



40


Krkine nagrade
ZNANOST POVEZUJE.

40. Krkine nagrade | 40th Krka Prizes

20. simpozij

Zbornik povzetkov

 KRKA

**Častni odbor
40. Krkih nagrad**

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke
akad. prof. dr. **Jože Trontelj**, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. **Radovan Stanislav Pejovnik**, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. **Ivan Rozman**, rektor Univerze v Mariboru
dr. **Gašper Marc**, predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
prof. dr. **Venčeslav Kaučič**, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. **Pavel Poredoš**, predsednik Zdravniškega društva

**Svet Sklada
Krkih nagrad**

dr. **Aleš Rotar**, predsednik
prof. dr. **Mihail Japelj**, častni predsednik

Znanstveni odbor

izr. prof. dr. **Franc Vrečer**, predsednik
doc. dr. **Aleš Gasparič**
Duša Oblak Božič
doc. dr. **Vida Škrabanja**
dr. **Silvo Zupančič**

Organizacijski odbor

Elvira Medved, predsednica
dr. **Miha Plevnik**
mag. **Simona Torkar Flajnik**
dr. **Jernej Zadnik**

**Glavni in odgovorni
urednik**

dr. **Miha Plevnik**

Recenzenti

Dunja Antonijević, mag. Borut Anžič, mag. Neda Benički Švagelj, dr. Primož Benkič, mag. Renata Bibič, mag. Marko Boh, dr. Sergeja Bombek, dr. Nina Cimerman, dr. Irena Čarman, mag. Angela Čuk, dr. Boris Dular, mag. Branko Filipovič, Maja Florjanič, mag. Mihael Florjanič, dr. Aleš Gasparič, dr. Ivan Gobec, mag. Mojca Golob, dr. Maša Goršič, mag. Miran Hvalec, dr. Špelca Jenko Brinovec, dr. Boštjan Jerman, mag. Brane Kastelec, Sonja Kermc, dr. Maja Kincl Skube, Samo Komel, mag. Helena Kotnik, mag. Andrejka Kramar, mag. Alenka Kramarič, dr. Zdenka Kranjc Gregorčič, dr. Vesna Krošelj, dr. Jernej Kužner, Nataša Lebar, dr. Roman Lenarskič, mag. Denise Leskovar, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateovič Rojnik, mag. Mateja Merlin, dr. Anita Mlakar, Duša Oblak Božič, dr. Viljem Pavli, dr. Anica Pečavar, mag. Andrej Petrišič, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, Gregor Pleterski, dr. Miha Plevnik, dr. Nataša Rebolj, dr. Tadej Recelj, dr. Aleš Rotar, Miloš Ružič, dr. Zvone Simončič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, dr. Matej Smrkolj, dr. Leon Ščuka, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Tina Šmuc, dr. Mojca Štaudohar Kozjan, Marko Štefanič, mag. Simona Torkar Flajnik, mag. Robert Ucman, mag. Aleš Urbančič, Tomaž Verbinc, dr. Miha Vrbinc, dr. Franc Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Silvo Zupančič

VSEBINA | CONTENT

40. KRKINE NAGRADE

- 8 | Uvodne besede: **Aleš Rotar, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad**
- 10 | **Krkini nagrajenci 2010**

20. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | Uvod: **Franc Vrečer, predsednik Znanstvenega odbora**

KRKINE NAGRADE ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 19 | **Tanja Bagar, Kemijski inštitut Ljubljana**
Spremljanje znotrajceličnih sprememb prostih kalcijevih ionov in vrednosti pH pri glivi *Aspergillus niger*
- 25 | **Ana Bergant Simončič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani**
Interakcije hidrotrioksidov in divodikovega trioksida z Lewisovimi bazami in kislinami
- 31 | **Žiga Jakopin, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani**
Načrtovanje in sinteza substituiranih 1,2,4-oksadiazolov in saharinov kot gradnikov potencialnih biološko aktivnih spojin
- 37 | **Matej Pavli, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani**
Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov
- 43 | **Alenka Zvonar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani**
Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom

40. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Jan Antonič**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Razvoj analiznih metod za ugotavljanje ostankov antiparazitikov in nesteroidnih protivnetnih učinkovin za vrednotenje prehoda v mleko ovc ter vpliva predelave na vsebnost v mlečnih izdelkih
- 52 | **Petra Brožič**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Priprava rekombinantnih človeških hidroksisteroid-dehidrogenaz in študije njihovih inhibitorjev
- 53 | **Tomaž Büdefeld**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Gensko pogojene razlike med spoloma pri urejanju telesne teže in izraženosti genov v vmesnih možganih pri miših brez gena SF-1
- 54 | **Biljana Hacin**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mehanizmi probiotičnega delovanja izbranih laktobacilov človeškega in živalskega izvora
- 55 | **Zala Jevnikar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv katepsina X na migracijo in morfologijo limfocitov T prek regulacije integrinov
- 56 | **Damjana Kastelic**, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani
Identifikacija označevalcev in razvoj proteinskih biočipov za določanje proteoma in tipizacijo malignih tkiv
- 57 | **Tina Kosjek**, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Kroženje ostankov zdravilnih učinkovin med čiščenjem vod
- 58 | **Nika Lendero Krajnc**, BIA Separations
Karakterizacija in optimizacija ionsko izmenjevalnih kromatografskih monolitov za izolacijo plazmidov
- 59 | **Nina Mohorko**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Vezava FDDNP in kurkumina na aggregate PrP^{Sc} in hiperfosforiliranega proteina tau pri izbranih nevrodegenerativnih boleznih
- 60 | **Matija Rijavec**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Dejavniki virulence uroseptičnih sevov *Escherichia coli* ter možnost uporabe kolicinov – novih protimikrobnih snovi v boju proti okužbam urinarnega trakta
- 61 | **Urban Švajger**, Zavod RS za transfuzijsko medicino
Indukcija tolerogenih dendritičnih celic in regulatornih limfocitov T *in vitro*
- 62 | **Hela Tokoš**, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Uporaba računalniško podprte procesne tehnike za integracijo industrijskih procesov

- 63 | **Rebeka Toporišič**, Krka, d. d., Novo mesto
Raziskava stabilnosti enalapriljevega maleata in termodinamika protolitskih ravnotežij te učinkovine v vodnih raztopinah
- 64 | **Katja Trontelj**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Zlivanje celic *in vitro* z elektropermeabilizacijo
- 65 | **Bernarda Bevc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi
- 66 | **Monika Brezovar**, Krka, d. d., Novo mesto
Študij vpliva parametrov kristalizacije na velikost delcev produkta
- 67 | **Teja Brezovar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija izdelave disperzije nanodelcev TiO₂ in ugotavljanje varnosti na celični liniji keratinocitov
- 68 | **Marko Hanželič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv procesnih spremenljivk na velikost mikrodelcev in izkoristek procesa s tehnologijo razprševanja s strjevanjem
- 69 | **Alenka Jaklič in Jasna Jereb**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vrednotenje obnašanja gastrorezistentnih pelet s testi sproščanja in stereomikroskopijo
- 70 | **Tanja Koleša**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
[2+2] Cikloadicije (dimetilamino)enaminonov na dimetyl acetilendikarboksilat
- 71 | **Petra Kos**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Študij kompleksov med kationsko učinkovino in polianionskimi karagenani za doseganje prirejenega sproščanja
- 72 | **Tamara Repec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Baktericidna učinkovitost srebra s hialuronatom
- 73 | **Urška Ribič**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Učinkovitost razkužil na delovnih površinah
- 74 | **Tanja Sever**, Krka, d. d., Novo mesto
Simulacija prehoda gastrorezistentnih pelet skozi želodec in študij raztapljanja z aparaturom USP IV
- 75 | **Jernejka Vovko**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza potencialnih nečistoč v farmacevtski učinkovini
- 76 | **Anja Zaletel, Katja Ložar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija pogojev testov sproščanja teofilina iz cilindričnih farmacevtskih oblik

- 77 | **Maja Bahor, Nataša Plut, Nina Štravs**, Gimnazija Novo mesto
Problematika neuporabnih zdravil
- 78 | **Matej Čelik**, Laboratorij za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici
Tehnološko nezahtevna priprava visokoučinkovitih fotokatalitskih tankih plasti na aluminiju za razgradnjo ibuprofena v vodi
- 79 | **Karin Jurglič, Nika Lužar, Nina Urbič**, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija,
Šolski center Novo mesto
Rezistenca pri glivah
- 80 | **Tina Kegl**, II. gimnazija Maribor
Združimo moči v boju proti diabetesu – tihemu ubijalcu
- 81 | **Mercedes Vitek, Mirjam Pušavec, Gregor Hrovat**, Gimnazija Novo mesto
Prehranska dopolnila pri psih in mačkah
- 82 | **Kazalo avtorjev**
- 83 | **Kazalo mentorjev/somentorjev**

UVODNE BESEDE | INTRODUCTORY WORDS



V okviru letošnjih, že 40. Krkinih nagrad se je na razpis prijavilo veliko mladih raziskovalcev z vseh stopenj študija. Veseli nas, da je raznovrstnost nalog v skladu z raznovrstnostjo znanstvenih strok in panog, ki so potrebne za razvoj in raziskave novih izdelkov in teh-nologij v farmacevtski industriji. Sedanje obdobje razvoja stroke in znanosti pa tudi tržne zahteve izrazito podpirajo multidisciplinarni pristop k reševanju problemov. Čeprav so poglobljene raziskave, ki se jih lotevate ob pomoči svojih mentorjev in njihovih raziskovalnih skupin, zelo usmerjene v določen cilj, je videti, da vam tak pristop ni tuj. Prav tako smo zadovoljni, da je med posameznimi znanstvenimi disciplinami ustrezeno razmerje prijav in posledično tudi nagrad. To je dokaz, da v različnih raziskovalnih skupinah rastejo novi, zagnani in vztrajni mladi raziskovalci. S tem postajate že danes del našega uspeha, ki bo že jutri tudi vaš. Na naši skupni poti napredka, ki temelji na znanju, vam tudi v prihodnje želim veliko podobnih us-pehov, kot so zaslužene Krkine nagrade.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Aleš Rotar".

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

Numerous young researchers from all levels of study applied to the competition organised as part of this year's 40th Krka Awards. We are very pleased that the diversity of research work matches the breadth of scientific fields required to research and develop new products and technologies in the pharmaceutical industry. Current professional and scientific development and market requirements are strongly supported by a multidisciplinary approach to problem solving. We are very proud that the work of the young researchers has addressed such a wide range of scientific fields. Although they approached their further research assisted by their mentors and research groups very focused on a specific objective, it is clear that they are familiar with the multidisciplinary approach. We are also satisfied to have seen an appropriate spread of entries, and subsequently awards, across the individual disciplines. This is proof that new and committed young researchers are coming forward throughout the scientific disciplines. This means that today you are already part of the successes we will enjoy tomorrow. In future, I wish you further successes like these impressive Krka Awards in our shared progress in the world of knowledge!



