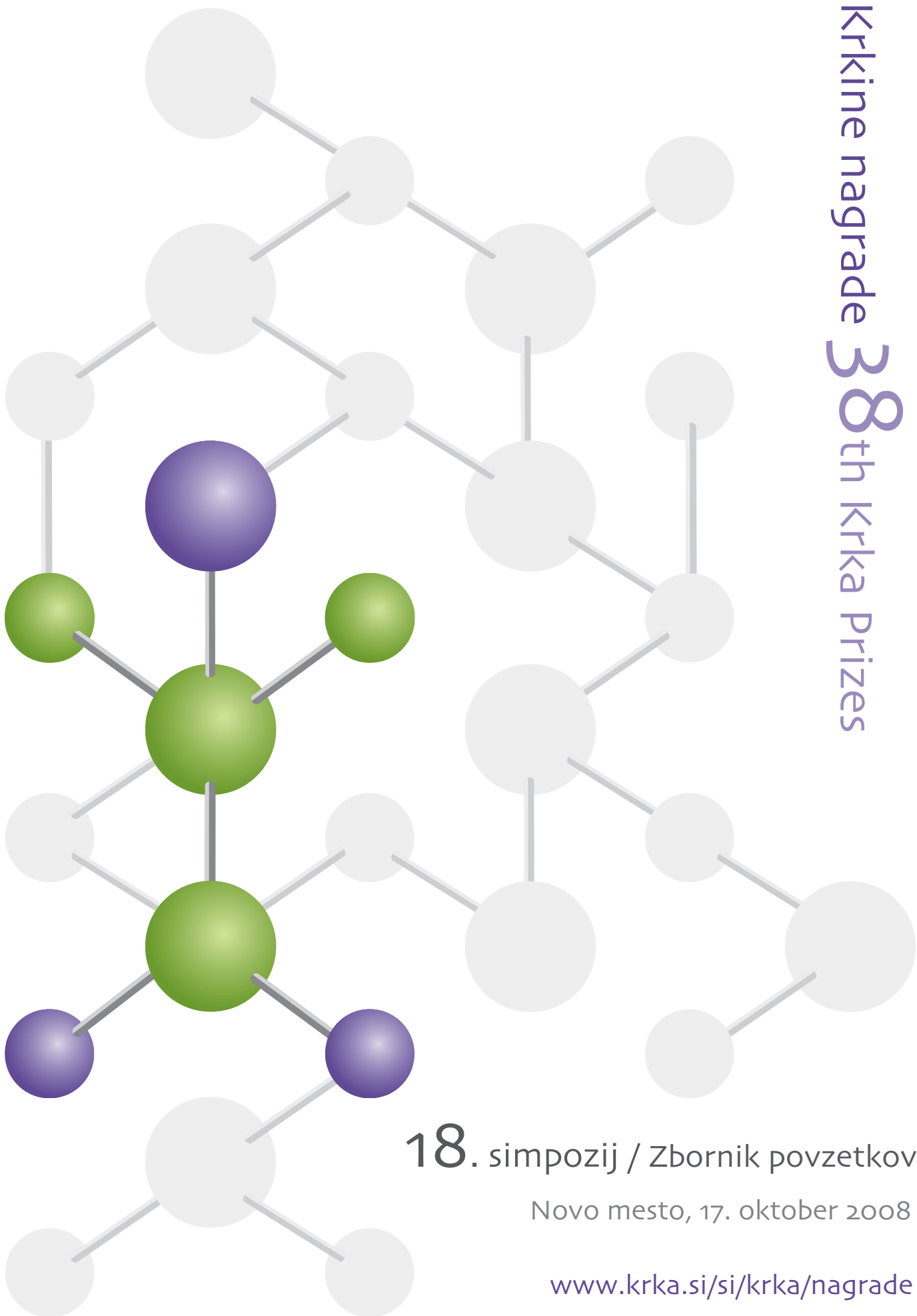


38. Krkine nagrade 38th Krka Prizes

18. simpozij / Zbornik povzetkov

Novo mesto, 17. oktober 2008

www.krka.si/si/krka/nagrade



Častni odbor 38. Krkinih nagrad

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke, predsednik
Akad. prof. dr. Jože Trontelj, 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: Duša Oblak Božič
izr. prof. dr. Franc Vrečer
dr. Aleš Gašparič
dr. Silvo Zupančič
doc. dr. Vida Škrabanja

Projekt E-Krkine nagrade: dr. Aleš Hvala

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

Recenzenti

mag. Borut Anžič, dr. Jože Arh, dr. Breda Barbič Žagar, mag. Neda Benički Švagelj, dr. Primož Benkič, dr. David Bevk, mag. Marko Boh, dr. Sergeja Bombek, mag. Marjanca Breznik, dr. Nina Cimerman, dr. Aleš Curk, dr. Irena Čarman, mag. Lidia Černoša, dr. Katarina Dobrovoljc, dr. Boris Dular, dr. Marko Fajdiga, mag. Branko Filipovič, Maja Florjanič, dr. Aleš Gasparič, Marko Glavač, dr. Ivan Gobec, mag. Mojca Golob, Dori Silvija Gorenc, dr. Marija Grčman, mag. Miran Hvalec, dr. Špelca Jenko Brinovec, dr. Davor Kidemet, mag. Iztok Klobčar, dr. Jože Korbar, dr. Jernej Kos, mag. Andrejka Kramar, dr. Zdenka Kranjc Gregorčič, dr. Roman Lenaršič, dr. Alenka Leskovar, Simon Makuc, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateović Rojnik, dr. Marjo Merslavič, mag. Mirjam Milharčič Simčič, dr. Anita Mlakar, dr. Urša Mohar, mag. Damjan Možina, mag. Tamara Nemec, mag. Danica Novak Malnar, dr. Renata Osolnik, mag. Vesna Pahor, mag. Virginija Pava Kelher, dr. Viljem Pavli, dr. Anica Pečavar, mag. Tatjana Pečnik, Mitja Pelko, dr. Robert Pišek, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, dr. Miha Plevnik, mag. Vladimir Pokorny, mag. Ivan Radež, dr. Marjeta Redek, Miloš Ružič, dr. Gregor Sedmak, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, dr. Janez Smodiš, dr. Polona Smrkolj, Matej Stergar, Tadej Stropnik, dr. Leon Ščuka, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Mojca Štaudohar Kozjan, dr. Matejka Štempelj, dr. Anton Štimac, dr. Jaroslav Tihi, Sandra Turk, mag. Robert Učman, dr. Miha Vrbinc, dr. Tomaž Vrbinc, izr. prof. dr. Franc Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Natalija Zajc, mag. Stanislav Zalar, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, dr. Rok Zupet

VSEBINA / CONTENTS

38. Krkine nagrade / 38th Krka Prizes

Uvodne besede / Introductory words

dr. Aleš Rotar, predsednik Sveta sklada Krkinih nagrad / President of the Krka Prizes Foundation 11

Krkini nagrajenci 2008 / Krka Prize Winners 2008 13

18. simpozij / 18th Symposium Zbornik povzetkov / Book of Abstracts

Uvod / Introduction

izr. prof. dr. Franc Vrečer, predsednik Znanstvenega odbora / President of the Scientific Board 19

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

Predstavitev nagrajencev / Presentation of prizewinners

NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN Z DUALNIM MEHANIZMOM
DELOVANJA

DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL ANTITHROMBOTICS WITH DUAL MECHANISM OF ACTION

Janez Ilaš

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 23

RAZVOJ NANOSISTEMOV ZA POVEČANJE HITROSTI RAZTAPLJANJA TEŽKO TOPNIH UČINKOVIN IN AKTIVNO
CILJANJE TUMORSKIH CELIC

DEVELOPMENT OF NANOSYSTEMS FOR ENHANCING DISSOLUTION RATE OF POORLY SOLUBLE DRUGS AND
ACTIVE TARGETING OF TUMOUR CELLS

Petra Kocbek

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 28

OPTIMIZACIJA IZDELAVE PELET Z LANSOPRAZOLOM S TERMOPLASTIČNIM PELETIRANJEM V HITREM
MEŠALNIKU

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF LANSOPRAZOLE PELLETS BY THERMOPLASTIC PELLETIZATION IN
A HIGH SHEAR MIXER

Vesna Krošelj

Krka, d.d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 34

NOVI KIRALNI LIGANDI ZA ASIMETRIČNE REDUKCIJE

NEW CHIRAL LIGANDS FOR ASYMMETRIC REDUCTIONS

Damjan Šterk

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija 38

α,β -NENASIČENE- α -AMINOKISLINE V SINTEZI NEKATERIH NARAVNIH SPOJIN IN NJIHOVIH ANALOGOV
 α,β -UNSATURATED- α -AMINO ACIDS IN THE SYNTHESIS OF SOME NATURAL COMPOUNDS AND THEIR
ANALOGUES

Jernej Waggener

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani 43



Krkine nagrade / Krka Prize

Povzetki / Abstracts

NAČRTOVANJE IN SINTEZA MIMETIKOV PREKURZORJEV PEPTIDOGLIKANA
DESIGN AND SYNTHESIS OF THE PEPTIDOGLYCAN PRECURSOR MIMETICS

Andrej Babič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

51

AVTOMATSKA VIZUALNA KONTROLA KAKOVOSTI TABLET IN KAPSUL
AUTOMATED VISUAL INSPECTION OF TABLETS AND CAPSULES

Marko Bukovec

Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

52

OPTIČNI SENZORJI ZA KONTINUIRANO SPREMLJANJE OGLJIKOVEGA DIOKSIDA
OPTICAL SENSORS FOR CONTINUOUS CARBON DIOXIDE MONITORING

Merima Čajlaković

Inštitut za kemijo, Karl Franzens Universität Graz

53

NOVI DEJAVNIKI TVEGANJA TER FUNKCIJSKE IN MORFOLOŠKE SPREMEMBE ARTERIJSKE STENE PRI
MLAJŠIH KORONARNIH BOLNIKI
NOVEL RISK FACTORS AND FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE ARTERIAL WALL IN
YOUNG CORONARY PATIENTS

Barbara Eržen

Klinični oddelek za žilne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana

54

VPLIV STRUKTURNIH SPREMENB PRIONSKEGA PROTEINA NA INFEKTIVNOST IN VEZAVO SPECIFIČNIH
REAGENTOV
INFLUENCE OF PRION PROTEIN STRUCTURAL CHANGE ON INFECTIVITY AND BINDING OF SPECIFIC
REAGENTS

Iva Hafner Bratkovič

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

55

DOLOČEVANJE IZBRANIH TERPENSKIH IN FENOLNIH SPOJIN V RASTLINSKIH EKSTRAKTIH S PLINSKO
KROMATOGRAFIJO IN MASNO SPEKTROMETRIJO
DETERMINATION OF SELECTED TERPENIC AND PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT EXTRACTS BY GAS
CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

Maša Islamčević Razboršek

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

56

TERMODINAMIČNE LASTNOSTI VODNIH RAZTOPIN IZOTAKTIČNE POLIMETAKRILNE KISLINE
THERMODYNAMIC PROPERTIES OF ISOTACTIC POLY(METHACRYLIC ACID) IN AQUEOUS SOLUTIONS

Boštjan Jerman

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

57

NAČRTOVANJE REŽIMOV ODMERJANJA VARFARINA, RISPERIDONA IN HALOPERIDOLA Z METODAMI
KLINIČNE FARMAKOKINETIKE
CLINICAL PHARMACOKINETICS OF WARFARIN, RISPERIDONE, AND HALOPERIDOLE: IMPLICATIONS FOR
DOSING REGIMEN DESIGN

Igor Locatelli

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

58

GENETSKI BIOOZNAČEVALCI PRI HUNTINGTONOVI BOLEZNI
GENETIC BIOMARKERS FOR HUNTINGTON'S DISEASE

Luca Lovrečič

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

59

RAZVOJ IN UPORABA ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE LIZOFSFATIDNE KISLINE (LPA) KOT
OZNAČEVALCA TUMORJA V JAJČNIKU
DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF LYSOPHOSPHATIDIC
ACID AS A BIOMARKER FOR OVARIAN TUMOURS

Marija Meleh

Krka, d.d., Novo mesto, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

60

VLOGA PROTEINA AIRE PRI PODALJŠEVANJU PREPISOVANJA GENOV V EPITELIJSKIH CELICAH TIMUSNE SREDICE ROLE OF AIRE IN TRANSCRIPTIONAL ELONGATION OF GENES IN MEDULLARY THYMIC EPITHELIAL CELLS Irena Oven Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani	61
STEREOSELEKTIVNE IN REGIOSELEKTIVNE SINTEZE BICIKLIČNIH PIRAZOLIDINONOV STEREOSELECTIVE AND REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF BICYCLIC PYRAZOLIDINONES Lidija Pezdirc Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	62
VPLIV REAKCIJSKIH POGOJEV NA TRANSFORMACIJE ORGANSKIH MOLEKUL Z N-HALOGENO REAGENTI THE EFFECT OF REACTION CONDITIONS ON THE FUNCTIONALISATION OF ORGANIC MOLECULES WITH N-X REAGENTS Igor Pravst Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani	63
KARAKTERIZACIJA MIKOCIPINOV IZBRANIH VRST PROSTOTROSNIC Z GENSKIM IN PROTEINSKIM INŽENIRSTVOM CHARACTERIZATION OF MYCOCYPINS FROM SELECTED BASIDIOMYCETE SPECIES USING GENETIC AND PROTEIN ENGINEERING Jerica Sabotič Institut Jožef Stefan, Ljubljana	64
ENCIMSKA SINTEZA ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN V ORGANSKIH TOPILIH IN V SUPERKRITIČNEM OGLJIKOVEM DIOKSIDU ENZYMATIC SYNTHESIS OF FATTY ACID ESTERS IN ORGANIC SOLVENTS AND IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE Saša Šabeder Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru	65
MOLEKULARNA ANALIZA GENOV SEROTONINSKE SIGNALNE POTI IN SAMOMOR V SLOVENIJI MOLECULAR ANALYSIS OF THE GENES OF SEROTONERGIC PATHWAY AND SUICIDE IN SLOVENIA Alja Videtič Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani	66
NEVTRALIZACIJA ENDOTOKSINA Z NOVIMI ANTIMIKROBNIMI UČINKOVINAMI NEUTRALIZATION OF ENDOTOXIN BY NOVEL ANTIMICROBIAL SUBSTANCES Mateja Zorko Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija	67
VPLIV SESTAVIN NA TERMIČNE LASTNOSTI SLADKORNIH TALIN THE INFLUENCE OF INGREDIENTS ON THERMAL BEHAVIOUR OF SUGAR HOT MELTS Zdenka Rajtman Krka, d.d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	68
VPLIV SOCIALNO-DEMOGRAFSKIH ZNAČILNOSTI IN ZDRAVSTVENEGA STANJA POPULACIJE NA UPORABO ZDRAVIL RASTLINSKEGA IZVORA V SLOVENIJI THE INFLUENCE OF SOCIO-DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND HEALTH STATUS OF THE POPULATION ON THE USE OF HERBAL MEDICINES IN SLOVENIA Barbara Razinger Mihovec Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	69
SINTEZA ANALOGOV SUBSTRATA MUREIN PEPTIDNE LIGAZE (Mpl) SYNTHESIS OF SUBSTRATE ANALOGS OF MUREIN PEPTIDE LIGASE (Mpl) Martin Banovec Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	70
DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI SEVA <i>Bacillus subtilis</i> IN UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI TOKSINOV DETERMINATION OF GENETIC STABILITY OF <i>Bacillus subtilis</i> STRAIN AND DETECTION OF TOXINS Peter Hančič Krka, d.d., Novo mesto	71

IZOLACIJA FOSFOLIPIDOV IZ ŽIVALSKIH IN RASTLINSKIH MATERIALOV
ISOLATION OF PHOSPHOLIPIDS FROM ANIMAL AND PLANT MATERIALS

Maša Knez

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

72

ČIŠČENJE ODPADNIH VOD FARMACEVTSKE INDUSTRIJE S TEHNOLOGIJO MEMBRANSKE FILTRACIJE
TREATMENT OF INDUSTRIAL PHARMACEUTICAL WASTEWATER WITH MEMBRANE FILTRATION

Teja Kump

Visoka šola za zdravstvo, Univerza v Ljubljani

73

ZAHTEV IN REGULATIVA V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI TER PRIMERJAVA EVROPSKEGA IN AMERIŠKEGA
SISTEMA DOBRE PROIZVODNE PRAKSE
REQUIREMENTS AND REGULATION IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND COMPARISON OF
EUROPEAN SYSTEM OF GOOD MANUFACTURING PRACTICE WITH AMERICAN ONE

Urška Pate

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

74

ŠTUDIJ INTERAKCIJ KATIONOV Z DNA APTAMEROM TROMBINA
STUDIES OF CATION INTERACTIONS WITH DNA APTAMER OF THROMBIN

Marko Trajkovski

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

75

UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKEGA IN PROTIGLIVNEGA DELOVANJA RDEČEGA PIGMENTA BAKTERIJE
Vibrio sp. DSM14379

ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF A RED PIGMENT PRODUCED BY *Vibrio* sp. DSM14379

Tadeja Ambrožič, Teja Banič, Maja Štangelj

Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma

76

LEPO ZA OKO, DOBRO ZA TELO?

IS NICE TO THE EYE ALSO GOOD FOR THE BODY?

Anja Bregar, Urška Bobnar

Gimnazija Novo mesto

77

GROZDNE PEČKE, VIR ZDRAVJA IN LEPOTE

GRAPE SEEDS, SOURCE OF HEALTH AND BEAUTY

Lea Lenart, Neža Rangus, Nataša Žigante

Gimnazija Novo mesto

78

ANALIZA PROIZVODNJE IN UČINKOVITOSTI V TOVARNI KRKA, D.D.

ANALYSIS OF WORK AND PRODUCTION LINE EFFICIENCY IN KRKA, D.D.

Matjaž Lovše, David Vidmar

Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

79

E - Krkine nagrade / e - Krka Prize Winners

PROUČEVANJE LASTNOSTI TABLET, IZDELANIH S KAPILARNO ABSORPCIJO RAZTOPINE KETOPROFENA ALI
HIDROKLOTIAZIDA
STUDY OF TABLETS, MADE WITH CAPILLAR ABSORPTION OF KETOPROFEN OR HYDROCHLOROTHIAZIDE
SOLUTION

Anja Ivanovič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

83

NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE PLAVAJOČIH TABLET NA OSNOVI KSANTANA
DESIGNING, FORMULATION AND EVALUATION OF FLOATING TABLETS BASED ON XANTHAN GUM

Urban Krajnc

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

84

VEZANJE KATIONSKEH ANTIBIOTIKOV NA LASNICO DNA Z VEZNIM MESTOM AAAAA
BINDING OF CATIONIC ANTIBIOTICS TO THE DNA HAIRPIN WITH AAAAA BINDING SITE

Ana Kunej

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

85

VPLIV KRITIČNIH PARAMETROV PRI VZORČENJU S POVRŠINE IN DOLOČEVANJE UČINKOVINE S
TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO
THE INFLUENCE OF CRITICAL PARAMETERS ON SAMPLING FROM SURFACE AND DETERMINATION OF THE
DRUG CONTENT BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Marko Lukšič

Krka, d.d., Novo mesto

86

PRIVLAČNE SILE MED DELCI PRAŠKASTIH SUBSTANC
ATTRACTIVE FORCES BETWEEN POWDER PARTICLES

Mateja Ravnikar

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

87

SELENOVE SPOJINE V NAVADNI AJDI (*Fagopyrum Esculentum* Moench), OBOGATENI S SELENOM
SELENIUM SPECIES IN SELENIUM ENRICHED COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum Esculentum* Moench)

Maja Vogrinčič

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

88

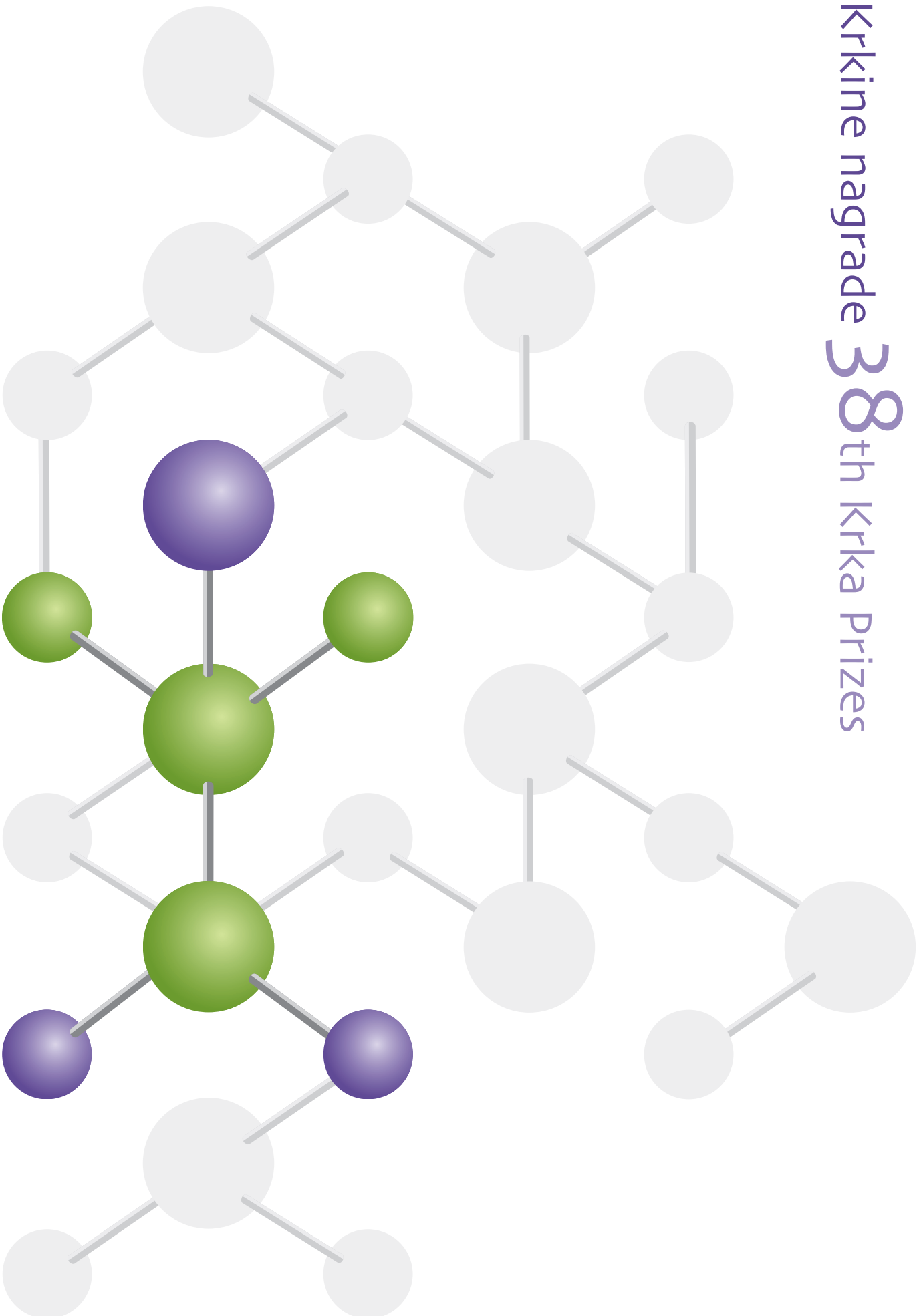
Seznam avtorjev / Author Index

90

Seznam mentorjev / Supervisor Index

91

38. krkine nagrade 38th Krka Prizes



Mnogokrat se sprašujemo, kaj nas vodi v uspešno prihodnost. Čeprav je na to vprašanje veliko zelo različnih odgovorov, pa je vsekakor najpogostejši: znanje in sposobnosti. Danes je povsod prisotna zavest o tem, da le znanje in trdo delo tlakujeta pot k uspehu. V obdobju, ko novi izdelki in tehnologije omogočajo skokovit in hiter napredek, pa je pomembno poudariti tudi sposobnost hitrega učenja in prilaganja. Bolj kot kadarkoli v preteklosti, je pomembno, da se pogosto in odgovorno sprašujemo, ali hodimo v pravi smeri, ali naše hipoteze držijo, ali je področje našega dela ustrezno ali je cilj resnično pravi. Uspehe pri raziskovalnem delu zato omogoča kombinacija mladosti in zagnanosti ter izkušenj in razsodnosti. Prav zaradi tega smo tudi letos, ob podelitvi 38. Krkinih nagrad veseli, da so prijavljene raziskovalne naloge potrdile to zmagovito kombinacijo. Z veseljem ugotavljamo, da smo na pravi poti. Prepričani pa smo, da so tudi letošnje Krkine nagrade potrditev vsem, tako raziskovalcem kot mentorjem, da bomo vztrajali na poti znanja in uspehov.



Dr. Aleš Rotar
Predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad



We often wonder what leads us towards a successful future. There are of course many answers to this question, but the most common one is knowledge and competence. In the modern world we are increasingly aware that only knowledge and hard work pave the road to success. In an era where new products and technologies allow saltatory and swift progress, one must be capable of rapid learning and adaptation. Now more than ever, it is important to ask oneself often, and with great responsibility, is one headed in the right direction, do one's hypotheses hold, is the field of one's work correct, and is one's goal the right one. Success in research is made possible by conditioned by a mixture of youth, enthusiasm, experience and sound judgment. Because of this we are thrilled that at this year's 38th Krka awards ceremony the winners corroborate this winning combination. We are on the right path. We are convinced that this year's Krka awards ensure all, researchers and their mentors, that we shall continue on the path of knowledge and success.



Dr. Aleš Rotar
President of the Krka Awards Council



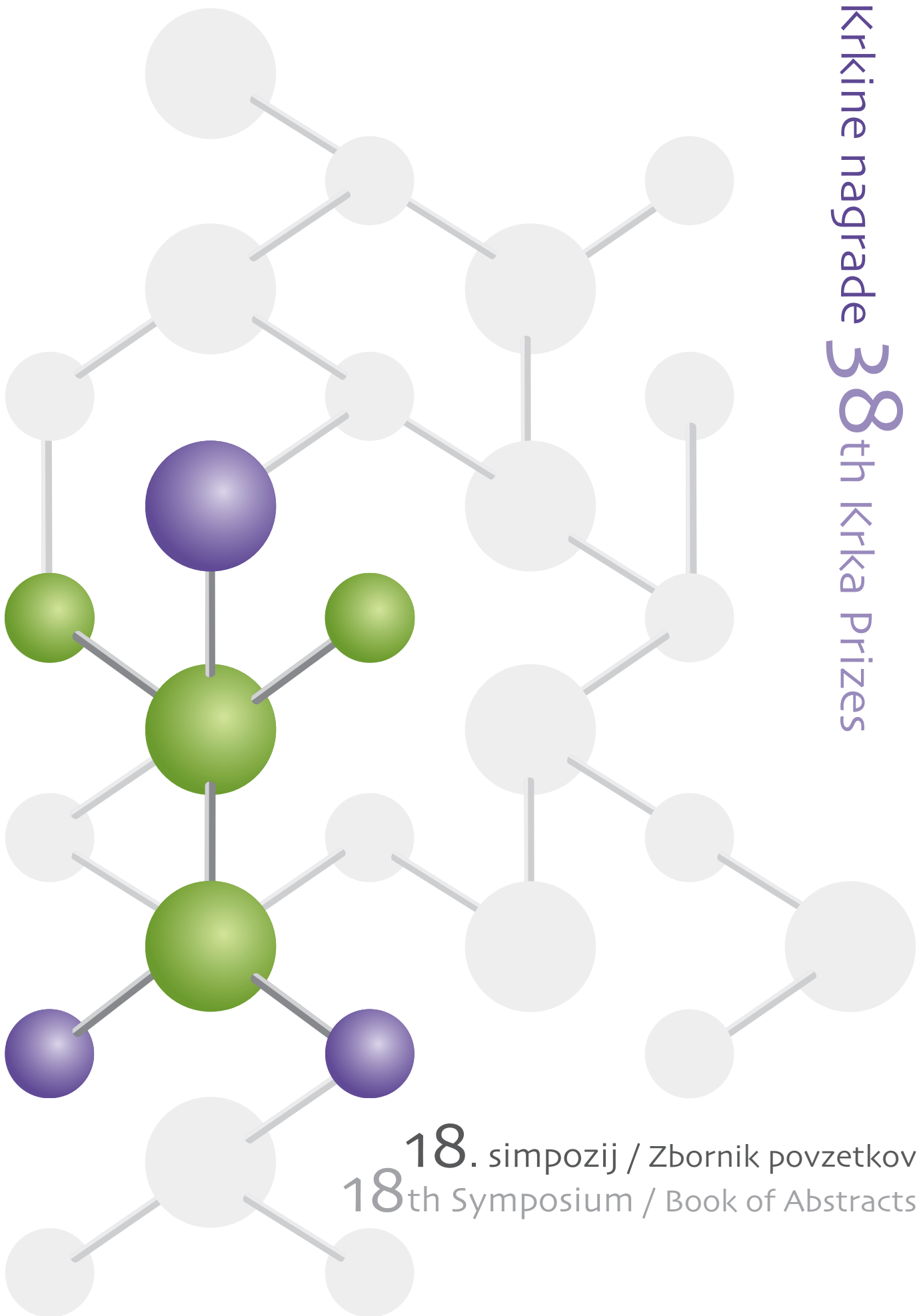
KRKINI NAGRAJENCI 2008 / KRKA PRIZE WINNERS 2008

Št.	Nagrajenci	Status	Mentor / Somentor(ji)
2190	Tadeja Ambrožič	dijakinja	Irena Kurajič Jana Goršin Fabjan Nejc Starič
2191	Andrej Babič	doktor znanosti s področja farmacije	Slavko Pečar
2192	Teja Banič	dijakinja	Irena Kurajič Jana Goršin Fabjan Nejc Starič
2193	Martin Banovec	magister farmacije	Stanislav Gobec Andreja Kovač
2194	Urška Bobnar	dijakinja	Marinka Kovač
2195	Anja Bregar	dijakinja	Marinka Kovač
2196	Marko Bukovec	doktor znanosti s področja elektrotehnike	Franjo Pernuš
2197	Merima Čajlaković	doktorica znanosti s področja kemije	Volker Ribitsch
2198	Barbara Eržen	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Pavel Poredoš
2199	Iva Hafner Bratkovič	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Roman Jerala
2200	Peter Hančič	magister farmacije	Janko Kos Andreja Plaper
2201	Janez Ilaš	doktor znanosti s področja farmacije	Danijel Kikelj
2202	Maša Islamčević Razboršek	doktorica znanosti s področja kemije	Darinka Brodnjak Vončina Valter Doleček
2203	Anja Ivanovič	magistrica farmacije	Odon Planinšek
2204	Boštjan Jerman	doktor znanosti s področja kemije	Ksenija Kogej
2205	Maša Knez	univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije	Mojca Škerget Jurij Krobe
2206	Petra Kocbek	doktorica znanosti s področja farmacije	Julijana Kristl
2207	Urban Krajnc	magister farmacije	Saša Baumgartner
2208	Vesna Krošelj	doktorica znanosti s področja farmacije	Franc Vrečer
2209	Teja Kump	diplomirana sanitarna inženirka	Nevenka Ferfila Irena Čarman

Št.	Nagrajenci	Status	Mentor / Somentor(ji)
2210	Ana Kunej	univerzitetna diplomirana kemičarka	Jurij Lah
2211	Lea Lenart	dijakinja	Stanka Florijančič Ana Rangus
2212	Igor Locatelli	doktor znanosti s področja farmacije	Iztok Grabnar
2213	Luca Lovrečič	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Borut Peterlin Dimitri Krainc
2214	Matjaž Lovše	dijak	Uroš Nosan Andrej Petkovič
2215	Marko Lukšič	diplomirani inženir kemijske tehnologije	Darinka Brodnjak Vončina Martina Rozman
2216	Marija Meleh	doktorica znanosti s področja kemije	Lucija Zupančič Kralj Anita Mlakar
2217	Irena Oven	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Mojca Narat Matija Peterlin
2218	Urška Pate	magistrica farmacije	Stane Srčič Mateja Vrečer
2219	Lidija Pezdirc	doktorica znanosti s področja kemije	Jurij Svete
2220	Igor Pravst	doktor znanosti s področja kemije	Marko Zupan Stojan Stavber
2221	Zdenka Rajtman	magistrica znanosti s področja farmacije	Stane Srčič
2222	Neža Rangus	dijakinja	Stanka Florijančič Ana Rangus
2223	Mateja Ravnikar	študentka	Rok Šibanc
2224	Barbara Razinger Mihovec	magistrica znanosti s področja farmacije	Metoda Lipnik Štangelj Aleš Krbavčič
2225	Jerica Sabotič	doktorica znanosti s področja biotehnologije	Borut Štrukelj Jože Brzin
2226	Saša Šabeder	doktorica znanosti s področja kemije	Maja Habulin Željko Knez
2227	Maja Štangelj	dijakinja	Irena Kurajič Jana Goršin Fabjan Nejc Starič
2228	Damjan Šterk	doktor znanosti s področja kemije	Boris Šket Barbara Mohar
2229	Marko Trajkovski	diplomirani biokemik	Primož Šket Janez Plavec

Št.	Nagrajenci	Status	Mentor / Somentor(ji)
 2230	Alja Videtič	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Martina Tomori Radovan Komel
 2231	David Vidmar	dijak	Uroš Nosan Andrej Petkovič
 2232	Maja Vogrinčič	univerzitetna diplomirana inženirka agronomije	Vekoslava Stibilj Ivan Kreft
 2233	Jernej Wagger	doktor znanosti s področja kemije	Branko Stanovnik
 2234	Mateja Zorko	doktorica znanosti s področja farmacije	Primož Pristovšek
 2235	Nataša Žigante	dijakinja	Stanka Florijančič Ana Rangus

38. krkine nagrade 38th Krka Prizes



18. simpozij / Zbornik povzetkov
18th Symposium / Book of Abstracts

»Za vsakim napredkom človeštva se skriva kal rasti v duši kakega osamljenega posameznika. Posameznika, ki so ga zbujale sanje sredi noči, ko so drugi mirno spali.«

Crawford H. Greenewalt

Razvoj znanstvenih dognanj na področjih medicine, kemije, biokemije, farmacije in drugih ved, pomembnih za zagotavljanje in izboljševanje zdravja prebivalstva, pred raziskovalce postavlja vedno nove izzive. Dodatno spodbudo raziskavam pa dajejo tudi nova spoznanja na področju zagotavljanja kakovostne, varne in učinkovite farmakoterapije, ki se odražajo tudi v spremembah regulativnih zahtev za zdravila.

