvisnosti od aplikacije, je pomembna tudi oblika materialov, zato smo s polimerizacijo multiple emulzije tipa V/O/V sintetizirali polimere v obliki kroglic, ki so primernejši za šaržne procese. Tako smo pripravili porozne, reaktivne polimerne delce na osnovi 4-vinilbenzil klorida in aril akrilatov. Raziskali smo vpliv reakcijskih pogojev in sestave emulzije na morfologijo delcev ter testirali reaktivnost novih polimerov na modelnih reakcijah.

POROUS POLYMER SUPPORTS FROM O/W HIGH INTERNAL PHASE EMULSIONS

D. Štefanec

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: P. Krajnc

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Co-supervisor: A. Podgornik

BIA Separations, Ljubljana

Because of increasing applications of porous polymer supports their needs constantly increase. Polymerisation of high internal phase emulsions (HIPEs) is one of the possibilities of porous monoliths synthesis. Hydrophobic porous polymers by emulsion polymerisation are researched quite well. However, hydrophilic porous polymers are almost unknown but their possible applications in organic synthesis, chromatography and biomedicine are quite perspective. Therefore hydrophilic crosslinked monoliths based on acrylic acid, acrylamide and as well as on 2-hydroxyethyl methacrylate were prepared. Influence of the emulsion composition and polymerising conditions on the emulsions stability and polymeric supports morphology was studied. Emulsions coalescence was controlled by initiation speed, addition of hydrophilic solvents and time before curing. All these factors have influenced also material structure. Due to the polymers applications, different materials forms are needed so polymeric particles based on 4-vinylbenzyl chloride and aryl acrylates were prepared by polymerisation of W/O/W multiple emulsions. Dependence of the particles morphology on the emulsion composition was investigated and reactivity of the novel supports was demonstrated by model reactions.

RAZISKAVE METABOLIZMA RALOKSIFENA Z EKSPERIMENTALNIMI MODELI NARAŠČAJOČE KOMPLEKSNOSTI

J. Trontelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: A. Mrhar

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Raloksifen (Ral) je novejša učinkovina za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze pri pomenopavzalnih ženskah. Zaenkrat še ne poznamo vzrokov za opažena velika nihanja (30-50%) v njegovih farmakokinetičnih parametrih. Iz telesa se izloča s konjugiranjem z glukuronsko kislino v jetrih in v steni tankega črevesa z encimi UGT do raloksifen-6-glukuronida (M1) in raloksifen-4'-glukuronida (M2). V okviru naše hipoteze smo privzeli, da je pri metaboličnem izločanju Ral med najpomembnejšimi dejavniki izoforma UGT1A1. Namen te naloge je bil 1) raziskati metabolizem in transport Ral v tankem črevesu in v jetrih ter 2) ugotoviti, če obstaja povezava med prej omenjenim polimorfizmom v genu za UGT1A1 in serumskimi koncentracijami Ral in, če ta posledično vpliva na spremembo, v kostni gostoti po uvedbi terapije z Ral. Uporabili smo naslednje *in vitro* modele z naraščajočo stopnjo kompleksnosti: supersome z UGT, prašičje in človeške jetrne in črevesne mikrosome ter difuzijske celice tipa Sweetana Grass (EasyMount™). Razvili in validirali smo LC/MS/MS metodo za določanje Ral, M1 in M2 v človeškem serumu in z njo analizirali 47 serumskih vzorcev preiskovank na terapiji z Ral. Tem je bila izmerjena tudi sprememba kostne gostote po 12 mesecih terapije. Rezultati študij na subcelularnih frakcijah so pokazali, da je prašičja sluznica tankega črevesa dober *in vitro* model za preučevanje hkratnega metabolizma in absorpcije Ral. Jetra, z izoformo UGT1A1, predstavljajo najpomembnejši organ za eliminacijo Ral. Homozigoti za polimorfični alel (7/7) so imeli v povprečju za 55% višje celokupne koncentracije Ral in obeh metabolitov v serumu v primerjavi s homozigoti za divji tip polimorfizma (6/6). Odkrili smo tudi značilni vpliv omenjenega polimorfizma na farmakodinamični učinek Ral, to je na povečanje kostne gostote v kolku.

STUDY OF RALOXIFENE METABOLISM BY EXPERIMENTAL MODELS WITH INCREASING COMPLEXITY

J. Trontelj

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: A. Mrhar

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Raloxifene (Ral) is a new member of drugs used for the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. It exhibits large (30-50%) variability in pharmacokinetic parameters, the source of which is still unknown. Ral is subjected to an extensive phase-II metabolism, which appears in the gut wall and in the liver. The main metabolic clearance of Ral occurs via the conjugation with glucuronic acid with UGT enzymes to raloxifene-6-glucuronide (M1) and raloxifene-4'-glucuronide (M2). The aim of our work was to study Ral's transport and metabolism and to determine, if the (TA)7 polymorphism affects the pharmacokinetics of Ral and the change in bone mineral density after the start with Ral therapy. The following *in vitro* models with increasing complexity were used: supersomes with expressed human UGTs, porcine and human liver and intestinal microsomes and Sweetana-Grass two compartment diffusion chambers (EasyMount™). An LC/MS/MS method was developed and validated to quantify levels of Ral, M1 and M2 in human sera of 47 subjects on Ral therapy. For each subject, the change in bone mineral density was determined 12 months after the start with Ral therapy. The results from *in vitro* models showed that the porcine small intestinal mucosa is a suitable model to study simultaneous Ral transport and metabolism. The liver, along with its major UGT isoform 1A1 present the dominant organ for Ral excretion. On average, homozygotes for polymorphic allele 7 had 55 % higher combined serum levels of Ral, M1 and M2 compared to homozygotes carrying wild type allele. Moreover, this polymorphism caused also a statistically significantly greater increase in hip bone mineral density among homozygous subjects for allele (TA)7.

AKTIVNOST BAKTERIOCINSKIH KOMPLEKSOV SEVOV *Lactobacillus gasseri* K7 IN *Lactobacillus gasseri* LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH

M. Zorič Peternel

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: I. Rogelj

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Seva *L. gasseri* K7 (K7) in *L. gasseri* LF221 (LF221) sta humanega izvora, izkazujeta osnovne probiotične lastnosti in tvorita bakteriocine s širokim protimikrobnim spektrom. Proučevali smo bakteriocinski kompleks seva K7 ter preverili obstojnost tvorbe in aktivnost v stresnih pogojih gojenja. Ugotavljali smo heterologno izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v izbranih sevih grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. Sev K7 tvori vsaj dva bakteriocina, gassericina K7 A in K7 B, katerih nukleotidni zaporedji smo shranili v gensko banko GenBank pod številka EF392861 in AY307382. Ugotovili smo 100-odstotno identičnost gassericina K7 A z acidocinom LF221 A ter gassericina K7 B z acidocinom LF221 B. Gassericina K7 A in K7 B smo kot nova predstavnika uvrstili med dvopeptidne bakteriocine. Heterolognega izražanja aktivnih bakteriocinov sevov K7 in LF221 v izbranih ekspresijskih sistemih nismo uspeli potrditi, kljub temu, da smo v transformantah potrdili prisotnost in nukleotidna zaporedja insertov. Izpostavljenost seva K7 povišani temperaturi gojenja ali mutagenim dejavnikom ni vplivala na sposobnost tvorbe in aktivnost bakteriocinov, se je pa spremenil plazmidni profil in povečala občutljivost za antibiotike. Probiotične lastnosti sevov K7 in LF221 ter širokospektralnost njihovih bakteriocinov obetajo številne možnosti uporabe, tako v živilski industriji (bio-konzervansi) kot farmaciji in biomedicini.

BACTERIOCIN COMPLEX ACTIVITY OF *Lactobacillus gasseri* K7 AND *Lactobacillus gasseri* LF221 STRAINS IN DIFFERENT EXPRESSION SYSTEMS

M. Zorič Peternel

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: I. Rogelj

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Strains *L. gasseri* K7 (K7) and *L. gasseri* LF221 (LF221) are of human origin, fulfil basic probiotic requirements and produce wide-inhibitory spectra bacteriocins. We studied closely bacteriocin complex of the K7 strain and investigated stability of production and activity under stress conditions. We performed heterologous expression studies with K7 and LF221 bacteriocins in selected Gram-negative and Gram-positive bacteria. K7 strain produces at least two bacteriocins, named gassericin K7 A and gassericin K7 B whose acquired nucleotide sequences were deposited at GenBank under accession numbers EF392861 and AY307382. We found out a 100-percent identity of gassericin K7 A to acidocin LF221 A and gassericin K7 B to acidocin LF221 B. Gassericins K7 A and K7 B were classified as new members of the two-peptide bacteriocins. We were not able to confirm heterologous production and activity of K7 and LF221 bacteriocins in selected expression systems, although we confirmed the presence and nucleotide sequences of the inserts. Higher incubation temperature or presence of mutagenic agents did not effect the production neither activity of K7 bacteriocins but caused increased antibiotic susceptibility and changes in plasmid profile. Probiotic properties of K7 and LF221 strains and production of wide-inhibitory spectra bacteriocins are very promising for applications in food industry (bio-conservans), pharmacy and biomedicine.