Dr. Aleš Rotar
President of the Krka Awards Council

KRKINI NAGRAJENCI 2010 | KRKA PRIZE WINNERS 2010

KRKINE NAGRADOV ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Status	Mentor, somentor	Številka
Tanja Bagar	doktorica znanosti <i>s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Mojca Benčina	2284
Ana Bergant Simončič	doktorica znanosti <i>s področja kemije</i>	Janez Cerkovnik	2285
Žiga Jakopin	doktor znanosti <i>s področja farmacije</i>	Marija Sollner Dolenc	2286
Matej Pavli	doktor znanosti <i>s področja farmacije</i>	Saša Baumgartner Franc Vrečer	2287
Alenka Zvonar	doktorica znanosti <i>s področja farmacije</i>	Mirjana Gašperlin	2288

KRKINE NAGRADOV ZA RAZISKOVALNO NALOGO | NAGRAJENCI

Nagrainec	Status	Mentor, somentor	Številka
Jan Antonić	doktor znanosti <i>s področja kemije</i>	Vesna Cerkvenik-Flajs Iztok Grabnar	2289
Maja Bahor	dijakinja	Miroslava Abazović Stanislava Florijančič	2290
Bernarda Bevc	magistrica farmacije	Aleš Obreza	2291
Monika Brezovar	diplomirana inženirka <i>kemijo tehnologije</i>	Radovan Stanislav Pejovnik Alen Kljajić	2292
Teja Brezovar	magistrica farmacije	Julijana Kristl Petra Kocbek	2293

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Petra Brožič	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Tea Lanišnik Rizner Stanislav Gobec	2294
Tomaž Büdefeld	<i>doktor znanosti s področja veterinarske medicine</i>	Gregor Majdič	2295
Matej Čelik	<i>dijak</i>	Urh Černigoj Marko Kete Silvana Štucin	2296
Biljana Hacin	<i>doktorica znanosti s področja veterinarske medicine</i>	Alojz Ihan Bojana Bogovič Matijašić	2297
Marko Hanželič	<i>magister farmacije</i>	Stanko Srčič Ilija Ilić	2298
Gregor Hrovat	<i>dijak</i>	Marjeta Redek Stanislava Florijančič	2299
Alenka Jaklič	<i>študentka farmacije</i>	Aleš Mrhar	2300
Jasna Jereb	<i>študentka farmacije</i>	Aleš Mrhar	2301
Zala Jevnikar	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Janko Kos	2302
Karin Jurglič	<i>dijakinja</i>	Valentina Mavrič Klenovšek	2303
Damjana Kastelic	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Radovan Komel Denis Pompon	2304
Tina Kegl	<i>dijakinja</i>	Vesna Hojnik	2305
Tanja Koleša	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Branko Stanovnik	2306

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Petra Kos	študentka farmacije	Ksenija Kogej Saša Baumgartner	2307
Tina Kosjek	doktorica znanosti s področja farmacije	Ester Heath Boris Kompare	2308
Nika Lendero Krajnc	doktorica znanosti s področja kemije	Aleš Podgornik Boris Pihlar	2309
Katja Ložar	študentka farmacije	Marija Bogataj	2310
Nika Lužar	dijakinja	Valentina Mavrič Klenovšek	2311
Nina Mohorko	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Mara Bresjanac Grega Repovš	2312
Nataša Plut	dijakinja	Miroslava Abazović Stanislava Florijančič	2313
Mirjam Pušavec	dijakinja	Marjeta Redek Stanislava Florijančič	2314
Tamara Repec	študentka kemije	Peter Bukovec Elizabeta Tratar Pirc	2315
Urška Ribič	univerzitetna diplomirana biotehnologinja	Hrvoje Petković Barbara Jeršek	2316
Matija Rijavec	doktor znanosti s področja medicinskih ved	Darja Žgur-Bertok	2317
Tanja Sever	magistrica farmacije	Marija Bogataj	2318
Nina Štravs	dijakinja	Miroslava Abazović Stanislava Florijančič	2319
Urban Švajger	doktor znanosti s področja farmacije	Matjaž Jeras	2320

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Hela Tokoš	<i>doktorica znanosti s področja kemijске tehnike</i>	Zorka Novak Pintarič	2321
Rebeka Toporišič	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Jurij Lah	2322
Katja Trontelj	<i>doktorica znanosti s področja biotehnologije</i>	Damijan Miklavčič Vladka Čurin Šerbec	2323
Nina Urbič	<i>dijakinja</i>	Valentina Mavrič Klenovšek	2324
Mercedes Vitek	<i>dijakinja</i>	Marjeta Redek Stanislava Florijančič	2325
Jernejka Vovko	<i>diplomirana inženirka kemijске tehnologije</i>	Marijan Kočevar Anton Štimac	2326
Anja Zaletel	<i>študentka farmacije</i>	Marija Bogataj	2327

UVOD | INTRODUCTION



Izjemne stvari se ne zgodijo na gladkih, uhojenih poteh.
J. W. von Goethe

Leto 2010 je za Krkine nagrade leto jubilejev, saj bodo letos mladi raziskovalci že 40. prejeli Krkine nagrade, svoje dosežke pa bodo izbrani nagrajenci predstavili na že 20. znanstvenem simpoziju. Ideja Krkinih nagrad je vsa minula leta rasla, se širila in sproti posodabljalna v svoji izvedbi. Svet Krkinih nagrad in podjetje Krka s ponosom zretja na prehodeno pot in številne nagrajence, ki so se uspešno dokazali in se še dokazujo na znanstvenem, strokovnem ali vodstvenem področju. Letošnji razpis za Krkine nagrade je vseboval nekaj pomembnih novosti. Prvič je bil razpis za dijake srednjih šol odprt za celotno Slovenijo. V duhu sodobnega časa, vedno bolj povezanega z internetom, smo celotno prijavo letos prvič izpeljali v elektronski obliki. V imenu Znanstvenega odbora pri Svetu Sklada Krkinih nagrad in v svojem imenu iskrena hvala vsem ocenjevalcem raziskovalnih nalog. Brez njihove pomoči, bi bilo delo znanstvenega odbora še težje. Pri izbiri ocenjevalcev smo se trudili izbrati strokovnjake, ki so bili glede na svojo akademsko izobrazbo ter raziskovalne in delovne izkušnje najprimernejši za posamezno nalogo. Postopek ocenjevanja temelji na upoštevanju tako znanstvenoraziskovalne vrednosti oziroma kakovosti posamezne naloge kot tudi njene industrijske uporabnosti (aplikativnosti).

Posebna zahvala tudi vsem mentorjem in somentorjem za njihovo pomoč in vodenje mladih raziskovalcev pri izdelavi nalog. Vloga mentorjev je še posebej pomembna pri najmlajših raziskovalcih (dijakih in diplomantih dodiplomskeih študijskih programov), ki svojo raziskovalno pot šele začenjajo in si raziskovalne izkušnje šele nabirajo.

Največja zahvala pa gre vsem kandidatom, ki so se odločili sprejeti izziv in so se prijavili na razpis ter pokazali, da imajo tudi mladi slovenski raziskovalci odlične ideje, ki so jih sposobni tudi uspešno realizirati. Vsem nagrajencem iskreno čestitamo in želimo, da bi svoje raziskovalne potenciale in želje še najprej uspešno udejanjali v svojem poklicnem in osebnem življenju in tako pripomogli k večji uspešnosti naše družbe in gospodarstva ter predstavljeni svetel zgled za dijake in študente, ki se šele odločajo o vstopu na pot raziskovalcev.


Izr. prof. dr. Franc Vrečer
predsednik Znanstvenega odbora

Izjemne stvari se ne zgodijo na gladkih, uhojenih poteh.

J. W. von Goethe

This year, 2010, is a jubilee year for the Krka Awards with 40 young researchers set to receive awards. After receiving their awards, select winners will present their work at the 20th Science Symposium. The Krka Awards concept has grown and expanded over the years, undergoing continual modernisation. The Krka Awards Committee and the Krka Company are extremely proud of the awards' success to date and the many award winners who have proved themselves or are still proving themselves in scientific, academic and management disciplines.

We added some important new features to the jubilee edition of the Krka Awards competition. First the competition for secondary school students was open to entrants from all over Slovenia. In the spirit of modern times in which the internet plays an increasingly important role, particularly for the generation of young researchers applying for these Krka Awards, this year's entire registration process took place online for the first time.

On my behalf and on behalf of the scientific committee of the Krka Awards Committee I offer my sincere thanks to all the research work assessors, without whom the work of the scientific committee would be rendered so much more difficult. In selecting the assessors we endeavoured to pick those experts whose academic qualifications and work and research experience best suited the specific research works. The assessment process takes into account the scientific and research value and quality of the research as well as its industrial applicability.

Particular thanks go to all mentors and co-mentors for their assistance and supervision of young researchers and their work. The role of mentor is particularly important for the younger researchers (school students and undergraduates), who are only just beginning to engage in research and gain research experience.

The greatest thanks go to all the candidates, who decided to accept the challenge and register for the competition, and who showed that Slovenia's young researchers not only have excellent ideas but also know how to put them into practice. I warmly congratulate all the award winners and hope that they continue to put their research potential and goals into practice in their professional and private life, in so doing contributing to a more successful economy and society and offering an example to the next school and university students to commit themselves to the world of research.



Assoc Prof Dr Franc Vrečer
Chair of the Scientific Committee

40




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

Predstavitev nagrajencev
Presentation of prizewinners



Dr. TANJA BAGAR

Dr. Tanja Bagar je naklonjenost naravoslovju kazala že od prvih korakov na poti izobraževanja. Nagnjenja so se z vpisom na Biotehniško fakulteto, kjer je študirala mikrobiologijo, spremenila v resno namero. »Različne vaje v času študija so podžigale moj raziskovalni duh, zares pa se je začelo z diplomsko nalogo, ki je bila nagrajena tudi s Prešernovo nagrado. Čas doktorskega študija je bil namenjen predvsem vsrkavanju čim več znanja in izkušenj iz domačega in tujih laboratorijev.«

Primarno področje raziskovanja dr. Tanje Bagar je molekularna biologija, ki omogoča edinstven vpogled v delovanje organizmov. V doktorski nalogi, s katero se je prijavila na Krkine nagrade, je proučevala filamentozne glive, bolj poznane kot plesni, ki rastejo v kopalnicah ali na pozabljenem kosu kruha, vendar pa lahko predstavljajo resno nevarnost za zdravje. Kljub visoki pojavnosti glivnih okužb še ni na voljo učinkovitih in varnih zdravil, zato je potreba po razvoju novih učinkovin in režimov zdravljenja velika. »V doktorskem delu smo s sodelavci razvili nove metode za študij fiziologije glivnih celic, ki so nam omogočile razvoj in preizkušanje novih učinkovin. Plod raziskav je nova kombinacija dveh učinkovin, ki sinergistično zavirata razmnoževanje gliv in tako omogočata zdravljenje glivnih okužb,« pove raziskovalka.

Ugotovitve iz doktorske naloge so novost na znanstvenem področju, zato so nekateri rezultati že v postopku pridobivanja patentnih pravic. »Ko uredimo patentne pravice, bomo ugotovitve predstavili farmacevtskim podjetjem in upamo, da bo to pot za prenos naših spoznanj v praks.«

Ta čas je dr. Tanja Bagar zaposlena v Bolnišnici Topolšica, v mikrobiološkem laboratoriju, kjer spoznava delo v klinični diagnostiki. Po končanem postopku pridobivanja habilitacije bo v Evropskem središču Maribor predavala mikrobiologijo in biokemijo. Kot znanstvenica in raziskovalka Krkino nagrado ceni, saj »imamo vsi raziskovalci krize, ko se nam zdi, da nam poskusi ne uspevajo, da se nam rezultati vztrajno izmikajo in da vse skupaj nikamor ne vodi. Tudi zato je na koncu resnično lep občutek, če ti nekdo na takšen način izkaže priznanje.«

Spremljanje znotrajceličnih sprememb prostih kalcijevih ionov in vrednosti pH pri glivi *Aspergillus niger*

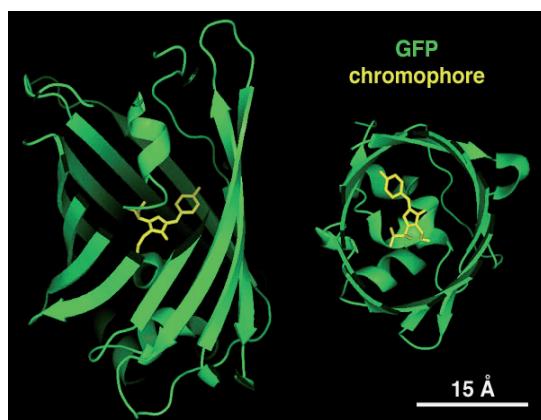
TANJA BAGAR, Kemijski inštitut, Ljubljana

Mentorica: Mojca Benčina, Kemijski inštitut, Ljubljana

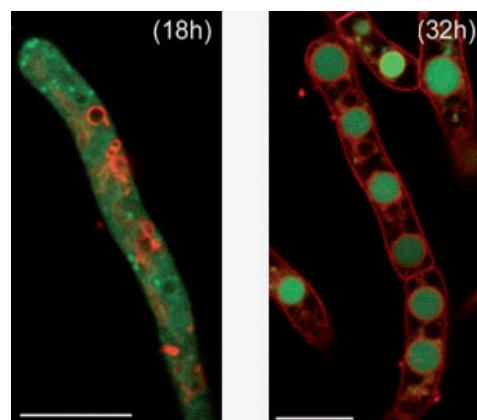
Filamentozne glive poznamo predvsem kot plesni, ki rastejo v naših kopalnicah ali na pozabljenem kosu kruha, vendar pa so lahko tudi zelo nevarni organizmi. V medicini so znani kot oportunistični patogeni, ki povzročajo resne, večkrat tudi smrtne, okužbe. Pri zdravih povzročajo različne oblike alergij, pri imunske oslabljenih pa okužbe kožnih tkiv, sinusnih votlin in pljuč, infekcija pa se lahko po krvnem obtoku razširi tudi na srce, ledvice in možgane. Smrtnost takšne invazivne aspergiloze je od 35-90 odstotna. Kljub temu da so glivne okužbe čedalje pogosteje, zaenkrat ni na voljo učinkovitih in varnih zdravil. Za zdravljenje se načeloma uporablja amfotericin B. Takšno zdravljenje je dolgotrajno, poteka intravenozno in ima vrsto resnih stranskih učinkov, kot so poškodbe ledvic, odpoved jeter, aritmija srca...