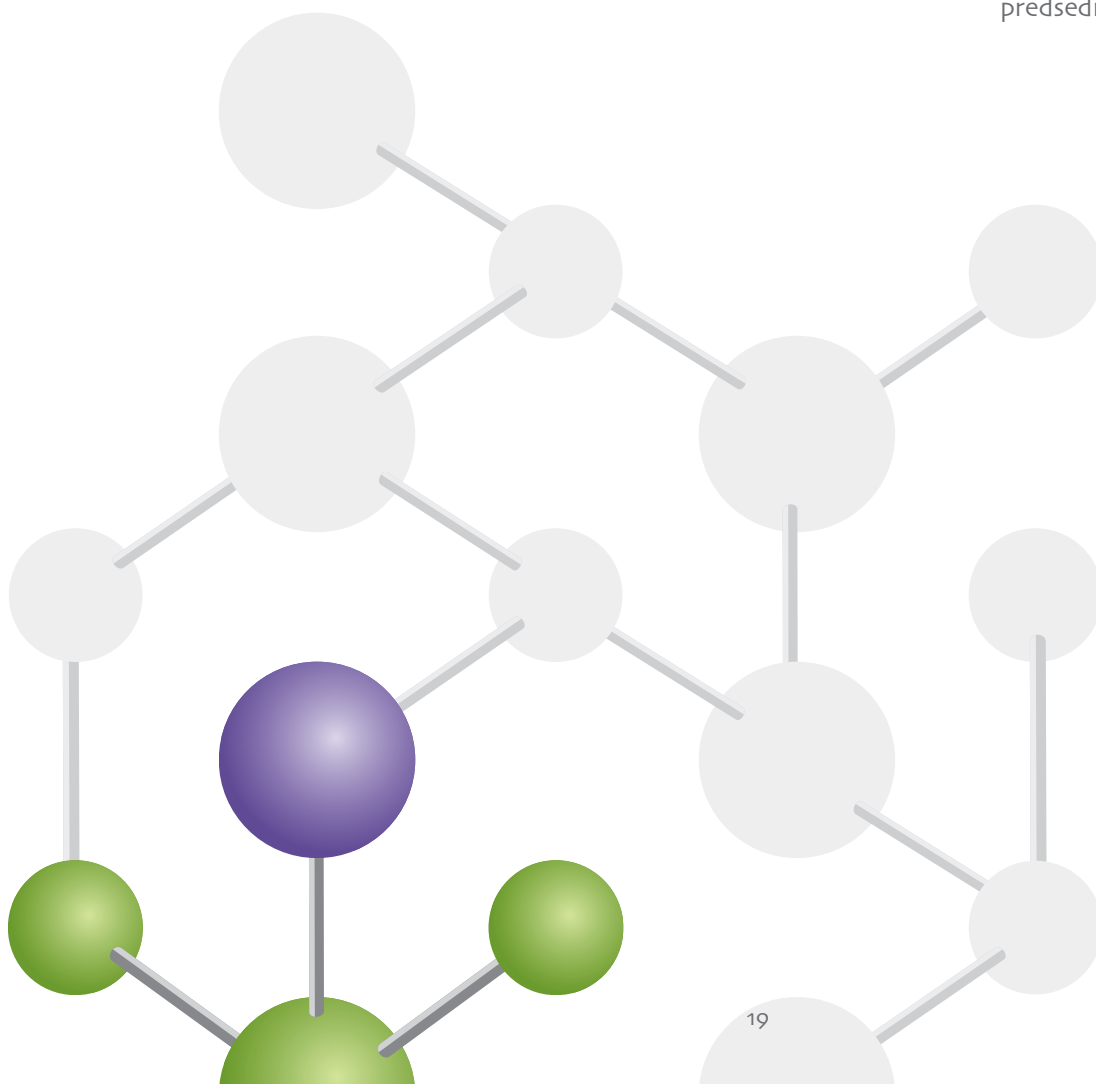
Naloge, prispеле na letošnji razpis za Krkine nagrade, so tako po znanstveni kot strokovni vrednosti zelo kakovostne in pokrivajo celoten spekter področij od raziskav novih tarč za terapijo, kemijskih in biotehnoloških procesov, razvoja in optimizacije dostavnih sistemov in farmacevtskih oblik, analiznega vrednotenja in zagotavljanja kakovosti, ekologije ter trženja.

Ključnega pomena za uspešne raziskovalne rezultate tako po raziskovalni, inovacijski kot uporabni vrednosti pa so ljudje, tako mladi raziskovalci kot izkušeni mentorji, ter njihova povezovanje in sodelovanje v interdisciplinarnih raziskovalnih timih.

S Krkinimi nagradami želimo nagraditi uspešne raziskovalce za njihove raziskovalne naloge, izdelane na različnih izobraževalnih stopnjah – od srednješolcev do študentov dodiplomskih in podiplomskih študijskih programov – in jih postaviti za zgled mladim, ki na raziskovalna pota šele vstopajo oz. so še na začetku svoje znanstveno-raziskovalne poti, da je mogoče z zagnanim delom, dobrim interdisciplinarnim povezovanjem z drugimi raziskovalci in seveda s sodelovanjem z izkušenimi mentorji doseči velika dognanja, ki bodo v dobrobit družbi.



izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.
predsednik Znanstvenega odbora



»Behind every advance of the human race is a germ of creation growing in the mind of some lone individual. An individual whose dreams waken him or her in the night while others lie contently asleep.«

Crawford H. Greenewalt

The development of scientific knowledge in the fields of medicine, chemistry, biochemistry, pharmacy and other sciences fundamental to ensuring and improving public health presents constant challenges to researchers. Research is additionally stimulated by new findings relating to the assurance of safe, quality and effective pharmacotherapy, which are also reflected in changes of regulatory requirements for medicinal products.

The quality of this year's papers sent in for Krka awards is admirably high from both the scientific and professional point of view. The papers cover a very wide range of areas, including research of new therapeutic targets, chemical and biotechnological processes, development and optimisation of delivery systems and pharmaceutical forms, analytical evaluation and quality assurance, ecology and marketing.

Successful research results producing innovative and useful information are credited to people, i.e. young researchers and their experienced mentors, as well as to their cooperation in interdisciplinary research teams.

Krka awards are designed to recognise and reward successful researchers for their work and research papers prepared at various educational levels (from high school to under-graduate and post-graduate levels). The recipients of these awards set an example for young researchers who are about to start their research projects or are at the beginning of their scientific-research career and show them that by hard work, good interdisciplinary cooperation with other researchers and good communication with experienced mentors, it is possible to make notable progress in scientific findings that will benefit the society.



Assoc. Prof. Franc Vrečer, Ph. D., M. Pharm.
President of the Scientific Committee



Krkeine nagrade za posebne dosežke na področju raziskovalnega dela

Krka Prizes for Special Achievements in Research

Predstavitev nagrajencev
Presentation of prizewinners





Dr. Janez Ilaš

Veliko zanimanje za naravoslovje je dr. Janez Ilaš pokazal že v gimnazijskih letih, ko je obiskoval Gimnazijo Novo mesto. »Pomemben navdih in tudi pomoč pri mojem raziskovalnem delu sta mi v času srednje šole nudili zelo dobri profesorici kemije Marinka Kovač in Zora Torbica. Udeleževal sem se kemijskih tekmovanj za Preglovo nagrado, pripravil pa sem tudi dve raziskovalni nalogi ter prejel pet Preglovih nagrad,« se svojih začetkov spominja mladi doktor znanosti, ki je zaposlen kot asistent na Fakulteti za farmacijo. »Na raziskovalni poti me navdihuje predvsem to, da probleme, ki obstajajo, skušam razrešiti. Želim spoznavati še neraziskane stvari.«

V doktoratu se je ukvarjal z odkrivanjem novih učinkovin za zdravljenje bolezni krvožilja, ki so trenutno v razvitem svetu najpogostejši vzrok smrtnosti. »Z ustrezno terapijo lahko življenjsko dobo takih bolnikov podaljšamo. Pri doktorski temi sem raziskoval, kako v eni učinkovini združiti terapevtsko delovanje na dve tarči. Gre za nov pristop, v katerem sem uspel pripraviti nove spojine, ki so izkazovale dobro in uravnoteženo delovanje na encim trombin in fibrinogeni receptor. To sicer še niso spojine, ki bi bile dobri kandidati za klinično testiranje, najpomembneje pri tem je, da sem dosegel razumevanje principa hkratnega delovanja, kar je nujen pogoj za nadaljnje delo na tem področju. Zadovoljen sem, da so kakovostno delo opazili tudi drugi in ga nagradili s Krkino nagrado. Seveda pa gre velika zahvala predvsem mojemu mentorju prof. dr. Danijelu Kiklju za vso podporo in spodbudo pri opravljanju doktorske disertacije.«

Tudi v prihodnje mlademu raziskovalcu izzivov ne bo zmanjkalo, saj je v svoji doktorski nalogi odkrival povsem novo področje, na katerem se bo, kot pravi, lahko še marsikaj naredilo. »Ko v nečem najdem izziv, se s tem notranje poistovetim in trdo delam, da pridem do rešitve.« Ker je delavnost poleg poštenosti in etičnosti med glavnimi vrednotami v njegovem življenju, mu prostega časa ne preostane prav veliko. »Večji del dneva sicer preživim na fakulteti, prosti čas pa, kolikor je le mogoče, izkoristim za športne aktivnosti.«

NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN Z DUALNIM MEHANIZMOM DELOVANJA

J. Ilaš

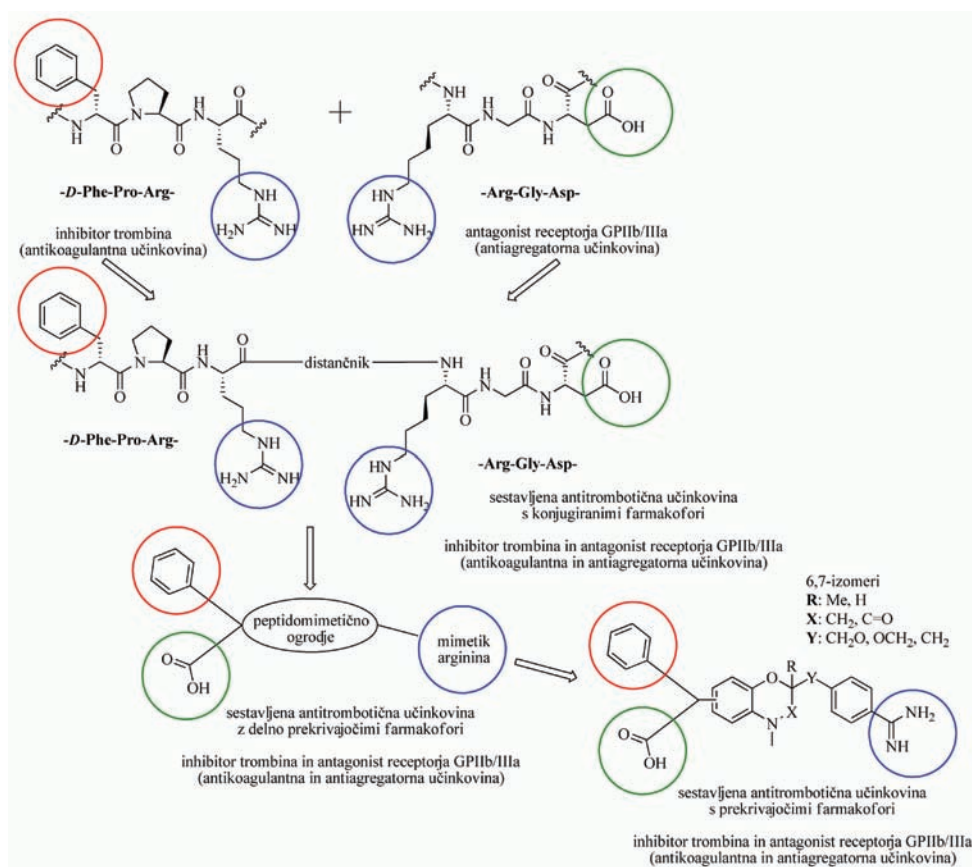
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: D. Kikelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

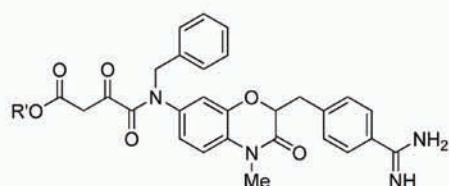
Srčnožilne bolezni, med katere uvrščamo koronarno bolezen (vključno s srčnim infarktom), srčnožilne motnje, bolezni perifernih arterij, globoko vensko trombozo in pljučni embolizem, so glavni vzrok smrti v razvitih državah, s spreminjajočim se življenjskim slogom pa se pojavljajo kot pomemben vzrok smrti tudi v razvijajočih se državah. Proces hemostaze ima ključno vlogo pri ohranjanju integritete žilnega sistema. Neustrezno delovanje trombocitov in nepravilnosti v poteku koagulacije krvi kot ključnih procesov hemostaze pogosto vodijo do srčnožilnih zapletov. Zato poteka stalen razvoj novih antitrombotičnih učinkovin, ki bi omogočale učinkovitejše zdravljenje z manj stranskimi učinki.

V okviru doktorske disertacije smo s kombinacijo antiagregatornega in antikoagulantnega delovanja v dvojnih inhibitorjih procesa hemostaze predstavili nov pristop k antitrombotičnemu zdravljenju, ki temelji na združevanju farmakoforov inhibitorjev trombina in antagonistov receptorja GPIIb/IIIa v eno molekulo. Aminokislinski sekvenci peptidnih spojin vodnic, t.j. Arg-Gly-Asp (RGD) sekvenco za antagoniste receptorja GPIIb/IIIa in *D*-Phe-Pro-Arg (fPR) sekvenco za inhibitorje trombina, smo združili v konjugat, prav tako pa smo pripravili tudi peptide z različno stopnjo prekritosti obeh farmakoforov.¹ V okviru peptidomimetičnega pristopa smo v načrtovane molekule potencialnih dvojnih antitrombotičnih učinkovin združevali mimetike obeh aminokislinskih zaporedij in na teh izhodiščih sintetizirali spojine z 1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onskim in 1,4-benzoksazinskim skeletom², na katerega smo uvedli benzamidinski in karboksilatni fragment preko različnih distančnikov. P₃ del smo optimizirali z uvedbo aromatskih skupin in derivatov karboksilnih skupin. Z encimsko amidolitično metodo smo določili inhibitorno delovanje na trombin, z metodo določanja inhibicije agregacije in modificiranim ELISA testom pa antagonistično delovanje na receptor GPIIb/IIIa.



Spojine z 1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onskim skeletom in z benzamidinsko skupino vezano na mestu 2 preko metilenskega distančnika so se izkazale kot močni in selektivni inhibitorji trombina.³ Kot najučinkovitejše dvojne antitrombotične spojine, ki zavirajo trombin in agregacijo trombocitov so se izkazale spojine z benzamidinsko skupino vezano na mestu 2 preko metiloksi distančnika in benzilaminsko skupino pripeto na mestu 6/7 1,4-benzoksazinskega skeleta. Te izkazujejo inhibitorno aktivnost na trombin in antagonistično aktivnost na receptor GPIIb/IIIa v submikromolarnem območju.⁴ V okviru doktorskega dela smo se v povezavi s pripravo ciljnih spojin ukvarjali tudi z novimi sintezni pristopi, pretvorbami in stabilnostjo spojin z 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onskim skeletom.^{5,6} Rezultati so predstavljeni v objavljenih člankih. Dejstvo, da smo tekom doktorskega študija sami izvajali vse faze od računalniškega načrtovanja dvojnih antitrombotičnih učinkovin do sinteze in biokemičnega vrednotenja, nam je omogočalo hitro in učinkovito upoštevanje doseženih rezultatov v nadaljnjih stopnjah načrtovanja dvojnih antitrombotičnih učinkovin. Na našem konceptu zasnovane antitrombotične učinkovine, ki v isti molekuli združujejo antikoagulacijsko in antiagregatorno delovanje, predstavljajo antitrombotične učinkovine prihodnosti, ki bi nadomestile obstoječe kombinacije antikoagulantnih in antiagregatornih učinkovin.

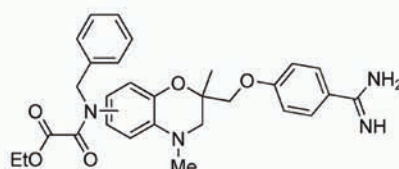
Selektivni inhibitorji trombina



R' = Me; $K_{i(trb)} = 3,4 \pm 1,8$ nM

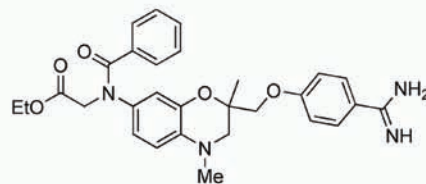
R' = H; $K_{i(trb)} = 2,6 \pm 0,7$ nM

Dualne antitrombotične učinkovine z inhibitornim delovanjem na trombin in antagonističnim delovanjem na receptor GPIIb/IIIa



6-izomer, $K_{i(trb)} = 0,38 \pm 0,11$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 1,45 \pm 0,91$ μ M

7-izomer, $K_{i(trb)} = 1,47 \pm 0,36$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 0,73 \pm 0,55$ μ M



7-izomer, $K_{i(trb)} = 0.156 \pm 0,023$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 1,78 \pm 0,58$ μ M

Reference

1. Ilaš, J.; Hudecz, F.; Süli-Vargha, H.; Kikelj, D. Peptides and pseudopeptides incorporating *D*-Phe-Pro-Arg and Arg-Gly-Asp lead sequences as potential antithrombotic agents. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 946-953.
2. Ilaš, J.; Štefanič, P.; Sollner Dolenc, M.; Kikelj, D. Recent advances in the synthesis of 2*H*-1,4-benzoxazin-3-(4*H*)-ones and 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazines. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348.
3. Ilaš, J.; Tomašić, T.; Kikelj, D. Novel potent and selective thrombin inhibitors based on a central 1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one scaffold. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2863-2867.
4. Ilaš, J.; Jakopin, Ž.; Borštnar, T.; Stegnar, M.; Kikelj, D. 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine Derivatives Combining Thrombin Inhibitory and Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonistic Activity as a Novel Class of Antithrombotic Compounds with Dual Function. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5617-5629.
5. Ilaš, J.; Lah, N.; Leban, I.; Kikelj, D. A pentacyclic condensation product from 2,4-dimethyl-7-nitro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine-2-carboxylic acid. *Tetrahedron lett.* **2008**, *49*, 225-228.
6. Ilaš, J.; Kikelj, D. Ring Opening of 2-(Benzylamino)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ones and 2-Bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ones. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 654-664.

DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL ANTITHROMBOTICS WITH DUAL MECHANISM OF ACTION

J. Ilaš

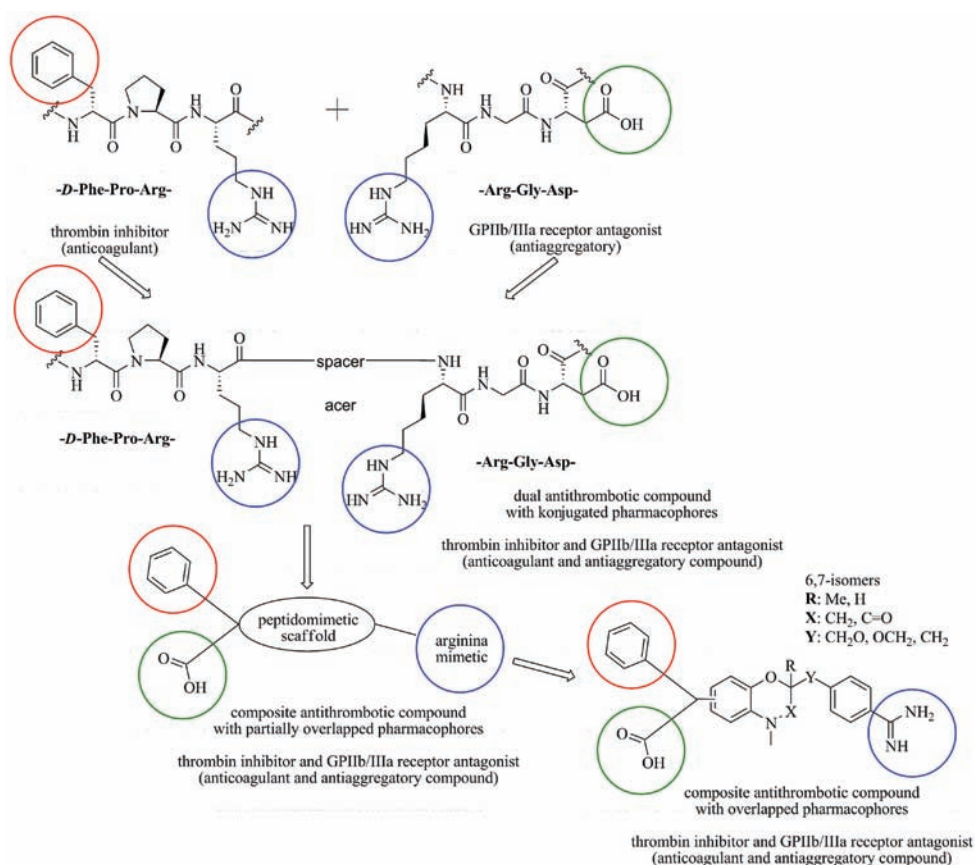
Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: D. Kikelj

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

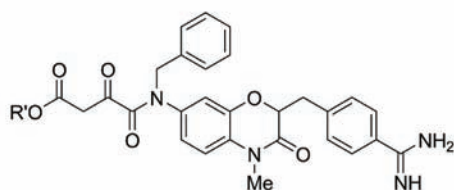
Cardiovascular diseases comprising coronary heart disease (including myocardial infarction), cerebrovascular disease, peripheral artery disease, deep vein thrombosis, pulmonary embolism and congenital heart disease are the main cause of death in developed countries. With a changing life style they are becoming important cause of death also in developing countries. Hemostasis plays an indispensable role in maintenance of vascular system integrity. However, the abnormalities in thrombocyte function and blood coagulation as the key hemostatic processes frequently lead to cardiovascular diseases. There is a growing need for new antithrombotic drugs that would provide more efficient therapy with fewer side effects.

In the doctoral thesis, we introduced a new approach to antithrombotic therapy by combining the pharmacophores of thrombin inhibitors and GPIIb/IIIa receptor antagonists in a single molecular entity. Amino acid sequences of the peptide leads, the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence for GPIIb/IIIa receptor antagonists and the *D*-Phe-Pro-Arg (fPR) sequence for thrombin inhibitors, were combined in a conjugate as well as in peptides with various degrees of pharmacophore overlapping.¹ Using a peptidomimetic approach, we combined also mimetics of RGD and fPR leads to designed dual antithrombotic compounds based on 2*H*-1,4-benzoxazine-3(4*H*)-one and 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine scaffolds². Benzamidine and carboxylate moieties were connected through various spacers to the central heterocyclic core. P₃ moiety was optimized with introduction of aromatic moieties and carboxylic acid moieties. Enzyme amidolytic method was used to determine inhibitory activity for thrombin. Inhibition of aggregation and modified ELISA test of inhibition of fibrinogen binding to the GPIIb/IIIa receptor were used to determine activity of tested compounds at GPIIb/IIIa receptor



Compounds with 2*H*-1,4-benzoxazine-3(4*H*)-one scaffold and benzamidine moiety connected through methylene spacer were found to be highly active and selective thrombin inhibitors.³ As the most potent dual inhibitors were found compounds having the benzamidine group attached at position 2 through methoxy spacer and benzylamine moiety attached at position 6 or 7 of the 1,4-benzoxazine scaffold. They possessed thrombin inhibitory activity and GPIIb/IIIa receptor antagonistic activity in submicromolar range.⁴ In the course of preparation of the target compounds, we also studied novel approaches to chemical synthesis, transformations and stability of 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ones.^{5,6} The results are presented in published articles. The fact, that we performed all phases of computer design of double antithrombotic compounds from synthesis to biochemical evaluation, allowed fast and efficient implementation of obtained result in the next cycle of design of double antithrombotic compounds. Antithrombotic compounds, based on our concept, which have combined anticoagulant and antiaggregatory activity, represent the antithrombotic compounds of future, which could substitute existing combinations of anticoagulant and antiaggregatory compounds.

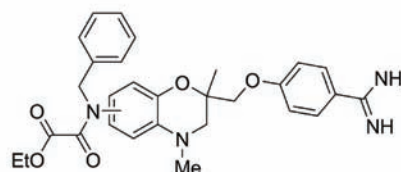
Selective thrombin inhibitors



R' = Me; $K_{i(trb)} = 3,4 \pm 1,8$ nM

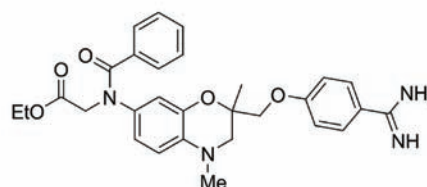
R' = H; $K_{i(trb)} = 2,6 \pm 0,7$ nM

Dual antithrombotic compounds with thrombin inhibitory and GPIIb/IIIa receptor antagonistic activity



6-isomer, $K_{i(trb)} = 0,38 \pm 0,11$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 1,45 \pm 0,91$ μ M

7-isomer, $K_{i(trb)} = 1,47 \pm 0,36$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 0,73 \pm 0,55$ μ M



7-isomer, $K_{i(trb)} = 0,156 \pm 0,023$ μ M, $IC_{50}(GPIIb/IIIa) = 1,78 \pm 0,58$ μ M

References

1. Ilaš, J.; Hudecz, F.; Süli-Vargha, H.; Kikelj, D. Peptides and pseudopeptides incorporating *D*-Phe-Pro-Arg and Arg-Gly-Asp lead sequences as potential antithrombotic agents. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 946-953.
2. Ilaš, J.; Štefanič, P.; Sollner Dolenc, M.; Kikelj, D. Recent advances in the synthesis of 2*H*-1,4-benzoxazin-3-(4*H*)-ones and 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazines. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348.
3. Ilaš, J.; Tomašić, T.; Kikelj, D. Novel potent and selective thrombin inhibitors based on a central 1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one scaffold. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2863-2867.
4. Ilaš, J.; Jakopin, Ž.; Borštnar, T.; Stegnar, M.; Kikelj, D. 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine Derivatives Combining Thrombin Inhibitory and Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonistic Activity as a Novel Class of Antithrombotic Compounds with Dual Function. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5617-5629.
5. Ilaš, J.; Lah, N.; Leban, I.; Kikelj, D. A pentacyclic condensation product from 2,4-dimethyl-7-nitro-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine-2-carboxylic acid. *Tetrahedron lett.* **2008**, *49*, 225-228.
6. Ilaš, J.; Kikelj, D. Ring Opening of 2-(Benzylamino)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ones and 2-Bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ones. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 654-664.



Dr. Petra Kocbek

Dr. Petra Kocbek, ki je na Fakulteti za farmacijo zaposlena kot asistentka na katedri za farmacevtsko tehnologijo, raziskovalni duh spremlja že od otroštva. Prihaja iz Maribora, kjer je po osnovni šoli obiskovala II. Gimnazijo, nato pa se je odločila za študij farmacije v Ljubljani. Odlična študentka se je takoj po diplomi na povabilo prof. dr. Julijane Kristl vpisala na doktorski študij in ga letos tudi uspešno zaključila.