VEČPARAMETRSKI MODEL ZA OCENO KAKOVOSTI BOLNIŠNIC

K. Čepon

Ekonomska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: V. Rajkovič

Fakulteta za organizacijske vede, Univerza v Mariboru

Somentor: B. Rusjan

Ekonomska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ministrstvo za zdravje je izdalo priročnik s splošnimi standardi za bolnišnice oz. zdravstvene ustanove, financirane iz javnih sredstev, in za zasebne izvajalce, ki imajo pogodbe z javnim zdravstvenim sistemom. Cilj tega dela je izdelati uporaben večparametrski model za akreditiranje bolnišnic po splošnih standardih zdravstvene obravnave za bolnišnice. V ta namen je v nalogi opisan večparametrski ocenjevalni model, s katerim je mogoče enostavneje zbrati podatke o merilih, ki jih s pomočjo programa za večparametrsko ocenjevanje vnesemo v model. Pridobljene rezultate ocenjevanja lahko interpretiramo in primerjamo z različnimi kriteriji izpolnjevanja zahtev standardov. Prav tako lahko sledimo razvoju organizacije in primerjamo njeno stanje s stanji v preteklih ocenjevalnih obdobjih. Rezultate lahko tudi grafično predstavimo in določimo smernice za v prihodnje. Kot orodje pri delu z večparametrskim modelom za vrednotenje in odločanje sta bila uporabljena in med seboj primerjana program za večparametrsko odločanje DEXi, ter program MS Excel, kjer so prav tako upoštevana pravila za določanje akreditiranosti.

MULTI-ATTRIBUTE MODEL FOR QUALITY EVALUATION OF HOSPITALS

K. Čepon

Faculty of Economics, University of Ljubljana

Supervisor: V. Rajkovič

Faculty of Organizational Sciences, University of Maribor

Co-supervisor: B. Rusjan

Faculty of Economics, University of Ljubljana

Ministry of health has issued a guide to general standards for hospitals and health institutions, financed by public means, and for private entities, having agreements with the public health system. The goal of this work is to create a useful multi-attribute model for accreditation of hospitals in accordance with the general standards for health treatment for hospitals. Accordingly, the assignment describes a multi-attribute evaluation model, which enables simpler collection of data on criteria, which are then entered into the model by using a multi-attribute evaluation program. The gathered evaluation data can be interpreted and compared by using various criteria for fulfillment of standards' demands. Additionally, the development of the organization can also be followed and its present condition compared to the past. The results can also be presented graphically and guidelines for the future can be determined. The program for multi-attribute decision making DEXi and the program MS Excel, which also considers the rules for determining accreditation, were used and compared as tools for working with the multi-attribute model for evaluation and decision making.

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREDPISOVALNE NAVADE ZDRAVNIKOV - PREDPISOVANJE STATINOV MED ZDRAVNIKI SPLOŠNE MEDICINE V SLOVENIJI

E. Suhadolc

IEDC – Poslovna šola Bled

Mentor: J. M. Pons

Axioma Marketing Consultants, Španija

Somentor: J. Drinovec

Krka, d. d., Novo mesto

V magistrski nalogi smo raziskovali predpisovalne navade in dejavnike, ki vplivajo na zdravnikovo odločitev o izbiri zdravila. Da bi zagotovili realne in uporabne podatke, smo se v raziskavi omejili na izbrano skupino zdravil (na statine), na določeno specializacijo zdravnikov (na zdravnike družinske medicine) in tudi geografsko (na Slovenijo). Rezultati raziskave so pokazali, da slovenski družinski zdravniki občasno do redno predpisujejo več kot tri različne statine in več kot šest različnih blagovnih znamk statinov. Ugotovili smo, da so pri izbiri statina in blagovne znamke statina pomembni povsem isti dejavniki: dokazana učinkovitost in dokazana varnost, klinična slika bolnika, priporočila stroke in smernice, lastne izkušnje z zdravilom ter spremljajoče bolezni bolnika. Ugotavljali smo tudi, katere so pričakovane lastnosti strokovnih sodelavcev farmacevtskih podjetij in njihov vpliv na izbiro zdravila. Ugotovili smo, da so pričakovanja zdravnikov glede lastnosti strokovnih sodelavcev zelo velika, saj so bile vse navedene lastnosti označene kot precej do zelo pomembne. Če je na trgu več znamk istega statina, slovenski družinski zdravniki raje predpišejo domače zdravilo. Hkrati pa imajo zdravniki do statusa originalnega oziroma generičnega zdravila relativno nevtralen odnos.

FACTORS THAT INFLUENCE PHYSICIANS' PRESCRIBING DECISIONS - THE CASE OF STATIN PRESCRIBING AMONG GENERAL PRACTITIONERS IN SLOVENIA

E. Suhadolc

IEDC – Bled School of Management

Supervisor: J. M. Pons

Axioma Marketing Consultants, Spain

Co-supervisor: J. Drinovec

Krka, d. d., Novo mesto

The objective of the Master's Thesis was to investigate prescribing habits and factors influencing a physician's decision for the selected, prescribed drug. To provide realistic and useful data, the study was restricted to a precisely defined drug group (statins) and to a definite physician speciality (general practitioners), and it was also geographically limited (to Slovenia). Slovenian general practitioners prescribe, periodically or regularly, more than three different statins and more than six different statin brands. It was established that the most important factors influencing statin selection and statin brand selection are exactly the same. They include: proven efficacy and safety, the patient clinical picture, speciality recommendations, guidelines and doctrine; personal experience with the drug and patient underlying diseases. We investigated the anticipated characteristics of PSRs and their influence on the selection of a prescribed drug. It was established that physicians' expectations regarding the PSRs' characteristics are very high, since all characteristics were marked as considerably to very important. Slovenian general practitioners prefer to prescribe a domestic drug if several brands of the same statin are on the market. Simultaneously, the physicians' attitude to the original or generic drug status is relatively neutral.

ACILIRANI TRIAZENI – PRIPRAVA IN LASTNOSTI

B. Alič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: S. Polanc

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Triazeni so zelo raznolika skupina spojin, ki je znana po svojih antitumornih in/ali inhibicijskih lastnostih. Delo obravnava sintezo in lastnosti 3-acil-1,3-diariltriazenov in enega 1,3-diariltriazena. Predhodni rezultati so pokazali, da je za biološko aktivnost potrebna prisotnost določenih elektron-privlačnih skupin na benzenovem obroču. Z aciliranjem 1,3-diariltriazenov smo sintetizirali 23 novih 3-acil-1,3-diariltriazenov. Pripravili pa smo tudi nekaj derivatov kavne kisline, ki je znana kot antioksidant in lovilec prostih radikalov. Omenjene 3-acil-1,3-diariltriazene smo poslali na testiranja biološke aktivnosti na Inštitut Ruđer Bošković v Zagreb. Rezultati testiranja štirih spojin na antitumorno aktivnost na celicah materničnega vratu (HeLa celice) so pokazale visoko aktivnost: IC_{50} (μM) je za acilirane diariltriazene znašala med 0,3 in 0,5 ter 2,0 za 1,3-diariltriazem, medtem ko rezultate testiranja ostalih spojin še pričakujemo.

ACYLATED TRIAZENES – PREPARATION AND PROPERTIES

B. Alič

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: S. Polanc

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Triazenes are very versatile group of compounds, which are known for their anticancer and/or inflammatory properties. This work describes the synthesis and properties of 3-acyl-1,3-diaryltriazenes and one 1,3-diaryltriatriene. The preliminary results showed that the presence of certain electron-withdrawing groups on the benzene ring is required for biological activity of those compounds. Acylation of 1,3-diaryltriazenes resulted in the synthesis of 23 new 3-acyl-1,3-diaryltriazenes. We also prepared several derivatives of caffeic acid, which is known as an antioxidant and a scavenger of free radicals. Those 3-acyl-1,3-diaryltriazenes were tested for biological activity at the Ruđer Bošković Institute in Zagreb. Results of four compounds tested on antitumour activity of cervical carcinoma cells (HeLa cells) have shown high activity: IC_{50} (μM) for acylated aryltriazenes was between 0,3 and 0,5 and 2,0 for 1,3-diaryltriatriene, while we are still waiting for the results of the other compounds.