Iz povedanega je razvidno, da je izjemno potreben razvoj novih učinkovin in drugačnih režimov zdravljenja glivnih okužb. Za to pa je najprej nujno poznavanje fiziologije tarčnega organizma. V ta namen smo v tej nalogi proučevali dva vidika celične fiziologije filamentoznih gliv: signalizacijo s kalcijem in znotrajcelično pH-homeostazo. Razvili smo dve novi metodi za proučevanje fiziologije glivnih celic: genetsko kodiran kalcijev senzor, ki temelji na ekvarinu, in genetsko kodiran pH-senzor, ki temelji na zeleno fluorescirajočem proteinu (Green Fluorescent Protein-GFP). Gena, ki kodirata oba senzorja, smo z molekularnimi metodami vgradili v genom glive *Aspergillus niger* in dokazali njuno izražanje in delovanje.

a)



b)

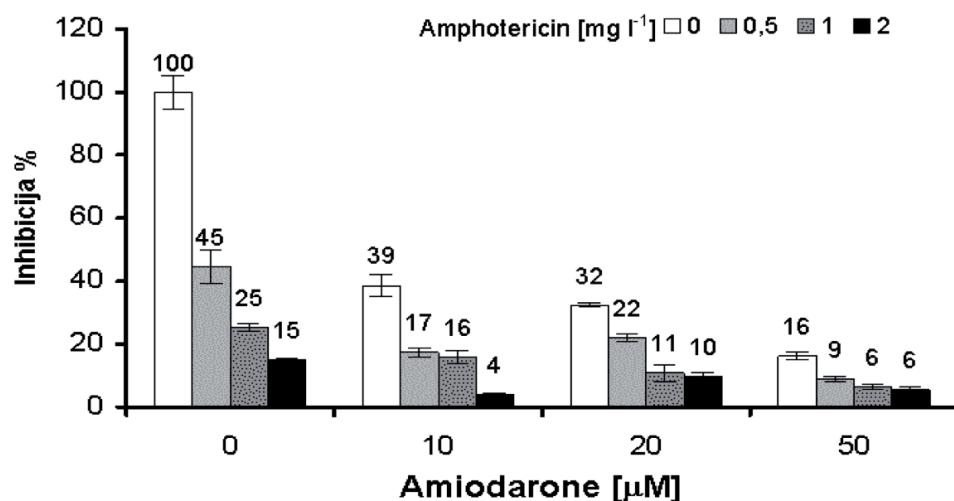


Slika 1: a) Struktura zeleno fluorescirajočega proteina ali GFP, b) izražanje genetsko kodiranega pH senzorja pri glivi *Aspergillus niger*.

Ta senzorja sta omogočila v prvi vrsti proučevanje kalcijeve in pH-homeostaze, v kasnejših fazah pa tudi preizkušanje novih učinkov in ugotavljanje njihovega vpliva na glivno fiziologijo. Spremljali smo učinke različnih spojin na kalcijovo in/ali protonsko homeostazo, saj sta ta vidika celične fiziologije izjemno pomembna. Povečane koncentracije kalcijevih ionov v citoplazmi so namreč toksične za celice, prav tako pa porušenje pH-homeostaze vodi v propad celice. Prav zato lahko s porušenjem pH- ali kalcijeve homeostaze dosežemo protiglivno delovanje.

Naš cilj je bil najti novo učinkovino ali kombinacijo učinkovin, ki bi v majhnih odmerkih učinkovito zavirala rast in razmnoževanje gliv. Naši poskusi so pokazali, da amiodaron učinkuje tako na kalcijevi signalizaciji kot tudi na pH-homeostazo in je zato zelo obetavna protiglivna učinkovina. Dokazali smo, da amiodaron deluje protiglivno, vendar ima v velikih koncentracijah prav tako stranske učinke. Zato smo se

usmerili v iskanje kombinacij učinkovin. Med preizkušanjem različnih kombinacij je izstopala kombinacija amiodarona in amfotericina B. Izkazalo se je, da imata učinkovini sinergističen protiglivni učinek in da s kombinacijo majhnih odmerkov obeh učinkov lahko dosežemo odlično protiglivno delovanje. S tem pristopom minimiziramo pojavnost stranskih učinkov, kljub temu pa dosežemo dobro fungicidno delovanje. Pomembna prednost tega pristopa je tudi v tem, da se obe učinkovini že uporablja v klinični medicini, zato bi bil postopek registracije zdravila krajsi.



Slika 2: Inhibicija rasti glive *Aspergillus niger* s kombinacijo različnih koncentracij amiodarona in amfotericina B.

Zaradi novih pristopov k zdravljenju se število ljudi z oslabljenim imunskim sistemom iz leta v leto povečuje. Prav ti so najbolj ranljiva skupina za glivna obolenja. Prav invazivna aspergiloza je eden najpogostejših in najresnejših zapletov pri zdravljenju s citostatiki. Rezultati te doktorske disertacije kažejo, da lahko odgovore za zdravljenje glivnih infekcij iščemo tudi v novih in učinkovitih kombinacijah obstoječih zdravil in da prihodnost zdravljenja glivnih infekcij morda leži bolj v iskanju novih kombinacij znanih zdravil kot pa v odkrivanju popolnoma novih učinkovin.

Monitoring Intracellular Changes in Free Calcium Ions and pH Value in the Fungus *Aspergillus niger*

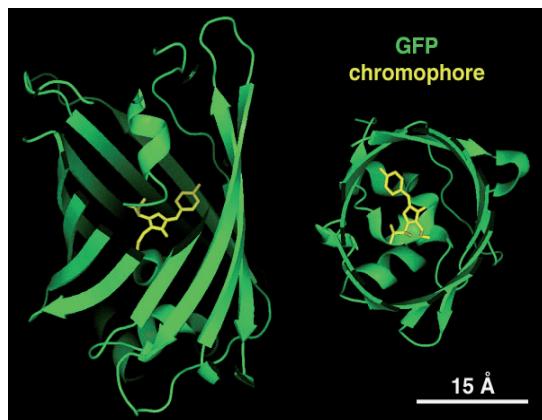
TANJA BAGAR, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Mojca Benčina, National Institute of Chemistry Ljubljana

Filamentous fungi, best known as molds growing in our bathrooms or on a forgotten piece of bread, can be very dangerous organisms. They are known as opportunistic pathogens that cause serious, often fatal, infections. In healthy individuals they cause various forms of allergies, in immunocompromised patients they can however cause systemic infections with high mortality. They can infect skin, sinus cavities and lungs, the infection can spread to the heart, kidneys and brain via the bloodstream. Mortality of such an invasive aspergillosis is from 35 to 90%. Although the incidence of fungal infections is ever increasing, we do not have an effective and safe treatment regime. Drug currently in use is amphotericin B, where the treatment regime is long with very serious side effects such as kidney failure and liver damage.

It is therefore clear that there is a great need for development of new active ingredients and different regimes of treatment for fungal infections. To achieve this it is essential to know the physiology of target organism. In this thesis we studied two aspects of cell physiology of filamentous fungi: calcium signaling and intracellular pH homeostasis. We have developed two new methods that gave us an insight in the physiology of cells: genetically encoded calcium sensor, based on aequorin and genetically encoded pH sensor based on green fluorescent protein (GFP). Genes encoding both the sensors were inserted into the genome of *Aspergillus niger* using molecular methods. In our results we demonstrate their expression and function in fungal cells.

a)



b)

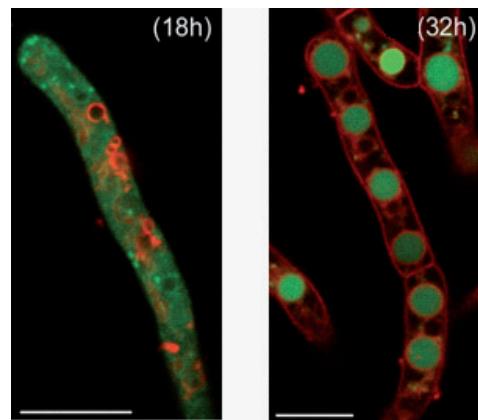


Figure 1: a) Structure of the green fluorescent protein, b) expression od the genetically encoded pH sensor in the fungus *Aspergillus niger*.

These sensors gave us a tool to study calcium and pH homeostasis and in later stages we also performed experiments with new substances to determine their impact on fungal physiology. We monitored the effects of different compounds on calcium and/or proton homeostasis, since these aspects are extremely important in cellular physiology. Elevated concentrations of calcium ions in the cytoplasm are in fact toxic for cells, and distortion of pH homeostasis also leads to cell collapse. With this in mind it is possible to achieve antifungal activity by deliberately disturbing pH or calcium homeostasis.

Our aim was to find a new substance or a combination of substances that would effectively inhibit fungal growth and reproduction in low doses. Our experiments have shown that amiodarone has an effect on the calcium signaling, as well as pH homeostasis and is therefore a very promising antifungal agent.

We proved that amiodarone indeed has antifungal activity, but in high concentrations, that would also have side effects. Therefore, we focused on combinations of substances. During the testing of various combinations we found the combination of amiodarone and amphotericine B most promising. They were shown to have a synergistic antifungal effect and with the use of low doses of both agents we were able to achieve excellent antifungal activity. This approach minimizes the occurrence of side effects while achieving good fungicidal activity. An important advantage of this approach is also the fact that both substances are already used in clinical medicine and the potential drug registration process would therefore be shorter.

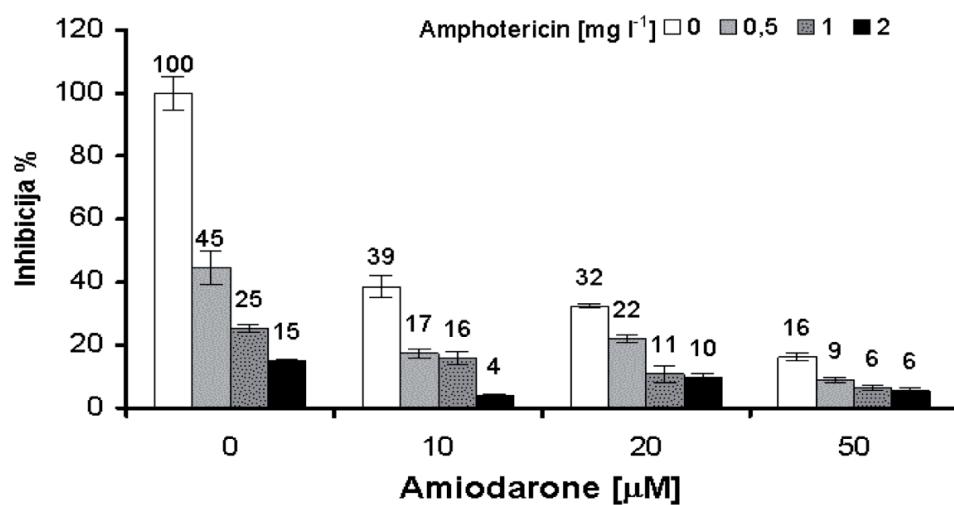


Figure 2: Inhibition of growth of the fungus *Aspergillus niger* using combinations of different doses of amiodarone in amphotericin B.