»Že kot majhno deklico me je vedno zanimalo, kako določena stvar deluje. In že takrat sem z logičnim razmišljanjem vedno prišla do rešitve. Pri raziskovanju me spodbuja predvsem spoznavanje dodane vrednosti nečesa novega. Pri meni se je tisto pravo raziskovanje začelo z diplomom in se nato intenzivno nadaljevalo štiri leta na doktorskem študiju, katerega glavna tema so bili nanosistemi, ki so danes zelo vroča tema ne le na področju farmacije, ampak tudi širše. Ukvarjala sem se z nanosuspensijami kot sodobnim pristopom za povečanje hitrosti raztapljanja učinkovin in z razvojem nanodelcev za zdravljenje raka. Z oblikovanjem nanodelcev sem v celični kokulturi dosegla ciljano dostavo učinkovine le v tarčne rakave celice, ki zdravlilo potrebujejo, hkrati pa druge, netaarčne oz. »zdrave celice«, niso prizadete. Prednost takšnega zdravljenja bo prav gotovo v povečanju učinkovitosti in zmanjšanju stranskih učinkov pri bolnikih.« Kot pravi dr. Kocbekova, v prihodnosti pričakujejo razmah takšnih sistemov, saj imajo mnogo prednosti pred tradicionalnimi, danes znanimi zdravili.

»Tudi v prihodnje bi rada na področju znanosti odpirala nove izzive in jih skušala rešiti skupaj s kolegi. Mislim, da je v znanosti ključno sodelovanje različnih strok. Za moje nadaljnje raziskovalno delo pa mi tudi Krkina nagrada predstavlja veliko spodbudo.«

Ponosna Štajerka, ki se vsak vikend vrača v rodni Maribor, pravi, da je včasih prevelika perfekcionistka. Poleg tega je še zelo trmasta. »Morda je vzrok za to tudi moje nebesno znamenje, saj sem kozoroginja,« in dodaja, »tisto, kar si zastavim, hočem tudi doseči.« Sicer pa ima rada pozitivno vzdušje ne le v delovnem okolju, temveč na sploh v življenju. Prosti čas najraje izkoristi za potovanja in športne aktivnosti, še najbolj pa se sprosti v naravi ob nabiranju gob.

RAZVOJ NANOSISTEMOV ZA POVEČANJE HITROSTI RAZTAPLJANJA TEŽKO TOPNIH UČINKOVIN IN AKTIVNO CILJANJE TUMORSKIH CELIC

P. Kocbek

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

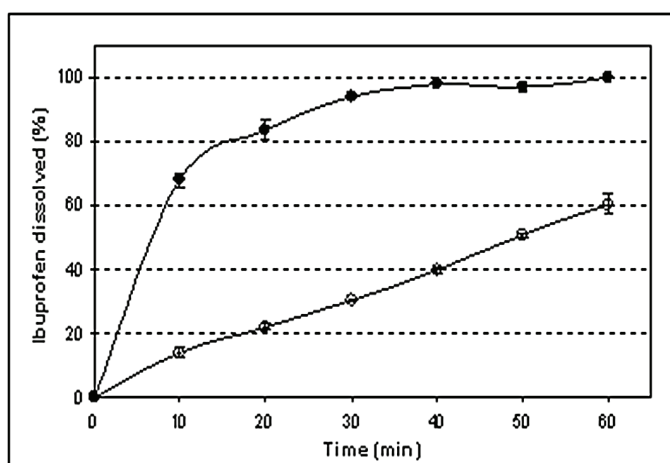
Mentorica: J. Kristl

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Nanosistemi predstavljajo danes zelo aktualno področje raziskav, saj omogočajo vnos tako nizko kot visokomolekularnih učinkovin, kot so proteini in geni v organizem. Izbiro ustreznega nanodostavnega sistema in metode njegove izdelave pogojujejo predvsem lastnosti učinkovine.

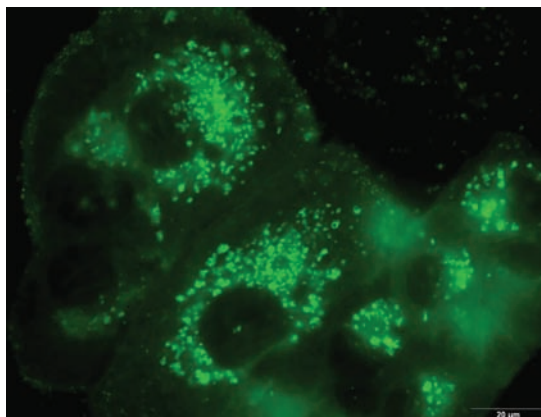
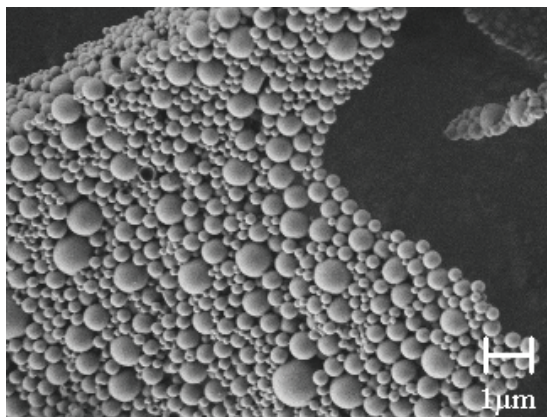
Raziskovalno delo sestavljajo trije sklopi: priprava in vrednotenje nanosuspenzij, načrtovanje polimernih nanodelcev za vnos novih težko topnih učinkovin in oblikovanje imunonanodelcev za ciljno dostavo proteinskih učinkovin v tumorske celice.

Za izdelavo nanosuspenzij smo razvili emulzijsko-difuzijsko metodo in metodo emulgiranja taline ibuprofena kot modelne težko topne učinkovine. Z nadzorom tehnoloških parametrov smo pripravili nanosuspenzije s povprečno velikostjo delcev od 70 do 450 nm in dokazali povečano hitrost raztapljanja nanosuspenzije v primerjavi z mikronizirano učinkovino (1).



Slika 1: Profila raztapljanja liofilizirane nanosuspenzije, stabilizirane s poloxamerom 188, (—●—) in fizikalne zmesi mikroniziranega ibuprofena s poloxamerom 188 (---○---).

V raziskave smo vključili dve novi, težko topni učinkovini, ki sta inhibitorja 17β -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1 in potencialni učinkovini za zdravljenje raka, saj povečana aktivnost omenjenega encima povzroči povečano proliferacijo celic dojke, kar povzroči nastanek in napredovanje raka. Sami učinkovini v raztopini oz. suspenziji v *in vitro* testih nista izkazovali biološkega učinka; poleg tega je bila stabilnost učinkovin v vodnem mediju majhna. Po vgrajevanju učinkovin v nanodelce iz poli(ϵ -kaprolaktona) in testiranju na celični liniji T-47D, ki izraža tarčni encim, smo ugotovili zmanjšano proliferacijo in spremenjeno morfologijo celic, kar je odraz biološkega učinka vgrajenih inhibitorjev. Ti rezultati dokazujejo, da lahko z oblikovanjem nanodelcev pripravimo terapevtsko uporabno farmacevtsko obliko za vnos težko topnih učinkovin, ki same v dovolj veliki koncentraciji ne dosežejo mesta delovanja in zato ne sprožijo farmakološkega učinka (2).



Slika 2: Slika nanodelcev iz poli(ϵ -kaprolaktona) kot jih vidimo z vrstičnim elektronskim mikroskopom (levo). Znotrajcelična porazdelitev nanodelcev v celicah raka dojke T-47D (desno).

Aktivno ciljanje tumorskih celic je cilj razvoja novih farmacevtskih oblik za zdravljenje raka, saj na tak način povečamo učinkovitost zdravljenja in hkrati zmanjšamo stranske učinke. Z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo smo izdelali nanodelce iz kopolimera mlečne in glikolne kisline in vanje vgradili modelno proteinsko učinkovino tj. kokošji cistatin, ki je inhibitor cisteinskih proteaz. Na površino nanodelcev smo z adsorpcijo ali kovalentno vezali monoklonsko protitelo CDI 315, ki prepozna specifični antigen na površini celic raka dojke. Ugotovili smo, da je ustrezna metoda izdelave imunonanodelcev le z adsorpcijo, saj je vgrajeni protein ohranil biološko aktivnost, protitelo pa sposobnost prepoznavanja in vezave na tarčni antigen. V kokulturi celic raka dojke MCF-10A neoT s celicami Caco-2 ali z diferenciranimi celicami U-937 so imunonanodelci selektivno vstopili le v tarčne celice in povzročili inhibicijo znotrajcelične proteolizne aktivnosti. S temi rezultati smo potrdili uspešnost aktivnega ciljanja tumorskih celic in selektivnega vnosa biološko aktivne proteinske učinkovine z imunonanodelci (3).

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da z oblikovanjem nanosuspenzij povečamo hitrost raztapljanja in tako biološko uporabnost težko topnih učinkovin. V določenih primerih pa to ni dovolj, da bi dosegli biološki učinek, kar velja zlasti za učinkovine, ki so nestabilne v fiziološkem okolju. V takšnih primerih smo dokazali, da je ustrezen pristop oblikovanje nanodelcev, kjer ogrodje ščiti vgrajeno učinkovino pred vplivi okolja in hkrati nadzorovano sprošča učinkovino na mestu delovanja. Z vezavo specifičnih monoklonskih protiteles na nanodelce smo dosegli aktivno ciljanje na celičnem nivoju tj. selektivni vstop imunonanodelcev in dostavo proteinske učinkovine do ciljnega mesta, kar prepreči pojav stranskih učinkov, ki so rezultat delovanja učinkovine na zdrave celice.

1. Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *J. Int. J. Pharm.* 2006, 312: 179-186.
2. Kocbek, P.; Teskač, K.; Brožič, P.; Lanišnik Rižner, T.; Gobec, S.; Kristl, J. Effect of free and in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles incorporated new type 1 17β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors on cancer cells, *Eur. J. Pharm. Sci.*, poslano v objavo.
3. Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J. Control. Release* 2007, 120: 18-26.

DEVELOPMENT OF NANOSYSTEMS FOR ENHANCING DISSOLUTION RATE OF POORLY SOLUBLE DRUGS AND ACTIVE TARGETING OF TUMOUR CELLS

P. Kocbek

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: J. Kristl

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Nanosystems represent a very promising research area nowadays, since they enable delivery of high and low molecular weight drugs into the body, such as proteins and genes. The choice of a suitable nanodelivery system and preparation method mainly depends on drug properties. The research work consists of three parts: preparation and evaluation of nanosuspensions, design of polymeric nanoparticles for delivery of poorly soluble drugs, and formulation of immuno-nanoparticles for targeted delivery of protein drug into tumour cells.

Emulsion diffusion method and melt emulsification method were developed for preparation of nanosuspensions with ibuprofen as a model drug. Control of technological parameters allowed formulation of nanosuspensions with mean particle size ranging from 70 to 450 nm. Increased dissolution rate was confirmed for nanosuspension compared to the dissolution of the micronized drug (1).

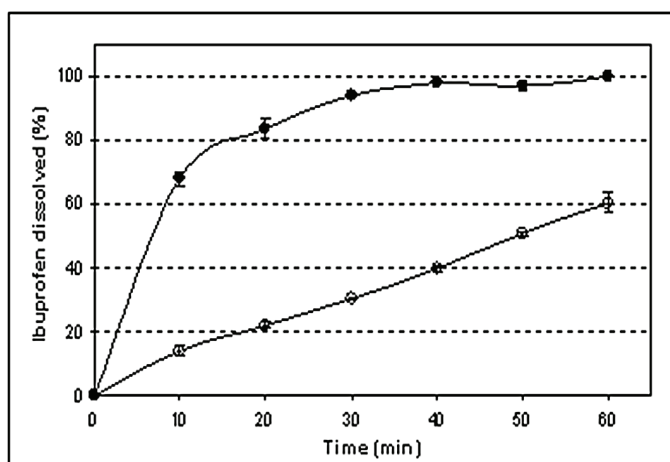


Figure 1: Dissolution profiles of lyophilized nanosuspension stabilised with poloxamer 188 (—●—) and a physical mixture of micronized ibuprofen with poloxamer 188 (—○—).

Two new poorly soluble drugs with potential anticancer activity were included in our research. The drugs are inhibitors of type 1 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, an enzyme which is involved in increased breast cell proliferation and therefore development and progression of cancer. The suspension of the inhibitors did not exert any biological effect in vitro. Besides that, stability of inhibitors in aqueous medium was low. Evaluation of formulated poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles on T-47D cell line, which expresses target enzyme, showed reduced cell proliferation and changes in cell morphology due to biological effect of incorporated inhibitors. Poorly soluble drugs do not reach the site of action in concentration high enough to exert pharmacological effect, however, these results demonstrate that therapeutically useful dosage form of poorly soluble drugs can be prepared using nanoparticle formulation (2).

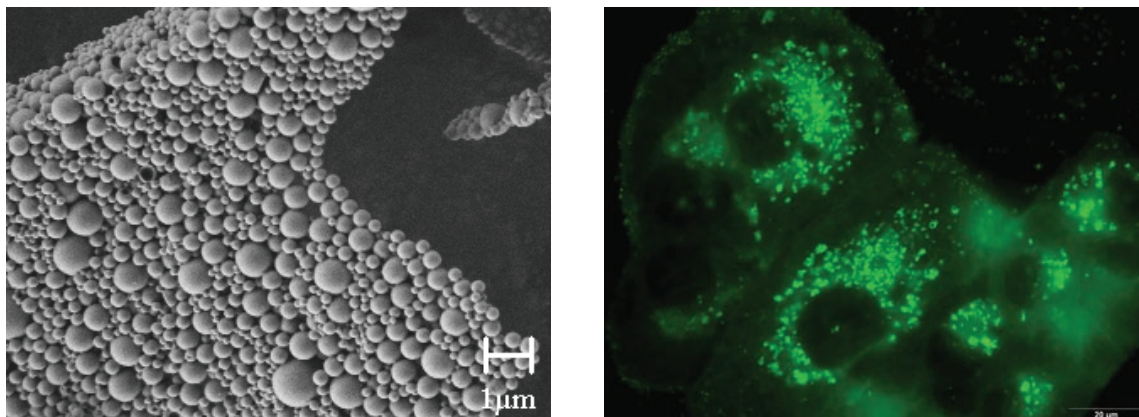


Figure 2: Scanning electron microscopy image of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles (left). Intracellular distribution of nanoparticles in T-47D breast cancer cells (right).

The aim of development of new dosage forms for cancer treatment is active targeting of tumour cells, because this can lead to increased treatment effectiveness and reduced side effects. Cystatin is an inhibitor of cysteine proteases and was chosen as our model protein drug. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with incorporated cystatin were formulated using double emulsion solvent diffusion method. Monoclonal antibody, which recognizes specific antigen on breast tumour cells, was bound by adsorption or covalently to the nanoparticle surface. Only adsorption was suitable for binding of monoclonal antibody, since biological activity of incorporated protein as well as recognition and binding properties of adsorbed antibody were preserved. In co-culture of MCF-10A neoT breast cancer cells and Caco-2 cells or differentiated U-937 cells immuno-nanoparticles selectively entered target MCF-10A neoT cells and caused inhibition of intracellular proteolytic activity in those cells. With these results successful active targeting of tumor cells and selective delivery of biologically active protein drug using immuno-nanoparticles was confirmed (3).

Based on our results it can be concluded that dissolution rate can be increased using nanosuspension formulations and consequently increased bioavailability of poorly soluble drugs can be expected. Due to instability of some drugs in physiological environment increased drug dissolution rate alone is not enough to achieve biological effect. For such drugs nanoparticle formulation can provide protection from environment and enables controlled drug release at the site of action as shown in our work. Active targeting on cellular level was achieved with specific monoclonal antibody bound to nanoparticles. Active targeting means selective uptake of immuno-nanoparticles and delivery of protein drug to target site which can reduce side effects caused by drug action on healthy cells.

1. Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *J. Int. J. Pharm.* 2006, 312: 179-186.
2. Kocbek, P.; Teskač, K.; Brožič, P.; Lanišnik Rižner, T.; Gobec, S.; Kristl, J. Effect of free and in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles incorporated new type 1 17β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors on cancer cells, *Eur. J. Pharm. Sci.*, sent for publication.
3. Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J. Control. Release* 2007, 120: 18-26.



Dr. Vesna Krošelj

Dom in delovno okolje dr. Vesne Krošelj sta trenutno v Indiji. Lansko poletje jo je poslovna pot zapeljala na Krkino predstavništvo v indijsko mesto Bangalore, kjer je odgovorna za Krkine razvojne projekte v tej državi. »Zdaj vidim, kako prav mi pride znanje, ki sem ga pridobila tako med študijem na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo kot tudi v sedmih letih dela v Krki. Tu sem si najprej nabirala izkušnje na področju patentov, nato na tehnologiji in hkratnem doktorskem študiju na Fakulteti za farmacijo, kasneje pa še ob projektnem vodenju v Krkinem Razvoju in raziskavah,« poudarja mlada raziskovalka, ki prihaja iz Šentjerneja na Dolenjskem.

V doktorski nalogi je raziskovala alternativno metodo priprave pelet. »Gre za precej enostavno metodo, ki predstavlja dobro alternativo klasičnim postopkom. Glede na patentne razmere, ki jih danes spremljamo v svetu, se mi zdi zelo koristno, da se vnaprej seznanimo z možnostmi, kako in na kakšen drugačen način priti do enakega izdelka. Metodo priprave pelet, ki sem jo razvila s pomočjo mentorja dr. Franca Vrečerja in ostalih sodelavcev, v Krki še ne uporabljamo, določene zaključke iz moje naloge pa že upoštevajo sodelavci pri razvoju Krkinih zdravil. Na to sem ponosna, saj sem doktorsko nalogo delala predvsem zato, da bi pridobljeno znanje lahko implementirala v industrijo ter se ob tem naučila nekaj novega.«

Nekdanja Zoisova štipendistka, danes doktorica znanosti, je tudi prava ambasadorka Krkinega poslanstva Živeti zdravo življenje. Že od nekdaj se veliko ukvarja s športom, najraje s tenisom, kolesarjenjem in tekom. Najpomembnejše vrednote, ki se jim v življenju predaja, so znanje, delo, družina in seveda prosti čas. »V Indiji imam nekoliko več časa tudi za branje in trenutno me najbolj zanima vzhodnjaška literatura. Pa tudi potujem zelo rada. Eksotične države so zdaj zelo blizu, tako da sem si že ogledala Laos, Kambodžo, Maldive.« Ker je svetovljanka, se ji na življenje v Indiji ni bilo težko privaditi, vendar kljub temu dodaja: »Indija je zelo posebna država, in če jo želiš resnično spoznati, jo moraš doživeti. Ko pa se vsake toliko časa vrnem v Slovenijo, se vedno znova prepričam, iz kako lepe dežele prihajam.« Dodaja še, da ji delo v Indiji trenutno nudi dovolj izzivov. »Tudi v prihodnje mi na poslovnem področju zagotovo ne bo dolgčas, saj sem tak človek, ki nenehno išče nove izzive.«

OPTIMIZACIJA IZDELAVE PELET Z LANSOPRAZOLOM S TERMOPLASTIČNIM PELETIRANJEM V HITREM MEŠALNIKU

V. Krošelj

Krka, d.d., Novo mesto

Mentor: F. Vrečer

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

Termoplastično peletiranje v hitrem mešalniku sodi med tehnologije s talinami, ki pomenijo alternativo klasičnim (vlažnim) farmacevtskim tehnološkim postopkom, med katerimi sta še vedno najbolj razširjena oblaganje nevtrálnih jader in iztiskanje s krogličanjem. Pred slednjima ima termoplastično peletiranje v hitrem mešalniku vrsto prednosti, med katerimi so najpomembnejše preprostost, hitrost in ekonomičnost postopkov ter primernost za vgrajevanje zdravilnih učinkovin, občutljivih na vlago. Kemijsko in fizikalno raznolika skupina veziv, primernih za tehnologije s talinami, omogoča fleksibilnost pri načrtovanju farmacevtskih oblik, ki jih z omenjenimi postopki lahko izdelamo.

V sklopu pričujočega dela smo raziskovali primernost termoplastičnega peletiranja za izdelavo ogrodnih pelet s takojšnjim sproščanjem v vodi slabo topne zdravilne učinkovine – lansoprazola (kemijsko 2-((3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoksi)-2-piridil)metil)-sulfinil benzimidazol). Za to smo uporabili po dve vezivi iz skupine makrogol gliceridov (Gelucire® 44/14 in Gelucire® 50/13) in poloksamerov (Lutrol® F68 in Lutrol® F127), ki se med seboj razlikujejo v termičnih in reoloških lastnostih. Vsa uporabljena veziva spadajo med površinsko aktivne snovi (s HLB-števili nad 10) in kot taka izboljšajo topnost slabo topnih učinkovin. Za referenco smo pripravili pelete s klasičnim postopkom in mikrokristalno celulozo kot tvorilom ogrodja. Znano je, da je postopek termoplastičnega peletiranja močno občutljiv že na majhne spremembe v sestavi ali v procesnih parametrih. V eksperimentih smo tako spreminjali koncentracijo veziva, velikost delcev polnila, koncentracijo učinkovine, način dodajanja veziva, hitrost mešala, uporabo sekala, temperaturo plašča in čas gnetenja, dokler nam ni uspelo izdelati pelet ustreznih velikosti.

Sejalna analiza izdelanih pelet je pokazala, da je porazdelitev velikosti v vseh primerih široka in primerljiva z referenčnimi peletami, kar je značilno za direktno peletiranje v hitrem mešalniku. To namreč ne omogoča tako ozke porazdelitve kot npr. metoda iztiskanja in krogličanja. Gostote pelet, izdelanih s termoplastičnim peletiranjem, so bile med seboj primerljive, prava gostota pa je bila nekoliko nižja od gostote referenčnih pelet. Pelete, izdelane z vezivi iz skupine makrogol gliceridov, so imele v povprečju višjo krušljivost kot pelete s poloksameri, krušljivost referenčnih pelet je bila nekje vmes. Mikroskopska analiza je pokazala, da so bile v primeru makrogol gliceridov in Lutrola® F68 izdelane pelete okrogle in gladke, medtem ko so bili aglomerati, izdelani z Lutrolom® F127, nepravilne oblike in s hrapavo površino.

Sproščanje lansoprazola iz referenčnih pelet je bilo odvisno od njihovih velikosti, v primeru majhnih pelet nekoliko hitrejše, v primeru večjih pa počasnejše od same zdravilne učinkovine. Izdelava pelet s termoplastičnim peletiranjem je v vseh primerih rezultirala v peletah s takojšnjim sproščanjem, pri čemer se je v primeru uporabe makrogol gliceridov kot termoplastičnega veziva v prvih 30 min sprostito 90% učinkovine. V primeru pelet, izdelanih s poloksameri kot vezivi, pa je bilo sproščanje lansoprazola še hitrejše. Koncentracija lansoprazola v peletah ni bistveno vplivala na profil sproščanja kakor tudi ne velikost analiziranih pelet, kar je posledica njihovega takojšnjega razpada ob stiku z medijem. Vzrok za hitro sproščanje je enakomerna porazdelitev lansoprazola v ogrodju, ki zaradi prisotnosti termoplastičnega veziva izboljša njegovo močljivost. To so potrdili tudi rezultati rentgenske analize in porazdelitve zdravilne učinkovine po prerezu izdelanih pelet.

V nadaljevanju naloge smo na primeru Gelucire® 50/13 in Lutrol® F68 z Box-Behnkenovim eksperimentalnim načrtom proučili vpliv različnih formulacijskih (količina veziva v formulaciji) in procesnih parametrov (hitrost mešala, čas gnetenja in količina produkta v posodi) na celokupni in uporabni izkoristek procesa, velikost izdelanih pelet in količino neželenih produktov – preostalih prahov in nastalih velikih aglomeratov. Potek procesa smo spremljali s pomočjo navora, temperature produkta in časa, s katerimi smo tudi določili končno točko peletiranja.

Statistična analiza Box-Behnkenovih eksperimentov je pokazala, da je vpliv proučevanih neodvisnih spremenljivk zelo zapleten, saj so bili v izpeljanih modelih prisotni kvadratni in interakcijski členi. Največji vpliv na uporabni izkoristek je imela količina veziva v formulaciji, še posebej pri višjih koncentracijah, ko je zaradi preobsežne aglomeracije nastala večja količina kep. Dodatni poskusi, ki smo jih izvedli z namenom lažje interpretacije rezultatov in pri katerih smo spreminjali eno samo spremenljivko – čas – so pokazali, da je prevladujoč mehanizem jedrenja v primeru Gelucire® 50/13 distribucija veziva in da aglomerati rastejo enakomerno. Poleg tega smo opazili praktično linearno odvisnost doseženega navora in povprečne velikosti izdelanih pelet in potrdili tezo, da je navor primerno orodje za določanje končne točke procesa.

V primeru Lutrola® F68 je bilo spremljanje procesa oteženo, velikost pelet ni korelirala z navorom, granulacijski grafi pa so pokazali samo, da je proces prešel v destruktivno fazo. Takrat je navor strmo narasel in začel nihati. Kot ključen parameter se je izkazal čas gnetenja, medtem ko je imela koncentracija veziva za razliko od Gelucire® 50/13 zelo omejen vpliv. Eksperimenti z različnim časom gnetenja so pokazali, da sta v primeru Lutrola® F68 v fazi jedrenja prisotna oba mehanizma, distribucija in imerzija, rast aglomeratov pa je prav tako kombinacija indukcije in enakomerne rasti.

Box-Behnkenov načrt in metoda odgovornih površin nista omogočila samo določitve faktorjev z največjim vplivom na proces, pač pa tudi njihovo optimizacijo. Napovedane vrednosti odzivov, ki smo jih dobili z matematičnim (regresijskim) modelom, smo v obeh primerih potrdili z dodatnimi eksperimenti in model uspešno validirali.

Rezultati naloge kažejo, da uporaba hidrofilnih veziv v postopku termoplastičnega peletiranja omogoča izdelavo aglomeratov s takojšnjim sproščanjem slabo topne modelne učinkovine. Tako termoplastično peletiranje predstavlja dobro alternativo klasičnim tehnološkim postopkom. To velja predvsem v primeru veziv z nizko viskoznostjo (makrogol gliceridi), pri vezivih visoke viskoznosti (poloksameri) pa je proces nekoliko težje nadzorovati. V tem primeru lahko potek peletiranja izboljšamo z uporabo višje temperature ogrevalnega plašča in možnostjo vpiha hladnega zraka, kar omogoča natančen nadzor nad temperaturo produkta, s tem pa tudi na stopnjo tekočinskega nasičenja in rast aglomeratov. Tudi občutljivost postopka na spremembe ostalih procesnih spremenljivk je mogoče obvladovati z identifikacijo, optimizacijo in natančnim nadzorom ključnih parametrov.

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF LANSOPRAZOLE PELLETS BY THERMOPLASTIC PELLETIZATION IN A HIGH SHEAR MIXER

V. Krošelj

Krka, d.d., Novo mesto

Supervisor: F. Vrečer

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

Thermoplastic pelletization in a high-shear mixer belongs to the group of hot-melt technologies, which represent a viable alternative to classical pharmaceutical technological processes among which the coating of neutral pellets and extrusion with spheronization are still the most popular. It offers a number of advantages, particularly due to its simplicity, shorter processing times and cost effectiveness as well as suitability for the incorporation of moisture-sensitive active ingredients. A chemically and physically versatile group of melting binders assures flexibility in the design of the pharmaceutical dosage forms, which can be produced using the above-mentioned process.

The aim of this study was to evaluate the thermoplastic pelletization process as a method for the production of immediate-release matrix pellets containing a poorly soluble model drug – lansoprazole (chemical name 2-[[3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)-2-pyridyl]methyl]-sulphonyl benzimidazole). Two types of binders were used for the preparation of the pellets, macrogolglycerides (Gelucire® 44/14, Gelucire® 50/13) and poloxamers (Lutrol® F68 and Lutrol® F127), which differ in rheological and thermal behavior. All used binders belong to the group of surface active ingredients (with HLB-numbers higher than 10) and as such improve solubility of poorly soluble drugs. Reference pellets were produced according to the classical process with microcrystalline cellulose as the matrix former. It is known that the thermoplastic pelletization process is very sensitive to small changes in composition and process parameters; therefore, changes in concentration of the binder, filler particle size, concentration of the drug, addition of the binder, mixer speed, use of a chopper, temperature of the heating jacket and mixing time were performed until pellets of appropriate size were obtained.

Sieve analysis of the produced pellets displayed wide distribution comparable to the reference pellets, which is characteristic of direct pelletization in a high-shear mixer. This does not offer such a narrow distribution as e.g. extrusion and spheronization. The density of pellets produced by thermoplastic pelletization was comparable and the true density was somewhat lower than that of the reference pellets. Pellets produced with binders from the group of macrogolglycerides displayed overall higher friability than those produced with poloxamers while the friability of the reference pellets was somewhere in between. Microscopic analysis showed that pellets produced with macrogolglycerides and Lutrol® F68 were round and smooth while agglomerates produced with Lutrol® F127 were of an irregular shape and rugged surface.

The dissolution of lansoprazole from reference pellets depended on their size, being faster than the active pharmaceutical ingredient in the case of smaller pellets and slower in the case of larger pellets. In thermoplastic pelletization the resulting pellets displayed immediate release in all cases with 90% of lansoprazole being dissolved in the first 30 min in the case of a macrogolglyceride binder. In the case of pellets produced using poloxamer binders dissolution of the active ingredient was even faster. The dissolution profile was not influenced considerably by the concentration of lansoprazole in the pellets, the type of filler used or the size of the pellets, which is due to the immediate disintegration of the pellets in contact with the solvent. This increase in the dissolution rate is attributed to the uniform distribution of lansoprazole in the matrix and the increased wettability due to the presence of the thermoplastic binder. This was also confirmed with X-ray results and the analysis of active ingredient distribution in pellet cross sections.

In the case of Gelucire® 50/13 and Lutrol® F68 we further analyzed the influence of different formulation (quantity of binder used) and process parameters (rotor speed, mixing time and quantity of product) on the total and effective yield of the process, the size of produced pellets and the quantity of unwanted by-products (remaining undersized particles and lumps), by applying the Box-Behnken experimental design. The process was monitored with the aid of torque, temperature of the product and time, which were also used to determine the end point of pelletization.