POSKUSI PARALELNE SINTEZE HETEROCIKLIČNIH SISTEMOV IZ DIMETILAMINOMETILIDENSKIH DERIVATOV ACETONDIKARBOKSILATOV

J. Baškovč

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: B. Stanovnik

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Dimetil aceton-1,3-dikarboksilat smo s hidrazin hidratom pretvorili v pirazolov derivat, ki ima dve aktivni metilenski skupini, na kateri smo lahko postopno vezali dimetilaminometilidenski skupini. V ta namen se je za učinkovit reagent izkazal DMFDMA (dimetilformamid dimetil acetal). Prvo dimetilaminometilidensko skupino smo lahko uvedli pod milimi pogoji, drugo pod ostrejšimi pogoji.

Vsako od dimetilaminometilidenskih skupin je moč izmenjati z amini, hidrazini in C-nukleofili. Če smo izvedli izmenjavo na pirazolu z eno dimetilaminometilidensko skupino, smo dobili ustrezne monosubstituirane derivate. Pri izmenjavi dveh skupin pa smo z amini in monosubstituiranimi hidrazini dobili pirazolo[4,3-c]piridine, pri izmenjavi z 1,2-disubstituiranimi hidrazini pa so nastali pirazolo[4,3-d]diazepini.

EXPERIMENTS OF PARALLEL SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC SYSTEMS FROM DIMETHYLAMINOMETHYLIDENE DERIVATES OF ACETONDICARBOXYLATES

J. Baškovč

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: B. Stanovnik

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Dimethyl acetone-1,3-dicarboxylate was converted with hydrazine to pyrazole derivate with two active methylene groups, on which we have bonded dimethylaminomethylidene groups. For this conversion DMFDMA has proven as a suitable reagent. The first dimethylaminomethylidene group was introduced under mild conditions and the second was introduced under more drastic conditions.

Each of the dimethylaminomethylidene groups could be substituted by amines, hydrazines and C-nucleophiles. If we substituted only one dimethylaminomethylidene group on a pyrazole ring, we got monosubstituted derivatives. When we carried out substitution of two dimethylaminomethylidene groups with amines and monosubstituted hydrazines, pyrazolo[4,3-c]pyridines were isolated and when the substitution was carried out with 1,2-disubstituted hydrazines, the result was formation of pyrazolo[4,3-d]diazepines.

VPLIV SPREMEMB PROTEINA MyD88 NA SIGNALIZACIJO TOLLU-PODOBNIH RECEPTORJEV

M. Ciglič

Kemijski inštitut, Ljubljana

Mentor: R. Jerala

Kemijski inštitut, Ljubljana

Celice prirojenega imunskega odziva na svoji površini izražajo Tollu-podobne receptorje (TLR), ki prepoznajo molekule, značilne za patogene mikroorganizme. Prepoznavanje sproži signalno pot, ki vodi v aktivacijo celic in sintezo vnetnih citokinov. Omenjena pot aktivacije sodeluje tudi pri kroničnih vnetnih boleznih, kot so revmatoidni artritis, kolitis in rak. Na citosolno domeno receptorjev TLR se veže adapter MyD88. Prenos signala lahko inhibiramo z obliko MyD88, ki vsebuje zgolj domeno TIR (dnMyD88). Želeli smo ugotoviti, kako lahko izboljšamo inhibicijo MyD88 preko peptidov, ki izboljšajo vezavo na celično membrano. Ugotovili smo, da dodatek kationskega peptida na C-terminalnem koncu, ki sicer izboljša signalizacijo preko MyD88, ne vpliva na inhibicijo z dnMyD88. Ker se povezava med dnMyD88 in TLR4 vzpostavi ob membrani, smo predvidevali, da C-terminalni dodatek lahko prepreči interakcijo z receptorjem. Z eksperimenti smo potrdili to hipotezo in pokazali, da je primernejše mesto modifikacije N-terminalni del dnMyD88, kar lahko vodi v razvoj učinkovitih inhibitorjev vnetja.

THE EFFECT OF MODIFICATION OF PROTEIN MyD88 ON TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING

M. Ciglič

National Institute of Chemistry, Ljubljana

Supervisor: R. Jerala

National Institute of Chemistry, Ljubljana

Cells of the innate immunity express Toll-like receptors (TLR) on their surface, which recognize molecules of pathogens. That triggers signaling pathway resulting in activation of the cells and production of inflammatory cytokines. TLR signaling is involved also in chronic inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis, colitis and cancer. Intracellular domain of TLR interacts with an adapter MyD88. Dominant negative MyD88 (dnMyD88) contains only TIR domain and causes inhibition of signaling. We tested how peptides, which enable binding to the plasma membrane, affect inhibition. We showed that adding of C-terminal cationic peptide, which enhances signaling through MyD88, has no effect on inhibition. As MyD88 and TLR4 interact closely to the membrane, we presumed that fusion on C-terminal side would obstruct the interaction. Experiments confirmed this hypothesis and showed that N-terminal modification of dnMyD88 is likely to have more effect on inhibition and could lead to the development of effective inflammatory inhibitors.

ŠTUDIJ GASTROREZISTENTNIH LASTNOSTI OBLOG S HIDROKSIPROPIL METILCELULOZO ACETAT SUKGINATOM

G. Hudovornik

Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: F. Vrečer

Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: N. Zajc

Krka, d. d., Novo mesto

Gastrorezistentne obloge so pomembne sestavine farmacevtskih oblik, pri katerih želimo, da se učinkovina sprosti v tankem črevesu pri višjem pH. Zdravilne učinkovine, ki so občutljive na kisel medij, ščitijo pred nizkim pH želodčnega soka, sluznico želodca pa pred škodljivimi učinki nekaterih zdravilnih učinkovin. V nalogi smo kot gastrorezistentni polimer uporabili hidroksipropil metilcelulozo acetat sukcinat. S pomočjo tehnologije zvrtničenih plasti smo z gastrorezistentno oblogo oblagali pelete, obložene s slojem učinkovine. Preučevali smo vpliv količine mehčala, stopnje nevtralizacije in količine smukca ter natrijevega lavrilsulfata. Preučevali smo vpliv debeline obloge na gastrorezistenco. Zanimal nas je tudi vpliv izbranih pogojev temperiranja na gastrorezistenco. Obložene pelete smo ovrednotili s testom gastrorezistence in s preskusom raztapljanja. Izdelali smo filme z različnimi količinami mehčala in jim z DSC metodo določili temperaturo steklastega prehoda. Ugotovili smo, da količina mehčala nima neposrednega vpliva na gastrorezistenco, nevtralizacija, količina smukca in natrijevega lavrilsulfata pa vplivajo na gastrorezistenco obloženih pelet. Ugotovili smo, da se pri temperiranju gastrorezistenca pelet še dodatno poveča, povečanje pa je odvisno od stopnje nevtralizacije polimera in količine mehčala v oblogi.

THE STUDY OF HYPROMELLOSE ACETATE SUCCINATE ENTERIC COATING PROPERTIES

G. Hudovornik

Krka, d. d., Novo mesto, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: F. Vrečer

Krka, d. d., Novo mesto, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-Supervisor: N. Zajc

Krka, d. d., Novo mesto

Enteric coatings are important components of dosage forms that need to be protected from harmful effects of gastric fluids. Enteric coating protects the active ingredient from low pH of gastric juice or the stomach mucosa from harmful effects of active ingredient. In present work hypromellose acetate succinate (HPMCAS) was used as coating agent for pellets coated with an active ingredient containing layer. We coated pellets in fluid bed using the Wurster insert. Neutralized polymer dispersions were used in our present work. The influence of dispersion composition (plasticizer content, degree of neutralization, talc, SDS content) and curing conditions on gastric resistance of coated pellets was studied. The influence of coating amount was also studied. Test of gastro resistance and dissolution test were used for evaluation of coated pellets. Different polymer films were prepared and the glass transition temperature was measured by DSC. Results showed that plasticizer content has no direct effect on gastro resistance of coated pellets, while the neutralization of polymer, talc content and SDS content showed significant effect on gastro resistance. Curing additionally improves the gastro resistance of coated pellets, latter being dependent on degree of polymer neutralization and plasticizer content.

OKARAKTERIZACIJA EKSTRACELULARNIH ENCIMOV PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis*

T. Jordan

Krka d. d., Novo mesto

Mentor: A. Gasparič

Krka d. d., Novo mesto

Somentor: M. Legiša

Kemijski inštitut, Ljubljana

Namen raziskave je bil pri izbranem sevu bakterije *B. subtilis* (CBS117162) preučiti ksilanolitični encimski sistem in določiti dejavnike, ki vplivajo na aktivnost teh encimov. S tem smo prispevali k optimizaciji pogojev za uspešno izolacijo encimov in k natančnejši preučitvi lastnosti seva CBS117162. Analizirali smo tudi druge probiotične lastnosti ter ocenili možnosti uporabe preiskovanega seva kot probiotika. *B. subtilis* smo gojili v sporulacijskem gojišču, kjer je močno inducirana produkcija ekstracelularnih encimov. S kombinacijo različnih metod smo uspeli določiti fizikalne lastnosti ksilanolitičnih encimov in približno molekulsko maso ksilanaze v preiskovanem sevu. Določili smo, da je pH optimum za največjo ksilanazno aktivnost v nevtralnem območju, temperaturni optimum pa je okoli 50°C. Dokazali smo, da prisotnost mikromineralov ugodno vpliva na termostabilnost spor in na nekatere encimske aktivnosti (ksilanazne, proteazne, fitazne...). Na ksilanogramu smo določili približno molekulsko maso ksilanaze v velikosti 20 kDa. Sev CBS117162 bi torej lahko uporabili kot probiotik v prehrani živali za izboljšanje razgradnje ksilana. Poleg njegovih izjemnih ksilanolitičnih sposobnosti pa ima tudi druge lastnosti, ki zagotavljajo uspešno uporabo kot probiotika.