Due to novel approaches in medicine the number of immunocompromised individuals is increasing annually. This is the most vulnerable group of people for fungal infections, with invasive aspergillosis being one of the most common and serious complications in treatment with cytostatics. The results of this thesis show that the answers for treating fungal infections can also be found in new and effective combinations of existing drugs and that the future of treatment of fungal infections may lie in finding new combinations of already known drugs rather than in finding new active ingredients.



Dr. ANA BERGANT SIMONČIČ

Dr. Ana Bergant Simončič je fascinacija nad razlago procesov v naravi, nad sposobnostjo njihovega izkoriščanja in pestrostjo iznajdb načinov za pridobivanje za človeka pomembnih doberin pripeljala na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Tu je diplomirala in nato še doktorirala s področja kemije hidrotrioksidov. V sklopu doktorskega študija se je izpopolnjevala v ZDA, na wisconsinski univerzi v Madisonu.

Kot raziskovalno področje jo je pritegnila kemija hidrotrioksidov. »Hidrotriokside so termično nestabilne molekule, zato so interakcije z okolico lahko ključnega pomena za njihovo obnašanje, kot sta obstojnost in reaktivnost. S poznavanjem vpliva okolice na lastnosti hidrotrioksidov pridobimo pomembne informacije o možnostih vplivanja na reakcijske mehanizme, v katerih nastopajo hidrotriokside kot intermediati, s čimer lahko izboljšamo učinkovitost procesov, kot je na primer peroksonski proces.«

Temeljna ugotovitev njenega raziskovanja je, da z dodatkom kisikovih baz povečamo stabilnost hidrotrioksidov, s katalizatorji pa modificiramo njihovo reaktivnost, kar predstavlja dodaten temelj pri raziskovanju kemizma hidrotrioksidov. »Odkritje katalitskega sistema pretvorbe hidrotrioksidov v divodikov trioksid je pomemben korak na poti k možnemu pridobivanju koncentriranih raztopin čistega divodikovega triokksida. To pa je zaželeno tako v smislu študija te spojine kot tudi s stališča uporabnosti divodikovega triokksida v kemijskih reakcijah.«

Izsledki raziskav dr. Ane Bergant Simončič ne koristijo samo študiju kemizma hidrotrioksidov, ampak so dodaten gradnik pri povečevanju učinkovitosti procesov, kjer kot intermediati nastopajo hidrotriokside. »Ugotovite bi lahko uporabili tudi pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin, saj obstajajo posredni dokazi za prisotnost divodikovega triokksida v živih organizmih.«

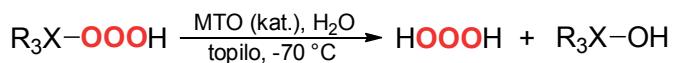
Ker je ta čas zaposlena v Krki, je njena pozornost usmerjena k delovnim izzivom v službi, kjer se ukvarja s sintezo zdravilnih učinkovin. »Pohvalno je, da se še najde podjetje, ki podpira tudi raziskave v akademskem svetu in se zaveda, da je dolgoročno to koristno tako za akademske ustanove kot za gospodarstvo.«

Interakcije hidrotrioksidov in divodikovega trioksida z Lewisovimi bazami in kislinami

ANA BERGANT SIMONČIČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Janez Cerkovnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V doktorskem delu sem proučevala interakcije hidrotrioksidov (ROOOH) in divodikovega trioksida (HOOOH) z različnimi Lewisovimi bazami in kislinami. Dodatek kronskeih etrov kot kisikovih baz in akceptorjev vodikove vezi povzroči v »inertnih« topilih, kot sta CD_2Cl_2 in toluen- d_8 , pomik OOOH ^1H NMR absorpcije za ROOOH oziroma HOOOH za 0,5 do 2 ppm proti nižnjemu polju, v primeru dodatka piridin *N*-oksidov pa celo za 2 do 4 ppm. Hkrati se OOOH absorpcije izostrijo, kar nakazuje porušitev intermolekularnih asociatov med molekulami hidrotrioksidov, ki so prisotni v »nebazičnih« topilih. Kronski etri povečajo stabilnost ROOOH (HOOOH), in sicer se konstante hitrosti razpada v CD_2Cl_2 in toluenu- d_8 zmanjšajo za 30- do 60-krat, aktivacijske energije oziroma entalpije za razpad pa povečajo od 2,0 do 4,9 kcal/mol, kar kaže na večjo energetsko razliko med začetnim in prehodnim stanjem v procesu razpada. Konstante hitrosti razpada ROOOH (HOOOH) pri dodatku piridin *N*-oksidov so nekoliko večje kot pri kronskeih etrih, čeprav gre pri asociaciji ROOOH (HOOOH) s piridin *N*-oksidom, glede na večje ^1H NMR kemijske premike, za očitno večje zmanjšanje elektronske gostote okoli OOOH protona (močnejša vodikova vez). Aktivacijske energije oziroma entalpije za razpad ostanejo približno enake. Močnejša vodikova vez vodi do hitrejšega preskoka protona na kisikov atom piridin *N*-oksidov, nastali $^{\cdot}\text{OOR}(\text{H})$ anion pa je nestabilen in razpade naprej na singletni kisik ($^1\Delta_g \text{O}_2$) in $^{\cdot}\text{OR}(\text{H})$ ion. Maksimalna stabilnost ROOOH (HOOOH) je dejansko ravnovesje med prosto, nevezano obliko ROOOH (HOOOH) in kompleksom z močno Lewisovo bazo, ki povzroči preskok protona. V primeru kronskeih etrov je za interakcijo z ROOOH (HOOOH) pomembna njihova ciklična struktura. Dodatna vključitev azo skupine v azobenzo kronskeih etrih, ki sem jih sintetizirala z namenom študija njihovih sposobnosti specifičnih interakcij s hidrotrioksidom, ne prispeva k večji stabilnosti HOOOH, kar pripisujem močnim elektrostatskim odbojnim interakcijam med neveznimi elektronskimi pari kisikovih atomov v obroču kronskega etra in HOOOH.

V drugem delu raziskav sem študirala interakcije ROOOH (HOOOH) in Lewisovih kislin, med katerimi sem se osredotočila na metiltrioksorenij(VII) (MTO) in vanadil acetilacetonat ($\text{VO}(\text{acac})_2$) zaradi njune katalitske aktivnosti v prisotnosti ROOOH (HOOOH). Katalitski dodatek MTO raztopinam različnih organosilicijevih hidrotrioksidov (R_3SiOOOH) in tudi nekaterih acetalnih hidrotrioksidov (R_3COOOH) vodi do skoraj kvantitativne pretvorbe le-teh v HOOOH. Nasprotno lahko pri nekataliziranih reakcijah v najboljših primerih dosežemo le majhne izkoristke HOOOH. Odkriti katalitski sistem je pomemben korak k možnemu pridobivanju koncentriranih raztopin čistega HOOOH.



Teoretični izračuni (DFT, B3LYP) za katalitski cikel s silil hidrotrioksidom (H_3SiOOOH) kot modelnim sistemom kažejo na tvorbo primarnega intermediata z reakcijo med H_3SiOOOH in MTO v stopnji, ki določa hitrost reakcije ($\Delta H^\ddagger(298 \text{ K}) = 9,8 \text{ kcal/mol}$). Izračuni so v skladu z eksperimentalno določeno aktivacijsko energijo ($9,5 \pm 2,0 \text{ kcal/mol}$) in majhnim kinetičnim izotopnim efektom vode kot dodanega topila ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 1,1 \pm 0,1$). V naslednji stopnji vstopi v katalitski cikel voda, kar ima za posledico metatezo σ -vezi na primarnem intermediatu: cepi se Re-OOOH vez ter tvori HOOOH, poleg sekundarnega dihidroksi intermediata. Končna stopnja v katalitskem ciklu vključuje dodatno molekulo vode kot katalizatorja, ki zmanjša bariero za tvorbo produkta (H_3SiOH) in sprostitev katalizatorja (MTO). Voda ni pomembna le kot reagent pri sintezi HOOOH iz ROOOH, katalizirani z MTO, temveč v njeni odsotnosti izraziteje potekajo tudi sekundarne reakcije. Tako v prisotnosti MTO iz silanola nastaja disiloksan, HOOOH pa se adira na karbonilno skupino acetona- d_6 kot topila; nastane hidrotrioksid 1,1,1,3,3-heksadevtero-2-propanola, kar je prvi primer katalizirane adicije HOOOH na karbonilno vez.

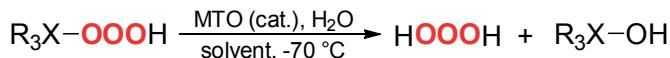
$\text{VO}(\text{acac})_2$ pa se je pokazal kot dokaj učinkovit katalizator pri oksidacijah sulfidov s HOOOH (ROOOH). Kot modelni substrat sem izbrala fenil metil sulfid, ki se je v različnih topilih s HOOOH oziroma Et_3SiOOOH oksidiral do fenil metil sulfoksida. Rezultati poskusov kažejo na možnost, da v prvi stopnji oksidacije pride najprej do reakcije med $\text{VO}(\text{acac})_2$ in HOOOH oziroma Et_3SiOOOH z nastankom reaktivnega intermediata kot oksidanta.

Interactions of Hydrotrioxides and Dihydrogen Trioxide with Lewis Bases and Acids

ANA BERGANT SIMONČIČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Janez Cerkovnik, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Interactions of hydrotrioxides (ROOOH) and dihydrogen trioxide (HOOOH) with various Lewis bases and acids were studied in the PhD thesis. The addition of oxygen bases as hydrogen bond acceptors leads to a downfield shift of the OOOH ^1H NMR absorption for ROOOH and HOOOH in »inert« solvents such as CD_2Cl_2 and toluene- d_8 , respectively. The downfield shift of the OOOH absorption spans from 0,5 to 2 ppm for the addition of crown ethers and 2 to 4 ppm for the addition of pyridine N -oxides. Moreover, there is a pronounced narrowing of the absorptions which implies the breakdown of self-associated hydrotrioxide molecules present in »non-basic« solvents. Crown ethers increase the stability of ROOOH (HOOOH). Rate constants for their decomposition are smaller by 30 to 60 times (CD_2Cl_2 , toluene- d_8), and the activation energies and enthalpies for their decomposition increase by 2,0 to 4,9 kcal/mol, which implies a greater difference between the initial and transition state in the decomposition process. The decomposition rate constants for ROOOH (HOOOH) are higher for the addition of pyridine N -oxides than in the case of crown ethers, albeit ^1H NMR OOOH chemical shifts imply a more pronounced decrease of electronic density around the OOOH proton, i.e., stronger hydrogen bonds. The activation energies and enthalpies for the decomposition of ROOOH (HOOOH) are, comparing to crown ethers, approximately the same. Stronger hydrogen bonds result in a faster transfer of the proton onto the oxygen atom of pyridine N -oxides. The $\cdot\text{OOR(H)}$ anion formed in this process is unstable and decomposes into singlet oxygen (${}^1\Delta_g \text{O}_2$) and the $\cdot\text{OR(H)}$ ion. The maximum stabilization of ROOOH (HOOOH) is actually an equilibrium between the free, non-bonded form of ROOOH (HOOOH) and the complex with a strong Lewis base which causes the transfer of the proton. The cyclic structure of crown ethers appears to be important for the interaction with ROOOH (HOOOH). Introduction of the azobenzo group in crown ethers, synthesized in order to study their capabilities of specific interactions with hydrotrioxides, does not contribute to greater stability of HOOOH . This observation might be a result of strong electrostatic repulsive interactions between non-bonding electron pairs on oxygen atoms in crown ethers and HOOOH .