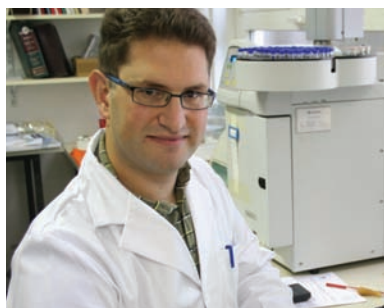
The statistical analysis of the Box-Behnken experiments showed that the influence of the studied independent

variables is very complex, since quadratic and interaction terms were present. The quantity of binder used had the greatest influence on the effective yield, particularly at greater concentrations, when larger quantities of lumps would form due to extensive agglomeration. Additional tests were performed in order to interpret the results more easily. Only one parameter – time – was modulated and the results showed that the determining mechanism of nucleation in the case of Gelucire® 50/13 is distribution of the binder and that agglomerates grow steadily. In addition, an almost linear correlation between torque and mean pellet size was observed which confirms the hypothesis that torque is an appropriate tool for determining the end point of the process.

Monitoring of the process was more difficult in the case of Lutrol® F68. Pellet size did not correlate with torque and granulation graphs would only show the transition into the destructive phase of the process. Torque would increase sharply and begin to fluctuate. The key parameter proved to be mixing time while, contrary to the case of Gelucire® 50/13, the concentration of the binder had only limited influence. Experiments with different mixing times showed that in the case of Lutrol® F68 both distribution and immersion mechanisms are present in the nucleation phase and, similarly, that the consolidation phase is a combination of induction and steady growth.

The Box-Behnken experimental design and the response surface methodology allowed both for the determination of the influence of particular process parameters and for their optimization. The predicted response values obtained mathematically (by regression model) were confirmed experimentally and the models were successfully validated, regardless of the binder used.

The results of the present work show that the use of hydrophilic melting binders in the thermoplastic pelletization enables the production of agglomerates with immediate release of a poorly soluble model drug. The process itself proves to be a simple and effective alternative to classical technological processes. This is especially the case with low viscosity binders (macrogolglycerides) whereas with high viscosity binders (poloxamers) the process was somehow more difficult to control. In the latter case, it could be improved with higher temperatures of the heating jacket and the use of cool inlet air, which would ensure better control of the temperature of the product and thus of the level of liquid saturation and agglomerate growth. Also, the sensitivity of the process to the changes in other process parameters can be overcome by their identification, optimization and careful control.



Dr. Damjan Šterk

Dr. Damjan Šterk je že v osnovni šoli, ki jo je obiskoval v Ljubljani, spoznal, da sta kemija in fizika vedi, ki ga najbolj zanimata. »Čeprav me je že takrat vleklo v srednjo kemijsko šolo, sem se v gimnazijo vpisal zato, da pridobim širše splošno znanje. Imel sem srečo, da sem hodil na Gimnazijo Šentvid, saj sem imel tam odlične možnosti za raziskovanje fizike in astronomije. Kljub temu pa sem se na koncu le odločil za študij kemije.«

Pravi, da ga je vedno navdihovalo iskanje nečesa novega. »To, da je človek sposoben narediti nekaj, kar je boljše, kar je inovativno, da pride do napredka. Najbolj me pritegnejo nova spoznanja, nove resnice. Tako sem se odločil tudi za doktorski študij na Kemijskem inštitutu, kjer sem zdaj zaposlen kot raziskovalec v Laboratoriju za organsko sintezo in kemijo zdravil.«

Da mora biti raziskovalec predvsem zelo vztrajen in motiviran, se je pokazalo tudi pri njegovi doktorski nalogi, v kateri se je ukvarjal s homogeno asimetrično katalizo, in sicer z razvojem novih ligandov za asimetrično hidrogeniranje olefinov in asimetrično transfer hidrogeniranje ketonov. »Kljub temu da je bilo narejenih že veliko ligandov za asimetrične transformacije, ne obstaja neki univerzalni ligand. Vsak substrat ima svoje lastnosti in za optimalno pretvorbo do kiralnega produkta potrebujemo katalizator, ki je "krojen" posebej za ta substrat. Namen moje naloge je bil razviti paleto novih ligandov. Širok nabor dostopnih ligandov je namreč ključnega pomena za hiter razvoj in visoko učinkovitost dane transformacije do zelenih optično čistih spojin, ki so pomembni gradniki v velikem številu farmacevtskih učinkovin, pesticidih, dišavah in aromah.«

»Krkina nagrada mi pomeni dodatno javno potrditev, da je bila moja izbrana pot prava, in mi predstavlja veliko spodbudo za nadaljnje delo. V prihodnje sicer ostajam zvest organski kemiji, vendar nameravam svoje znanje še razširiti in se preizkusiti na še kakšnem drugem, prav tako zanimivem področju organske kemije.«

Dr. Šterk je prepričan, da lahko človek deluje celostno takrat, ko so zadovoljene vse plati življenja. »Če pogledam v luči vrednot, mi je kot raziskovalcu vsekakor med najpomembnejšimi znanje, nato pa že družina in prijatelji. Zelo cenim dobre medčloveške odnose.« Tudi prosti čas mu veliko pomeni. Kolikor je le mogoče, ga posveti športu. Obiskuje tudi gledališke predstave. »Tudi svoje delo jemljem kot hobi. Občasno se ukvarjam še z astronomijo. Moja filozofija namreč je, da je treba v življenju delati in spoznavati različne stvari in si ustvariti široko bazo znanj.«

NOVI KIRALNI LIGANDI ZA ASIMETRIČNE REDUKCIJE

D. Šterk

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Mentor: B. Šket

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

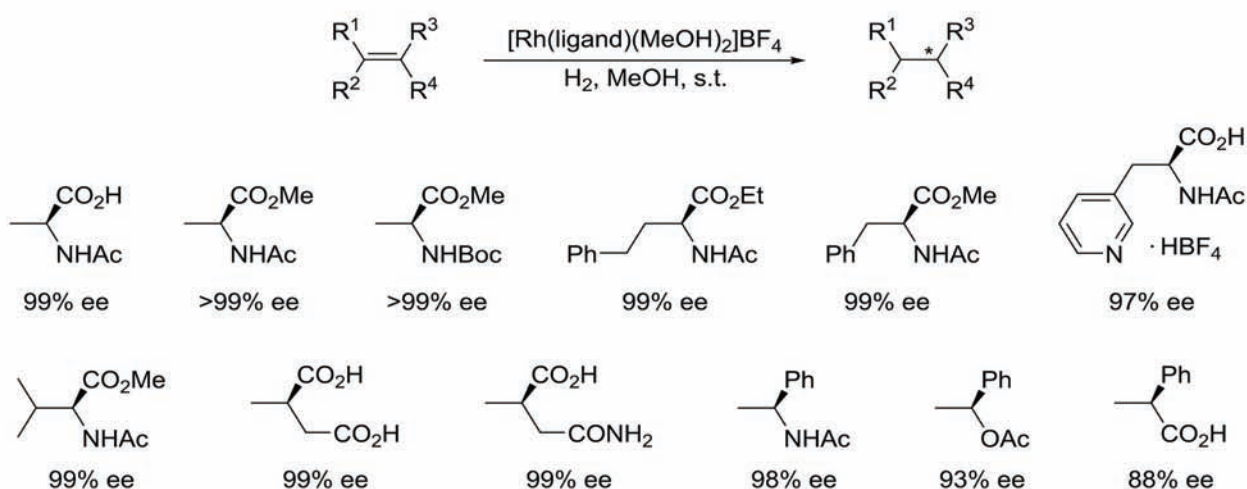
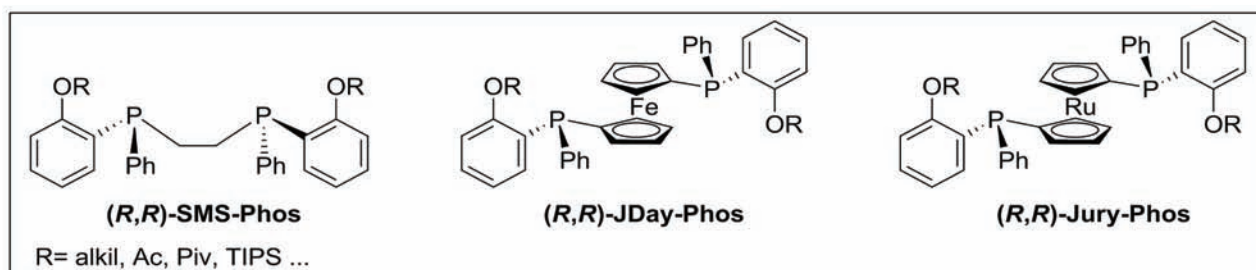
Somentor: B. Mohar

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Številni enantiomeri kiralnih molekul so specifično biološko aktivni in predstavljajo aktivne sestavine v farmacevtskih in agrokemijskih proizvodih, aromah, dišavah itd. Homogena asimetrična kataliza je zelo cenjena tehnologija za pripravo visoko enantiomerno obogatenih spojin in omogoča pripravo velikih količin željenih kiralnih spojin ob uporabi majhnih količin topnega katalizatorja, najpogosteje je to kovinski kompleks s kiralnim ligandom. Asimetrično Rh-katalizirano hidrogeniranje olefinov in Ru-katalizirano transfer hidrogeniranje ketonov sta zanimivi industrijski tehnologiji. Univerzalni ligand, ki bi ga lahko uporabili pri vseh željenih transformacijah, ne obstaja, zato se pojavlja potreba po širokem naboru različnih ligandov/katalizatorjev. Pripravili smo nove enantiomerno čiste ligande in njihove Rh- ali Ru-katalizatorje za obe omenjeni tehnologiji, ki so pokazali višjo enantioselektivnost in aktivnost v primerjavi z že uveljavljenimi ligandi.

Asimetrično hidrogeniranje olefinov

Preko Jugé-Stephanove asimetrične poti smo v enantiomerno čisti obliki in v visokih izkoristkih pripravili serije novih P-stereogenih difosfinskih ligandov z etanskim ("SMS-Phos"), ferocenskim ("JDay-Phos") in rutenocenskim ("Jury-Phos") mostom. Rodijevi kompleksi s pripravljenimi ligandi so pokazali visoko aktivnost in enantioselektivnost (do 99.8% ee) pri hidrogeniranju širokega spektra prokiralnih olefinov. Z visokimi enantiomernimi presežki in pod milimi pogoji nam je uspelo reducirati tudi težavne substrate kot so β,β -disubstituirane dehidro- α -amino kisline, itakonati in atropična kislina.

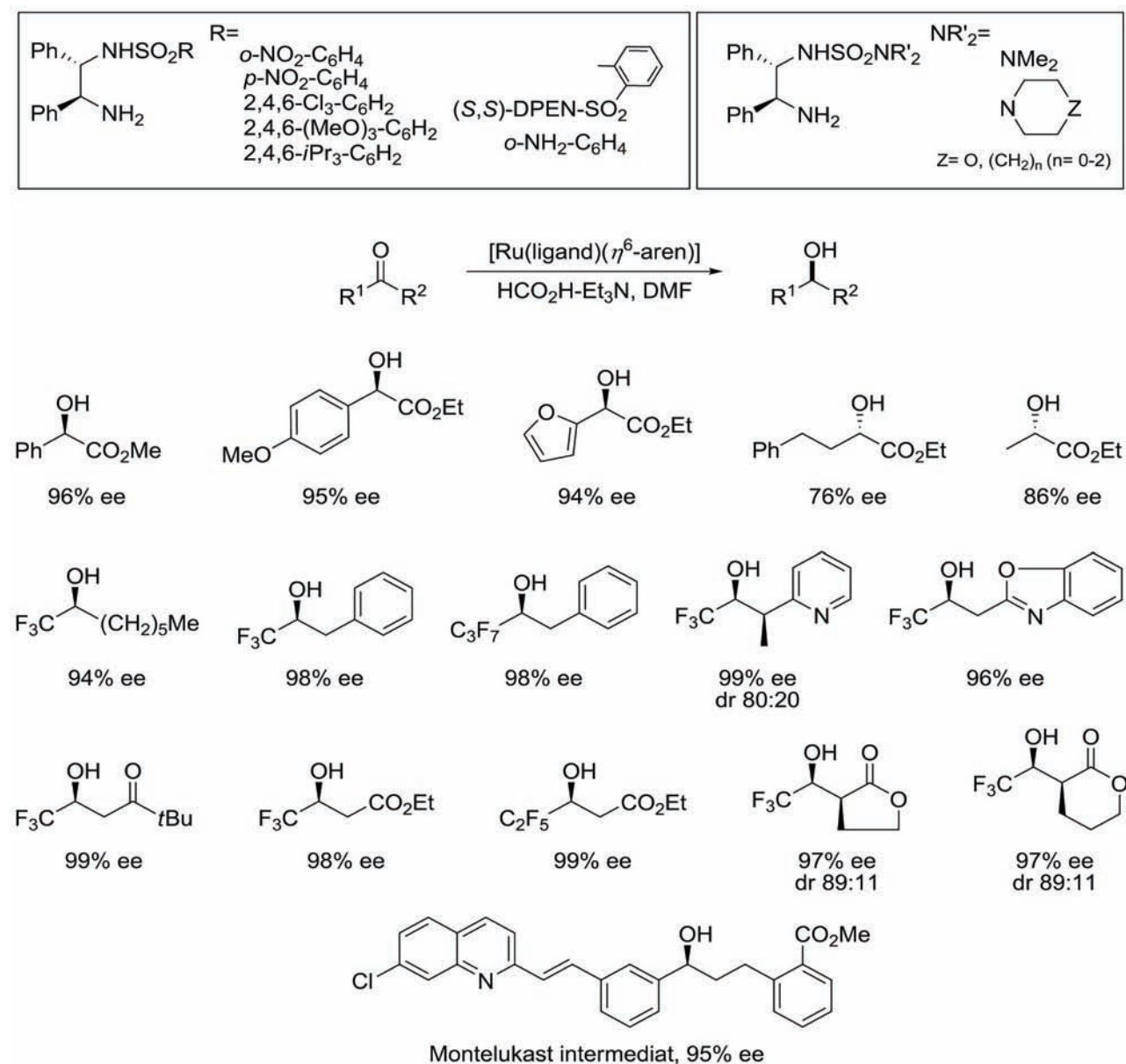


Shema 1: Strukture sintetiziranih skupin P-stereogenih difosfinskih ligandov za Rh-katalizirano asimetrično hidrogeniranje olefinov in primeri nekaterih spojin pripravljenih z uporabo rodijevih katalizatorjev s prikazanimi ligandi.

Izvedli smo tudi preliminarne mehanistične študije katalizatorjev (^{31}P NMR, X-žarkovna analiza, vpliv reakcijskih parametrov ipd.). Prvikrat se je pokazalo, da je bolj reaktiven katalizator-substrat kompleks, ki je večinoma odgovoren za izid reakcije, tudi večinski diastereomer. Poleg tega smo preučili možnost uvedbe sterično velikih skupin preko Jugé-Stephanove asimetrične poti do *P*-stereogenih difosfinskih ligandov. Npr., ko je napad na fosforjev atom kiralnega 3,4-dimetil-2,5-difenil-1,3,2-oksazafosfolidin-2-borana (ključnega prekursorja *P*-stereogenih spojin) oviran, pride do deprotonacije na benzilni skupini, kar vodi do nastanka enantiomerno čistega *trans*-(S_P)-(N-metilamino)(fenil)(1-fenil-1-propeniloksi)fosfin-*P*-borana.

Asimetrično transfer hidrogeniranje ketonov

Pripravili smo nove enantiomerno čiste *N*-arensulfonil- in *N*-sulfamoil-1,2-difeniletildiaminske ligande in z njimi dobili odlične enantiomerne presežke (do 99%) pri Ru(II)-kataliziranem asimetričnem transfer hidrogeniranju različnih α -keto estrov in fluoroalkih ketonov. Te ligande smo tudi uspešno uporabili v ključni stopnji sinteze montelukasta, antagonist levkotrienskih receptorjev.



Shema 2: Strukture pripravljenih *N*-arensulfonil- in *N*-sulfamoil-1,2-difeniletildiaminskih ligandov za Ru-katalizirano asimetrično transfer hidrogeniranje ketonov in nekateri kiralni alkoholi pripravljeni z uporabo rutenijevih katalizatorjev s prikazanimi ligandi.

NEW CHIRAL LIGANDS FOR ASYMMETRIC REDUCTIONS

D. Šterk

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Supervisor: B. Šket

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: B. Mohar

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Many enantiomers of chiral molecules possess specific biological activity and constitute the active ingredient of pharmaceuticals, agrochemicals, flavours, fragrances, etc. Homogeneous asymmetric catalysis is a very sought-after technology for the preparation of highly enantiomerically enriched compounds. It enables the production of large amounts of a desired enantiomer by the use of catalytic amount of an optically active metal complex of a chiral ligand through transformation of a prochiral substrate. Asymmetric Rh-catalyzed hydrogenation of olefins and Ru-catalyzed transfer hydrogenation of ketones are interesting industrial technologies. However, as no universal ligand exists that could be used in all desired transformations, a diversity of ligands/catalysts is needed. We have prepared large series of enantiomerically pure ligands and their catalysts for both technologies which showed enhanced enantioselectivities and activities compared to established ones.

Asymmetric hydrogenation of olefins

A series of new *P*-stereogenic diphosphine ligands with ethane- ("SMS-Phos"), ferrocene- ("JDay-Phos") and ruthenocene- ("Jury-Phos") bridges were prepared in enantiomerically pure form with high yields through the Jugé-Stephan asymmetric route. Their rhodium complexes showed high activity and yielded high enantiomeric induction (up to 99.8% ee) in the hydrogenation of a wide variety of olefins. Challenging substrates as β,β -disubstituted dehydro- α -amino acids, itaconates and atropic acid were efficiently hydrogenated under mild conditions.

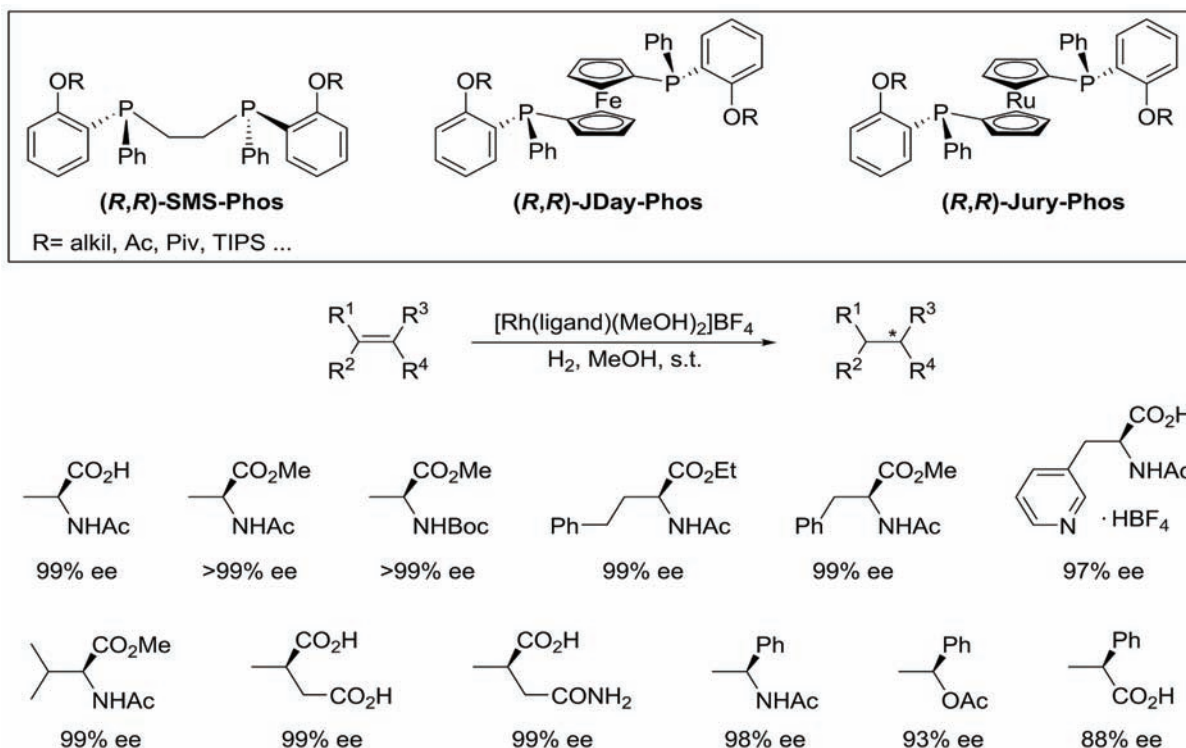


Figure 1: Prepared *P*-stereogenic diphosphine ligands for Rh-catalyzed asymmetric hydrogenation of olefins and examples of compounds prepared.

Preliminary mechanistic studies (^{31}P NMR, X-ray, variation of reaction parameters, etc) were carried out. For the first time, we showed that the most reactive catalyst-substrate adduct, responsible for the reaction outcome, is the predominant diastereomer by contrast to the general trend.

In addition, the Jugé-Stephan asymmetric route to *P*-stereogenic diphosphine ligands was studied for the introduction of bulky groups. We found that when the attack on the phosphorus atom of the key intermediate 3,4-dimethyl-2,5-diphenyl-1,3,2-oxazaphospholidine-2-borane is hindered, deprotonation on the benzylic position of the heterocycle occurs leading to the formation of enantiomerically pure *trans*-(*S_P*)-(N-methylamino)(phenyl)(1-phenyl-1-propenyloxy)phosphine-*P*-borane.

Asymmetric transfer hydrogenation of ketones

Ruthenium catalysts of novel enantiomerically pure *N*-arenesulfonyl- and *N*-sulfamoyl-1,2-diphenylethylenediamine ligands showed excellent enantioselectivities (up to >99% ee) in transfer hydrogenation of various classes of α -keto esters and fluoroalkyl ketones. These ligands were also successfully employed in the key-step preparation of Montelukast, a leukotriene receptor antagonist drug.

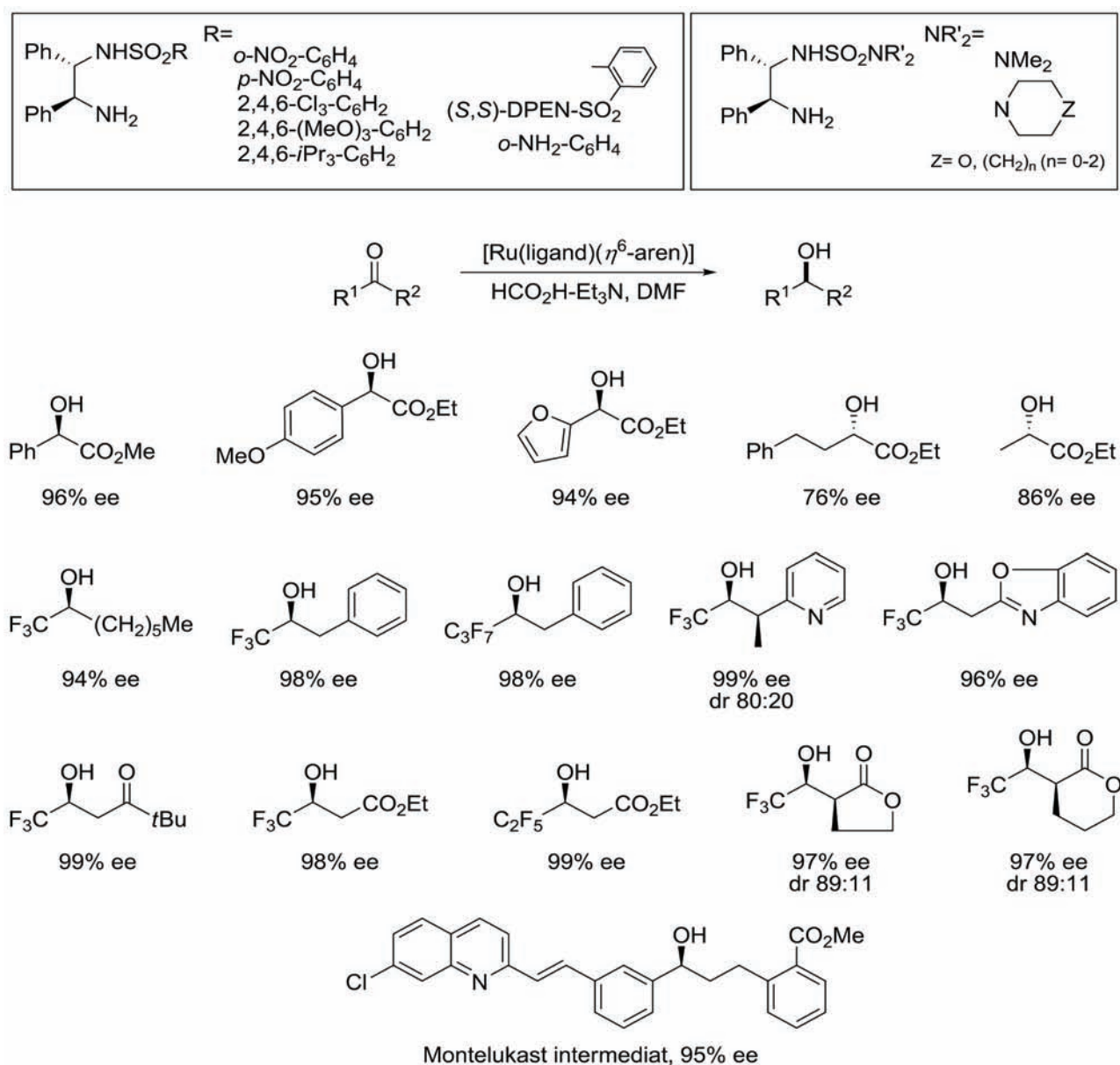


Figure 2: Prepared *N*-arenesulfonyl- and *N*-sulfamoyl-1,2-diphenylethylenediamine ligands for Ru-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation of ketones and examples of prepared chiral alcohols.



Dr. Jernej Waggoner

Dr. Jernej Waggoner prihaja iz Ljubljane, kjer je obiskoval Šubičovo gimnazijo, nato pa se vpisal na Fakulteto za farmacijo, kjer je vzljubil organsko kemijo. »Med izbirnimi predmeti v devetem semestru sem bil edini iz generacije, ki sem si izbral predmet organske reakcije pri prof. dr. Branku Stanovniku. Moja odločitev je bila pravilna, saj sem bil pri tem predmetu zelo uspešen. Zato mi je profesor Stanovnik najprej ponudil, da lahko pod njegovim mentorstvom opravljam diplomu in nato še doktorat. Delam kot raziskovalec v njegovi skupini.«

Pri raziskovalnem delu ga navdihujejo eksperimentiranje, razmišljanje, reševanje problemov, neznano na sploh. »Ker pa sem po osnovni izobrazbi farmacevt, je zame zelo zanimiva uporaba organske kemije v sintezi spojin, ki imajo različne biološke učinke, in pa sinteza naravnih spojin.«

V doktorski nalogi se je ukvarjal s sintezo naravnih produktov in njihovih analogov. »Moje delo je temeljilo na sintezi naravnih produktov oziroma njihovih analogov, ki v svoji strukturi vsebujejo alfa, beta nenasičeni triptofan. Pri svojem delu sem odkril tudi zanimive lastnosti enega od sinteznih intermediatov. Izkazalo se je namreč, da sem ga lahko uporabljal kot kiralni solvatizirajoči reagent pri določanju enantiomernih presežkov različnih kiralnih aminov. V farmacevtski industriji je analitika enantiomernih zmesi zelo pomembna in metoda, ki smo jo razvili, bi lahko gotovo našla praktično uporabo tudi v tej panogi.«

»Krkinga nagrada je potrditev, da sem na pravi poti, da delam dobro in pravilno, vsekakor pa predstavlja tudi obvezo za naprej,« pravi znanstvenik, ki je bil nekoč tudi športni telovadec. »Z gimnastiko sem se aktivno ukvarjal skoraj deset let, zato so športni vzorci še vedno zakoreninjeni v meni. Med njimi lahko še posebej izpostavim disciplino in vztrajnost. Izjemno pa cenim tudi poštenost in iskrene odnose med ljudmi.« Prosti čas najraje izkoristi za šport. »V glavnem tečem, plavam, smučam, še največ energije pa mi vzame moja triletna hčerkica.«

α,β -NENASIČENE- α -AMINOKISLINE V SINTEZI NEKATERIH NARAVNIH SPOJIN IN NJIHOVIH ANALOGOV

J. Wagger

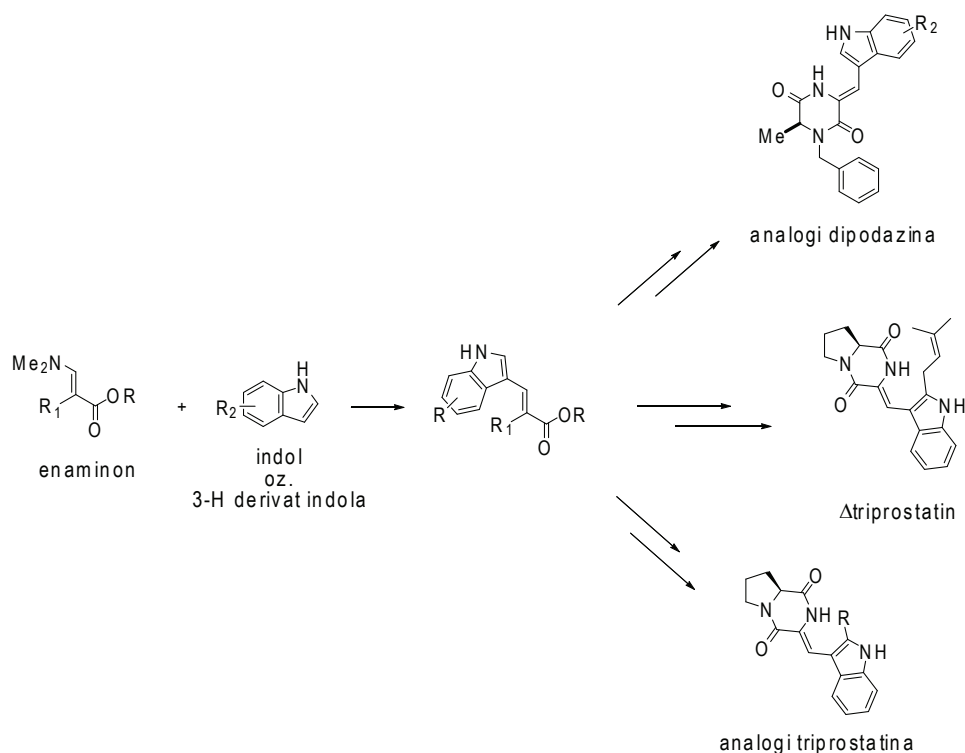
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: B. Stanovnik

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

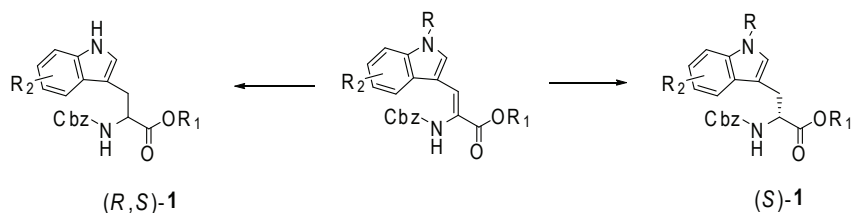
Aminokisline uvrščamo v pomembno skupino spojin, saj predstavljajo enega izmed osnovnih gradnikov živega sveta. Zato ni naključje, da v živem svetu najdemo številne spojine, ki vsebujejo aminokislinski skelet in ki služijo kot spojine vodnice v razvoju novih zdravilnih učinkovin. α,β -Nenasičene- α -aminokisline biosintezno nastanejo iz α -aminokislin v različnih encimsko kataliziranih post-translacijskih reakcijah v sintezi peptidov. Vsebujejo jih številni sekundarni metaboliti oz. alkaloidi kot so npr.: cefalosporin C, spirotriprostatin B ter azinomicina A in B.