CHARACTERIZATION OF EXTRACELULLAR ENZYMES FROM BACTERIA *Bacillus subtilis*

T. Jordan

Krka d. d., Novo mesto

Supervisor: A. Gasparič

Krka d. d., Novo mesto

Co-supervisor: M. Legiša

National Institute of Chemistry, Ljubljana

The purpose of this study was to identify biochemical characteristics and factors that have influence on activity and production on xylanolytic enzyme system of the selected *B. subtilis* strain. With this research the optimal conditions for efficient enzyme activity was determined. Other characteristics were studied and possible application of the selected strain as probiotic was estimated. Bacteria *B. subtilis* (strain CBS117162) were cultured under proper conditions (sporulation media) and analysed. The combination of different methods and procedures led to determination of biochemical characteristic of xylanase and its molecular mass. We determined that pH optimum for maximal xylanase activity is in neutral range and that temperature optimum is near 50°C. We proved that the presence of microminerals in the production media has positive effect on thermostability of endospores and on activity of certain enzymes (xylanase, protease, phytase...). On the xylanogram we determined approximate molecular mass of xylanase (20kDa). Strain CBS117162 can be used as probiotic in animal feeds for improvement of xylan degradation. In addition to its exceptional xylanolytic abilities it possess other characteristics that makes it very useful as probiotic.

MATRIČNI MODIFIKATORJI V ELEKTROTERMIČNI ATOMSKI ABSORPCIJSKI SPEKTROSKOPIJI

S. Klobčar

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: M. Veber

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V diplomskem delu smo ugotavljali vplive nekaterih permanentnih modifikatorjev – molibdena, volframa, vanadija in cirkonija – na parametre določevanja kadmija, bakra, železa in niklja z elektrotermično AAS. Za vsak modifikator smo določili optimalne temperature razkroja in atomizacije. Nadalje smo določevali linearnost in občutljivost določevanja elementov v prisotnosti modifikatorjev v različnih osnovah, kot so amonijev klorid, natrijev klorid, vodovodna voda, in meritve primerjali z Milli-Q vodo. Pri kadmiju smo z W in Zr lahko povišali temperaturo razkroja, znižali temperaturo atomizacije ter povečali občutljivost meritev in linearno območje ter s tem izboljšali pogoje za določevanje z navadnimi grafitnimi in pirolitskimi cevki, medtem ko je molibden izboljšal linearnost in naklone umeritvenih krivulj samo pri pirolitskih cevkah. V prisotnosti amonijevega klorida in natrijevega klorida permanentni modifikatorji izboljšajo občutljivost meritev. Pri železu modifikatorji ne vplivajo na temperaturo razkroja in atomizacije, medtem ko sta se volfram in molibden izkazala kot najboljša modifikatorja pri grafitnih cevkah, saj sta izboljšala občutljivost meritev pri vseh koncentracijah natrijevega klorida. Termično obdelane pirolitske cevke izboljšajo občutljivost, občutno pa zmanjšajo linearno območje. Za nikelj smo ugotovili, da modifikatorji tako kot pri železu ne izboljšajo temperature razkroja in atomizacije, izboljšajo pa občutljivost meritev pri grafitnih cevkah pri visokih koncentracijah natrijevega klorida. Volfram nam izboljša ponovljivost pri obeh vrstah cev. V pirolitskih cevkah pa modifikatorji na splošno izboljšajo občutljivost, zmanjša pa se linearno območje.

MATRIX MODIFIERS IN ELECTROTERMIC ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

S. Klobčar

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: M. Veber

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In the thesis we were trying to ascertain the influences of some permanent modifiers – molybdenum, tungsten, vanadium and zirconium on the parameters of defining cadmium, copper, iron and nickel with electrothermic AAS. For each modifier we defined the optimal pyrolysis and atomization temperatures. Further on, we defined the linearity and the sensitivity of defining elements in the presence of modifiers, considering different bases, like ammonium chloride, sodium chloride, tap water. All these measurements were compared with Milli-Q water. With tungsten and zirconium we raised the pyrolysis temperature, we reduced the atomization temperature, we enlarged the sensitivity of measurements, and we increased the linear sphere of cadmium. By doing that, we improved the conditions of defining with ordinary graphite and pyrolithic tubes. Meanwhile, molybdenum improved the linearity and inclinations of calibration curves just in the case of pyrolithic tubes. When permanent modifiers were in the presence of ammonium chloride and sodium chloride the sensitivity of measurements was improved.

In the case of iron the modifiers did not influence the pyrolysis and atomization temperature, whereas tungsten and molybdenum proved to be the best modifiers in combination with graphite tubes, because the sensitivity of measurements in all concentrations of sodium chloride was improved. In the case of pyrolithic tubes, thermically treated tubes improved the sensitivity, but they noticeably deteriorated the linear sphere. The observations for nickel were that modifiers, the same as in the case of iron, did not improve the pyrolysis and atomization temperature, but they did improve the sensitivity of measurements in the case of graphite tubes in the presence of the high concentrations of sodium chloride. Tungsten improved the repeatability in both kinds of tubes. In the case of pyrolithic tubes modifiers in general improved the sensitivity, but worsen the linear sphere.

UPORABA MIKROKALORIMETRIJE IN TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE V PREFORMULACIJSKIH ŠTUDIJAH RAMIPRILA

S. Kralj

Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

Mentor: V. Kmetec

Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

Somentor: R. Roškar

Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

Osnovni namen diplomske naloge je predstavljalo ugotavljanje stabilnostne indikativnosti izotermne mikrokolorimetrije, ki smo jo skušali ovrednotiti s pomočjo primerjave z že uveljavljeno HPLC metodo.

Stabilnost vodne raztopine ramiprila smo spremljali s pomočjo mikrokolorimetra in rezultate primerjali s HPLC analizo. Razpad je bil hitrejši pri višjem pH in pri višji temperaturi, opazili pa smo tudi fizikalen proces na termogramu, in sicer obarjanje.

Dodatne analize na drugih ACE – inhibitorjih, enalapril maleatu in KE-694, so pokazale, da je mikrokolorimetrija prav tako primerna za kvalitativno razlago rezultatov.

Na podlagi eksperimentalnih rezultatov smo ugotovili, da predstavlja uporaba izotermne mikrokolorimetrije velike analitske možnosti v preformulacijskih študijah, kar pa zahteva dobro poznavanje temeljnih procesov. V okviru obravnavanih študij je ustrezna za kvalitativno spremljanje stabilnosti, za kvantitativno spremljanje pa je potrebna še dodatna, sočasna uporaba stabilnostno indikativnejše metode.

USE OF MICROCALORIMETRY AND LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PREFORMULATION STUDIES OF STABILITY OF RAMIPRIL

S. Kralj

Faculty of Pharmacy, Ljubljana

Supervisor: V. Kmetec

Faculty of Pharmacy, Ljubljana

Co-supervisor: R. Roškar

Faculty of Pharmacy, Ljubljana

The basic aim of my thesis was determining the stable indicativeness of isothermal microcalorimetry which we tried to evaluate by means of comparison with an already established HPLC method.

We measured the stability of aqueous solution with a microcalorimeter and compared the results with HPLC analysis. Decomposition was faster at higher pH and higher temperature; we also noticed a physical process on a thermogram, namely precipitation.

Further analysis on other ACE – inhibitors, on enalapril maleate and KE-694 showed that microcalorimetry is also appropriate for qualitative interpretation of results.

On the basis of experimental results we found out that the use of isothermal microcalorimetry opens up great analytic possibilities in preformulation studies, which, however, demands good knowledge of basic processes. In the framework of studies in question it is also appropriate for qualitative monitoring of stability, but for quantitative monitoring an additional simultaneous use of stable indicative method is needed.