In the second part of my work I studied the interactions of ROOOH (HOOOH) with Lewis acids. The work focused on methyltrioxorhenium(VII) (MTO) and vanadyl acetylacetone ($\text{VO}(\text{acac})_2$) due to their catalytic activity in the presence of ROOOH (HOOOH). Addition of catalytic amounts of MTO to solutions of various organosilicon hydrotrioxides (R_3SiOOOH) and some acetal hydrotrioxides (R_3COOOH) results in almost quantitative conversions into HOOOH . On the contrary, uncatalyzed reactions lead to low yields of HOOOH at best. The discovered catalytic system is an important step towards the possible generation of concentrated solutions of pure HOOOH .



Theoretical calculations (DFT, B3LYP) for the catalytic cycle with silyl hydrotrioxide (H_3SiOOOH) as the model substrate imply the formation of a primary intermediate in the reaction between H_3SiOOOH and MTO in the rate-determining step ($\Delta H^\ddagger(298 \text{ K}) = 9,8 \text{ kcal/mol}$). The calculations agree well with the experimentally determined activation energy ($9,5 \pm 2,0 \text{ kcal/mol}$) and the kinetic isotope effect of water ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 1,1 \pm 0,1$). With the addition of water in the next step, the intermediate undergoes σ -bond metathesis reaction to break the $\text{Re}-\text{OOH}$ bond and form HOOOH , together with the second dihydroxy intermediate. The final step in the catalytic cycle involves a second, catalytic water molecule that lowers the barrier to form the product (H_3SiOH) and release of the catalyst (MTO). The absence of water in the MTO-catalyzed transformation of ROOOH into HOOOH leads to secondary reactions, i.e., MTO-catalyzed generation of disiloxane from silanol, and the reaction of HOOOH with acetone- d_6 as the solvent. The reaction where the hydrotrioxide of 1,1,1,3,3-hexadeutero-2-propanol was formed is the first example

of a catalyzed addition of HOOOH to a carbonyl group.

$\text{VO}(\text{acac})_2$ was found to be a fairly efficient catalyst in the oxidations of sulfides with HOOOH (ROOOH). Methyl phenyl sulfide was oxidized, as the model substrate, into methyl phenyl sulfoxide by HOOOH and Et_3SiOOOH in various solvents. Experimental results imply a possible initial reaction between $\text{VO}(\text{acac})_2$ and HOOOH (or Et_3SiOOOH), generating a reactive intermediate as an oxidizing species.





Dr. ŽIGA JAKOPIN

Dr. Žiga Jakopin, Mariborčan po rodu, ki ta čas živi in dela v Ljubljani, ljubezen do kemije goji že od srednješolskih let. Kot dijak Druge gimnazije Maribor se je redno udeleževal tekmovanj iz kemije in med drugim prejel zlato Preglovo plaketo. Odločitev za študij na Fakulteti za farmacijo je bila tako samoumevna. Po diplomi, ki jo je opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo, se je kot mladi raziskovalec zaposlil na omenjeni katedri, kjer danes svoje delo nadaljuje kot asistent.

V doktorski disertaciji se je ukvarjal predvsem s sintezo imunomodulatorjev na osnovi muramil dipeptida. »Odločitvi za raziskovalno delo na tem področju je botrovalo dejstvo, da imunomodulatorji predstavljajo svež pristop k protimikrobnii terapiji. Tovrstne spojine imajo namreč zmožnost spodbujanja ali zaviranja imunskega sistema, kar odpira potencialno širok spekter uporabe.« Spojine je raziskovalec skupaj z mentorico prof. Marijo Sollner Dolenc biološko ovrednotil na monocitni celični liniji in primarnih humanih mononuklearnih celicah.

V raziskovalni nalogi je dr. Žiga Jakopin želel zlasti predstaviti velik potencial spojin, ki povečajo odzive prijnjene imunosti, saj se v tem skriva ključ do uspešnega nadziranja večine okužb. Med drugim je uspel sintetizirati tako spojine, ki povečajo, kot tudi spojine, ki zavirajo vnetni odziv prijnjene imunosti. »V prihodnje se bom sicer usmeril na področje toksikologije, vendar bom v majhni meri sodeloval tudi v sinteznih projektih na fakulteti. Po srcu in duši bom za vedno ostal farmacevtski kemik,« poudarja Krkin nagrjenec, ki je prepričan, da so prav Krkine nagrade v luči uspešnega sodelovanja akademskih institucij in farmacevtske industrije tisto, kar slovenska farmacija nujno potrebuje. »Zelo sem vesel, da moj trud ni bil zaman, in hkrati ponosen, da v skupino Krkinih nagrajencev spadam tudi sam.«

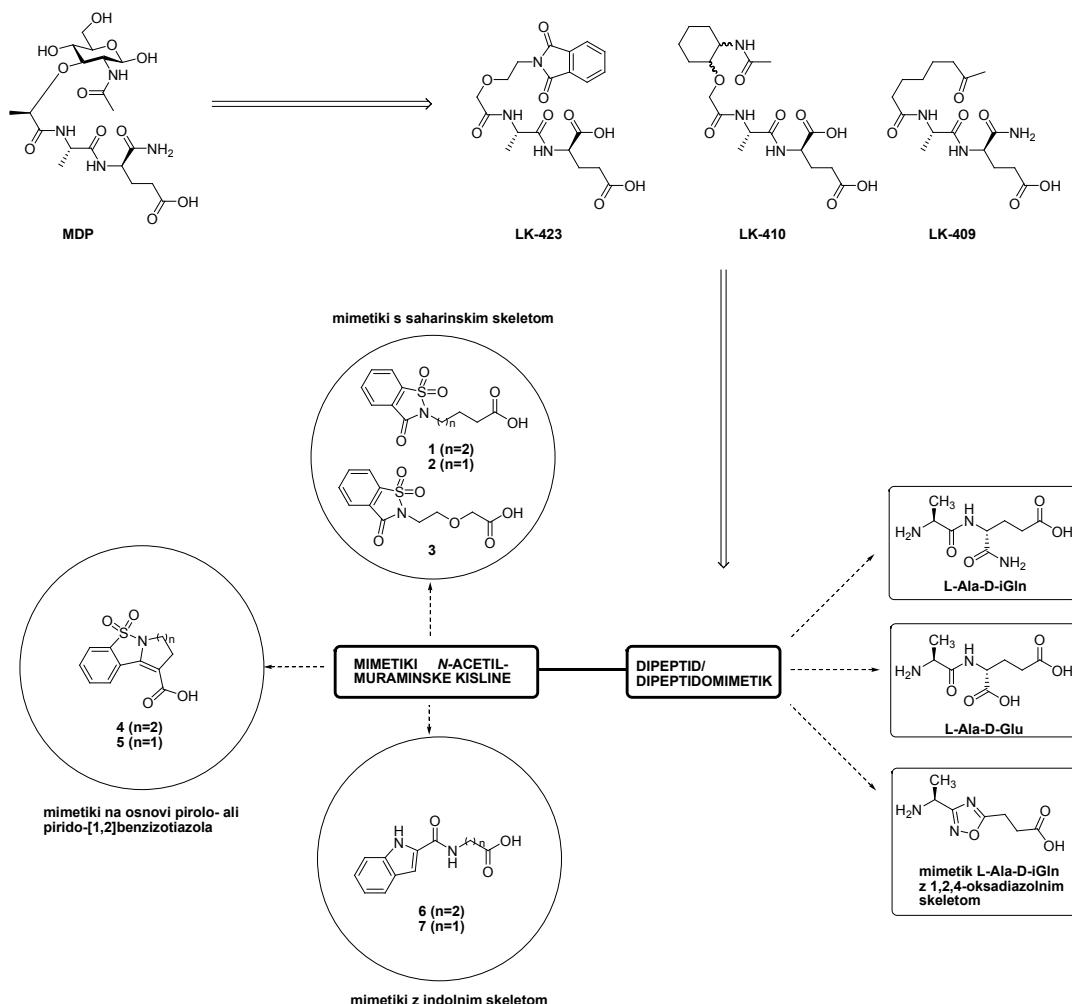
Ob predanem znanstvenem delu sicer ostane malo prostega časa, ki ga dr. Žiga Jakopin najraje izkoristi za šport, saj »delo znanstvenika zahteva odlično fizično in mentalno kondicijo, pa tudi zdravo mero tekmovalnosti.«

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

ŽIGA JAKOPIN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Marija Sollner Dolenc, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Klub številnim protimikrobnim učinkovinam, cepivom in protivirusnim učinkovinam, ki so na voljo, okužbe s patogenimi mikroorganizmi ostajajo stalna grožnja zdravju ne le razvijajočih, ampak tudi razvitih držav. Dodaten problem predstavlja okužbe z mikroorganizmi, odpornimi proti protimikrobnim učinkovinam, tako imenovane bolnišnične okužbe, do katerih je prišlo zaradi pretirane uporabe protimikrobnih učinkovin in hitrega razvoja rezistence nanje. Zato poteka stalen razvoj novih protimikrobnih učinkovin, ki bi omogočale učinkovitejše zdravljenje z manjšo verjetnostjo povzročanja rezistence. Zmožnost modulacije imunskega odziva predstavlja posreden način, kako preprečiti ali zdraviti širok spekter okužb. Prirojeni imunski odziv namreč predstavlja prvo oviro proti mikroorganizmom, saj jih prepozna, se ob tem aktivira in jih v večini primerov tudi uniči.

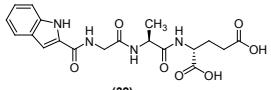
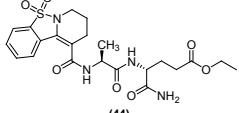


V okviru doktorske disertacije smo načrtovali, sintetizirali in biokemijsko ovrednotili nove dezmuramilne analoge muramil dipeptida, ki delujejo kot imunomodulatorji. Na osnovi poznavanja odnosov med strukturo in delovanjem poznanih in uveljavljenih analogov MDP in različnih peptidomimetičnih

pristopov smo načrtovali nove spojine s saharinom¹ in njegovimi derivati^{2,3} kot mimetiki N-acetilmuraminskega dela. Saharinski obroč se kot fragment pojavlja v številnih biološko aktivnih spojinah, med drugim tudi v spojinah z delovanjem na imunski sistem. Kot neklasične mimetike sladkorja smo uporabili tudi derivate indola in jih vgradili v serijo analogov MDP. V okviru peptidomimetičnega pristopa smo v načrtovane molekule na mestu nativnih dipeptidov L-Ala-D-iGln in L-Ala-D-Glu, uporabili tudi 1,2,4-oksadiazolni mimetik^{4,5} zaporedja L-Ala-D-iGln.

Sintetiziranim spojinam smo določili imunomodulatorno delovanje na rakavi monocitni celični liniji THP-1 ter najaktivnejšim spojinam tudi na primarnih humanih mononuklearnih celicah⁶. Nekatere izmed spojin so se pokazale kot učinkoviti modulatorji izločanja vnetnih citokinov iz stimuliranih humanih mononuklearnih celic. Nekatere reprezentativne spojine so bile ovrednotene tudi s toksikološkega vidika, pri čemer smo ugotovili, da ne delujejo mutageno, citotoksično ali genotoksično.

Spojine, ki smo jih načrtovali, sintetizirali in biološko ovrednotili, delujejo kot imunomodulatorji. Čeprav spojine, ki so se pokazale kot najboljše (**39** in **42**), niso dosegle učinka že uveljavljenega imunomodulatorja murabutida, vseeno predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo.