V naši raziskovalni skupini se med drugim ukvarjamo tudi s pripravo različnih enaminonskih reagentov, ki so se že izkazali pri sintezi različnih heterocikličnih sistemov in nekaterih analogov naravnih produktov, kot so analogi aplisinopsina in meridianinov. Enaminonska sintezna strategija pa je še posebej primerna za pripravo prekurzorjev α,β -nenasičenega triptofana (Δ Trp). Tako smo v našem raziskovalnem delu pripravili različne analoge dipodazina, alkaloida, ki so ga izolirali iz plesni *Penicillium nalgiovense* in alkaloidov triprostatina B, in spirotriprostatina B izoliranih iz plesni *Aspergillus fumigatus*. Omenjeni alkaloidi posedujejo zanimive biološke oz. farmakološke učinke. Tako so za nekatere analoge dipodazina dokazali inhibitorni učinek razvojnega kroga morskega raka vitičnjaka, kar jih uvršča med potencialno uporabne sestavine biopremazov plovil, katerih plovna površina je pogosto prekrita prav z vitičnjakom. Za triprostaina A in B ter za spirotriprostatina A in B pa je bilo dokazano inhibitorno delovanje celičnega delitvenega cikla in sicer so za triprostatin A uspeli dokazati dualni inhibitorni mehanizem polimerizacije mikrotubulov in topoizomeraze II (Shema 1).



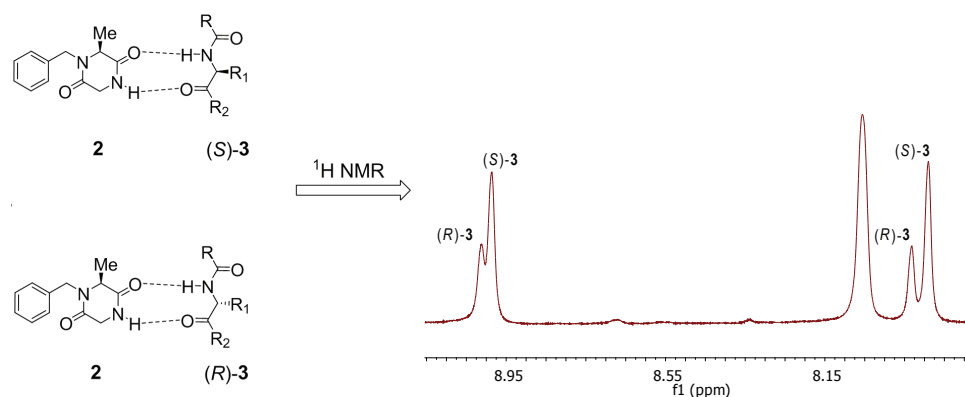
Shema 1. Analogi alkaloidov dipodazina in triprostatina B pripravljeni z enaminonsko sintezno strategijo.

Pripravili smo tudi nekaj *N*-benziloksikarbonil zaščiteneh derivatov Δ Trp, ki smo jih nato bodisi simetrično ali asimetrično reducirali do nenasičenih derivatov triptofana **1** (Shema 2).



Shema 2. Simetrična ali asimetrična redukcija Δ Trp analogov v triptofanske analoge.

Med sintezo analogov dipodazina pa smo odkrili kiralno solvatizirajoče lastnosti (*S*)-1-benzil-6-metilpiperazin-2,5-diona **2**. Spojina **2** tvori preko vodikovih vezi z različnimi kiralnimi amini **3** diastereomerne heteromolekularne dimerne asociate, ki jih lahko opazujemo z NMR spektroskopijo in, ki nam omogočajo določanje enantiomernega presežka omenjenih aminov **3** (Shema 2).



Shema 3. Diastereomerni asociati spojine **2** z različnimi kiralni amini **3** in diskriminacija spojin **3** v $^1\text{H NMR}$ spektru. Iz $^1\text{H NMR}$ spektra je mogoče določiti enantiomerni presežek spojin **3**.

α,β -UNSATURATED- α -AMINO ACIDS IN THE SYNTHESIS OF SOME NATURAL COMPOUNDS AND THEIR ANALOGUES

J. Wagger

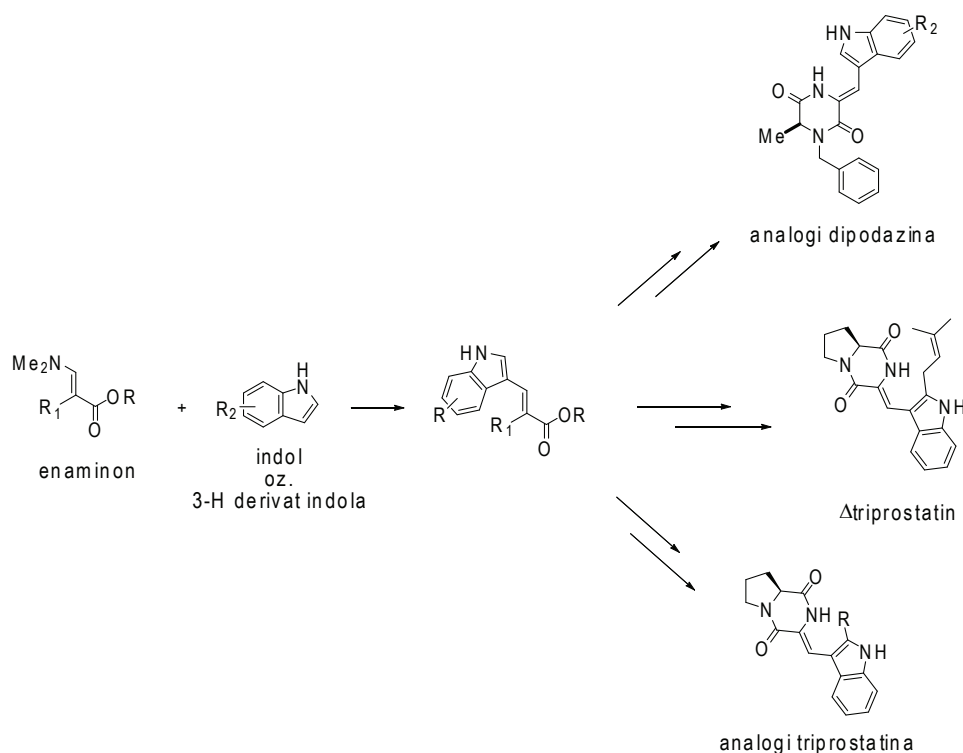
Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: B. Stanovnik

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

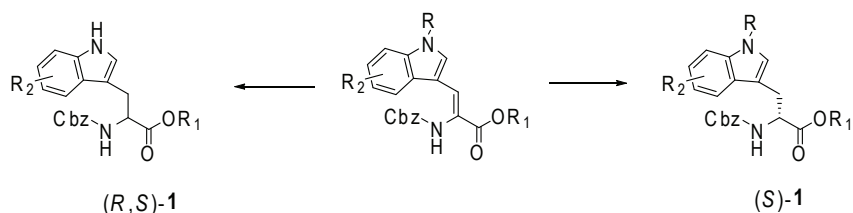
Amino acids belong to important group of compounds, since they represent one of the building blocks of life. It is not a surprise that in living world one can find numerous compounds which consist of amino acids and serve as a lead compounds in the drug discovery. α,β -Unsaturated- α -amino acids belong to a group of amino acids bio-synthesised from α -amino acids in various post-translation enzyme catalysed reactions in the synthesis of peptides and can be found in several natural products and alkaloids as for example: cephalosporine C, spirotryprostatin B and azinomycins A and B.

In our research group, among the others, we are also involved in the preparation of various enaminone based reagents, which were already successfully used in the synthesis of numerous heterocyclic compounds and some natural product analogues, as for example analogues of aplysinopsin and meridianine. Enaminone based synthetic strategy is very well suited for the synthesis of α,β -unsaturated tryptophan derivatives (Δ Trp). In our research work, we have prepared various analogues of dipodazine, an alkaloid that was isolated from *Penicillium nalgiovense*, and tryprostatin B and spirotryprostatin B, alkaloids isolated from *Aspergillus fumigatus*. These alkaloids possess interesting biological and pharmacological activities. For some analogues of dipodazine, it was shown on their antifouling activity, thus making them potential ingredients of bio-antifouling paints for maritime crafts. For tryprostatins A and B and spirotryprostatins A and B a cell cycle inhibition was found, while for the tryprostatin A a dual inhibition mechanism of microtubule polymerization and topoisomerase II was confirmed (Scheme 1).



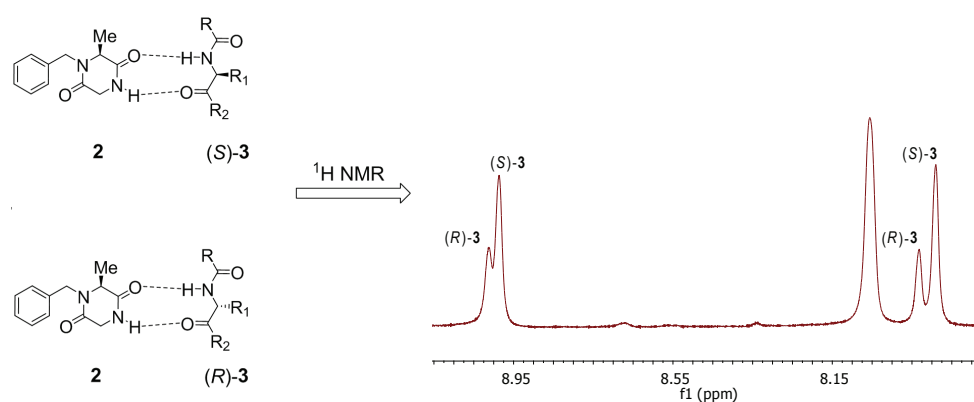
Scheme 1. Analogues of alkaloids dipodazine and tryprostatin B prepared by enaminone based synthetic strategy.

Also some *N*-benzyloxycarbonyl protected derivatives of Δ Trp were prepared and reduced symmetrically or asymmetrically to their tryptophan analogues **1** (Scheme 2).



Scheme 2. Symmetric or asymmetric reduction of Δ Trp analogues to tryptophan analogues.

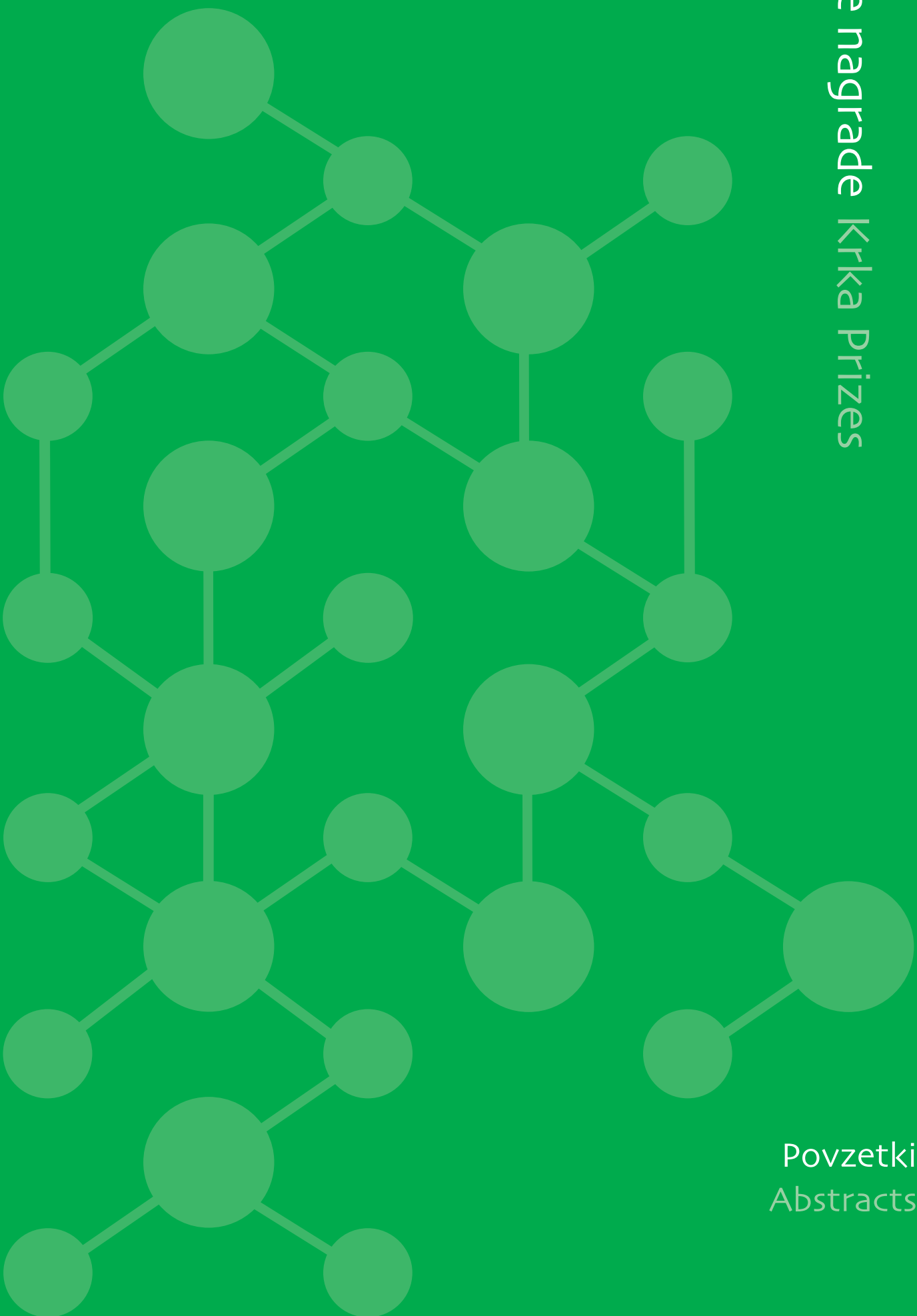
During synthesis of dipodazine analogues a chiral solvating properties of (S)-1-benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione **2** were discovered. Compound **2** interacts with various chiral amines **3** through hydrogen bonds, thus forming diastereomeric heteromolecular dimeric associates that can be observed by NMR spectroscopy and enable enantiomeric excess determination of previously mentioned amines **3** (Scheme 3).



Scheme 3. Diastereomeric associates of **2** with various chiral amines **3** and ^1H NMR spectrum of **3**. Enantiomeric excess of **3** can be determined from ^1H NMR spectrum.

Krkrine nagrade Krka Prizes

Povzetki
Abstracts



NAČRTOVANJE IN SINTEZA MIMETIKOV PREKURZORJEV PEPTIDOGLIKANA

A. Babič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: S. Pečar

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Že ob koncu 60. let se je človeštvo soočilo s problemom bakterijske rezistence človeku nevarnih patogenih mikroorganizmov. Zmanjšan razvoj novih protimikrobnih učinkovin in velik evolucijski pritisk z veliko uporabo znanih antibiotikov in kemoterapevtikov sta povzročila, da so bakterije pospešeno uporabile svoj rezistom, za pridobitev rezistence na praktično vse vrste antibiotikov v klinični uporabi. Več kot očitno je, da je potreba človeštva po nenehnemu iskanju in razvoju novih antibiotikov izjemno velika. Raziskave novih protimikrobnih učinkovin se usmerjajo v modulacijo novih tarč v bakterijah, ki bi zavirale njihovo rast po doslej še neznanih mehanizmi. Mur encimi, ki sodelujejo pri biosintezi peptidoglikana, bistvenega dela bakterijske celične stene, predstavljajo dobro raziskana in validirana tarčna mesta. V okviru te doktorske disertacije smo načrtovali in sintetizirali mimetike peptidoglikanskih prekurzorjev z namenom inhibicije encimov, ki sodelujejo pri citoplazemskih stopnjah biosinteze peptidoglikana. Sintetizirali smo nove mimetike prehodnega stanja, s katerimi smo skušali oponašati tetrahedrično prehodno stanje Mur ligaz. V sklopu tega dela smo razvili sintezne pristope, ki omogočajo sintezo hidroksietilaminskih dipeptidov in acetiliranih dipeptidov z reducirano peptidno vezjo. Sintetizirali smo tudi analoge dveh pomembnih peptidoglikanskih prekurzorjev: UDP-*N*-acetil-glukozamina and UDP-*N*-acetil-muraminske kisline. S konvergentno sintezo smo sintetizirali spojine, ki imajo difosfatni del nadomeščen z *O*- in *N*-sulfamoiilno skupino. Tako smo dobili stabilne analoge substratov Mur encimov, ki smo jih smo biološko ovrednotili. Izboljšali smo tudi totalno kemijsko sintezo UDP-*N*-acetil-muraminske kisline, ki je substrat MurC ligaze in izvedli prvo totalno sintezo UDP-*N*-acetil-muramoiil-L-alanina, ki je substrat MurD ligaze. Komercialno nedostopni in strukturno kompleksni substrati Mur encimov so potrebni za biološko testiranje novih inhibitorjev. Sintezno strategijo smo izboljšali in na bistvenih mestih modificirali.

DESIGN AND SYNTHESIS OF THE PEPTIDOGLYCAN PRECURSOR MIMETICS

A. Babič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: S. Pečar

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

By the end of the sixties humanity faced an increasing problem of antimicrobial resistance. Lack of research and development in new antimicrobial agents and high evolutionary pressure on bacteria by the use of known antibiotic have led to the emergence of resistance to virtually all antibiotic classes in clinical use today. The research efforts towards the development of new antibiotics are focusing on modulation of new essential targets in bacteria. Mur enzymes which catalyze the cytoplasmic steps of the cell wall biosynthesis constitute an established and validated group of targets. Peptidoglycan precursor mimetics have been designed and synthesized with the intent to inhibit essential enzymes involved in the cytoplasmic peptidoglycan biosynthesis. The design and synthesis of novel transition state mimetics which mimic the tetrahedral transition state in the Mur ligases is presented. Synthetic routes which allow convenient synthesis of hydroxyethylamine and acetylated reduced amide dipeptide isosteres have been developed. Diphosphate analogues of UDP-*N*-acetylmuramic acid and UDP-*N*-acetylglucosamine have also been synthesized. *O*- and *N*-sulfamoyl moieties have been introduced in place of the diphosphate by a convergent synthesis giving stable diphosphate mimetics of the peptidoglycan precursors which have been biologically evaluated. In the end the total chemical syntheses of UDP-*N*-acetylmuramic acid and UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine, the nucleotide substrates of the MurC and MurD ligases are presented. Commercially unavailable and structurally complex substrates of Mur ligases are needed for the biochemical evaluation of new inhibitors. The multi-step synthetic strategy has been improved and modified at several key reaction steps.

AVTOMATSKA VIZUALNA KONTROLA KAKOVOSTI TABLET IN KAPSUL

M. Bukovec

Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Mentor: F. Pernuš

Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Avtomatska vizualna kontrola kakovosti tablet in kapsul je zahtevna, ker so tablete in kapsule različnih velikosti, oblik, barv ter imajo različne oznake in ker se na njih pojavljajo različne napake. Predlagali, vrednotili in primerjali smo tri metode za avtomatsko vizualno kontrolo kakovosti tablet in kapsul. Geometrijska, statistična in neparametrična statistična metoda so zasnovane za dvodimenzionalne slike tablet in kapsul, ki so slikane iz tlorisa. Med seboj se razlikujejo v vrsti predznanja, s katerim modelirajo pojavnost izdelka na sliki. Predznanje o pojavnosti izdelka na sliki je zajeto z modelom pojavnosti, ki predstavlja jedro posamezne metode. Rezultati razvrščanja, ki so bili ovrednoteni z ROC analizo na petih različnih vrstah tablet in eni vrsti kapsul, kažejo, da je med tremi predlaganimi postopki neparametrična statistična metoda najbolj univerzalna posamezna metoda. Vendar se je metoda, ki združuje značilnice geometrijske, statistične in neparametrične metode, izkazala za najboljšo, saj je imela vedno enako ali boljšo občutljivost razvrščanja kot katerakoli od treh posameznih metod. Hitrost razvrščanja tablet in kapsul s predlaganimi postopki je predvsem odvisna od površine objekta, ki ga analiziramo. Hitrosti avtomatske kontrole kakovosti do 100 izdelkov na sekundo ali 360.000 izdelkov/h so za manjše tablete in kapsule realne in v praksi izvedljive. Predstavljene metode so splošno in obetajoče orodje za avtomatsko vizualno kontrolo kakovosti tablet in kapsul.

AUTOMATED VISUAL INSPECTION OF TABLETS AND CAPSULES

M. Bukovec

Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: F. Pernuš

Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Automated visual inspection of tablets and capsules is very demanding because products come in different sizes, shapes, colours, and imprints and have different surface defects. Three alternative methods for automated visual inspection of tablets and capsules are proposed, evaluated and compared. The geometrical, statistical and non-parametrical statistical methods are proposed for the analysis of 2D planar images of tablets and capsules. The problem becomes more manageable if some a priori knowledge of the imprint shape and/or appearance is incorporated into the tablet and capsule feature estimation. The proposed image analysis methods differ in image appearance models they incorporate. The classification results, evaluated by ROC analysis, of five different types of tablets and one type of capsules, indicate that the non-parametrical statistical method yields better defect detection sensitivity and specificity than the statistical and geometrical methods. The method incorporating features from all three methods proved to be the best, having equal or better defect detection sensitivity as any of the three individual methods. Since the inspection speed depends mainly on the object size, smaller tablets and capsules could easily be inspected with the speed of 100 tablets per second, i.e. 360,000 tablets per hour, which is sufficient for the current pharmaceutical tablet production rates and outperforms all of the currently available tablet inspection machines. The proposed image analysis methods are quite general and promising tools for automated visual inspection of pharmaceutical tablets and capsules.

OPTIČNI SENZORJI ZA KONTINUIRANO SPREMLJANJE OGLJIKOVEGA DIOKSIDA

M. Čajlaković

Institut za kemijo, Karl Franzens Universität Graz

Mentor: V. Ribitsch

Institut za kemijo, Karl Franzens Universität Graz

Znanje o podkožnem tkivu med travmatskimi situacijami je zelo omejeno, zato optični senzorji, ki so sposobni določanja metabolitskih parametrov (pH, $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$) igrajo pomembno vlogo pri karakterizaciji podkožnega tkiva in so pomembni za spremljanje sprememb v mikrovaskularnem krvnem toku in pri oskrbi tkiva z kisikom. Razvoj instrumentacije primerne za kontinuirano spremljanje parcialnega pritiska $p\text{CO}_2$ v podkožnem tkivu pri kritično bolnih pacientih je bil eden izmed ciljev evropskega projekta imenovanega CLINICIP (Closed Loop Insulin Infusion in Critically Ill Patients). Za ostvaritev določenih ciljev sta bila uporabljena dva principa: (1) DLR (Dual Luminophore Referencing) in RET-bazirani princip (Resonance Energy Transfer). DLR tehnika določanja temelji na uporabi pH indikatorja 8-hidroksipiren-1,3,6-trisulfonske kisline (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt HPTS) kot analit-odvisno barvilo in inertnega referenčnega dolgo-živečega luminoforja (rutenijev kompleks imobiliziran v poliakrilonitrilne nano delce za zmanjšanje kisikovega vpliva). Pri RET principu gre za prenos energije od inertnega dolgo-živečega luminoforja (rutenijev kompleks) kot donor k deprotonirani obliki pH-občutljivega kratko-živečega indikatorja kot akceptor. V obeh primerih je metoda merjenja takoimenovana fazno modulacijska fluorometrija. Da bi se vzpostavilo ali so spremembe $p\text{CO}_2$ in $p\text{O}_2$ v podkožnem tkivu med fazo šoka in oživljanja dejansko uporaben pokazatelj kliničnih pogojev pacientov, so bili izvedeni *in-vivo* poskusi na živalih in zdravih prostovoljcih s kombinacijo mikrodialize za ekstrakcijo medcelične tekočine in optičnih CO_2 senzorjev.

OPTICAL SENSORS FOR CONTINUOUS CARBON DIOXIDE MONITORING

M. Čajlaković

Institut für Chemie, Karl Franzens Universität Graz

Mentor: V. Ribitsch

Institut für Chemie, Karl Franzens Universität Graz

The knowledge about adipose tissue during traumatic situations is very limited, therefore optical sensors capable of determination of metabolic parameters (pH, $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$) are playing an important role to characterise adipose tissue and to monitor the changes in the micro vascular blood flow and in tissue oxygenation. The development of instrumentation suitable for continuous monitoring of $p\text{CO}_2$ in the adipose tissue of intensive care patients and $p\text{O}_2$ was one of the objectives of European project CLINICIP (Closed Loop Insulin Infusion in Critically Ill Patients). To realise defined goal, two sensing principles were followed: (1) DLR-based sensing technique and (2) FRET-based approach. DLR is based on use of pH-indicator 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) as analyte-dependent dye and an inert reference long-lifetime luminophore (ruthenium complex entrapped in poly(acrylonitrile) nanobeads to reduce oxygen cross-sensitivity). RET is using an inert long-living luminophore (ruthenium complex) as donor and deprotonated form of pH-sensitive short-living indicator as acceptor. Phase modulation fluorometry was used as measuring principle. *In-vivo* experiments on animal and healthy volunteers have been performed in order to examine tissue gas tensions during the shock and resuscitation phase and to investigate the changes of $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$ in subcutaneous tissue as useful information for clinical conditions of patients. Microdialysis was the approach for the extraction of the sample from the subcutaneous adipose tissue, the drawn interstitial fluid flows through a microfluidic circuit composed of CMA 60 microdialysis catheter to the optical sensor.

NOVI DEJAVNIKI TVEGANJA TER FUNKCIJSKE IN MORFOLOŠKE SPREMEMBE ARTERIJSKE STENE PRI MLAJŠIH KORONARNIH BOLNIKI

B. Eržen

Klinični oddelek za žilne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Mentor: P. Poredoš

Klinični oddelek za žilne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Številni, zlasti mladi bolniki utrpijo srčni infarkt brez prisotnih klasičnih dejavnikov tveganja za aterosklerozo. Namen naloge je bilo ugotoviti, ali imajo mladi bolniki po prebolelem srčnem infarktu prisotno endotelno disfunkcijo (ED) in zvečano prisotnost vnetnih pokazateljev v krvi, ter najti dodatne pokazatelje žilne funkcije in morfologije, ki bi omogočili boljšo oceno koronarne ogroženosti pri teh bolnikih. V raziskavo so bili vključeni mlajši moški bolniki v stabilnem obdobju po prebolelem srčnem infarktu bodisi z veliko ali majhno prisotnostjo klasičnih dejavnikov tveganja, kontrolno skupino pa so predstavljali zdravi, enako stari moški. V raziskavi smo med posameznimi skupinami preiskovancev primerjali ED, ki smo jo izračunali s pomočjo ultrazvočnega določanja od endotelija odvisne dilatacije brahialne arterije, vnetne pokazatelje v krvi, ter ostale pokazatelje žilne funkcije in morfologije (debelino intime-medie (IMT), gleženjsko-sistolni indeks in pulzni pritisk) ter ocenjevali ledvično delovanje, merjeno z glomerulno filtracijo (GFR). Naša raziskava je pokazala: da ED ni povzročena samo s klasičnimi, temveč tudi z neklasičnimi dejavniki tveganja; da prisotnost klasičnih dejavnikov tveganja oz. njihova odsotnost ne vpliva na raven vnetnih pokazateljev v krvi v stabilnem obdobju po prebolelem srčnem infarktu, z izjemo vrednosti interlevkina 6 ki je povečana pri vseh bolnikih po prebolelem srčnem infarktu; da je interlevkin 6 verjetno najbolj ustrezen cirkulirajoči pokazatelj (žilnega) vnetja in ED pri bolnikih po prebolelem srčnem infarktu; da sta ED in IMT pri mladih moških po prebolelem srčnem infarktu boljša pokazatelja koronarne ogroženosti kot klasični dejavniki tveganja; da so vrednosti GFR pomembno povezane z nekaterimi pokazatelji aterosklerotičnega procesa.

NOVEL RISK FACTORS AND FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE ARTERIAL WALL IN YOUNG CORONARY PATIENTS

B. Eržen

Clinical Department of Vascular Diseases, University Medical Centre Ljubljana

Supervisor: P. Poredoš

Clinical Department of Vascular Diseases, University Medical Centre Ljubljana

Younger patients frequently suffer myocardial infarction (MI) in the absence of classical risk factors of atherosclerosis. Aim of the study was to establish, whether young post-MI patients have endothelial dysfunction (ED) and increased presence of inflammation markers in the blood; to find out which markers of vascular function and morphology enable better risk estimation in these patients. Younger male patients in the stable phase after MI with either high or low expression of risk factors were included in the study. The control group consisted of healthy age-matched males. In the study we compared ED (estimated by ultrasound measurement of the endothelium-dependent dilation of the brachial artery), vessel inflammation markers in the blood and other markers of vascular function and morphology (intima-media thickness (IMT), ankle-brachial pressure index and pulse pressure) between different groups and investigated renal function, determined by glomerular filtration rate (GFR). Our study has showed: that ED is not due only to classical, but also to non-classical risk factors; that the presence of classical risk factors or their absence does not affect the levels of inflammation markers in the stable period after MI, with the exception of interleukin 6; that interleukin 6 appears to be the most suitable marker of (vascular) inflammation; that in young post-MI patients ED and IMT are better markers of coronary risk than classical risk factors; that GFR correlates to several markers of the atherosclerotic process.