IZOLACIJA MIKOORGANIZMA Z ESTERAZNO AKTIVNOSTJO IN KARAKTERIZACIJA ESTERAZE

P. Ljubi

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: B. Lenarčič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: G. Sladič

Krka d. d., Novo mesto

Esteraze pripadajo raznoliki skupini hidrolaz, ki katalizirajo nastanek in cepitev estrskih vezi in so močno razširjene pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih. Iz okolja smo izolirali mikroorganizem z esterazno aktivnostjo za biotransformacijo aktivni farmacevtski učinkovini SL in SK. Spektrofotometrično z merjenjem encimske aktivnosti na o-nitrofenil butirat, smo določili temperaturni optimum pri 40°C in optimalno pH-območje delovanja esteraze 7,5–8,0. Ugotovili smo, da se esteraza pri temperaturi nad 55°C denaturira. Določili smo specifično aktivnost na komercialne substrate o-NPB (0,479 U/mg), p-NPB (0,216 U/mg) in p-NPA (0,126 U/mg). Na NaDS-PAGE in IEF-gelu smo po inkubaciji v raztopini 1-naftil butirata v prisotnosti soli Fast Blue RR detektirali esterazno aktivnost. Po nadaljnjem barvanju obeh gelov s Commassie Brilliant Blue smo določili velikost 58 kDa in izoelektrično točko 6,4. Koncentriran vzorec EE smo delno očistili z gelsko filtracijo na Sephadex G-100 in določili velikost proteina 63 kDa.

ISOLATION OF MICROORGANISM WITH ESTERASE ACTIVITY AND CHARACTERIZATION OF THE ESTERASE

P. Ljubi

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: B. Lenarčič

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: G. Sladič

Krka d. d., Novo mesto

Esterases represent a diverse group of hydrolases catalyzing cleavage and formation of ester bonds and are widely distributed in animals, plants and microorganisms. A microorganism with esterase activity for biotransformation active pharmaceutical ingredients SL and SK was isolated from natural sample and industrial and mineral nutrient growth media were optimized. Optimal temperature of 40°C and optimal pH range between 7,5–8,0 for esterase activity were determined with a spectrophotometric method based on measuring enzyme activity on substrate o-nitrophenyl butyrate. Above 55°C the esterase was denaturated. Specific activities on commercial substrates o-NPB (0,479 U/mg), p-NPB (0,216 U/mg) and p-NPA (0,126 U/mg) were determined. Esterase activity was detected by NaDS-PAGE and IEF after incubation in 1-naphtyl butyrate solution in the presence of Fast Blue RR salt. After additional staining both gels in Commassie Brilliant Blue the size of esterase of 58 kDa and isoelectric point of 6,4 were determined. Concentrated esterase-containing sample was partly purified by gel filtration on Sephadex G-100 and the molecular mass of 63 kDa was determined.

DIELS-ALDERJEVE REAKCIJE NEKATERIH 2H-PIRAN-2-ONOV IN PRETVORBE NASTALIH ADUKTOV Z DERIVATI HIDRAZINA

M. Rajer

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: M. Kočevár

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Raziskovalna naloga predstavlja pretvorbo dvojnih cikloaduktov (derivatov biciklo[2.2.2]okt-7-en-2ekso,3ekso,5ekso,6ekso-tetrakarboksilne kisline) s hidrazinom, derivati hidrazina (*p*-metilfenilhidrazin, *p*-metoksifenilhidrazin, *p*-bromofenilhidrazin, *p*-fluorofenilhidrazin in 2-piridilhidrazin) in nekaterimi amini (3-pikolilamin in anilin) do ustreznih imidov. Pretvorbe dvojnih cikloaduktov so bile izvedene v vodi pod pogoji obsevanja z mikrovalovi. Ta sinteza se je izkazala za bolj učinkovito od klasičnih refluksov; energija se porabi direktno za segrevanje reaktantov, reaktanti se segrejejo hitreje kot pod termičnimi pogoji, reakcijo izvedemo pod lastnim tlakom reaktantov in lahko dosežemo temperaturo, ki je višja od temperature vrelišča topila, reakcijski časi so običajno krajši kot pri uporabi klasičnih termičnih reakcij, produkti so čistejši (nastane manj stranskih produktov). Izvedba reakcij pod mikrovalovnimi pogoji je zelo uporabna in praktična ter zaradi dobre kontrole reakcijskih pogojev in ponovljivosti ponuja veliko možnosti na področju sintezne organske kemije.

DIELS-ALDER REACTIONS OF SOME 2H-PIRAN-2-ONES AND TRANSFORMATIONS OF PRODUCED ADUCTS WITH DERIVATES OF HYDRAZINES

M. Rajer

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: M. Kočevár

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

This research work describes the transformation of double cycloadducts (derivatives of bicyclo[2.2.2]oct-7-ene-2exo,3exo,5exo,6exo-tetracarboxylic acid) with hydrazine and its derivatives (*p*-methylphenylhydrazine, *p*-methoxyphenylhydrazine, *p*-bromophenylhydrazine, *p*-fluorophenylhydrazine and 2-pyridylhydrazine) and some amines (3-picolylamine and aniline) towards corresponding amides. This transformation was achieved in water under microwave irradiation. This synthesis proved to be more efficient than the classical reflux conditions. Energy is directly consumed for heating the reactants and is thus transferred to reagents faster than in the case of normal thermal reactions. The use of a closed microwave reactor enables reactions to run under autogeneous pressure (temperature of the reaction mixture can be higher than its boiling point at normal pressure). Reaction times are usually shorter, products are cleaner (there are less side products). The use of microwave irradiation is very useful and practical because of good control of reaction conditions and reproducibility thus offering many possibilities in the field of synthetic organic chemistry.

STABILNOST DVOVERIŽNIH IN ENOVERIŽNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN PREPOZNAVANJE NJIHOVEGA OŽJEGA KANALA Z ANTIBIOTIKI

M. Seručnik

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: J. Lah

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Veliko funkcij DNK razumemo kot posledico njene sekundarne strukture. Termodinamska stabilnost sekundarne strukture je odvisna od zaporedja baznih parov in jo je mogoče le približno določiti s pomočjo tako imenovane metode najbližjih sosedov. V tej luči predstavljajo poseben problem deli DNK, ki niso urejeni v klasično dvoverižno obliko. Zato smo se odločili za popolno termodinamsko karakterizacijo razvijanja nekaterih oligonukleotidov (dveh dupleksov, ki se razlikujeta v dolžini za dva bazna para GC, in dveh lasničnih zank, ki se od dupleksov ločijo po TCTC zavoju). S pomočjo UV spektroskopije in diferenčne dinamične kalorimetrije smo uspeli določiti termodinamske parametre razvijanja, in ugotovili, da lasnična zanka bistveno stabilizira sekundarno strukturo DNK zaradi kratkosežnih interakcij.

Poznavanje fizikalnih in kemijskih lastnosti nastanka kompleksov ligand-DNK je zelo pomembno s stališča razumevanja interakcij, ki vodijo prepoznavanje DNK z ligandom. V tej luči smo z uporabo spektropolarimetrije spremljali proces vezave antibiotikov distamicina A (DST), netropsina (NET) in 4',6-diamin-2-fenilindola (DAPI) na vezno mesto AATT. Pokazali smo, da se na eno molekulo modelne DNK veže z znatno afiniteto le ena molekula NET in DAPI. Presenetljivo se na eno molekulo DNK vežeta dve molekuli DST, pri čemer se druga molekula DST veže šibkeje.

STABILITY OF DOUBLE- AND SINGLE-STRANDED OLIGONUCLETIDES AND MINOR GROOVE RECOGNITION BY ANTIBIOTICS

M. Seručnik

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: J. Lah

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Many functions of the DNA molecule are explained as consequences of its secondary structure. Thermodynamic stability of secondary structure is a result of the sequence of base pairs, which can be determined only approximately, using the nearest neighbour method. Consequently, parts of DNA that are not organised in the typical double-stranded structure, pose a particularly difficult problem. Accordingly, we decided on a complete thermodynamic characterization of unfolding of certain oligonucleotides (two duplexes that differ in length by two GC base pairs, and two hairpins that differ from the duplexes by the TCTC loop). Using UV-absorption spectroscopy, and differential scanning calorimetry, we managed to determine thermodynamic parameters of molecules' unfolding, and established that hairpin's loop considerably stabilizes DNA's secondary structure due to short-distance interactions.

Determining physical and chemical properties of formation of ligand-DNA complexes is of great importance for the understanding of interactions that occur between DNA molecule and ligand. Therefore, we monitored the process of binding of antibiotics distamycin A (DST), netropsin (NET), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) with AATT binding site. We demonstrated that only one molecule of NET and DAPI bind with one DNA molecule with a considerable affinity. Additionally, we demonstrated for the first time that two molecules of DST can bind with one DNA molecule in which case the second DST molecule will bind weaker.