Citokin	TNF-α	IL-10	IL-6	IL-1β	IL-8
PMA/iono	100 ± 9.2	100 ± 11.5	100 ± 8.1	100 ± 17.3	100 ± 5.8
	63.5 ± 1.7*	75.8 ± 8.6*	42.5 ± 0.6*	96.5 ± 0.6	90 ± 9.2
(39) + PMA/IONO					
	142 ± 8.1*	82.5 ± 4.0*	139.5 ± 8.7*	406 ± 52.0*	134 ± 15.0*
(44) + PMA/IONO					

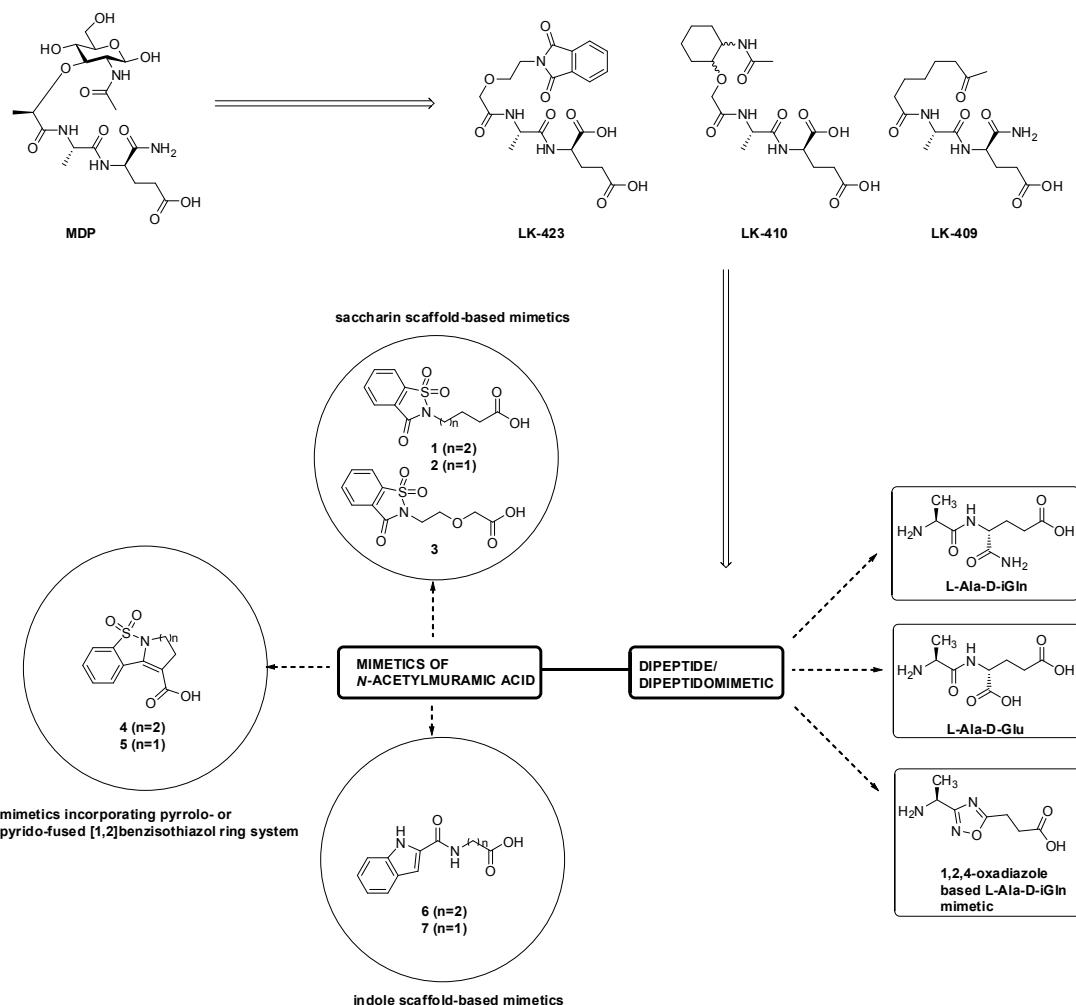
Reference

1. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Advances in the Chemistry of Saccharins: From Synthetic novelties towards biologically active compounds. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 651-671.
2. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Microwave-assisted preparation of N-alkylated saccharins and their reactions with potassium t-butoxide. *Synth. Comm.* **2010**, *40*, 2464-2474.
3. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Preparation of saccharin derivatives of amino acids as potential peptidomimetic building blocks. *Synth. Comm.* **2008**, *38*, 3422-3438.
4. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Recent advances in the synthesis of 1,2,4- and 1,3,4- oxadiazoles. *Curr. org. chem.* **2008**, *12*, 850-898.
5. Jakopin, Ž.; Roškar, R.; Dolenc, M. S. Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1465-1468.
6. Jakopin, Ž.; Corsini, E.; Dolenc, M. S. Design, synthesis and biological evaluation of novel desmurryldipeptide analogues, poslano v objavo.

Design and Synthesis of Substituted 1,2,4-oxadiazoles and Saccharins as Building Blocks of Potential Biologically Active Compounds

ŽIGA JAKOPIN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Marija Sollner Dolenc, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

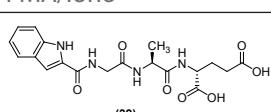
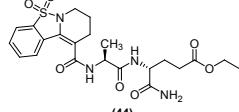
Despite numerous antimicrobials, vaccines and antiviral agents that are available, infections caused by pathogen microorganisms remain a constant threat to the health of developing and developed nations. In addition, excessive use of antimicrobial agents brought about the emergence of microorganisms that are resistant to numerous antimicrobials and cause so called hospital-acquired infections. Therefore, there is an urgent need for the development of novel antimicrobial compounds endowed with superior characteristics to the existing regimen. The ability of immune response modulation represents indirect means of preventing or treating broad spectrum of infections. The innate immune response constitutes the first line of defense against microorganisms. It is activated to resist infection by molecular recognition of their components. This resistance is non-specific, and extends to unrelated species of bacteria, fungi, and viruses.



Within the doctoral thesis we designed, synthesized and biochemically evaluated novel desmuramyl analogues of muramyl dipeptide that displayed immunomodulatory activities. Based on the knowledge of structure-activity relationship of well known MDP analogues, new compounds incorporating a saccharin moiety^{1,2,3} were designed as mimetics of *N*-acetyl muramic part of MDP and were coupled with native dipeptides L-Ala-D-iGln and L-Ala-D-Glu. The saccharin ring system motif appears in many biologically active compounds, including immunomodulatory compounds. Indole derivatives were also employed as mimetics of *N*-acetyl muramic part and incorporated into a series of MDP analogues. Using a rational peptidomimetic approach 1,2,4-oxadiazole^{4,5} containing dipeptidomimetic, mimicking sequence L-Ala-D-iGln, were also synthesized and subsequently incorporated into target compounds.

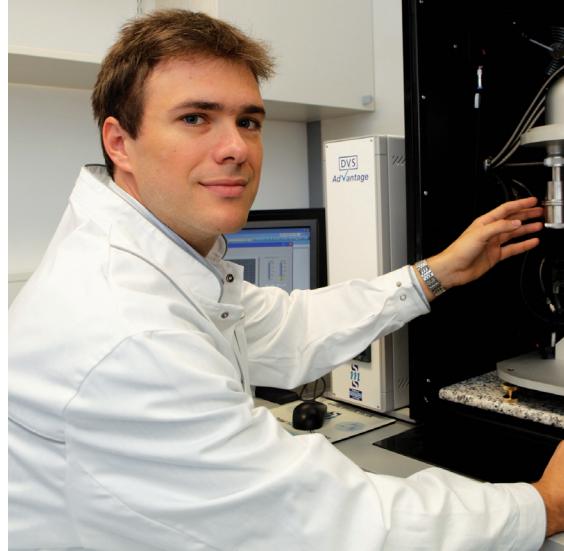
The synthesized desmuramyl dipeptides were screened for their ability to modulate TNF- α inducing activity of LPS-stimulated THP-1. The series of most active compounds was then assessed for their ability to modulate proinflammatory cytokine production evoked by LPS or PMA/ionomycin in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)⁶. Furthermore, representative compounds underwent a toxicological evaluation, and were found as non-mutagenic, non-cytotoxic and non-genotoxic.

Novel desmuramyl analogues of muramyl dipeptide which we designed, synthesized and biochemically evaluated displayed diverse immunomodulatory activities. Although the compounds found as the most active in modulation of immune response were not as effective as murabutide, a well known immunomodulator, those compounds (**39** and **42**) represent a good starting point for further optimization.

Cytokine	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-1 β	IL-8
PMA/iono	100 \pm 9.2	100 \pm 11.5	100 \pm 8.1	100 \pm 17.3	100 \pm 5.8
 (39) + PMA/IONO	63.5 \pm 1.7*	75.8 \pm 8.6*	42.5 \pm 0.6*	96.5 \pm 0.6	90 \pm 9.2
 (44) + PMA/IONO	142 \pm 8.1*	82.5 \pm 4.0*	139.5 \pm 8.7*	406 \pm 52.0*	134 \pm 15.0*

References

1. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Advances in the Chemistry of Saccharins: From Synthetic novelties towards biologically active compounds. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 651-671.
2. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Microwave-assisted preparation of N-alkylated saccharins and their reactions with potassium t-butoxide. *Synth. Comm.* **2010**, *40*, 2464-2474.
3. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Preparation of saccharin derivatives of amino acids as potential peptidomimetic building blocks. *Synth. Comm.* **2008**, *38*, 3422-3438.
4. Jakopin, Ž.; Dolenc, M. S. Recent advances in the synthesis of 1,2,4- and 1,3,4- oxadiazoles. *Curr. org. chem.* **2008**, *12*, 850-898.
5. Jakopin, Ž.; Roškar, R.; Dolenc, M. S. Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1465-1468.
6. Jakopin, Ž.; Corsini, E.; Dolenc, M. S. Design, synthesis and biological evaluation of novel desmuramyl dipeptide analogues, sent for publication.



Dr. MATEJ PAVLI

Dr. Matej Pavli spada med tiste raziskovalce, ki so se s Krkinimi nagradami srečali kot študentje dodiplomskih študijskih programov. Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani je izdelal raziskovalno naložo, ki mu je leta 2004 prinesla prvo Krkino nagrado. Po opravljeni diplomi na Katedri za farmacevtsko tehnologijo leta 2005 se je kot mladi raziskovalec iz gospodarstva zaposlil v Krki, kjer še danes dela na Oddelku za farmacevtski razvoj na področju farmacevtske tehnologije. »Cilj naših raziskav je narediti učinkovito, varno in kakovostno zdravilo. Razvoj zdravilnih učinkovin, ki izkazujejo farmakološko učinkovitost pri zdravljenju bolezni ali lajšanju simptomov, je le prvi korak pri razvoju novega zdravila. Če želimo zagotoviti terapevtsko učinkovitost zdravila, je nujna vgradnjna zdravilne učinkovine v ustrezno farmacevtsko obliko, kot so tablete, kapsule ipd.«

V doktorski nalogi je s sodelavci pokazal uporabnost naravnih polimerov kot pomembnih funkcionalnih pomožnih snovi, ki se lahko vključijo v izdelavo zdravil s prirejenim sproščanjem. »V kontekstu znanosti imajo naše ugotovitve precejšen pomen, saj sta področji naravnih polimerov in njihova uporaba v zdravilih relativno slabo raziskani. Naloga pojasnjuje nekatere lastnosti in obnašanje naravnih polimerov in hkrati nakazuje potencialne možnosti uporabe pri prirejenem sproščanju zdravilnih učinkovin iz ogrodnih tablet.«

Omenjeni rezultati raziskav so že implementirani v praksi, kar se kaže tudi v mednarodnih patentnih prijavah. Kot dodaja dr. Matej Pavli, mu raziskovanje na področju farmacevtske tehnologije, predvsem na področju prirejenega sproščanja zdravilnih učinkovin, še vedno predstavlja izziv, zato želi svoj znanstveni potencial izkoristiti v okviru sodelovanja v Krkini razvojno-raziskovalni skupini, ki se ukvarja z razvojem novih generičnih zdravil.