VPLIV STRUKTURNIH SPREMEMB PRIONSKEGA PROTEINA NA INFEKTIVNOST IN VEZAVO SPECIFIČNIH REAGENTOV

I. Hafner Bratkovič

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Mentor: R. Jerala

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Prionske bolezni, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen spadajo med nevrodegenerativne bolezni, pri katerih v možganih nastajajo netopni amiloidni agregati. Prionske bolezni so edine izmed teh tudi nalezljive. Pod vplivom prionov se nativna oblika prionskega proteina (PrP) pretvori v netopen agregat, PrP^{Sc}, katerega trodimenzionalne strukture ni mogoče določiti. Z uvedbo novih disulfidnih vezi smo v PrP imobilizirali posamezne strukturne segmente. Z rezultati *in vitro* ter na celičnih linijah smo v nasprotju z večino dosedanjih modelov PrP^{Sc} ugotovili, da se pri pretvorbi velik del strukture PrP ohrani. Analizirali smo tudi vezavo protitelesa V5B2 in fluorescenčnih spojin na različne konformacijske oblike rekombinantnega PrP. Ugotovili smo, da fluorescenčne spojine (kurkumin, FDDNP ipd.) specifično prepoznajo le spremenjene oblike PrP in se na nativno obliko ne vežejo. Kurkumin kot spojina naravnega izvora z dolgo tradicijo uporabe v prehrani in zdravilstvu predstavlja odlično izhodišče za terapijo, druge spojine pa bodo uporabne za diagnostiko prionskih in sorodnih nevrodegenerativnih bolezni.

INFLUENCE OF PRION PROTEIN STRUCTURAL CHANGE ON INFECTIVITY AND BINDING OF SPECIFIC REAGENTS

I. Hafner Bratkovič

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Supervisor: R. Jerala

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Prion diseases, Alzheimer's and Parkinson's disease are neurodegenerative diseases, characterized by insoluble protein aggregates, however, only prion diseases are infectious. During disease progression native prion protein (PrP) under influence of infectious prion changes conformation into insoluble amyloid, PrP^{Sc}, 3D structure of which could not be determined. We restricted different parts of PrP structure by introduction of disulfide bonds. Our results based on cell culture and *in vitro* studies show that most of the PrP structure is conserved during conversion which is in contrast to majority of published PrP^{Sc} models. We also studied binding of antibody V5B2 and fluorescent compounds (curcumin, FDDNP etc.) to different conformations of recombinant PrP. Fluorescent compounds specifically recognized abnormal, but not native form of PrP. Curcumin as compound of natural origin with long tradition in human diet represents excellent starting-point for therapy, while other compounds have a great potential for diagnostics of prion and related diseases.

DOLOČEVANJE IZBRANIH TERPENSKIH IN FENOLNIH SPOJIN V RASTLINSKIH EKSTRAKTIH S PLINSKO KROMATOGRAFIJO IN MASNO SPEKTROMETRIJO

M. Islamčević Razboršek

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentorica: D. Brodnjak Vončina

Somentor: V. Doleček

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Razvili smo enostavno, pravilno in natančno analizno metodo za določanje devetih izbranih fenolnih in terpenskih spojin v različnih rastlinah iz družine *Umbelliferae* in v rastlinskih produktih. Izbrane preiskovane spojine so iz skupine fenolnih kislin (*cis*-, *trans*-rožmarinska in *cis*-, *trans*-kavna kislina), fenolnih diterpenov (karnozolna kislina in produkti njene razgradnje) in pentacikličnih triterpenov (betulin, oleanolna, betulinska in ursolna kislina). Ekstrakcija spojin je potekala v ultrazvočni kopeli ob uporabi mešanice topil tetrahidrofurana, etanola in piridina. Temu je sledilo čiščenje ekstraktov z ekstrakcijo na trdni fazi in z velikostno izključitveno kromatografijo. Razvita metoda temelji na ločevanju in določanju spojin po postopku derivatizacije s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo. Preverjali smo tudi stabilnost izbranih spojin ob izpostavljanju različnim pogojem. Stabilnostni testi so pokazali, da fenolne kisline pod vplivom UV svetlobe, povišane temperature in ob prisotnosti določenih topil izomerizirajo iz *trans* v *cis* obliko. Diterpenske spojine se ob enakih pogojih razgrajujejo oz. pretvarjajo v druge spojine. Nekatere razgradne produkte smo identificirali.

DETERMINATION OF SELECTED TERPENIC AND PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT EXTRACTS BY GAS CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

M. Islamčević Razboršek

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: D. Brodnjak Vončina

Co-supervisor: V. Doleček

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

A simple and precise analytical method has been developed for determination of nine selected phenolic and terpenic compounds in different plant species from *Lamiaceae* family and plant products. Selected compounds are from the groups of phenolic acids (*cis*-, *trans*-rosmarinic and *cis*-, *trans*-caffeic acid), phenolic diterpenes (carnosic acid and products of its degradation process) and pentacyclic triterpenoids (betulin, oleanolic, betulinic and ursolic acid). Extraction of the compounds was performed in an ultrasonic bath using a solvent mixture of tetrahydrofuran, ethanol and pyridine. The extracts were additionally cleaned with solid phase extraction and size exclusion chromatography. Developed procedure is based on the separation and determination of the compounds after derivatisation with gas chromatography and mass spectrometry. Stability of the selected compounds exposed to different conditions was established. The stability tests showed the isomerisation of the phenolic acids from *trans* to *cis* form caused by UV light, high temperature or presence of some solvents. Under the same conditions the diterpenic compounds were decomposed or transformed to the other compounds. Some of the decomposing compounds were identified.

TERMODINAMIČNE LASTNOSTI VODNIH RAZTOPIN IZOTAKTIČNE POLIMETAKRILNE KISLINE

B. Jerman

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: K. Kogej

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Vodne raztopine izotaktične polimetakrilne kisline (i-PMA) so kljub zelo svojskim lastnostim precej slabo raziskane. Z meritvami in izračuni termodinamskih lastnosti i-PMA ter primerjavo le-teh z ataktično oz. konvencionalno PMA (a-PMA) sem ugotovil razloge za drugačno topnost in obnašanje obeh stereoizomer pri nizkih stopnjah ionizacije ter razložil razlike v konformacijskem prehodu v procesu nabijanja verige. S pomočjo kalorimetričnih in potenciometričnih merjenj sem predlagal dva modela, ki razložita obnašanje verig obeh stereoizomer tekom procesa ionizacije. Meritve dinamičnega sipanja svetlobe ter navideznih molskih volumnov so pokazale težnjo verig i-PMA k medmolekulski asociaciji pri nizkih stopnjah ionizacije. Za razlago konformacije verig i- in a-PMA sem si pomagal tudi z izračuni molekulske dinamike. Ugotovil sem tudi, da je gostota naboja na verigi i-PMA večja kot v primeru a-PMA, kar je v primeru i-PMA posledica orientacije funkcionalnih skupin na verigi v obliki vijačnice.

THERMODYNAMIC PROPERTIES OF ISOTACTIC POLY(METHACRYLIC ACID) IN AQUEOUS SOLUTIONS

B. Jerman

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: K. Kogej

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Aqueous solutions of isotactic poly(methacrylic acid) (i-PMA) show very peculiar behavior, but sadly, were of little interest in the past. Thermodynamic properties for i-PMA have been measured and compared with the ones for atactic PMA (a-PMA) in dependence on degree of ionization. Reasons for differences in solubility and in conformational transition during the ionization process have been explained for both polymers. Two different molecular models were used to describe peculiar behavior of both chains during the ionization process. Dynamic light scattering measurements and apparent molar volume have shown great tendency of i-PMA chains towards intermolecular association. Molecular dynamics images on both PMA isomers were used to explain the conformation of both chains. Results have also shown greater charge density on i-PMA chain, which was attributed to locally helical conformation of the i-PMA chain.

NAČRTOVANJE REŽIMOV ODMERJANJA VARFARINA, RISPERIDONA IN HALOPERIDOLA Z METODAMI KLINIČNE FARMAKOKINETIKE

I. Locatelli

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: I. Grabnar

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Optimalni terapevtski učinek zdravil z učinkovinami, za katera je značilna velika interindividualna variabilnost (IIV) v farmakokinetičnih (FK) parametrih, je moč doseči z načrtovanjem individualnega odmerjanja zdravil. Osnovo za uspešno načrtovanje individualnega odmerjanja daje populacijska FK analiza, ki omogoča proučevanje vplivov različnih dejavnikov na IIV v FK parametrih. V okviru prve raziskave smo proučevali antikoagulacijsko zdravljenje z varfarinom, za katerega sta značilna velika IIV v višini potrebnega dnevnega odmerka ter ozko terapevtsko okno. Ugotovili smo, da je vzrok za razlike v potrebnem dnevnem odmerku varfarina različen metabolizem S-varfarina in da je njegov plazemski očistek največji pri nosilcih dveh normalnih alelov *CYP2C9*, pri nosilcih enega polimorfne alela je za polovico manjši, pri nosilcih dveh polimorfne alelov pa je zmanjšan za 70%. Izsledki te raziskave so bili uporabljeni pri posodobitvi povzetka glavnih značilnosti za varfarin, ki ga je avgusta leta 2007 odobrila agencija za zdravila v ZDA. V drugi raziskavi smo povezali veliko IIV v FK lastnostih risperidona in haloperidola s pojavnostjo neželenih učinkov oz. ekstra-piramidnih motenj gibanja. Razvili smo populacijski FK model risperidona, s katerim smo pojasnili, da *in vivo* iz risperidona nastaja predvsem (+)-9-hidroksirisperidon in da genetski polimorfizem *CYP2D6* pomembno vpliva na hitrost te pretvorbe. Ugotovili smo, da je pri bolnikih, ki so izkazovali ekstrapiramidne motnje gibanja, koncentracija aktivne oblike risperidona pomembno večja v primerjavi z bolniki, ki teh neželenih učinkov niso izkazovali, kar nakazuje na potencialno korist genotipizacije *CYP2D6* pri uvajanju antipsihotične terapije z risperidonom.

CLINICAL PHARMACOKINETICS OF WARFARIN, RISPERIDONE, AND HALOPERIDOLE: IMPLICATIONS FOR DOSING REGIMEN DESIGN

I. Locatelli

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: I. Grabnar

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Individual dosing regimen design is important for achieving optimal therapeutic outcome of drugs with large inter-individual variability (IIV) in pharmacokinetic (PK) parameters. With population PK approach the factors influencing the IIV of PK parameters can be evaluated, allowing designing individual dosing regimen. In the first study warfarin pharmacokinetics was investigated. Warfarin is an anticoagulant drug with narrow therapeutic index and high IIV in dose requirement. Thus, based on clinically relevant factors personalized pharmacotherapy for warfarin was suggested. *CYP2C9* genotype was found to be the most important factor influencing S-warfarin plasma clearance. In comparison to the patients homozygous for wild type allele the patients carrying only one and those carrying two polymorphic *CYP2C9* alleles had 50% and 70% lower S-warfarin clearance, respectively. The results of this study were included in the new labeling information for warfarin, approved by the FDA in August 2007. In the second study, risperidone and haloperidol pharmacokinetics were evaluated and relationship between PK and extrapyramidal adverse effects was assessed. A population PK model was developed revealing that (+)-9-hydroxyrisperidone was the main metabolite of risperidone *in vivo* and that *CYP2D6* genotype significantly influenced (+)-9-hydroxyrisperidone formation clearance. Patients with extrapyramidal symptoms had higher plasma concentration of risperidone active moiety, suggesting that these patients could benefit from previous *CYP2D6* genotyping and consequent reduction of risperidone dose level at the initiation of the therapy.

GENETSKI BIOOZNAČEVALCI PRI HUNTINGTONOVI BOLEZNI

L. Lovrečič

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: B. Peterlin

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: D. Krainc

Harvard Medical School, Boston

Huntingtonova bolezen (HB) je avtosomno dominantno dedna nevrodegenerativna bolezen s prevalenco 1/10.000 v večini evropskih držav. Bolezen je usodna po 15-20 letih progresivne nevrodegeneracije. Zdravila zaenkrat še ne poznamo. Čeprav sta bila gen, odgovoren za HB in mutacija odkrita že leta 1993, sta funkcija normalnega huntingtina in mehanizem, kako mutacija vodi do nevrodegeneracije, še vedno neznanka. Rezultati nedavnih raziskav so pokazali, da je mutirani huntingtin vpleten v delovanje splošnih transkripcijskih faktorjev, ki se izražajo v številnih tkivih. Zato je možno, da so motnje transkripcije prisotne v tkivih izven centralnega živčnega sistema, tudi v krvi. Predpostavili smo, da bi z analizo globalne genske ekspresije v krvi pri bolnikih s HB in nosilcih mutacije odkrili značilne ekspresijske profile, ki bi služili kot biooznačevalci. Odkriti biooznačevalci bi bili lahko uporabni kot orodje za napovedovanje začetka simptomov in napredovanja bolezni po pojavu simptomov, za boljše razumevanje patogenetskih mehanizmov bolezni, in v prihodnosti za oceno odgovora na nove oblike zdravljenja HB. Pokazali smo, da so v krvi preiskovancev s HB v primerjavi z zdravimi kontrolami prisotne spremembe v izražanju številnih genov in da te razlike lahko zaznamo. Izražanje genov je moteno in zaznavno že v presimptomatskih stadijih bolezni. Profili izražanja genov bi bili potencialno uporabni kot biooznačevalci, vendar so potrebne dodatne natančno definirane študije globalne genske ekspresije za izbiro specifičnih biooznačevalcev, za podrobnejši vpogled v napredovanje bolezni in njihovo klinično vrednost. Rezultati kažejo, da so spremembe v izražanju genov potencialno uporabno orodje za spremljanje odgovora na zdravljenje.

GENETIC BIOMARKERS FOR HUNTINGTON'S DISEASE

L. Lovrečič

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: B. Peterlin

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: D. Krainc

Harvard Medical School, Boston

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder with the prevalence of 1/10.000 in most European countries. The disease is fatal after 15-20 years of progressive neurodegeneration. No effective treatment has been available so far. Although the responsible gene and mutation were identified and characterized already in 1993, the function of normal huntingtin and the mechanism how the mutation leads to neurodegeneration are still not clear. Recent studies have shown that mutant huntingtin interferes with the function of widely expressed transcription factors, suggesting that gene expression may be altered in a variety of tissues in HD including peripheral blood. Thus, we hypothesized that analysis of global gene expression in blood of HD patients and mutation carriers may reveal specific gene expression signatures that could serve as biomarkers. These biomarkers may be utilized as tools for the prediction of disease onset and progression of symptoms, for better understanding the pathogenesis of the disease, and for monitoring clinical response to potential new therapies in the future. We have shown that global gene expression differences between HD patients and healthy controls in blood are present and detectable. Moreover, these changes are present already in presymptomatic mutation carriers. Gene expression profiles might potentially be used as biomarkers, although more well-defined global gene expression profiling studies are needed to choose specific biomarkers to improve the insight into the progression monitoring and clinical value. Also, our results suggest that gene expression changes might be useful as an instrument for treatment response monitoring.

RAZVOJ IN UPORABA ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE LIZOFOSFATIDNE KISLINE KOT OZNAČEVALCA TUMORJA NA JAJČNIKU

M. Meleh

Krka, d.d., Novo mesto, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: L. Zupančič Kralj

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: A. Mlakar

Krka, d.d., Novo mesto

Razvili smo hitro ter selektivno metodo za določevanje posamezne lizofosfatidne kisline (LPA) v serumu. Najprej smo ugotovili, da je potrebno ustrezno hranjenje vzorcev v silikonizirani oziroma stekleni embalaži, saj se LPA veže na plastiko. Ugotovili smo tudi, da je pomemben čas centrifugiranja krvi (največ 15 minut) zaradi težnje LPA po tvorbi micelov. Vse serume je potrebno pripraviti na enak način in jih shranjevati pri temperaturi nižji od 4°C. LPA smo z mešanico metanol-kloroform kvantitativno ekstrahirali iz seruma. V čistih ekstraktih smo določevali koncentracijo posameznih LPA s HPLC-MS/MS metodo. MS/MS detekcija je potekala po ionizaciji z razprševanjem v električnem polju s spremljanjem specifičnih reakcij razpada $[M-H]^-$. Razvito analizno metodo smo ustrezno ovrednotili ter uporabili za določevanje LPA v več kot 200 serumih. Dokazali smo bistveno višje koncentracije LPA v serumih pacientk z različnimi tumorji jajčnikov (benignimi in malignimi) kot v serumih zdravih žensk. V serumih pacientk z benignimi in z malignimi tumorji pa ni bilo pomembnih razlik v koncentracijah LPA, zato povišana koncentracija LPA za napovedovanje malignosti ni primerna.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ANALITICAL METHOD FOR DETERMINATION OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID AS A BIOMARKER FOR OVARIAN TUMOURS

M. Meleh

Krka, d.d., Novo mesto, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: L. Zupančič Kralj

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: A. Mlakar

Krka, d.d., Novo mesto

A fast and selective analytical method, used to determine the different lysophosphatidic acid (LPA) species in serum, has been developed. Since LPA stick to plastics, samples were kept in siliconised or glass packaging. The centrifugation time of the blood was also considered. It should be less than 15 minutes, because LPA tends to form micelles. Therefore all serums have to be prepared the same way and kept at temperature below 4°C. LPA species were quantitatively extracted from serum using methanol-chloroform. LPA levels were determined in clear extracts using the HPLC-MS/MS method. MS/MS detection was performed using electro-spray ionisation of specific degradation reactions of $[M-H]^-$. This method was properly validated and used to determine LPA in more than 200 sera. Significantly higher total LPA levels were determined in the sera of patients with different types of tumours (benign and malignant) comparing to healthy controls. However, no differences were found between the sera of patients with malignant and benign tumours, which mean that malignancy cannot be predicted on the basis of higher LPA concentration.

VLOGA PROTEINA AIRE PRI PODALJŠEVANJU PREPISOVANJA GENOV V EPITELIJSKIH CELICAH TIMUSNE SREDICE

I. Oven

Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: M. Narat

Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: M. Peterlin

University of California, San Francisco

Ena od napak v delovanju imunskega sistema je avtoimunost, okvara delovanja mehanizmov tolerance proti lastnim antigenom. Protein AIRE je pomemben dejavnik centralne tolerance in mutacije v človeškem genu *AIRE* lahko povzročijo nastanek bolezni avtoimunskega poliendokrinopatskega sindroma tipa 1. Prejšnje študije so pokazale, da AIRE sproži prepisovanje nekaterih tkivno-specifičnih antigenov v epitelijskih celicah timusne sredice in igra pomembno vlogo pri negativni selekciji avtoreaktivnih celic T. Vendar pa molekularni mehanizmi uravnavanja teh procesov z AIRE še niso razjasnjeni. V raziskavi smo preučevali, kako AIRE deluje na molekularni ravni in kako aktivira prepisovanje širokega repertoarja celičnih genov. Ugotovili smo, da AIRE deluje kot transkripcijski aktivator tipa IIA, ki uravnava predvsem podaljševanje prepisovanja z RNA polimerazo II, tako da v epitelijskih celicah timusne sredice veže in pripelje na promotor pozitivni dejavnik podaljševanja prepisovanja b (P-TEFb). V timusnih celicah AIRE tudi vzpodbudi ektopično prepisovanje genov za inzulin in za protein slin tipa 1, kar smo dokazali z metodo imunoprecipitacije kromatina. V zaključnem delu raziskave smo pokazali, da utišanje izražanja mišjega gena za ciklin T1, ki je del kompleksa P-TEFb, povzroči, da se geni, odvisni od proteina AIRE, ne prepisujejo več, kar povzroči nastanek limfocitnih infiltratov v solzni žlezi in žlezi slinavki pri miši.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da AIRE skupaj s P-TEFb stimulira podaljševanje prepisovanja tarčnih genov z RNA polimerazo II. Naše ugotovitve tako osvetljujejo ključne korake proteina AIRE, ki so potrebni za prepisovanje genov, ki uravnavajo centralno toleranco v timusu.

ROLE OF AIRE IN TRANSCRIPTIONAL ELONGATION OF GENES IN MEDULLARY THYMIC EPITHELIAL CELLS

I. Oven

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: M. Narat

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: M. Peterlin

University of California, San Francisco

AIRE is a transcriptional activator that directs the ectopic expression of many tissue-specific genes in medullary thymic epithelial cells, which plays an important role in the negative selection of autoreactive T cells. However, its mechanism of action remains poorly understood. In this study, we found that AIRE regulates the step of elongation rather than initiation of RNA polymerase II. For these effects AIRE bound and recruited positive transcriptional elongation factor b (P-TEFb) to target promoters in medullary thymic epithelial cells. In these cells, AIRE activated the ectopic transcription of insulin and salivary protein 1 genes. Indeed, by chromatin immunoprecipitation, we found that RNA polymerase II was already engaged on these promoters but was unable to elongate in the absence of AIRE. Moreover, the genetic inactivation of cyclin T1 (CycT1) from P-TEFb abolished the transcription of AIRE-responsive genes and led to lymphocytic infiltration of lacrimal and salivary glands in the CycT1^{-/-} mouse. Our findings reveal critical steps by which AIRE regulates the transcription of genes that control central tolerance in the thymus.

STEREOSELEKTIVNE IN REGIOSELEKTIVNE SINTEZE BICIKLIČNIH PIRAZOLIDINONOV

L. Pezdirc

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: J. Svete

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V našem raziskovalnem delu smo proučevali reakcije različnih (1Z,4*R**,5*R**)-1-arilmetiliden-4-benzoilamino-5-fenilpirazolidin-3-on-1-azometin iminov z različnimi dipolarofili. Tip produkta je bil odvisen od tipa dipola, uporabljenega dipolarofila in reakcijskih pogojev. V večini primerov so potekle 1,3-dipolarne cikloadicije azometin iminov na dipolarofile. Izjema so bile reakcije azometin iminov s kalijevim cianidom, pri čemer je prišlo do odprtja obroča s cepitvijo N-N vezi. Pri cikloadicijah so nastali biciklični in triciklični sistemi. V večini primerov so bile cikloadicije visoko selektivne. Stereokemija reakcij je bila odvisna od fenilne skupine na položaju 5 v azometin iminu, *orto*-substituentov vezanih na aromatskem obroču azometin imina in od tipa dipolarofila.

V nadaljevanju smo študirali uporabnost (1Z,4*R**,5*R**)-1-arilmetiliden-4-benzoilamino-5-fenilpirazolidin-3-on-1-azometin iminov v kombinatorni sintezi.

STEREOSELECTIVE AND REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF BICYCLIC PYRAZOLIDINONES

L. Pezdirc

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: J. Svete

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In our research, reactions of various (1Z,4*R**,5*R**)-1-arylmethylidene-4-benzoylamino-5-phenylpyrazolidin-3-on-1-azomethine imines with different dipolarophiles were studied. The type of product depended on the structure of dipole and the dipolarophile and on the reaction conditions. In most cases, 1,3-dipolar cycloadditions of azomethine imines to dipolarophiles took place. Exception was reaction of azomethine imines with potassium cyanide, where a ring opening by cleavage of the N-N bond occurred. Cycloadditions yielded bicyclic and tricyclic systems. In most cases, cycloadditions were highly stereoselective. Stereochemistry of the cycloadditions to azomethine imines was found to be controlled by the stereodirecting phenyl group at position 5 in azomethine imines, by the type of dipolarophiles, and by the *ortho*-substituents at the aromatic ring.

In extension, applicability of (1Z,4*R**,5*R**)-1-arylmethylidene-4-benzoylamino-5-phenylpyrazolidin-3-on-1-azomethine imines in combinatorial synthesis was studied.

VPLIV REAKCIJSKIH POGOJEV NA TRANSFORMACIJE ORGANSKIH MOLEKUL Z N-HALOGENO REAGENTI

I. Pravst

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: M. Zupan

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: S. Stavber

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Raziskoval sem vpliv reakcijskih pogojev na transformacije ketonov ter fenolov in njihovih derivatov z N-halogeno reagenti in pri tem posebno pozornost posvetil razvoju okolju prijaznejših reakcijskih protokolov. Ugotovil sem, da je številne ketone mogoče uspešno halogenirati z N-halosukcinimidi (NXS) pod pogoji brez topila v prisotnosti kislinskega katalizatorja, medtem ko funkcionalizacija bolj enoliziranih β -dikarbonilnih spojin poteče že brez prisotnosti katalizatorja. Produkta sem v nekaterih primerih uspel izolirati povsem brez uporabe organskih topil, kar je pomembno s stališča varovanja okolja. Pri tem sem ugotovil, da so reakcije pod pogoji brez topil v splošnem bolj selektivne in hitre kot v organskih topilih. Pri bromiranju metoksi substituiranih aril ketonov pod reakcijskimi pogoji brez topila nastanejo α -bromo substituirani produkti, medtem ko voda kot reakcijski medij spremeni regioselektivnost in selektivno nastanejo produkti substitucije na aromatskem jedru. Odkril in razvil sem nov postopek sinteze α,α -difluoroketonov preko ustreznih iminskih derivatov. Transformacija poteče selektivno in učinkovito z uporabo F-TEDA v acetonitrilu pri 80°C. Nadalje sem raziskal fluoriranje 4-alkil substituiranih fenolov pod milimi reakcijskimi pogoji z N-F reagenti. Sterične interakcije, struktura reagenta in reakcijski pogoji zelo vplivajo na regioselektivnost uvedbe fluora.

THE EFFECT OF REACTION CONDITIONS ON THE FUNCTIONALISATION OF ORGANIC MOLECULES WITH N-X REAGENTS

I. Pravst

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: M. Zupan

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: S. Stavber

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

The effect of reaction conditions on the functionalisation of ketones, phenols and their derivatives with N-X reagents using environmentally friendlier synthetic protocols is described. The halogenation of ketones, 1,3-diketones, β -keto esters and β -keto amides using N-halosuccinimides (NXS) in water and under solvent-free conditions is explored. A number of ketones were halogenated with N-halosuccinimides and PTSA as an acid catalyst under solvent-free reaction conditions at various temperatures in molten reaction mixtures. The halogenation of more enolized 1,3-diketones and β -ketoamide also proceeds in the solid state and without the need for a catalyst. Organic solvent-free conditions, a major feature of the green chemistry concept, were successfully applied for these reactions and for product isolation. The process is selective and occurs more rapidly than when using organic solvents. Methoxy substituted aryl ketones are brominated on the side chain under solvent-free reaction conditions; a change in the regioselectivity is noted in water, where ring functionalisation occurs. A novel procedure for the synthesis of α,α -difluoroketones via imine derivatives was also developed. Transformation can be performed effectively and selectively if F-TEDA is used as the reagent, and when the reaction is performed at 80°C in acetonitrile. The fluorination of 4-alkyl substituted phenols under mild reaction conditions with three different reagents: F-TEDA, NfTh in FP-B800 was also explored. Steric interactions, reagent structure and reaction conditions strongly influence the regioselectivity of the transformation.

KARAKTERIZACIJA MIKOCIPINOV IZBRANIH VRST PROSTOTROSNIC Z GENSKIM IN PROTEINSKIM INŽENIRSTVOM

J. Sabotič

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Mentor: B. Štrukelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: J. Brzin

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Prostotrosnice ali gozdne gobe so kljub številčnosti in dokazanem zdravilnem delovanju v biokemijskem smislu zelo slabo raziskane. S celostnim pristopom k proučevanju proteolitičnih sistemov pri gobah smo, tako na molekularnem nivoju, kot tudi na nivoju beljakovin in njihove vloge, proučevali proteaze in ustrezne inhibitorje v gobah. Proteaze imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških in patoloških procesih, zaradi česar so pomembne tarče pri načrtovanju in razvoju zdravil. Pokazali smo presenetljivo raznolikost in število proteaz pri prostotrosnicah ter opisali popolnoma nov tip inhibitorja cisteinskih proteaz iz gob poprhnjene livke (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*). Gre za izjemno obstojne beljakovine, ki specifično zavirajo delovanje mnogih človeških, živalskih in rastlinskih proteolitičnih encimov. Ta tip inhibitorjev smo poimenovali mikocipini in ga okarakterizirali na proteinskem in genetskem nivoju, kar je omogočilo vzpostavitev nove družine proteaznih inhibitorjev v biokemični klasifikaciji MEROPS. Mikocipini imajo verjetno več bioloških vlog, zlasti zaščitno vlogo pred naravnimi sovražniki, to je drugimi glivami, virusi in žuželkami, izključena pa ni niti vloga povezana z metabolizmom RNA. Nove in neobičajne lastnosti proteaznih inhibitorjev iz gob kažejo na njihovo uporabnost v humani in veterinarski medicini, pri zaščiti in izboljšavi poljščin v kmetijstvu ter v različnih biotehnoloških procesih.

CHARACTERIZATION OF MYCOCYPINS FROM SELECTED BASIDIOMYCETE SPECIES USING GENETIC AND PROTEIN ENGINEERING

J. Sabotič

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Supervisor: B. Štrukelj

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: J. Brzin

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Basidiomycetes or mushrooms are despite their abundance and proven medicinal properties biochemically poorly known. We have extensively studied proteolytic systems of mushrooms by analyzing proteases and their inhibitors at the molecular level as well as biochemical and functional levels. Proteases play important roles in many physiological and pathophysiological processes which makes them ideal targets for drug development and design. We have shown the remarkable number and diversity of proteases in basidiomycetes and identified a new type of cysteine protease inhibitors from clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) and parasol mushroom (*Macrolepiota procera*). These are exceptionally stable proteins that specifically inhibit proteolytic activity of many human, animal and plant proteases. We named this type of inhibitors mycocypins and characterized it at protein and gene level, which led to establishment of a new family of protease inhibitors in the MEROPS biochemical classification. Mycocypins probably have several biological roles, foremost a defensive role against natural enemies, namely other fungi, viruses and insects, while another possible role of mycocypins is linked to RNA metabolism. New and unusual properties of protease inhibitors from mushrooms make their potential applications apparent in human and veterinary medicine, in plant protection and improvement in agriculture, and in various biotechnological processes.

ENCIMSKA SINTEZA ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN V ORGANSKIH TOPILIH IN V SUPERKRITIČNEM OGLJIKOVEM DIOKSIDU

S. Šabeder

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentorica: M. Habulin

Somentor: Ž. Knez

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Namen doktorske disertacije je bil razviti nove, alternativne metode sinteze estrov maščobnih kislin, ki omogočajo uporabo produktov v prehrabetni, kozmetični in farmacevtski industriji. Prva metoda sinteze temelji na uporabi organskih topil, dovoljenih za proizvodnjo produktov uporabnih v prehrabetni industriji in druga na uporabi superkritičnih fluidov. Za sistema esterifikacije sladkorjev z maščobnimi kislinami in esterifikacije terpenov z maščobnimi kislinami, katalizirana z imobilizirano lipazo, smo določili optimalne reakcijske parametre v organskih topilih pri atmosferskem tlaku in v SC CO₂. Nadalje smo očistili encimsko sintetizirane sladkorne estre maščobnih kislin ter določili njihovo antimikrobno delovanje proti testnim mikroorganizmom, katerega smo primerjali z antimikrobnim delovanjem komercialnih estrov sahoroze ter tako nakazali nove možnosti uporabe produktov. Sladkorni estri delujejo potencialno antibakterijsko, anti-tumorno in insekticidno. Ker potreba po učinkovitih postopkih za kontrolo patogenih mikroorganizmov v živilih narašča, predstavljajo sladkorni estri maščobnih kislin obetajočo alternativo prehrabetnim dodatkom, ki za razliko od komercialnih emulgatorjev delujejo potencialno antibakterijsko.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF FATTY ACID ESTERS IN ORGANIC SOLVENTS AND IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

S. Šabeder

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: M. Habulin

Co-supervisor: Ž. Knez

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Aim of the PhD thesis was to develop new, alternative methods for the fatty acid esters synthesis, which would allow application of the products in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The first method is based on the use of organic solvents compatible for the application in food industry and the second method is based on the use of supercritical fluids. Optimal reaction conditions were determined for systems of esterification of sugars with fatty acids and esterification of terpenes with fatty acids, catalyzed by immobilized lipase in organic solvents at atmospheric pressure and in SC CO₂. Furthermore, enzymatically synthesized sugar fatty acid esters were purified and their antimicrobial activities against test microorganisms were determined and compared to the antimicrobial activities of commercial sucrose esters, which may open new possibilities for their use. Sugar fatty acid esters have potential antibacterial, antitumoral and insecticidal properties. Since a demand for production of novel compounds able to inhibit the growth of micro-organisms causing food spoilage is rising, enzymatically synthesized sugar fatty acid esters present a promising alternative to food additives, which have a potential antimicrobial activity compared to the commercial emulsifiers.