PRODUKCIJA IN IZOLACIJA POLISAHARIDOV GLIVE *Grifola frondosa* V SUBMERZNI KULTIVACIJI

J. Staniša

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: M. Berovič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: B. Boh

Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Micelij glive *Grifola frondosa* sem gojila submeržno v erlenmajericah in v 10-litrskem mešalnem bioreaktorju. Iz tekočega gojišča sem izolirala ekstracelularne polisaharide, iz peletov glive pa intracelularne polisaharide. Očistila sem jih z ionsko izmenjevalno kromatografijo, gelsko filtracijo in afinitetno kromatografijo. Dobila sem 5 frakcij ekstracelularnih β -D-glukanov s skupno maso 6,7 mg (40.1 μ g/g suhe biomase oz. 4.0 μ g/L tekočega substrata) in 2 frakciji intracelularnih β -D-glukanov s skupno maso 4,9 mg (29.3 μ g/g suhe biomase oz. 0.5 μ g/L tekočega substrata). Pri testiranju očiščenih imunomodulatornih in proti-tumornih učinkov polisaharidov na celičnih linijah miši sta bila dokazana vzpodbujanje proliferacije limfocitov in inhibicija rasti tumorskih celic.

PRODUCTION AND ISOLATION OF POLYSACCHARIDES OF *Grifola frondosa* IN SUBMERGED CULTIVATION

J. Staniša

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: M. Berovič

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: B. Boh

Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana

Mycelium of *Grifola frondosa* was cultivated in erlenmayer flasks and in a 10-L mixing bioreactor. Mycelium was growing in the form of pellets from which intracellular polysaccharides were isolated. Extracellular polysaccharides were isolated from the liquid substrate. Isolated polysaccharides were separated by ion-exchange chromatography, gel filtration and affinity chromatography. 5 fractions of extracellular β -D-glucanes were obtained, with total mass of 6.7 mg (40.1 μ g/g dry biomass or 4.0 μ g/L liquid substrate) and 2 fractions of intracellular β -D-glucanes with total mass of 4.9 mg (29.3 μ g/g dry biomass or 0.5 μ g/L liquid substrate). Testing of immunomodulatory and anti-tumor effects of polysaccharides on mouse cell lines showed an increase in the proliferation of lymphocytes, and growth inhibition on tumor cells.

KINETIČNE ŠTUDIJE HITROSTI RASTI KEFIRNIH ZRN

K. Zajšek

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentorica: A. Goršek

Somentor: P. Glavič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

V diplomskem delu opisujemo eksperimentalni postopek določanja kinetike rasti kefirnih zrn. Eksperimente smo izvajali v laboratorijskem šaržnem reaktorju (reakcijski kalorimeter RC1) pri predhodno določenih treh optimalnih procesnih pogojih (temperatura, masna koncentracija glukoze, vrtilna frekvenca mešala). Za namene nadaljnjih raziskav smo določili še četrti procesni parameter, začetno masno koncentracijo zrn, in tako definirali bistvene parametre, pri katerih smo dobili največjo prirast. Izvajali smo 24-urne eksperimente. Pri optimalnih procesnih pogojih smo v drugi fazi raziskav beležili časovno spreminjanje prirasta zrn. Na osnovi eksperimentalnih podatkov smo z nelinearno regresijo izvedli parametrično analizo različnih kinetičnih modelov, ki upoštevajo inhibicijo (Aibov, Edwardsov, Haldaneov, Luongov). S statistično analizo smo določili najugodnejši kinetični model in vrednosti njegovih parametrov. Ugotovili smo, da lahko hitrost rasti kefirnih zrn najbolje opišemo z Luongovim kinetičnim modelom. S tako dobljenimi kinetičnimi podatki smo lahko za izbrano proizvodno kapaciteto kefirnih zrn ocenili prostornino reaktorja za zahtevano proizvodnjo.

KINETIC STUDIES OF GROWTH RATE OF KEFIR GRAINS

K. Zajšek

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: A. Goršek

Co-supervisor: P. Glavič

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

In the diploma work experimental determination of kefir grains growth kinetics is described. All experiments were performed in a laboratory batch reactor (reaction calorimeter RC1) under previously determined optimal process conditions (temperature, mass concentration of glucose, rotational frequency of agitator). For the purpose of further research we determined a fourth process parameter (initial mass concentration of kefir grains). In that way we defined the four fundamental parameters that gave maximal growth of kefir grains. We performed 24-hour experiments.

In the second phase of our research we were observing at previously determined optimal process conditions and at optimal initial mass concentration of kefir grains how their growth changes with time. We applied the experimental data by using nonlinear regression to perform parametric analysis of some known kinetic models (Aiba's, Edwards's, Haldane's, Luong's) which consider inhibition. The kinetic models mentioned above has been statistically analyzed and the most suitable kinetic model together with its parameters have been determined. The growth rate of kefir grains fits the Luong kinetic model best. Kinetic data enabled us to design an industrial reactor for the production of kefir grains.

GRENIVKA IN ZDRAVILA

M. Bregar, K. Hribar, M. Rapuš

Gimnazija Novo mesto

Mentor: S. Florjančič

Gimnazija Novo mesto

V raziskovalni nalogi smo preučevale grenivko in njen vpliv na zdravila. Na spletu in v literaturi smo poiskale informacije o grenivki in njenih učinkih. Čeprav je na spletu zelo veliko informacij, ki opozarjajo na vplive grenivke na delovanje zdravil, ljudje tega ne poznajo in tudi tisti, ki ta zdravila uživajo, ne vedo, da ob teh zdravilih ne smejo jesti grenivke. Izvedle smo tudi anketo, ki je potrdila naše domneve o nepoznavanju grenivke. Pomembno je, da so ljudje bolj seznanjeni tako s pozitivnimi, kot z negativnimi učinki grenivke.

V eksperimentalnem delu smo s poskusi preizkušale redukcijske lastnosti grenivke, vse to pa smo predstavile tudi dijakom Gimnazije Novo mesto pri pouku kemije.

GRAPEFRUIT AND MEDICAMENTS

M. Bregar, K. Hribar, M. Rapuš

Gimnazija Novo mesto

Supervisor: S. Florjančič

Gimnazija Novo mesto

In this research we studied grapefruit and medicaments that grapefruit affects. On the internet there is a lot of information about grapefruit and its effects. Even though there is so much information, people do not know how grapefruit affects their medicaments. We also carried out a survey, which confirmed our hypothesis that people lack information on grapefruit. It is important to know that grapefruit provides medical and health benefits, but people should control the intake of grapefruit, because grapefruit can be harmful together with some medicaments.

In the experimental part of this research we tried to prove that grapefruit is a reducer. We presented our findings to the students of Gimnazija Novo mesto in chemistry classes.

SKRIVNOSTNO ŽIVLJENJE TALNE BAKTERIJE

A. Lahne, M. Ruperčič

Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma

Mentorica: J. Goršin Fabjan

Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma

V raziskovalni nalogi vam bova predstavili rezultate pri raziskovanju talne bakterije, naključno izolirane iz komposta, za katero predvidevava, da producira antibiotik.

Bakterijo sva skušali determinirati. Naredili sva barvanje po Gramu, ugotavljali prisotnost encima katalaze in oksidaze, zmožnost bakterije, da razgrajuje škrob, ali razgrajuje ogljikove hidrate po oksidativni ali fermentativni poti, katere sladkorje razgrajuje, kaj nastane pri razgradnji, ali tvorijo spore. Ugotavljali sva na katerih gojiščih in pri katerih temperaturi bakterija uspeva in kakšne kolonije tvori na posameznem gojišču. S pomočjo rezultatov sva skušali bakterijo uvrstiti v eno izmed skupin in rod. Na petrijevkah z ustreznim gojiščem sva skupaj gojili talno bakterijo in različne patogene bakterije ter ugotavljali medsebojno inhibitorno delovanje. Uporabljene patogene bakterije so bile *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.* in kvasovka *Candida albicans*.

Ugotavljali sva, ali bakterija proizvaja snov, ki deluje antibiotično, in kako se patogene bakterije odzivajo na to snov.

MYSTERIOUS LIFE OF FLOOR BACTERIUM

A. Lahne, M. Ruperčič

Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism

Supervisor: J. Goršin Fabjan

Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism

In our study we are going to present the results of our research of ground bacterium, obtained by isolation from compost by random sampling. We anticipated that the bacterium produces antibiotic.

We tried to determine the bacterium. We have done the Gram's colouring test, we established the presence of enzyme catalase and oxidase, the ability of bacterium to decompose starch or carbohydrates in the oxidation or fermentation way. Moreover, we tried to determine which sugars are decomposed and what are the products. We were interested in finding out if the bacterium produces spores. We determined in which nutrient medium and at which temperatures bacterium grows and what kind of colony it creates in separate nutrient medium. We bred ground bacteria together with different pathogenic bacteria on Petri dishes with suitable culture medium in order to determine their mutual inhibitory activity. The following pathogenic bacteria were used: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.* and yeast *Candida albicans*.

We wanted to find out if the bacterium produces the substance which has an antibiotic effect and how the pathogenic bacteria are responding to that substance.