Krkino nagrado razume kot priznanje raziskovalcem za uspešno zastavljeno in izpeljano raziskovanje z gospodarskim pomenom, ki s 40-letno tradicijo potrjuje, da so raziskovalci pomembni za Krko in obratno. »Želja vsakega raziskovalca je, da njegov znanstveni dosežek prepozna tudi gospodarska družba, saj se s tem njegova uporabnost mogoče nekoč udejani tudi v praksi. Ponenos sem, da sem Krkin nagrajene!«

Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov

MATEJ PAVLI, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

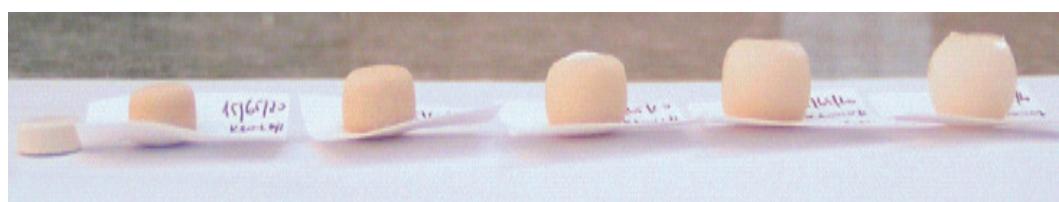
Mentorica: Saša Baumgartner, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Franc Vrečer, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Krka, d. d., Novo mesto

Zagotavljanje učinkovitosti, kakovosti in varnosti zdravil poleg razvoja zdravilne učinkovine (ZU) zahteva tudi razvoj farmacevtske oblike (FO), ki zagotavlja ustrezne biofarmacevtske lastnosti, tj. kinetiko sproščanja ZU. Eno od možnosti doseganja optimalne terapije predstavlja izdelava tablet s prirejenim sproščanjem ZU. V ta namen se v farmacevtski tehnologiji največkrat uporabljajo ogrodne tablete, katerih ogrodje tvori eden ali kombinacija več biološko sprejemljivih polimerov. Sproščanje ZU iz takega sistema lahko poteka po različnih mehanizmih, ki so odvisni tako od fizikalno-kemijskih lastnosti ZU kot uporabljenih polimerov. V zadnjem času potekajo intenzivne raziskave na področju naravnih polimerov, ki ponujajo alternativo obstoječim, dobro raziskanim, sinteznim in polsinteznim polimerom. Velik problem ogrodnih tablet na osnovi naravnih polimerov je, da zaradi premajhnega razumevanja njihovega obnašanja na molekularnem nivoju težko napovedujemo lastnosti in podvrženost tovrstnih sistemov različnim dejavnikom, ki lahko vplivajo na sproščanje ZU, poleg tega pa je problematična tudi ponovljivost lastnosti takšne surovine, kar lahko bistveno vpliva na biofarmacevtske lastnosti končne farmacevtske oblike.

V doktorski nalogi smo načrtovali ogrodne tablete na osnovi naravnih polimerov ksantana, semenske sluzi rožičevca in različnih tipov karagenanov. Za vse omenjene polimere je značilna kompleksna polisaharidna struktura, ki lahko zavzema različne konformacije. Vrsta konformacije in posledično različne interakcije med polimernimi verigami bistveno vplivajo na izražene lastnosti teh polimerov. To lahko izkoristimo pri izdelavi ogrodnih tablet, saj različne lastnosti naravnih polimerov omogočajo vrsto mehanizmov, s katerimi nadzorujemo sproščanje izbrane ZU.

Izdelali in proučevali smo ogrodne tablete na osnovi ksantana z vgrajenim pentoksifilinom kot modelno ZU. Ugotovili smo, da lahko sproščanje modelne ZU, kljub njeni visoki topnosti in odmerku, iz tovrstnih tablet nadzorujemo več kot 24 ur. Bistven dejavnik pri doseganju podaljšanega sproščanja je tvorba gelske plasti (slika 1), ki nadzoruje hitrost sproščanja ZU.



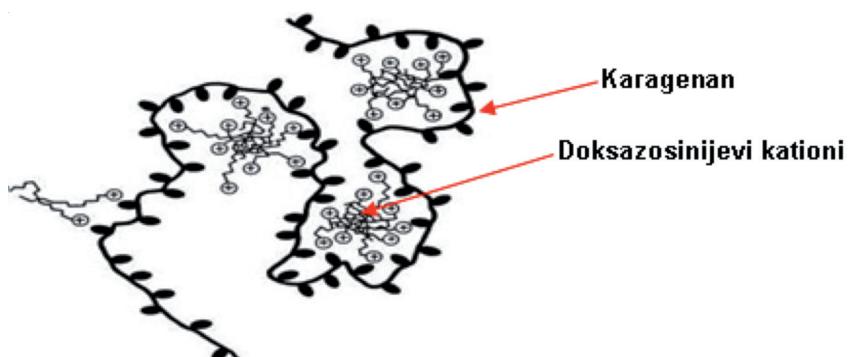
Slika 1: Primer nastanka viskozne gelske plasti. Skrajno levo je suha, nenabrekla ogrodna tablet, proti desni sledijo vedno bolj nabrekle ogrodne tablete, skrajno desno je popolnoma nabrekla ogrodna tablet.

Dokazali smo, da lahko z dodatkom kalcijevih ionov v ogrodno tableto ali v medij za sproščanje vplivamo na teksturo gelske plasti in tako spremiščamo sproščanje. Dodatek kalcijevih ionov je rezultiral v čvrstejši, koherentnejši gelski plasti, kar pa je kljub temu pospešilo sicer difuzijsko nadzorovano sproščanje ZU. Razlog za čvrstejšo gelsko plast je bilo zmanjšanje odbojnih sil med molekulami ksantana zaradi kondenzacije kalcijevih ionov na ioniziranih skupinah stranskih verig ksantana.

V nadaljevanju smo proučili sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet na osnovi kombinacije ksantana in semenske sluzi rožičevca v razmerju 1 : 3. Podobno kot pri ogrodnih tabletah na osnovi ksantana se je tudi tu ob dodatku kalcijevih ionov sproščanje ZU pospešilo, kar je bila posledica spremembe gelske tekture. Ugotovili smo tudi, da čvrstejša gelska tekstura preiskovanih ogrodnih tablet, ki je povezana z manjšim nabrekanjem in erozijo polimerov, ob dodatku kalcijevih ionov ni zagotovilo za bolj podaljšano sproščanje ZU. V okviru proučevanja gelske tekture ogrodnih tablet na osnovi ksantana in semenske

sluzi rožičevca smo dali velik poudarek na uporabi metode analize gelske tekture in prikazali njeno uporabnost v razvoju in razumevanju tovrstnih FO.

Raziskovanje smo nato usmerili na polielektrolitske karagenane (CARR), ki spadajo med anionske biopolimere in so komercialno dostopni v obliki tipov I, K, in λ ter lahko tvorijo polielektrolitske ogrodne tablete. Vanje smo vgradili nasprotno nabito ZU doksazosinijev mesilat (DM). Posebnost tega sistema je, da za nadzorovanje sproščanja ZU izkorišča dva mehanizma: nabrekanje/erozijo hidrofilnih polimerov ter interakcije med učinkovino in polimerom (polielektrolitom). Ugotovili smo, da lahko sproščanje DM iz ogrodnih tablet na osnovi CARR nadzorujemo tudi več kot 24 ur, odvisno od stopnje sulfatiranosti CARR. Nižji pH, bolj obremenilna hidrodinamika in višja ionska moč medija so povzročili hitrejše sproščanje ZU. Interakcije med DM (v interakciji vstopa doksazosinijev kation – DH^+) in CARR smo potrdili tako s klasičnimi analiznimi metodami (DSC) kot posredno z meritvijo zeta potenciala omenjenih snovi. Ugotovili smo, da kompleksi med DH^+ in CARR nastanejo *in situ*. Za študij interakcij v mediju smo kot prvi na področju prirejenega sproščanja v farmaciji naredili in uporabili membransko ionoselektivno elektrodo (MIE), specifično le za preiskovano učinkovino. Z njeno pomočjo smo konstruirali izoterme vezave DH^+ na karagenane, ki smo jih nato razložili z aplikacijo Zimm-Braggove teorije ter kooperativnega modela vezave. Ugotovili smo kooperativnost vezave ZU na CARR, kar pomeni, da je bil poleg elektrostatskih interakcij prisoten še hidrofoben efekt med samimi molekulami ZU (slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz kooperativne vezave doksazosinijevih kationov na karagenane.

Naše študije z MIE kažejo, da tip karagenana, njegova čistost, ionska moč medija ter temperatura lahko bistveno vplivajo na obseg interakcije ZU s polimerom in s tem na kinetiko oziroma profil sproščanja. Ključno na področju prirejenega sproščanja ZU je dobro poznavanje lastnosti izbrane farmacevtske oblike. Pri uporabi ogrodnih tablet na osnovi naravnih polimerov je nujno dobro proučiti in razumeti njihovo obnašanje na molekularnem nivoju, saj je le na tej osnovi možno uspešno načrtovati in izdelati tovrstne sisteme. Za vrednotenje teh sistemov pogosto niso dovolj uveljavljene analitske metode, temveč je treba vključiti tudi druge, ki so bolj poznane in bolj uporabljane na drugih, nefarmacevtskih področjih. Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov zato zahteva nadaljnje poglobljene študije. Le povezovanje in implementacija znanstvenih dognanj bosta omogočila uspešen razvoj kompleksnih farmacevtskih dostavnih sistemov.

Designing, Manufacturing and Evaluation of Modified Release Matrix Tablets Based on Natural Polymers

MATEJ PAVLI, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Saša Baumgartner, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Efficiency, quality and safety of drugs in addition to the development of the active substance itself require the development of pharmaceutical dosage forms with suitable biopharmaceutical properties, i.e. appropriate release kinetics of active substance. One possibility of achieving optimal therapy is to design special tablets with modified release of an active substance. To this end, matrix tablets are most commonly used in pharmaceutical technology, and are composed of one or a combination of several biologically acceptable polymers. Release of the active ingredient from such dosage form can be controlled by different mechanisms, which depend on the physicochemical properties of the active ingredient as also the polymer used. More recently, intensive research on natural polymers, which offer an alternative to existing, well-researched synthetic and semi-synthetic polymers is taking place. A major problem concerning matrix tablets based on natural polymers is that due to the lack of understanding of their behavior at the molecular level, it is difficult to predict the properties and susceptibility of these systems to different factors, that may affect the release of active substances. In addition, reproducibility of the raw materials properties can be problematic and can significantly contribute to varying biopharmaceutical properties of the final dosage forms.

In our thesis, matrix tablets based on natural polymers xanthan, locust bean gum and different types of carrageenans were designed. Complex polysaccharide structure that may favor different chain conformations is characteristic for all these polymers. The type of conformation and, consequently, different interactions between polymer chains significantly affect the properties of these polymers. This can be exploited in the development of matrix tablets since different characteristics of natural polymers provide a range of mechanisms to control the release of selected active substance.

Matrix tablets based on xanthan gum with incorporated pentoxyfylline as model active ingredient were prepared and evaluated. We found out that the release of model drug, in spite of its high solubility and high dose, can be controlled for more than 24 hours. The essential factor in achieving sustained release from xanthan matrix tablets was the gel layer formation (Fig. 1), which controlled the release rate of active substance.

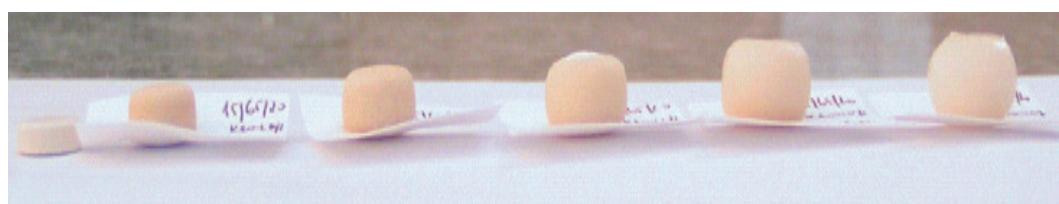


Figure 1: Example of viscous gel layer formation. Dry, unswollen matrix tablet is presented on the extreme left, followed to the right are increasingly swollen matrix tablets, on the extreme right is fully swollen matrix tablet.

We proved that with the addition of calcium ions in the matrix tablet or in the dissolution media the texture of the gel layer can be altered, thus affecting the release of active substance. Addition of calcium ions resulted in a firmer, more coherent gel layer, where the release of the active substance was faster and more diffusion controlled. The reason for firmer gel layer was the decrease of repulsive forces between xanthan molecules, resulting from condensation of calcium ions on the ionized groups of xanthan side chains.