MOLEKULARNA ANALIZA GENOV SEROTONINSKE SIGNALNE POTI IN SAMOMOR V SLOVENIJI

A. Videtič

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: M. Tomori

Somentor: R. Komel

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Samomor predstavlja velik zdravstveni problem po celem svetu, saj ga vsako leto stori približno milijon ljudi. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je bilo leta 2003 v Sloveniji 25 samomorov na 100.000 prebivalcev, kar nas uvršča med deset držav z najvišjim samomorilskim količnikom na svetu. Ker je samomor večplasten fenomen, je odvisen od spleta številnih okoljskih dejavnikov, molekularno-biološke raziskave pa kažejo tudi na vpliv genetskih dejavnikov. Genetske študije živčnih prenašalcev na vzorcih možganov in krvi žrtev samomora so pokazale, da je z največjo verjetnostjo v samomor vpleten serotoninski (5-HT, 5-hidroksitriptofan) sistem. Namen našega dela je bila genetska preiskava polimorfizmov večjega števila kandidatnih genov serotoninske signalne poti in ugotovitev njihove možne povezave s samomorom. Ugotovili smo, da se skupini kontrol in žrtev samomora v porazdelitvi frekvenc genotipov in alelov med seboj statistično razlikujeta v skupini žensk, in sicer za funkcijski polimorfizem G68C v genu HTR2C. Statistična pomembnost se je ohranila, tudi ko smo združili žensko in moško populacijo. Za polimorfizem C(-1420)T v genu HTR2A smo ugotovili možno povezanost s samomorom. Analiza ostalih polimorfizmov ni pokazala povezave s samomorom. Naredili smo eno izmed najbolj obširnih genetskih analiz žrtev samomora na slovenski populaciji in pridobili pomembne informacije, ki lahko služijo kot smernice za nadaljnje raziskovanje.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE GENES OF SEROTONERGIC PATHWAY AND SUICIDE IN SLOVENIA

A. Videtič

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: M. Tomori

Co-supervisor: R. Komel

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Suicide is a serious health problem; every year, world-wide approximately one million people commit suicide. According to WHO, 25 people per 100.000 citizens committed suicide in Slovenia in the year 2003, which ranks Slovenia among the top ten countries with highest suicide rates in the world. Suicide is a complex phenomenon of environmental factors, but nevertheless, molecular-biologic investigations suggest implication of genetic factors in tendency of committing suicide. Genetic studies of neurotransmitters from brain and blood samples of suicide victims showed that serotonergic system might be implicated in suicide. The purpose of the present work was to perform genetic analysis of the polymorphisms of candidate genes of serotonergic system and to try to ascertain possible implications in suicide. Statistically important differences between suicide and control groups of women were found in genotype and allele frequencies for polymorphism G68C in the HTR2C. Statistical importance was resumed even after combining male and female populations. For polymorphism C(-1420)T in the HTR2A, a possible tendency for connection with suicide was noticed. Analysis of all the other polymorphisms was not statistically significant. The present genetic investigation is one of the first of such extent on Slovenian population of suicide victims and we obtained important information that could give new directions for further investigations.

NEUTRALIZACIJA ENDOTOKSINA Z NOVIMI ANTIMIKROBNIMI UČINKOVINAMI

M. Zorko

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Mentor: P. Pristovšek

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Sestavine bakterijskih sten (lipopolisaharid, lipoteihoična kislina, peptidoglikani) sprožijo imunski odziv, ki vodi v aktivacijo komplementa ter izločanje citokinov. Če je ravnotežje med vnetnim in protivnetnim odzivom porušeno, se lahko razvije sepsa. Namen naše raziskave je bil razviti in analizirati učinkovite antimikrobne peptide ter oleoilamine kot peptidomimetike s širokim spektrom delovanja na bakterije, sposobnostjo nevtralizacije endotoksina ter nizko toksičnostjo za človeške celice.

Pripravili smo sistem za pridobivanje večjih količin biološko aktivnega rekombinantnega peptida preko tvorbe netopnega fuzijskega proteina. V okviru evropskega projekta ANEPID so bile pripravljene tri generacije antimikrobnih peptidov. Za spojino vodnico je služil LF11, kratek peptidni fragment z N-terminalnega dela človeškega laktoferina. Vezavo peptidov na lipopolisaharid in lipoteihoično kislino smo analizirali s fluorescenčnim BODIPY-kadaverinom.

Farmakofor za nevtralizacijo lipopolisaharida sestavlja amfipatična molekula s terminalnima protoniranimi kationskima skupinama na razdalji 14 Å ter vmesno hidrofobno skupino. Na osnovi tega farmakofora smo zasnovali sintetične oleoilamine ter izbrali dva bisbiguanida aleksidin in klorheksidin, ki nevtralizirata imunostimulatorne komponente bakterijskih sten.

NEUTRALIZATION OF ENDOTOXIN BY NOVEL ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

M. Zorko

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Supervisor: P. Pristovšek

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

The components of bacterial cell walls (lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, peptidoglycan) trigger an immune response which leads to activation of complement proteins and cytokine release. If the balance between the inflammatory and anti-inflammatory response is disrupted, sepsis can develop.

The aim of our research was to develop and analyse effective antimicrobial peptides and oleoylamines as peptidomimetics with a broad activity spectrum on bacteria, the ability to neutralize endotoxins and low toxicity on human cells. We prepared a system in bacteria to obtain larger quantities of the biologically active recombinant peptide via formation of an insoluble fusion protein. In the framework of the European project ANEPID, we prepared three generations of antimicrobial peptides. The leading compound was LF11, a short peptide fragment originating from the N-terminal of human lactoferrin. We analysed the binding of peptides to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid with fluorescent BODIPY-cadaverine.

The structural motif required to neutralise lipopolysaccharides consists of an amphiphatic molecule with terminal protonated cationic groups separated by a distance of 14 Å with an additional hydrophobic moiety in-between. On the basis of this pharmacophore we designed synthetic oleoylamines and chose two bisbiguanides alexidine and chlorhexidine which neutralizing immunostimulatory components of bacterial cell walls.

VPLIV SESTAVIN NA TERMIČNE LASTNOSTI SLADKORNIH TALIN

Z. Rajtman

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

Mentor: S. Srčič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

V proizvodnem obratu Ljutomer, Krka, d.d., tovarna zdravil Novo mesto, proizvajamo obložene tablete s tehnologijo sladkornih talin in talin s sladkornimi analogi. Obložene tablete imajo trdo sladkorno jedro, ki je izdelano s stiskanjem in obloženo s sladkorno oblogo. Vsebujejo različne skupine zdravilnih učinkovin, npr. vitamine, minerale, eterična olja, antiseptike, lokalne anestetike, lecitin, etc.

Ugotavljali smo vpliv sestavin na temperaturo steklastega prehoda (T_g) sladkornih talin. Proučevali smo posebej pripravljene vzorce in polizdelke različnih stopenj redne proizvodnje. Vzorcem smo s termičnimi metodami (DSC ali/in MTDSC) določali T_g , jih opazovali pod mikroskopom, s Karl Fischer metodo smo določili vsebnost vode. Ugotovili smo, da je pri pripravi sladkorne taline izjemno pomembna vsebnost vode, ki jo lahko uravnavamo s stopnjo vakumiranja. Voda v talini deluje kot mehčalo in zniža T_g . Relativna vlažnost v proizvodnih prostorih pri sobni temperaturi ne sme presegati vrednosti 40%. Ugotovili smo, da dodatek vitaminov zniža vrednost T_g , in da imajo značilen vpliv hidrofilni vitamini. Vpliv je odvisen tudi od količine dodatka (večja količina, večji vpliv). Med preiskovanimi hidrofilnimi vitamini pa je imel največji vpliv vitamin C. Vpliv dodatkov je bil bolj izražen, če je bila vsebnost vode v izhodišču nižja. Potrdili smo tudi literaturne podatke, da dodatek polimera PVP zviša vrednost T_g .

Zmesi dodatkov delujejo kompleksno in praviloma pride do »prekrivanj« in je zato absolutni učinek le v grobem napovedljiv iz posameznih prispevkov.

THE INFLUENCE OF INGREDIENTS ON THERMAL BEHAVIOUR OF SUGAR HOT MELTS

Z. Rajtman

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

Supervisor: S. Srčič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

In the production facility of Ljutomer, Krka, d.d., Novo mesto we produce coated tablets with the technology of sugar hot melts and melts with sugar-like compounds. Coated tablets have a hard sugar core, produced by compression and coated with a sugar layer. They contain various groups of medical active ingredients, e.g. vitamins, minerals, essential oils, antiseptics, local anaesthetics, lecithin, etc.

We determined the influence of ingredients on the glass transition temperature (T_g) of sugar hot melts. We analysed individually prepared samples and half-products at various stages of the standard production. We determined the T_g of the samples with thermal methods (DSC and/or MTDSC), watched them under the microscope and determined their water content with the Karl Fischer method. We determined that the water content, which can be regulated through the vacuum level, during the preparation of the sugar hot melts, is extremely important. The water in the melt effectively works as a plasticizer and decreases T_g . The relative humidity in the production rooms at room temperature cannot ever exceed 40%. We determined that the addition of vitamins lowers the T_g value and that hydrophilic vitamins have a characteristic effect. The effect depends on the quantity of additive (the greater the quantity, the greater the effect). Among the analysed hydrophilic vitamins, vitamin C had the greatest effect. We determined that the influence of the additives was more noticeable, if the initial water content was lower. We also confirmed the literature data, that the addition of PVP polymer raises the T_g value.

The additive mixes work in a complex manner and it naturally comes to "overlapping". It is hence only possible to roughly establish the absolute effect of the individual contributions.

VPLIV SOCIALNO-DEMOGRAFSKIH ZNAČILNOSTI IN ZDRAVSTVENEGA STANJA POPULACIJE NA UPORABO ZDRAVIL RASTLINSKEGA IZVORA V SLOVENIJI

B. Razinger Mihovec

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: M. Lipnik Štangelj

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: A. Krbavčič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

V nalogi smo z javnomnenjsko raziskavo s telefonskim anketiranjem proučili in analizirali pogostnost uporabe zdravil rastlinskega izvora v Republiki Sloveniji ter vpliv zdravstvenega stanja in nekaterih socialno-demografskih značilnosti na uporabo zdravil rastlinskega izvora. Pridobili in analizirali smo tudi podatke, katera zdravila rastlinskega izvora ljudje najpogosteje uporabljajo in za kakšne namene. Raziskava je pokazala, da uporablja zdravila rastlinskega izvora skoraj 72% slovenske populacije.

Ugotovili smo, da na uporabo zdravil rastlinskega izvora značilno vplivata le ženski spol in prisotnost bolezni. Ostali dejavniki, kot so starost, izobrazba, zaposlitveni status, velikost naselja, v katerem ljudje živijo, niso pokazali značilnega vpliva. Prebivalci Republike Slovenije uporabljajo zdravila rastlinskega izvora predvsem za zdravljenje sezonskih bolezni. Največ zdravil rastlinskega izvora še vedno uporabljajo v obliki čajev. Rezultati magistrskega naloge bodo uporabni predvsem za lažjo identifikacijo uporabnikov zdravil rastlinskega izvora, njihovo ustrežnejšo zdravstveno oskrbo in kot vir podatkov, potrebnih pri načrtovanju proizvodnje in trženja zdravil rastlinskega izvora.

THE INFLUENCE OF SOCIO-DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND HEALTH STATUS OF THE POPULATION ON THE USE OF HERBAL MEDICINES IN SLOVENIA

B. Razinger Mihovec

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: M. Lipnik Štangelj

Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: A. Krbavčič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

A population-based telephone survey was performed to investigate and analyse the frequency of herbal medicines use in the Republic of Slovenia and the relationship between their use, health status, and some socio-demographic characteristics. A further aim was to identify and analyse which herbal medicines people take the most frequently and for which indications. The study showed that nearly 72% of the Slovenian population uses herbal medicines.

We found that only female gender and existence of disease were significantly related to herbal medicines use. Other factors such as age, education, occupational status, place of residence, did not show significant influence on herbal medicines use. The population of the Republic of Slovenia uses herbal medicines mainly for the seasonal diseases. Most herbal medicines are consumed in the form of teas. The study results will be useful to more easily identify the users of herbal medicines and will contribute to their more appropriate medical care. They can be a source of information for planning a production and marketing of herbal medicines.

SINTEZA ANALOGOV SUBSTRATA MUREIN PEPTIDNE LIGAZE (Mpl)

M. Banovec

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: S. Gobec

Somentorica: A. Kovač

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Peptidoglikan je glavna komponenta bakterijske stene, ki varuje bakterijsko celico pred lizo. Sestavljen je iz dolgih glikanskih verig, ki so prečno premrežene s kratkimi peptidi. Biosinteza peptidoglikana je kompleksen večstopenjski proces pri katerem sodelujejo številni encimi. Murein peptidna ligaza (Mpl) je prisotna pri nekaterih G- bakterijah in omogoča, da se tripeptid L-Ala-γ-D-Glu-*mezo*-A₂pm, ki nastaja ob razgradnji celične stene, veže na UDP-MurNAc in tako reciklira. V okviru raziskovalne naloge smo s sodobnimi metodami peptidne kemije sintetizirali serijo tripeptidov s splošno formulo L-Ala-γ-D-Glu-Xaa. Xaa so različne aminokisline, ki imajo v primerjavi z *mezo*-diaminopimelinsko kislino (*mezo*-A₂pm) drugačno pozicijo terminalne amino skupine, ali pa amino skupine sploh nimajo. Te spojine bi ob vgradnji v peptidoglikan z Mpl lahko delovale kot lažni substrati, ki bi onemogočile prečno premreženje peptidoglikana in s tem sprožile bakterijsko smrt.

SYNTHESIS OF SUBSTRATE ANALOGS OF MUREIN PEPTIDE LIGASE (Mpl)

M. Banovec

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: S. Gobec

Co-supervisor: A. Kovač

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Peptidoglycan is a major component of the bacterial cell wall that plays an essential role in protecting bacteria from lysis. It is composed of long glycan chains that are cross-linked by short peptides. The biosynthesis of bacterial cell wall peptidoglycan is a complex process involving many enzymes. Murein peptide ligase (Mpl) is a nonessential enzyme found in some G- bacteria. Mpl is known to be a recycling enzyme allowing reincorporation into peptidoglycan of the tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm, which is released during the maturation of bacterial cell. Using modern methods of peptide chemistry we synthesized a focused library of tripeptides with general formula L-Ala-γ-D-Glu-Xaa. Xaa are different amino acids without side-chain amino group or with side-chain amino group attached to different positions as compared to *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-A₂pm). Incorporation of these potential false substrates into peptidoglycan with Mpl might accordingly affect stability of bacterial cell wall and thus potentially provoke bacterial cell lysis.

DOLOČANJE GENSKÉ STABILNOSTI SEVA *Bacillus subtilis* IN UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI TOKSINOV

P. Hančič

Krka, d.d, Novo mesto

Mentor: J. Kos

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: A. Plaper

Krka, d.d., Novo mesto

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki izboljšujejo črevesno mikrofloro in imajo ugoden učinek na gostitelja. Nekatere seve probiotika *Bacillus subtilis*, ki izloča encime in antibiotike, preučujemo v genetskih in biokemijskih raziskavah že nekaj desetletij. Uvrščamo ga v rod *Bacillus*, prav tako kot *Bacillus cereus*, ki povzroča diarejske in emetične sindrome zastrupitve s hrano z različnimi toksini. Namen diplomske naloge je bil določiti gensko stabilnost *B. subtilis* z uporabo metode naključno pomnožene polimorfne DNK (RAPD) s petimi različnimi izolati DNK, ki smo jih izolirali ob različnih časovnih ciklih razmnoževanja. Pred začetkom izvedbe omenjene reakcije smo RAPD metodo optimizirali z dvema različnima začetnima oligonukleotidoma. Ugotovili smo, da je *B. subtilis* gensko stabilen, saj so bili RAPD profili pomnoženih odsekov med sabo homogeni. V raziskavo smo vključili tudi ugotavljanje prisotnosti enterotoksina Hbl v *B. subtilis* z reverzno pasivno aglutinacijo z lateksom (BCET-RPLA test). Rezultat testa je bil negativen; enterotoksin Hbl, ki ga izloča *B. cereus*, ni bil prisoten v preiskovani bakteriji *B. subtilis*.

DETERMINATION OF GENETIC STABILITY OF *Bacillus subtilis* STRAIN AND DETECTION OF TOXINS

P. Hančič

Krka, d.d, Novo mesto

Supervisor: J. Kos

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: A. Plaper

Krka, d.d., Novo mesto

Probiotics are living microorganisms with a positive impact on the digestive microflora. Some strains of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* has been used for genetic and biochemical studies for several decades. *Bacillus subtilis* secretes enzymes and antibiotics. It is a member of the genus *Bacillus* as *Bacillus cereus* which causes diarrheal and emetic food-poisoning syndromes, each caused by distinct toxins. The purpose of this study was to determinate genetic stability of *B. subtilis* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers among five DNA isolates which were isolated at different cycles of growth. Before starting RAPD the reaction was first optimized by two primers. The conclusion of our study is that *B. subtilis* is genetically stabile at different times of growth. RAPD profiles of isolates were namely homologous. In our study we also determined presence of *Bacillus cereus* enterotoxin Hbl in *B. subtilis* with BCET-RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) Kit. The result was negative; the enterotoxin was not present in *B. subtilis*.

IZOLACIJA FOSFOLIPIDOV IZ ŽIVALSKIH IN RASTLINSKIH MATERIALOV

M. Knez

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentorica: M. Škerget

Somentor: J. Kroppe

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Zavest o pomembnosti fosfolipidov se je razširila šele nedavno, z razvojem molekularne biologije. Fosfolipidi ali fosfatidi so diestri fosforjeve kisline. Fosfolipidi so amfifilne oziroma amfipatične spojine, kar pomeni, da imajo tako hidrofilni kot hidrofobni del. Amfifilne spojine so površinsko aktivne snovi. Pomembni so za pravilno delovanje organizma. So gradniki lipoproteinov v krvi in celičnih membran rastlinskih in živalskih celic. Fosfolipide smo izolirali iz rastlinskih in živalskih materialov: ribje moke ter sončničnih semen in nezmlete soje. Fosfolipide Pe, Pi, Ps in Pc srečujemo najpogosteje, saj so prisotni v vsakodnevni prehrani, njihovo prisotnost smo dokazali tudi v oljnih vzorcih, pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi iz materialov rastlinskega in živalskega izvora pri različnih pogojih. Separacije s superkritičnimi fluidi imajo številne prednosti pred konvencionalnimi separacijskimi procesi. S spremembami temperature in tlaka močno vplivamo na lastnosti superkritičnega fluida in tako na potek procesa. Za načrtovanje sistema za ekstrakcijo s sub- in superkritičnimi fluidi potrebujemo podatke o obratovalnih pogojih za ekstrakcijo in separacijo, vrsti in količini topila, hitrosti recirkulacije topila in porabi energije. Te določimo iz podatkov o faznih ravnotežjih in z meritvijo parametrov prenosa snovi.

ISOLATION OF PHOSPHOLIPIDS FROM ANIMAL AND PLANT MATERIALS

M. Knez

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: M. Škerget

Co-supervisor: J. Kroppe

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Phospholipids have been discovered in greater detail after year 1970, with the development of molecular biology. Lipids which contain a phosphate moiety are grouped together as phospholipids. It is known, that phospholipids have amphipathic character. Due to its polar nature, the head of a phospholipid is hydrophilic (attracted to water); the lipophilic (or often known as hydrophobic) tails are not attracted to water. When placed in water, phospholipids form one of a number of lipid phases. In biological systems this is restricted to bilayers, in which the lipophilic tails line up against one another, forming a membrane with hydrophilic heads on both sides facing the water. Substances with amphipathic character are surfactants. Phospholipids are important for our health and they are also contained in cell membranes and lipoproteins. Phospholipids have been isolated from nature materials, like fishmeal, sunflower and soybean. Phospholipids have also been found in our samples, which were extracted from plant and animal material with supercritical fluids. Separations with supercritical fluids have a lot of advantages comparing to conventional separations. By changing temperature and pressure it is easy to affect the properties of supercritical fluid and the process. Data about operating conditions, about recirculation, quality and amount of solvent and also data about the demand of energy are needed to design the system for extraction with supercritical fluids. This data are defined from the phase equilibrium data and the measurements of mass transfer parameters.

ČIŠČENJE ODPADNIH VOD FARMACEVTSKE INDUSTRIJE S TEHNOLOGIJO MEMBRANSKE FILTRACIJE

T. Kump

Visoka šola za zdravstvo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: N. Ferfila

Visoka šola za zdravstvo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: I. Čarman

Krka, d.d., Novo mesto

V diplomskem delu preverjamo učinkovitost ultrafiltracije pri čiščenju odpadnih vod farmacevtske industrije. V ta namen smo uporabili pilotno napravo z ultrafiltracijo. Učinkovitost čiščenja odpadnih vod farmacevtske industrije smo spremljali s kemijskimi in mikrobiološkimi metodami. Rezultate, dosežene na iztoku iz pilotne naprave z ultrafiltracijo smo primerjali s kvaliteto iztoka iz obstoječe industrijske čistilne naprave. Rezultati kemijskega preskušanja so pokazali, da je proces čiščenja odpadnih vod farmacevtske industrije z ultrafiltracijo v primerjavi z obstoječim sistemom na čistilni napravi učinkovitejši pri odstranitvi organskega onesnaženja (izraženega kot KPK vrednost) in obarvanosti. Oba sistema omogočata učinkovito odstranitev dušikovih spojin. Mikrobiološko preskušanje dokazuje, da je ultrafiltracija zelo učinkovita pri odstranitvi skupnih koliformnih bakterij, koliformnih bakterij fekalnega izvora, streptokokov fekalnega izvora in skupnega števila bakterij pri temperaturi 22°C in 36°C. Ugotovitve diplomskega dela dokazujejo, da je obstoječo industrijsko čistilno napravo smiselno nadgraditi z ultrafiltracijo.

TREATMENT OF INDUSTRIAL PHARMACEUTICAL WASTEWATER WITH MEMBRANE FILTRATION

T. Kump

College of Health, University of Ljubljana

Supervisor: N. Ferfila

College of Health, University of Ljubljana

Co-supervisor: I. Čarman

Krka, d.d., Novo mesto

Efficiency of ultrafiltration on a pilot plant for treating industrial pharmaceutical wastewater was studied in the thesis. Chemical and microbiological methods were used to monitor the efficiency of the treatment. Quality of the outflow from the pilot plant and the current industrial wastewater treatment plant were compared. Ultrafiltration proved to be more effective for reducing organic pollution (expressed as COD value) and for removing water colour. Both systems enable successful removal of nitrogen compounds. Ultrafiltration has proved to be extremely useful for eliminating total coliform bacteria, faecal coliforms, faecal streptococcus and total number of bacteria at the temperature of 22°C and 36°C. The results show that the current industrial wastewater treatment plant should be upgraded with ultrafiltration.

ZAHTEV IN REGULATIVA V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI TER PRIMERJAVA EVROPSKEGA IN AMERIŠKEGA SISTEMA DOBRE PROIZVODNE PRAKSE

U. Pate

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

Mentor: S. Srčič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: M. Vrečer

Krka, d.d., Novo mesto

Dobra proizvodna praksa (DPP) je sistem navodil in vodil, ki ob upoštevanju in izvajanju omogoča, da se izdelki dosledno izdelujejo in kontrolirajo skladno s standardi kakovosti in registracijsko dokumentacijo. V svetu obstajajo številne različice DPP, ki so si med seboj podobne. Namen našega dela je bil pregled in primerjava evropskega sistema DPP, ki ga določa Evropska komisija, z ameriškim sistemom, ki ga definira FDA preko Code of Federal Regulations. Primerjava je pokazala, da oba sistema uporabljata predpise, ki so dopolnjeni s smernicami. Smernice FDA so bolj specifične kot evropske. V Evropi se novosti objavljajo v obliki dodatkov oz. dopolnil poglavij, v Ameriki pa se vključujejo v obstoječe besedilo (cGMP). Zahteve za proizvodnjo zdravilnih učinkovin so v ZDA enake kot za proizvodnjo končnih izdelkov, v Evropi pa so definirane posebej (EU GMP Part II). FDA ima stroge zahteve glede originalnosti pakiranja izdelkov, v Evropi pa te zahteve ni. V EU sta zahtevani notranja presoja in pisne pogodbe o zagotavljanju kakovosti pri pogodbeni proizvodnji. FDA teh zahtev nima, v praksi pa se jih zahteva. Primerjava evropskega in ameriškega DPP dokazuje, da med njima razlike so, vendar niso bistvene. Evropski proizvajalec, ki izdeluje farmacevtske izdelke za ameriški trg (in obratno) mora biti pozoren na te razlike. Upoštevati mora zahteve, ki jih določa FDA oz EU GMP.

REQUIREMENTS AND REGULATION IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND COMPARISON OF EUROPEAN SYSTEM OF GOOD MANUFACTURING PRACTICE WITH AMERICAN ONE

U. Pate

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

Supervisor: S. Srčič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: M. Vrečer

Krka, d.d., Novo mesto

Good Manufacturing Practice (GMP) is a system of instructions and guidance. The system ensures that products are produced consistently and controlled according to the quality standards and as required by the marketing authorization. There are many similar varieties of GMPs in the world. The purpose of our work was to review and compare the European GMP determined by the European Commission with the American GMP determined by FDA. The comparison showed that both systems use regulations supplemented with guidelines. FDA's guidelines are more specific than the European. In the EU they introduce innovations in the form of chapter's supplements. In the USA they introduce them in the subsistent text (cGMP). In the USA the requirements for producing active substances are the same as for finished products. In the EU requirements for finished products are defined separately (EU GMP Part II). FDA has strict requirements for tamper resistant features. Europe hasn't got such requirements. In the EU self inspections and written contracts about quality assurance by contract manufacture are demanded. FDA does not have such requirements but in practice they are demanded. The comparison of European and American GMPs shows that both systems are very similar. A European manufacturer who produces products for American market (and also inversely) has to pay attention to these differences. He/she has to consider FDA's requirements (EU GMP).

ŠTUDIJ INTERAKCIJ KATIONOV Z DNA APTAMEROM TROMBINA

M. Trajkovski

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

Mentor: P. Šket

Somentor: J. Plavec

Kemijski inštitut Ljubljana Slovenija

S pomočjo NMR spektroskopije, CD in UV spektroskopije smo preučevali interakcije amonijevih, kalijevih in natrijevih ionov z oligonukleotidom $d[G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2]$. Ta oligonukleotid se je izkazal kot inhibitor trombina, zato ga v literaturi navadno omenjajo kot "thrombin binding aptamer" (TBA). Ugotavljali smo, kako prisotnost različnih kationov v raztopini vpliva na zvitje TBA. Dokazali smo, da ob prisotnosti amonijevih ionov TBA tvori antiparalelen G-kvadrupleks z enako topologijo zvitja kot ob prisotnosti kalijevih ionov. Ob prisotnosti natrijevih ionov v raztopini je v ravnotežju več zvrsti TBA G-kvadrupleksov, ni pa razvidno ali je med prisotnimi tudi TBA G-kvadrupleks z enako topologijo zvitja kot ob prisotnosti kalijevih oziroma amonijevih ionov. Konformacija treh zank TBA G-kvadrupleksa, ki se tvori ob prisotnosti amonijevih oziroma kalijevih ionov je zelo podobna. Ugotovili smo, da je TBA G-kvadrupleks, ki se tvori ob prisotnosti kalijevih ionov, stabilnejši od tistega, ki se tvori ob prisotnosti amonijevih ionov. V TBA G-kvadrupleksu, ki nastane ob prisotnosti amonijevih ionov, smo določili mesto vezave amonijevih ionov. Določili smo konstanto vezave amonijevih ionov in njihov rezidenčni čas.

STUDIES OF CATION INTERACTIONS WITH DNA APTAMER OF THROMBIN

M. Trajkovski

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

Supervisor: P. Šket

Co-supervisor: J. Plavec

National Institute of Chemistry Ljubljana Slovenia

We investigated the interactions of ammonium, potassium and sodium ions with oligonucleotide $d[G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2]$ by NMR, CD and UV spectroscopy. This oligonucleotide is known as "thrombin binding aptamer" (TBA). We studied the influence of the three cations on folding of the TBA in solution. We proved that in the presence of ammonium ions TBA folds into antiparallel G-quadruplex with the same topology as in the presence of potassium ions. There are more types of TBA G-quadruplexes in equilibrium when sodium ions are present, but it is not evident whether TBA G-quadruplex with the same topology as in the presence of potassium or ammonium ions is among them. The conformations of the three loops of the TBA G-quadruplex that forms in the presence of potassium and ammonium ions are very much the same. We found that TBA G-quadruplex that forms in the presence of potassium ions is more stable than the one that forms in the presence of ammonium ions. We determined the binding site for ammonium ions in G-quadruplex that forms in the presence of ammonium ions. We also determined the binding constant for ammonium ions and their residence time.

UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKEGA IN PROTIGLIVNEGA DELOVANJA RDEČEGA PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp. DSM14379

T. Ambrožič, T. Banič, M. Štangelj

Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma

Mentorici: I. Kurajič, J. Goršin Fabjan

Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma

Somentor: N. Starič

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 proizvaja rdeči pigment, ki je podoben pigmentu prodigiozinu, za katerega je značilno protibakterijsko, protiglivo, imunosupresivno in protitumorsko delovanje. Pri našem raziskovalnem delu smo na sedemindvajsetih kulturah mikroorganizmov preiskovali, ali ima rdeči pigment, ki ga bakterija *Vibrio* sp. proizvaja, protibakterijsko in protiglivo delovanje. S pomočjo difuzijskega antibiograma smo ugotovili, da rdeči pigment, pridobljen neposredno iz celic bakterije *Vibrio* sp., ne deluje na kvasovke in plesni, učinkuje pa na grampozitivne bakterije *Staphylococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus* in *Bacillus cereus* ter na Izolat iz zemlje 1, Morski izolat in Izolat 2A. Največji povprečni premer inhibicijske cone smo izmerili pri bakteriji *Micrococcus luteus* (16,4 mm), najmanjšega pa pri *Staphylococcus* sp. (7,4 mm). Rdeči pigment, pridobljen iz izrabljenega gojišča bakterije *Vibrio* sp., ni deloval na nobeno od testnih kultur, razen na Morski izolat in Izolat 2A, ki tako kot *Vibrio* sp. raste v slanem okolju. Iz rezultatov sklepamo, da bi rdeči pigment lahko oviral sintezo mureina v celični steni gram pozitivnih bakterij, vendar bodo za potrditev te domneve potrebne nadaljnje raziskave.

ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF A RED PIGMENT PRODUCED BY *Vibrio* sp. DSM14379

T. Ambrožič, T. Banič, M. Štangelj

Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism

Supervisors: I. Kurajič, J. Goršin Fabjan

Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism

Co-supervisor: N. Starič

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

The bacterium *Vibrio* sp. DSM14379 produces a red pigment similar to the prodigiosin pigment which is known for its antibacterial, antifungal, immunosuppressive and anti-tumour activities. In our research twenty-seven cultures of microorganisms were tested to find out if the red pigment excreted by the *Vibrio* sp. bacterium has antibacterial and/or antifungal activity. Using a diffusion antibiogram method we found out that the red pigment, extracted directly from the cells of bacterium *Vibrio* sp., does not affect yeasts and mildews but has an affect on Gram-positive bacteria *Staphylococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, Soil isolate 1, Sea isolate and Isolate 2A. The largest average diameter of the inhibition zone was measured at the bacterium *Micrococcus luteus* (16,4 mm), the smallest in *Staphylococcus* sp. (7,4 mm). The red pigment from a conditioned medium of the bacterium *Vibrio* sp. did not affect any test cultures except for the Sea isolate and Isolate 2A which grow at similar salinity as *Vibrio* sp. According to the results we presume, that the red pigment effects the synthesis of murein in the cell wall of gram-positive bacteria. However, further research will be needed to confirm this hypothesis.

LEPO ZA OKO, DOBRO ZA TELO?

A. Bregar, U. Bobnar

Gimnazija Novo mesto

Mentorica: M. Kovač

Gimnazija Novo mesto

Že celo življenje nas obdajajo barvasta živila. In med nami se težko najde nekdo, ki se nikoli ni vprašal zakaj je ta bonbon rumen, spet drugi rdeč. Zdaj, ko smo »večji«, in prebiramo razno razne članke pa smo zasledile, da je lahko v barvastih živilih veliko nenaravnih sestavin, ki so vprašljive za zdravje. Pa je lepo za oko, dobro za telo!?

Tak naslov je imela tudi delavnica, ki je potekala na gimnaziji Novo mesto, v okviru projektnega tedna. Na to delavnico se je prijavilo 40 dijakov, kar kaže na aktualnost teme. V njej smo se spraševali zakaj uporabljamo barve v živilih, kakšne barve uporabljamo, kako to označimo na embalaži, kako določamo barve v živilih, so ti dodatki zdravi ali škodljivi? Na ta vprašanja sva želeli dobiti odgovore tudi me. Da pa bi izvedli koliko temo poznajo ljudje in kakšno je njihovo mnenje sva izvedli anketo.

IS NICE TO THE EYE ALSO GOOD FOR THE BODY?

A. Bregar, U. Bobnar

Gymnasium Novo mesto

Supervisor: M. Kovač

Gymnasium Novo mesto

There have been colored provisions around us for all our lifetimes. And there's hardly anyone among us that hasn't questioned himself why is this candy yellow and the other one red. Now we've grown and as we're reading articles, we found out that colored provisions can contain many unnatural ingredients that could harm our health. So is nice to the eye also good for the body?

That was the title of our activity in the project week running on Gimnazija Novo mesto. 40 pupils applied for the activity, which shows how popular the subject is. At the activity we asked ourselves why do we use dyed provisions, what kinds of dyes are we using, how do we mark that on the packaging and if these additives are healthy or hazardous. We wanted to answer these questions as well. To find out how well the other people are aware of the additives and what their opinion is, we made a pool.

GROZDNE PEČKE, VIR ZDRAVJA IN LEPOTE

N. Rangus, N. Žigante, L. Lenart

Gimnazija Novo mesto
Mentorica: S. Florijančič
Gimnazija Novo mesto
Somentorica: A. Rangus
Krka, d.d., Novo mesto

Grozdne pečke so odpadki pri pridelavi vina. Naloga opisuje kemijsko sestavo pečk in njihovo morebitno nadaljnjo uporabo. V laboratorijskem poizkusu smo iz grozdnih pečk pridelale maščobno olje s postopkom ekstrakcije s topilom - heksan. V povprečju smo dobile 7,2% olja. Na osnovi statističnih podatkov o letni proizvodnji grozdja v Sloveniji in deleža pečk v grozdju 3–4% (2–5%) smo teoretično izračunale količino olja iz grozdnih pečk, ki jo je mogoče v Sloveniji pridelati. Glede na dostopne podatke iz literature je naša ocena, da se lahko pridelava letno iz grozdnih pečk od 500.000–750.000 kg olja. (Vir: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije). Sestavo olja smo določile s pomočjo plinske kromatografije. Glavne sestavine olja so nenasičene maščobne kisline (več kot 80%), od katerih prevladuje linoleinska. Olje iz grozdnih pečk ima zelo nizko vsebnost nasičenih maščobnih kislin (palmitinska, stearinska) in je bogato z vitamini in minerali (vitamin E). Zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin je to olje visoko kakovostno in je primerno za prehrano. Uporablja se tudi v kozmetiki, saj ima vlažilne, negovalne in antioksidativne lastnosti. Te lastnosti so uporabne tudi v zdraviliškem turizmu. Naše olje iz laboratorijskega poizkusa smo primerjali z drugimi nam dostopnimi komercialnimi olji. Približno enako vsebnost nenasičenih maščobnih kislin (skupno več kot 80%) smo določili v olju, kupljenem v Italiji (Proizvajalec: Basso Fedele E Figli) in domačem Drašičkem grozdnem olju (proizvajalec - družina Pečarič, Drašiči, Bela Krajina). V našem laboratorijskem vzorcu smo določili relativno nizko vsebnost linoleinske kisline (55.6%), v primerjavi s komercialnimi vzorci (68.1% ; 67.9%). To pomeni, da je naš laboratorijski proces potrebno dodatno optimizirati.

GRAPE SEEDS, SOURCE OF HEALTH AND BEAUTY

N. Rangus, N. Žigante, L. Lenart

Gymnasium Novo mesto
Supervisor: S. Florijančič
Gymnasium Novo mesto
Co-supervisor: A. Rangus
Krka, d.d., Novo mesto

Grape seeds are waste in wine industry. This research describes chemical composition of grape seeds and their possible further use. In a laboratory experiment our group produced oil with hexane extraction. 7.2 % of oil was produced on average. On the basis of statistics data in yearly production of grapes in Slovenia and on the amount of seeds these grapes contain, 3–4% (2–5%), we have theoretically worked out the amount of oil which is likely to be produced from grape seeds in Slovenia. We estimate that this is 500.000 kg – 750.000 kg of oil from grape seeds, according to the available sources. (Source: Agricultural Forestry Chamber of Slovenia). The composition of oil defined with the help of gas chromatography. The main oil components are unsaturated fatty acids (more than 80 %) in which linoleic acid prevails. The grape seed oil has a very low content of saturated fatty acids (palmitic, stearic) and is full of vitamins (vitamin E) and minerals. Due to its high content of unsaturated fatty acids, this oil is of high quality and suitable for cooking. Grape seed oil is also used in cosmetics, especially because of its moisture, nourishing and antioxidant properties. These characteristics are also used in spa tourism. We compared the oil produced in a laboratory experiment with other oils available on the market. Approximately the same amount of unsaturated fatty acids (together more than 80%) was defined in oil, bought in Italy (manufactured by: Basso Fedele E Figli) and in home made grape seed oil from Drašiči (manufacturer: Family Pečarič, Drašiči, Bela Krajina). In our laboratory experiment relatively low amount of linoleic acid (55.6 %) was defined in comparison with commercial samples (68.1 % ; 67.9 %), meaning our laboratory experiment should be additionally optimized.

ANALIZA PROIZVODNJE IN UČINKOVITOSTI V TOVARNI KRKA, d.d.

M. Lovše, D. Vidmar

Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

Mentor: U. Nosan

Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

Somentor: A. Petkovič

Krka, d. d., Novo mesto

Raziskovalna naloga je nastala v sodelovanju Srednje elektro šole in tehniške gimnazije, Šolskega centra Novo mesto in podjetja Krka, d. d. Ideja za raziskovalno nalogo je nastala v Krki, d. d., kjer se ukvarjajo s problemom, kako zmanjšati stroške v proizvodnji.

Da bi spoznala stanje v proizvodnji, sva dobila del Krkine podatkovne baze. Dobljene podatke sva morala ustrezno obdelati, to pa je bilo mogoče šele, ko sva spoznala sam proizvodni proces. Poznavanje proizvodnje nama je omogočilo izdelavo ustreznih proizvodov. Te so potrdile najino hipotezo, da je bolje izdelovati velike serije zdravil. Ugotovila sva, da predstavljajo majhne serije zdravil veliko izgubo časa.

ANALYSIS OF WORK AND PRODUCTION LINE EFFICIENCY IN KRKA, d.d.

M. Lovše, D. Vidmar

School Center Novo Mesto, Central Electrical Engineering School and High School

Supervisor: U. Nosan

School Center Novo Mesto, Central Electrical Engineering School and High School

Co-supervisor: A. Petkovič

Krka, d. d., Novo mesto

This research project was done in cooperation with Srednja elektro šola in tehniška gimnazija, Šolski center Novo mesto, and Krka, d.d. The idea was formed in Krka, d.d. with the intention to cut costs of production.

To get familiar with the current state of the production line in Krka, d.d., we were given a fraction of their computer database. We have then started to study their production line, which helped us to make the necessary queries. These queries helped us to confirm our hypothesis that it is better to produce larger amounts of products so that the company can cut some costs.

e - Krkine nagrade e - Krka Prizes



Krkine nagrade

PROUČEVANJE LASTNOSTI TABLET, IZDELANIH S KAPILARNO ABSORPCIJO RAZTOPINE KETOPROFENA ALI HIDROKLOROTIAZIDA

A. Ivanovič

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: O. Planinšek

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

S postopkom direktnega tabletiranja smo izdelali placebo tablete iz pomožne snovi Prosolv SMCC® HD 90. Tablete so obstojne v organskih topilih, medtem ko v vodi hitro razpadejo. V tako izdelane tablete smo vgradili učinkovini ketoprofen in hidroklorotiazid iz raztopine organskih topil s kapilarno absorpcijo. Tako pripravljene tablete smo primerjali s tabletami izdelanimi po postopku direktnega tabletiranja, kjer je bila v zmesi za tabletiranje poleg Prosolv® –a tudi učinkovina.

Z vgrajevanjem učinkovine v obliki raztopine dosežemo enakomerno razporeditev učinkovine v obliki manjših delcev po celotni masi tablete, kar nam potrjujejo slike z elektronskega mikroskopa. Na ta način lahko pospešimo hitrost raztapljanja učinkovine. Rezultati raztapljanja kažejo, da se v tabletah s ketoprofenom, izdelanih s postopkom kapilarne absorpcije, učinkovina raztaplja hitreje kot v običajno izdelanih tabletah. Delci učinkovine v direktno stisnjenih tabletah so večji in neenakomerno porazdeljeni po tableti. Iz njih se ketoprofen tudi ne sprosti v celoti. Med tabletami, ki vsebujejo hidroklorotiazid, so razlike v hitrosti raztapljanja minimalne. Predvidevamo, da zato, ker je bil hidroklorotiazid že predhodno mikroniziran in je bil tudi v direktno stisnjenih tabletah v obliki majhnih delcev, kar nam potrjujejo tudi slike iz elektronskega mikroskopa.

Rezultati DSC kažejo, da so termične lastnosti učinkovin v polnjenih tabletah spremenjene, v primerjavi s klasično izdelanimi tabletami. Sklepamo, da se obe učinkovini v polnjenih tabletah porazdelujeta v tankem sloju oziroma v porah pomožnih snovi.

STUDY OF TABLETS, MADE WITH CAPILLAR ABSORPTION OF KETOPROFEN OR HYDROCHLOROTHIAZIDE SOLUTION

A. Ivanovič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: O. Planinšek

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Excipient Prosolv SMCC® HD 90 was used to prepare placebo tablets by direct compression. So prepared tablets were stabile in organic solvent, while in water they disintegrate very fast. Active substances ketoprofen and hydrochlorothiazide were built in these tablets from organic solution by capillary absorption. These tablets were compared to the tablets, produced by direct compression from mixture of both, Prosolv® and active substance.

In tablets produced by capillary absorption uniform and smaller particle distribution was achieved, what can be seen from scanning electron microscopy (SEM) micrographs. In this way it is possible to increase the dissolution rate. Dissolution rate studies show that ketoprofen releases faster from the tablets produced by capillary absorption than from directly compressed tablets. Active substance particles in directly compressed tablets are bigger and distributed no uniformly in the tablet. The release of ketoprofen from directly compressed tablets is inadequate. Between differently produced hydrochlorothiazide tablets no significant difference in the dissolution rate was observed. Most probably this was due to the fact that hydrochlorothiazide was already micronized and was present in very small particles also in the tablets prepared by direct compression. This was confirmed by SEM microscopy.

DSC results show, that the thermal properties of active substances in tablets produced by capillary absorption are changed when compared to directly compressed tablets. We concluded, that the active substance in by capillar absorption prepared tablets are distributed in very thin layer and/or in the excipient's pores.

NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE PLAVAJOČIH TABLET NA OSNOVI KSANTANA

U. Krajnc

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: S. Baumgartner

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Plavajoče tablete na osnovi ksantana z učinkovino amoksisilin predstavljajo specifičen dostavni sistem za zdravljenje okužb s *Helicobacter pylori*. S plavanjem in povečanjem volumna ogrodja zagotovimo, da tableta ostane v želodcu dalj časa, kjer podaljša čas sproščanja in zadrževanja amoksicilina na mestu delovanja. To pomeni, da je za doseg učinka potrebna manjša količina učinkovine.

Proučevali smo vpliv različnih pomožnih snovi in tehnoloških parametrov na hitrost splavanja ksantanskih tablet in sproščanje učinkovine iz njih. Da bi optimirali sproščanje amoksicilina, smo izdelali tudi dvo-plastne tablete.

Ugotovili smo, da eno-plastne tablete s trdnostjo okoli 60N, ki poleg ksantana in učinkovine vsebujejo še NaHCO_3 ter mikrokristalno celulozo (MCC), splavajo v manj kot 15-ih minutah in v osmih urah neprestanega plavanja sprostijo približno 60% učinkovine.

Še boljše rezultate smo dosegli z izdelavo dvo-plastnih tablet. Načrtovali smo jih tako, da je prva plast, ki je razpadla takoj po stiku z medijem, zagotavljala takojšnjo sprostitev učinkovine nad minimalno inhibitorno koncentracijo. Druga plast, ki je vsebovala preostalih 70% učinkovine v ogrodju iz ksantana, NaHCO_3 in MCC, pa je omogočala plavanje in podaljšano sproščanje učinkovine.

Zaključimo lahko, da smo poleg enoplastnih razvili tudi dvoplastne plavajoče tablete, ki imajo ustrezno mehansko čvrstost, zagotavljajo dobre plovne lastnosti ter upočasnijo sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine.

DESIGNING, FORMULATION AND EVALUATION OF FLOATING TABLETS BASED ON XANTHAN GUM

U. Krajnc

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: S. Baumgartner

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Xanthan gum based floating tablets represent specific drug delivery system for the treatment against *Helicobacter pylori*. Floating and increased matrix volume enable prolonged drug release as well as prolonged gastric residence time; consequently longer time presence of amoxicillin on the target site is achieved. It means that lower amounts of substance are needed for optimal effect.

The influence of different excipients and technological parameters of xanthan tablets on the floating time and drug release rate was investigated. To achieve optimal release rate of amoxicillin, double-layered tablets were prepared.

Our results show that mono-layered tablets composed of xanthan gum, NaHCO_3 and microcrystalline cellulose (MCC) (tablet hardness of 60N) start to float in less than 15 min. After 8 hours of continuous floating they released about 60% of incorporated drug.

Even better results were achieved with double-layered tablets. The first tablet layer was designed to disintegrate immediately after the contact with the medium and instantly releasing drug substance above minimal inhibitory concentration. The 2nd layer composed of the rest of drug substance (70%), xanthan as matrix with NaHCO_3 and MCC, enabled tablet buoyancy and prolonged release of amoxicillin.

It can be concluded that single- and double-layered floating tablets were developed. They possessed good floating ability, firm structure and enabled prolonged drug release.

VEZANJE KATIONSКИH ANTIBIOTIKOV NA LASNICO DNA Z VEZNIM MESTOM AAAAA

A. Kunej

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: J. Lah

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Kljub številnim študijam vezanja majhnih molekul (ligandov) na DNA ni na voljo preprostih pravil, ki bi pojasnila zakonitosti vezanja antibiotikov v ožji kanal DNA. Zato predstavlja vsaka informacija o afiniteti vezanja in specifičnosti prepoznavanja ožjega kanala z ligandom pomemben prispevek k razumevanju teh zapletenih procesov. S pomočjo CD – spektropolarimetrije smo raziskovali način in jakost vezanja netropsina (NET), 4'-6-diamidin-2-fenilindola (DAPI) in distamicina A (DST) na lasnico (H), ki se tvori iz oligonukleotida 5'-GAAAAACCCCCTTTTC-3'. Ugotovili smo, da se na H lahko veže z znatno afiniteto le ena molekula dikationa NET ali DAPI, medtem ko lahko vezanje DST opišemo kot zaporedno vezanje dveh molekul DST. S prilagajanjem modelnih funkcij k CD titracijskim krivuljam smo uspeli določiti ustrezne konstante (jakosti) vezanja pri 20°C. Vrstni red jakosti vezanja je naslednji: NET > DST (prva molekula) > DAPI > DST (druga molekula). Rezultati kompetitivnega vezanja kažejo, da DST lahko izpodrine NET ali DAPI z veznega mesta 5'-AAAAA-3' s pomočjo kooperativnega vezanja dveh molekul. Poleg tega lahko NET ali DAPI izpodrineta DST iz ene polovice njegovih 1:1 kompleksov s H, kar verjetno ni le posledica tvorbe kompleksov H-NET ali H-DAPI, ampak tudi posledica vezanja izpodrinjenih molekul DST na 1:1 komplekse H-DST.

BINDING OF CATIONIC ANTIBIOTICS TO THE DNA HAIRPIN WITH AAAAA BINDING SITE

A. Kunej

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: J. Lah

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In spite of numerous studies on drug binding to the minor groove of DNA, there is no simple general code that would explain the observed binding affinity and specificity of minor groove directed antibiotics. To get a deeper insight into the minor groove recognition by small molecules we studied netropsin (NET), 4'-6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) and distamycin-A (DST) binding to the hairpin (H) formed from the 5'-GAAAAACCCCCTTTTC-3' oligonucleotide by using circular dichroism (CD) spectroscopy. Results reveal that H binds with significant affinity only one molecule of NET or DAPI and two molecules of DST (consecutive binding). By fitting the model functions to the CD titration curves describing NET, DAPI and DST binding to the hairpin, we were able to determine the corresponding binding constants at 20°C. Binding affinity follows the order: NET > DST (first molecule) > DAPI > DST (second molecule). Competitive binding studies show that DST may displace NET or DAPI from the 5'-AAAAA-3' binding site by cooperative binding of the two DST molecules. In addition, we observed that NET or DAPI may displace DST from one half of its 1:1 complexes with the hairpin. We propose that the driving force of this displacement is not only the strong binding of NET or DAPI to H but also the binding of the displaced DST molecules to the available DST-hairpin 1:1 complexes.

VPLIV KRITIČNIH PARAMETROV PRI VZORČENJU S POVRŠINE IN DOLOČEVANJE UČINKOVINE S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO

M. Lukšič

Krka, d.d., Novo mesto

Mentorica: D. Brodnjak Vončina

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentorica: M. Rozman

Krka, d.d., Novo mesto

V diplomski nalogi je opisana priprava vzorcev in določevanje učinkovine s tankoplastno kromatografijo. Za odvzem vzorcev s površine so bili uporabljeni brisi in vata, medtem ko je bila površina vzorčenja velikosti 1 dm² in 10 dm². S spreminjanjem materiala za vzorčenje in velikosti površine vzorčenja smo prišli do različnih izkoristkov metode. Kvantitativno določevanje učinkovine v vzorcih je bilo izvedeno s pomočjo denzitometra na podlagi umeritvene krivulje niza standardnih raztopin.

THE INFLUENCE OF CRITICAL PARAMETERS ON SAMPLING FROM SURFACE AND DETERMINATION OF THE DRUG CONTENT BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

M. Lukšič

Krka, d.d., Novo mesto

Supervisor: D. Brodnjak Vončina

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

Co-supervisor: M. Rozman

Krka, d.d., Novo mesto

Goal of diploma thesis is to study the influence of swab material and swab surface size on the efficiency of swabbing by measuring the content of the drug swabbed from stainless steel surface. Sample preparation and quantitative evaluation of the drug content using thin layer chromatography is described. By varying parameters such as the content of the drug on the surface, swab material for sampling and swab surface size the optimal recovery was evaluated.

PRIVLAČNE SILE MED DELCI PRAŠKASTIH SUBSTANC

M. Ravnikar

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: R. Šibanc

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Lastnosti praškov se lahko razlikujejo med posameznimi serijami in dobavitelji. Kemijsko identični praški se lahko zaradi različne čistote, porazdelitve velikosti delcev, morfologije delcev, polimorfne oblike, psevdopolimorfne oblike (hidrati), stopnje kristaliničnosti v procesih obnašajo povsem različno. Poznavanje interakcij med delci praškastih substanc, nam je lahko v pomoč pri reševanju in razumevanju številnih težav v farmacevtski tehnologiji.

Danes poznamo štiri vrste osnovnih sil: močne in šibke interakcije (jedrske sile), elektromagnetne ter gravitacijske sile. Osnova vsem intermolekularnim povezavam so elektromagnetne oziroma elektrostatske sile. Interakcije so lahko fizikalne, kamor uvrščamo Coulombove in van der Waalsove interakcije ali kemijske kot so kovalentne, kovinske in deloma tudi ionske interakcije. Vse naštetje sile se bistveno razlikujejo po moči in doletu.

Za preučevanje sil je najbolj primeren mikroskop na atomsko silo (angl.: The Atomic Force Microscope oziroma AFM). Uporabljajo se tudi modificirane metode kot so TDFM (angl.: Transverse Dynamic Force Microscopy) in RSM (angl.: Resonant Scanning Microscopy).

ATTRACTIVE FORCES BETWEEN POWDER PARTICLES

M. Ravnikar

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: R. Šibanc

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Powder properties may vary between each series and supplier. Chemically identical powders act differently in various processes because of different impurities, distribution of particle size, morphology of the particles, polymorphic form, hydrate form and degree of crystallinity. Knowledge of interactions between powder particles helps us to solve and understand numerous problems in pharmaceutical technology.

Four basic types of forces are known nowadays: strong and weak nuclear force, electromagnetic and gravitational forces. The origin of all intermolecular interactions are electromagnetic or electrostatic forces. Interactions can be physical like Coulombic and van der Waals interactions or chemical like covalent, metal and partly Coulombic interactions. All mentioned forces greatly differ in strength and effective range.

The Atomic Force Microscopy is the most suitable method for measuring forces. Modified methods like TDFM (Transverse Dynamic Force Microscopy) and RSM (Resonant Scanning Microscopy) can also be used.

SELENOVE SPOJINE V NAVADNI AJDI (*Fagopyrum esculentum* Moench), OBOGATENI S SELENOM

M. Vogrinčič

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Mentorica: V. Stibilj

Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Somentor: I. Kreft

Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani

Selen (Se) je esencialen element, ajda pa rastlina z dobro prehransko vrednostjo, ki jo lahko uporabljamo tudi kot zdravilno rastlino. Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri se s foliarnim dodajanjem Se poveča njegova vsebnost v posameznih delih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja), kako se njegova koncentracija spreminja glede na dolžino rastne dobe ter v kakšni obliki se nahaja v zrelem zrnju in listih. Rastline smo v času cvetenja foliarno gnojili z raztopino natrijevega selenata (10 mgSe/L). Kontrolno in tretirano skupino rastlin smo vzorčili 65 in 79 dni po setvi, vsebnost Se v posameznih delih rastlin pa določili z metodo (HG-AFS) ter Se spojini s HPLC-UV-HG-AFS in HPLC-ICP-MS. Ugotovili smo, da je kontrolna skupina rastlin v vseh svojih delih vsebovala zelo malo Se (od 5 do 45 ng/gSS), največ ga je bilo v steblih, listih, pediclih in nezrelem zrnju. V foliarno gnojeno skupino se je vsebnost Se glede na posamezne dele rastline povečala za približno 50- do 500-krat, najbolj v zrelem zrnju (s 6 na 3500 ng/gSS). V obeh skupinah rastlin smo opazili podobno porazdelitev Se po posameznih delih rastline (pedicli > zrnje > listi > luske > stebila), njegova vsebnost pa se glede na čas vzorčenja in s tem na različno dolžino rastne dobe ni pomembno razlikovala. Z encimsko hidrolizo smo v zrnju ekstrahirali ~63 % Se, le-ta je večinoma prisoten v obliki SeMet. Delež vodotopnega Se v listih je bil nizek, in sicer ~14 %, manj kot 4 % je prisotnega v obliki Se(VI). Delež posameznih selenovih spojin je bil ne glede na dolžino rastne dobe rastlin enak.

SELENIUM SPECIES IN SELENIUM ENRICHED COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum* Moench)

M. Vogrinčič

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Supervisor: V. Stibilj

Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Co-supervisor: I. Kreft

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Selenium (Se) is essential element and buckwheat plant with high nutritional value for humans and can also be used as a drug plant. The aim of our work was to find out how foliar addition of Se affects the content of this element in parts of buckwheat plant, how its concentration changes due to plant's growth period length and to find out which Se species are in seeds and leaves. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) plants were foliarly sprayed with sodium selenate (10 mgSe/L) in flowering phase. Sampling of both tested and control group was carried out 65 and 79 days after sowing. Total selenium content in parts of plants was analyzed by (HG-AFS), speciation was made using HPLC-UV-HG-AFS and HPLC-ICP-MS. Results show that all plant parts in control group contain low Se values (5-45 ngSe/gDM), the majority of it in stems, leaves, flower remains and unripe seeds. Se content in treated group was 50- to 500-fold higher than in control group. The highest difference in concentration between control and treated group is noticed in ripe seeds (from 6 to 3500 ngSe/gDM). We can see very similar Se distribution in plant parts in both control and treated group. The difference in Se concentration in plant parts between growth period lengths was not significant. After enzymatic hydrolysis we found ~63 % soluble Se in seeds and only ~14 % in leaves. The main Se species in seeds was SeMet (~60 % according to total Se content) in leaves we found less than 4 % Se(VI) according to total Se content. % of Se species was the same regardless to plants growth length.

Kazalo avtorjev

Ambrožič T. _____	76
Babič A. _____	51
Banič T. _____	76
Banovec M. _____	70
Bobnar U. _____	77
Bregar A. _____	77
Bukovec M. _____	52
Čajlaković M. _____	53
Eržen B. _____	54
Hafner Bratkovič I. _____	55
Hančič P. _____	71
Ilaš J. _____	23
Islamčević Razboršek M. _____	56
Ivanovič A. _____	83
Jerman B. _____	57
Knez M. _____	72
Kocbek P. _____	28
Krajnc U. _____	84
Krošelj V. _____	33
Kump T. _____	73
Kunej A. _____	85
Lenart L. _____	78
Locatelli I. _____	58
Lovrečič L. _____	59
Lovše M. _____	79
Lukšič M. _____	86
Meleh M. _____	60
Oven I. _____	61
Pate U. _____	74
Pezdirč L. _____	62
Pravst I. _____	63
Rajtman Z. _____	68
Rangus N. _____	78
Ravnikar M. _____	87
Razinger Mihovec B. _____	69
Rotar A. _____	9
Sabotič J. _____	64
Šabeder S. _____	65
Štangelj M. _____	76
Šterk D. _____	38
Trajkovski M. _____	75
Videtič A. _____	66
Vidmar D. _____	79
Vogrinčič M. _____	88
Vrečer F. _____	19
Wagger J. _____	43
Zorko M. _____	67
Žigante N. _____	78

Kazalo mentorjev

Baumgartner S. _____	84
Brodnjak Vončina D. _____	56, 86
Brzin J. _____	64
Čarman I. _____	73
Doleček V. _____	56
Ferfila A. _____	73
Florjančič S. _____	78
Gobec S. _____	70
Goršin Fabjan J. _____	76
Grabnar I. _____	58
Habulin M. _____	65
Jerala R. _____	55
Kikelj D. _____	23
Knez Ž. _____	65
Kogej K. _____	57
Komel R. _____	66
Kos J. _____	71
Kovač A. _____	70
Kovač M. _____	77
Krinc D. _____	59
Krbavčič A. _____	69
Kreft I. _____	88
Kristl J. _____	28
Krope J. _____	72
Kurajić I. _____	76
Lah J. _____	85
Lipnik Štangelj M. _____	69
Mlakar A. _____	60
Mohar B. _____	38
Narat M. _____	61
Nosan U. _____	79
Pečar S. _____	51
Pernuš F. _____	52
Peterlin B. _____	59
Peterlin M. _____	61
Petkovič A. _____	79
Planinšek O. _____	83
Plaper A. _____	71
Plavec J. _____	75
Poredoš P. _____	54
Prislovšek P. _____	67
Rangus A. _____	78
Ribitsch V. _____	53
Rozman M. _____	86
Srčič S. _____	68, 74
Stanovnik B. _____	43
Starič N. _____	76
Stavber S. _____	63
Stibilj V. _____	88
Svete J. _____	62
Šibanc R. _____	87
Škerget M. _____	72
Šket B. _____	38
Šket P. _____	75
Štrukelj B. _____	64
Tomori M. _____	66
Vrečer F. _____	33
Vrečer M. _____	74
Zupan M. _____	63
Zupančič Kralj L. _____	60

Uredniški odbor

dr. Miha Plevnik, glavni in odgovorni urednik

Oblikovanje

2AM Draftfcb, Ljubljana

Produkcija

Modan informatika d. o. o., Maribor

Tisk

Grafex tiskarna

Izdajatelj

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

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