VITAMIN D IN NJEGOV POMEN ZA OPTIMALNO ZDRAVJE LJUDI

N. Novak, Š. Rabzelj

Gimnazija Novo mesto

Mentorica: E. Rustja

Somentorica: M. Kovač

Gimnazija Novo mesto

Čeprav je vitamin D poznan že več desetletij, se v zadnjem času interes zanj izjemno povečuje. Obsežne raziskave v Evropi in ZDA ter njihove ugotovitve poudarjajo pomembnost zadostnih količin vitamina D za optimalno zdravje ljudi v vseh življenjskih obdobjih.

V raziskovalni nalogi predstavlja novejša raziskava v Evropi in ZDA. Eksperimentalni del pa vključuje del klinične študije, ki poteka na Univerzitetnem Kliničnem Centru v Ljubljani. V študijo so vključene bolnice s pomenopavzalno osteoporozo. Določanje 25- hidroksiholekalciferola v serumu bolnic se izvaja s pomočjo RIA metode. Vrednosti serumskih koncentracij 25- hidroksi vitamin D₃ kažejo na status vitamina D pri bolnicah. Izvedli sva tudi anketo, ki na izbranem vzorcu predstavlja prehranske navade ljudi na Dolenjskem.

VITAMIN D AND ITS IMPLICATION FOR OPTIMAL HEALTH OF HUMANS

N. Novak, Š. Rabzelj

Gimnazija Novo mesto

Supervisor: E. Rustja

Co-supervisor: M. Kovač

Gimnazija Novo mesto

Although vitamin D is known for many decades it is becoming the subject of growing interest in last 10 years. Extensive research in Europe and USA is pointing out that vitamin D sufficiency is required for optimal health of children and adults.

We are presenting new research studies in Europe and USA. Experimental part is covering a part of a clinical study, presently running in University Medical Center Ljubljana on patients with postmenopausal osteoporosis. Analytical determination of 25- hydroxyl vitamin D₃ with RIA method in serums of these patients is showing their status of vitamin D. We have organized also a survey, which on a selected sample shows dietary habits of humans in Dolenjska region.

UČINEK RAZLIČNIH ZELIŠČNIH EKSTRAKTOV NA VONJ ČESNA

M. Valerij, Ž. Klobučar

Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma

Mentorica: V. Zupančič

Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma

Somentor: M. Stergar

Krka d. d., Novo mesto

Česen razkužuje, uničuje črevesne zajedavce, znižuje krvni tlak in raven sladkorja ter holesterola v krvi, je bakteriostatik in antimikotik ter krepi imunsko sposobnost telesa. Uživanje česna spremlja tudi neprijeten vonj, ki mnoge odvrne od njegove uporabe. Za specifičen česnov vonj so odgovorne žveplo vsebujoče spojine (različni tiosulfinati in njihovi razpadni produkti), ki nastanejo v česnu po mehanski obdelavi.

Namen naše raziskovalne naloge je bil odstraniti oziroma zmanjšati neprijeten vonj po česnu z dodajanjem različnih zeliščnih ekstraktov (zelišča s področja Slovenije).

Izvedli smo primerjavo učinkov različnih zelišč in zeliščnih ekstraktov na česen oziroma na njegov vonj. Uporabljali smo svež česen in starani vodni česnov ekstrakt – kyolic. Vpliv zeliščnih ekstraktov na neprijeten vonj česna smo ugotavljali tako, da smo česnovemu ekstraktu kyolicu dodali encim diastazo (s čimer smo ustvarili okolje podobno tistemu v ustih) in izbrani zeliščni ekstrakt.

Pri svojem delu smo uporabljali različne kemijske metode (ekstrakcija trdno-tekoče, tankoplastna kromatografija (TLC), spektroskopske metode analize (IR)). Učinek nekaterih zelišč na vonj česna smo preverili tudi z organoleptičnimi testi na vonj. Za najbolj učinkovite so se izkazali žajbelj, melisa in meta.

EFFECT OF VARIOUS HERBAL EXTRACTS ON THE GARLIC ODOUR

M. Valerij, Ž. Klobučar

Grm Novo mesto - Centre of Biotechnology and Tourism

Supervisor: V. Zupančič

Grm Novo mesto - Centre of Biotechnology and Tourism

Co-supervisor: M. Stergar

Krka d. d., Novo mesto

Garlic has antiseptic capabilities and it's known for its anti-helminthic and blood-stream activity - it lowers blood pressure and reduces the level of blood sugar and cholesterol. It is a bacteriostatical and anti-fungal herb and it brings general improvement to immunity. The consumption of garlic is accompanied by a harsh odour which turns many people away from using it. Compounds responsible for garlic unpleasant odour are sulphur-containing compounds (various thiosulfinates and their brake-down products) which appear in garlic after mechanical treatments, such as smashing and crushing.

The purpose of our research was to remove or at least reduce the unpleasant garlic odour by adding various herbs and herbal extracts (herbs from Slovenia).

We compared effects of various herbs and extracts on garlic and its odour. We used fresh garlic bulbs and aged garlic extract kyolic. The effect of herbal extracts on garlic has been established by adding the enzyme diastase to the garlic extract kyolic (in this way the environment similar to human mouth has been created) and a chosen herbal extract.

During the research various chemical methods have been used (Thin-Layer Chromatography and Infrared Spectroscopy). The effect of some herbs on the garlic odour has been tested with organoleptical tests.

The most efficient herbs which reduce garlic odour turned out to be sage, mint and melissa.

e - Krkine nagrade e - Krka Prizes



Krkine nagrade

SMERI RAZVOJA ALTERNATIVNIH OBLIK V PREDKLINIČNIH RAZISKAVAH

S. Legiša

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

V laboratorijih vsakodnevno odkrivamo in razvijamo nova zdravila. Kakovost učinkovin preverjamo s številnimi laboratorijskimi testiranjmi z najobčutljivejšimi, najzanesljivejšimi in validiranimi analitskimi metodami in aparaturami. Za registracijo novih zdravil in kozmetičnih izdelkov pa so še vedno potrebne predklinične raziskave, v katerih se uporabljajo laboratorijske živali. Poskuse na njih izvajamo v akademske namene na raziskovalnih inštitutih, univerzah, v bolnišnicah in industriji. S hitrim razvojem biotehnologije in informacijskih tehnologij pa se ponujajo možnosti uvajanja novih metod, ki bi lahko zmanjšale, izpopolnile ali nadomestile testiranja na laboratorijskih živalih. Te metode so zelo učinkovite in zanesljive tudi za testiranje kozmetičnih in gospodinjskih proizvodov, poleg tega so ponavadi kratkotrajnejše, bistveno cenejše in niso motene zaradi različnih rezultatov med različnimi vrstami živali in ostalih motečih dejavnikov.

Kljub temu te metode ne morejo popolnoma nadomestiti testiranj na laboratorijskih živalih, saj so, preden se začnejo klinične študije na ljudeh, potrebne tudi študije učinka različnih snovi v živem organizmu. Poskusi na prostovoljcih so ena od alternativnih metod, med katerimi so najpomembnejše celične in tkivne kulture, različne simulacije ter testi na mikroorganizmih. Vendar je zdravilo še prej potrebno testirati in dokazati njegovo učinkovitost, stranske učinke.

V današnjem času je glavni časovni problem pri postopku sprejema in potrditve novih alternativnih metod, s čimer se ukvarja agencija ECVAM. Vseeno je napredek viden in predvsem zaradi etičnega vidika poskusov na živih bitjih se strokovnjaki trudijo, da bi omenjena postopka čim bolj pospešili.

DIRECTIONS OF DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE FORMS IN PRE-CLINICAL RESEARCH

S. Legiša

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

We discover and develop new drugs in laboratories every day. We check the quality of drugs with lots of laboratory testings with the most sensitive, reliable and valid analytical methods and devices. For the registration of new drugs and cosmetrical products pre-clinical research by using laboratory animals are still necessary. Animals are also used for academical purposes in research institutes, universities, hospitals and industry. However, with the development in biotechnology and information technology we are nowadays given the possibilities of validating the new methods which could reduce, refine or replace testings on laboratory animals. This methods are very effective and reliable for testing of the cosmetic and household products. What is more, they are also of short duration, much cheaper and they are not affected by different results among different animal species and other disturbing factors.

Nevertheless, all this methods cannot completely replace the laboratory animals, because before clinical studies on humans start, studies of effect of different substances in living organism are also important. Experiments on volunteers are one of the alternative methods, including the most important cell and tissue cultures, different simulations and tests on microorganisms. However, a new drug has to be first tested in different ways to prove its safety and pharmacological suitability.

Nowadays, time is the main problem in the process of acceptance and confirmation of a new alternative method, this is what ECVAM deals about. Anyway, the progress has been seen and the researchers are trying their best to accelerate this process, especially because of ethics view on testings on human beings.

VPLIV PRIPRAVE VZORCA IN POGOJEV SNEMANJA NA RENTGENSKI PRAŠKOVNI DIFRAKTOGRAM FARMACEVTSKIH SUBSTANC

M. Pajk

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: A. Meden

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: M. Smrkolj

Krka, d. d., Novo mesto

V prvem delu raziskav smo želeli preučiti vpliv različnih nastavitv difraktometra na difraktogram farmacevtskih substanc, predvsem na razmerje signal-šum. To razmerje pomembno vpliva na določitev meje detekcije, ločljivost ter intenziteto uklonov v difraktogramu. Ugotovili smo, da sta za najboljši posnetek potrebna najvišja dopustna napetost in tok na rentgenski cevi, pomembno pa na posnetek vplivajo tudi optične nastavitve difraktometra. Pri nekaterih zmesih farmacevtskih substanc smo z nastavitvami, ki so omogočale visoko intenziteto, dosegli nizko mejo detekcije farmacevtske substance v zmesi.

Drugi del raziskave je zajemal ugotavljanje vpliva priprave vzorca na difraktogram ob enakih nastavitvah difraktometra. Primerjali smo dva načina homogenizacije vzorcev, in sicer suho homogenizacijo v mlinu in homogenizacijo s suspendiranjem v tekočini. Meritve smo statistično ovrednotili ter rezultate prikazali kot umeritveno krivuljo. Ugotovili smo, da je homogenizacija s suspendiranjem v tekočini nekoliko boljša od homogenizacije v mlinu, saj daje manjše sipanje rezultatov, ima pa izrazito slabost, saj je težko oz. včasih celo nemogoče najti topilo, ki ne raztaplja vzorca. Pri določevanju umeritvene krivulje je pomembno snemanje vsaj petih paralelek, saj je sipanje intenzitet uklonov predvsem pri nižjih koncentracijah precejšnje.

INFLUENCE OF SAMPLE PREPARATION AND INSTRUMENT SETTINGS ON X-RAY POWDER DIFFRACTION PATTERN OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCES

M. Pajk

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: A. Meden

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: M. Smrkolj

Krka, d. d., Novo mesto

In a first part of our research we tried to investigate an influence of different settings of diffractometer on the acquired data, first of all in a signal to noise ratio, which is very important to define limit of detection, resolution and peak intensity in powder diffraction pattern. We found out that for the best acquired data we need most admissible tension and current on X-ray tube. Of course other instrument settings have a large influence on powder diffraction pattern too. In some mixtures of pharmaceutical substances, with high intensity settings, we achieved low limit of detection of pharmaceutical substance in mixture.

The goal of second part of our research was to determine the influence of sample preparation on powder diffraction pattern at the same settings of diffractometer. We compare two different methods of sample homogenization. First method was homogenization in mill, second one homogenization in fluid suspension. Measurements were statistically analyzed and results were shown on calibration curve. We found out that homogenization in fluid suspension is a bit better than homogenization in mill, because it gives lower scattering level of results. This kind of homogenization also has one weakness, because sometimes it is very difficult to find an appropriate solvent which does not dissolve samples. To define calibration curve it is important to analyze more samples of one concentration because there is a lot of peak scattering, especially at lower concentration levels.

ZAVEDANJE POTROŠNIKOV O VARNOSTI, KAKOVOSTI IN UČINKOVITOSTI ZDRAVIL RASTLINSKEGA IZVORA

V. Vajda

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Namen naloge je bil ugotoviti, kakšna je stopnja zavedanja o varnosti, kakovosti in učinkovitosti zdravil rastlinskega izvora.

V prvem delu naloge so na kratko predstavljene splošne smernice, ki se jih je potrebno držati pri doseganju kakovosti in registraciji fitofarmakov. Temu sledijo dokazani primeri neželenih stranskih učinkov nekaterih najpogosteje uporabljenih zdravil rastlinskega izvora.

Velik del naloge obsega izvedena anketa, s katero sem poskušal ugotoviti, kako so fitofarmaki sprejeti med potrošniki, v kolikšni meri se potrošniki zavedajo, da imajo lahko tudi tovrstna zdravila neželene stranske učinke in za katere težave se fitofarmaki najpogosteje uporabljajo.

V splošnem je moč trditi, da zdravila rastlinskega izvora uživajo veliko mero zaupanja med potrošniki, prav tako pa se le-ti zavedajo, da obstaja nevarnost stranskih učinkov tovrstnih zdravil. Iz tega, kakor tudi iz ostalih rezultatov ankete je moč zaključiti, da bodo tovrstna zdravila zasedala pomembno mesto na farmacevtskem tržišču tudi v prihodnosti.

Na koncu naloge je podanih nekaj idej, kako povečati varnost in učinkovitost fitofarmakov, predvsem v smislu komunikacije med uporabnikom, farmacevtom, zdravnikom in nenazadnje tudi proizvajalcem, ter njegovim prispevkom k izobraževanju strokovnega kadra in osveščanju uporabnikov o pravilni uporabi fitofarmakov.

CONSUMER AWARENESS OF THE SAFETY, QUALITY AND EFFICACY OF HERBAL DRUG PREPARATIONS

V. Vajda

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The objective of the research was to establish the level of awareness of the safety, quality and efficacy of herbal drug preparations.

In the first part the general guidelines, which need to be followed in order to assure high quality and the registration of herbal drugs, are presented. These are followed by documented cases of unwanted side effects of some of the most commonly used herbal drug preparations.

The main part of the research is the questionnaire with which I tried to establish how herbal drugs are accepted among consumers, what is the level of awareness that such drugs can also have unwanted side effects, and for which medical conditions are these drugs used the most.

It can be generally claimed that herbal drug preparations enjoy a high level of acceptance among consumers. However, the consumers are aware that there is a risk of unwanted side effects. From this, and also from other results given by the questionnaire, it can be concluded that this kind of drugs will play an important role on the pharmaceutical market also in the future.

At the end a few ideas are presented on how to increase safety and efficacy of herbal drug preparations, especially in the sense of communication between the consumer, pharmacist, doctor and also the producer. A significant part could also be played by the producer's contributions in the field of educating experts and informing the consumers on the correct use of herbal drugs.

Kazalo avtorjev

Agnič R. _____	45
Alič B. _____	58
Baškovč J. _____	59
Bregar M. _____	70
Ciglič M. _____	60
Čepon K. _____	56
Drinovec J. _____	15
Hribar K. _____	70
Hudovornik G. _____	61
Jordan T. _____	62
Klobčar S. _____	63
Klobučar Ž. _____	73
Kolar L. _____	46
Kralj S. _____	64
Križančič Bombek L. _____	47
Kubale V. _____	48
Lahne A. _____	71
Langerholc T. _____	49
Legiša S. _____	77
Ljubi P. _____	65
Mally M. _____	19
Mravljak J. _____	24
Novak N. _____	72
Novak Štagoj M. _____	29
Pajk M. _____	78
Povh J. _____	50
Prislan I. _____	51
Rabzelj Š. _____	72
Rajer M. _____	66
Rapuš M. _____	70
Režen T. _____	52
Rotar A. _____	9
Ruperčič M. _____	71
Seručnik M. _____	67
Staniša J. _____	68
Suhadolc E. _____	57
Šala M. _____	32
Štefanec D. _____	53
Trontelj J. _____	54
Vajda V. _____	79
Valerij M. _____	73
Vrbinc M. _____	37
Zajšek K. _____	69
Zorič Peternel M. _____	55

Kazalo mentorjev

Berovič M.	68
Boh B.	68
Drinovec J.	57
Florjančič S.	70
Gasparič A.	62
Glavič P.	69
Goršek A.	69
Goršin Fabjan J.	71
Jerala R.	60
Juvan M.	50
Kmetec V.	64
Kočevar M.	66
Kokalj Vokač N.	47
Kolar J.	32
Koloini V.	45
Komel R.	29
Kos J.	49
Kovač M.	72
Kožuh Eržen N.	46
Krajnc P.	53
Lah J.	67
Legiša M.	62
Lenardič B.	65
Mihelčič M.	45
Mohar B.	50
Mrhar A.	54
Pečar S.	24
Pihlar B.	32
Podgornik A.	53
Polanc S.	58
Pons J. M.	57
Rajkovič V.	56
Rendl F.	50
Rogelj I.	55
Rorman D.	52
Roškar R.	64
Rusjan B.	56
Rustja E.	72
Sladič G.	65
Stanovnik B.	59
Stergar M.	73
Svetina S.	19
Štrukelj B.	29
Turk B.	49
Veber M.	63
Vesnaver G.	51
Vlaisavljevič V.	47
Vrecl M.	48
Vrečer F.	37
Vrečer F.	61
Zajc N.	61
Zupančič V.	73
Žekš B.	19

Uredniški odbor

dr. Miha Plevnik, glavni in odgovorni urednik

Oblikovanje

2AM|FCB, Ljubljana

Produkcija

Modan informatika d. o. o., Maribor

Tisk

Tiskarna Dalmatin d. o. o., Ljubljana

Izdajatelj

Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija
natisnjeno v nakladi 500 izvodov

www.krka.si/si/krka/nagrade/