In addition, we studied the release of pentoxyfylline from matrix tablets based on a combination of xanthan and locust bean gum in 1:3 ratio. Similar to matrix tablets based on xanthan gum the addition

of calcium ions resulted in faster release of active substance which was due to altered gel layer texture. In the case of added calcium ions firmer gel texture of investigated matrix tablets, which was associated with reduced swelling and erosion of the polymers, could not itself guarantee more prolonged release of active substance. In the framework of gel texture study of matrix tablets based on xanthan and locust bean gum, a great emphasis was given on the use of gel texture analysis method. Its usefulness in the development and understanding of such FO was demonstrated.

Afterwards we focused our research on polyelectrolytes carrageenans (CARRs), anionic biopolymers, which are commercially available in the form of three types: ι , κ , and λ and can be used as matrix formers in polyelectrolyte tablets. These matrix tablets were loaded with doxazosin mesylate (DM), an oppositely charged active substance. A special feature of this polyelectrolyte matrix system is the ability to control the release of active substance by two mechanisms: swelling / erosion of hydrophilic polymers and the interactions between the active substance - polymer (polyelectrolyte). We found out that DM release from CARR matrices can be controlled more than 24 hours, depending on the sulfatation degree of CARRs. Lower pH, more vigorous hydrodynamics and higher ionic strength of dissolution media resulted in faster release of active substance.

Interactions between DM (doxazosin cation – DH^+ , exactly) and CARRs were confirmed by classical analytical methods (DSC) as also indirectly by measuring the zeta potential. We found out that complexes between DH^+ and CARRs are formed in situ. In order to study interactions in the medium, a special membrane ionoselective electrode (MIE), specific to the investigated substance, was constructed for the first time for the usage in pharmaceutical modified release field. This allowed us to construct binding isotherm curves of DH^+ on different carrageenans, which were then explained by the application of the Zimm-Bragg theory and the cooperative binding model. Cooperative binding of active substance to carrageenans was observed, which indicated that beside electrostatic interactions hydrophobic effect was also present among the molecules of the active substance (Fig. 2).

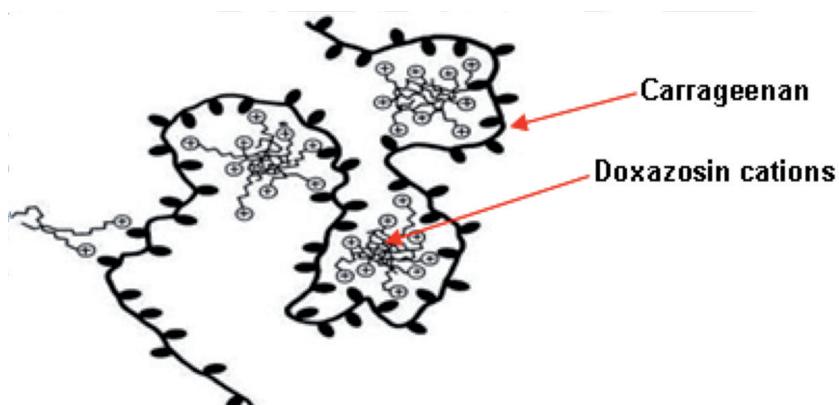


Figure 2: Schematic drawing of cooperative binding of doxazosin cations by carrageenans.

Our studies with MIE indicate that the type of carrageenan, its purity, ionic strength and temperature of the medium can significantly affect the extent of interaction of active substance with the polymer and thus the kinetics or release profile.

Properties of dosage forms are essential for modified release of active substance. When matrix tablets based on natural polymers are considered, properties of polymers on molecular level are of great importance since only then designing and manufacturing of such systems can be successful. For the evaluation of these systems conventional analytical methods in pharmaceutical development are often not enough, therefore it is necessary to use the specific analytical methods from other fields. Designing, manufacturing and evaluation of matrix tablets with modified release based on natural polymers thus requires further in-depth studies and only the integration and implementation of scientific knowledge will enable the successful development of complex pharmaceutical delivery systems.



Dr. ALENKA ZVONAR

Da bo učiteljica, je bila kot majhna deklica prepričana dr. Alenka Zvonar. A kot srednješolka se je pri izbiri študijske smeri znašla v zagati, saj jo je privlačilo široko polje študijskih smeri. Prevladala je ljubezen do naravoslovja in tako se je začela pisati njena zgodba o farmaciji. Na znanstvenem področju se ukvarja z raziskovanjem (samo)mikroemulgirajočih sistemov (SMES) in njihovo pretvorbo v trdne oblike s pomočjo mikrokapsuliranja.

»Na področje farmacevtske tehnologije me je najprej usmerilo povabilo med demonstratorje v času, ko sem bila še študentka. Ko sem se kasneje odločala za diplomsko delo, mi je prof. Julijana Kristl predlagala možnost zaposlitve na mestu tehnične sodelavke. Od tu naprej pa se je vse odvijalo kar samo od sebe in tako sem letos pod mentorstvom prof. Mirjane Gašperlin zaključila podiplomski študij.«

Osnovni cilj njenega raziskovalnega dela je bila izdelava mikrokapsul s tekočim lipidnim jedrom. Samomikroemulgirajoči sistemi z lipidi med drugim omogočajo izboljšanje absorpcije učinkovin iz prebavil. Vgradnja teh sistemov v večenotne farmacevtske oblike, kot so mikrokapsule, pa omogoča pretvorbo tekočih lipidov v trdne sisteme, ki so tako s stališča terapije kot industrije bolj zaželeni. »Pridobljeni rezultati so korak bližje k obvladovanju in robustnosti postopka pretvorbe tekočega SMES v trdne mikrokapsule, ki združujejo tako prednosti SMES kot trdnih farmacevtskih oblik.« Praktičen pomen omenjenega dela Krkina nagrjenka vidi predvsem v poglobljenem poznavanju SMES, ki so zaradi naraščajočega števila slabo vodotopnih učinkovin vedno bolj zanimivi tudi za industrijo.

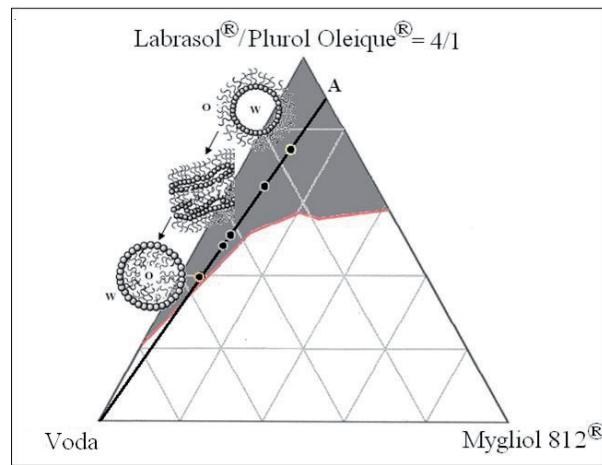
Dr. Alenka Zvonar je od letos kot asistentka zaposlena na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo, tako da bo svojo energijo tudi v prihodnje usmerjala predvsem v pedagoško in raziskovalno delo. »Zelo pomembno se mi zdi, da obstaja dobra povezava med raziskovalnim delom na fakultetah in industrijo. Projekt, kot so Krkine nagrade, gotovo pripomore k utrjevanju teh vezi in širjenju naših obzorij.« Kot še dodaja, je vesela, da so v raziskavo vloženi trud opazili tudi drugi.

Optimizacija tehnološkega postopka izdelave ter vrednotenje mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom

ALENKA ZVONAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Mirjana Gašperlin, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Razvoj učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik je ključnega pomena za tržni uspeh novih zdravilnih učinkovin (ZU). Za doseganje zadostnega obsega absorpcije po peroralnem vnosu se mora ZU izogniti številnim pregradam, kot so neustreza stabilnost in topnost v prebavnih sokovih, nezadostno prehajanje skozi biološke membrane ter predsistemska metabolizem v enterocitih ali jetrih. Peroralni vnos tako predstavlja velik izviv za mnoge slabo vodotopne ZU, saj je pogosto povezan z njihovo šibko in/ali močno intra- in interindividualno variabilno biološko uporabnostjo ter odsotnostjo linearne razmerja med odmerkom in učinkom. Samomikroemulgirajoči lipidni sistemi (SMES), ki v stiku z vodnim medijem pod vplivom peristaltičnega gibanja želodca in črevesja hitro in spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa o/v, spadajo med novejše tehnološke pristope za razvoj učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik z ZU, ki imajo neustrezne biofarmacevtske lastnosti. Sistemi s SMES so običajno na tržišču v obliki tekočin ali mehkih želatinskih kapsul. Ker se pri izdelavi slednjih soočamo z visokimi proizvodnimi stroški in nekompatibilnostjo nekaterih sestavin z ovojnico kapsul, se intenzivno isčejo novi pristopi za razvoj trdnih formulacij s SMES, ki bi združevala tako prednosti tekočih SMES kot trdnih farmacevtskih oblik. Glavni namen našega raziskovalnega dela je bila zato optimizacija tehnološkega postopka izdelave mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom in ovojnico iz Ca-alginata/pektinata, ki bi bile primerne za peroralno dostavo ZU z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi.

V okviru doktorske naloge smo tako najprej razvili SMES z dvema modelnima ZU, s slabo topnim celekoksibom ter slabo topnim in slabo permeabilnim furosemidom, ter ju optimizirali z vidika solubilizacijske kapacitete. Nato smo identificirali in ovrednotili notranje strukture mikroemulzij z vgrajeno ZU in brez, ki nastanejo z razredčevanjem SMES z vodno fazo (slika 1), ter njihov vpliv na kinetiko sproščanja celekoksiba. Znano je, da mikroemulzije kljub termodinamični stabilnosti niso inertni sistemi, temveč se hitro odzovejo na spremembe, kot je dodatek nove snovi, zato smo potrdili tudi fizikalno-kemijsko stabilnost mikroemulzij s celekoksibom. [1]

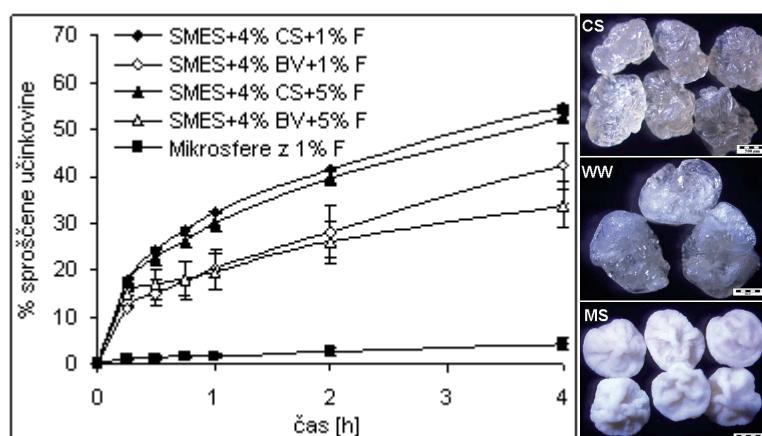


Slika 1: Pseudotrikomponentni fazni diagram za sistem Miglyol 812®/Labrasol®/Plurol Oleique®/voda; temno področje - mikroemulzije, svetlo področje - nestabilne emulzije, A - analizirana razredčitvena premica. Shematsko so prikazani fazni prehodi, ki potekajo med redčenjem SMES.

V nadaljevanju smo ovrednotili vpliv SMES na permeabilnost furosemida skozi različne segmente tankega črevesa podgane in monosloj celične linije Caco-2. V prisotnosti 0,2-odstotnega SMES smo določili povečano permeabilnost furosemida, kar je najverjetneje posledica manjših reverzibilnih sprememb tes-

nih stikov, predvsem pa povečane fluidnosti membran ter inhibicije sekretornih prenašalcev v prebav nem traktu.

Nato smo se osredotočili na optimizacijo procesa mikrokapsuliranja SMES v polimerno ogrodje iz Ca-alginata/pektinata. Tekoči SMES smo pretvorili v trdno formulacijo z uporabo enkapsulatorja Inotech IE-50R s koncentrično šobo z metodo koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane [2, 3]. Glede na učinkovitost vgradnje, morfološke lastnosti in profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul smo identificirali in optimizirali tako kritične procesne parametre kot tudi samomikroemulgirajoče jedro in ovojnico mikrokapsul. Največji izziv pri izdelavi mikrokapsul je omejiti neželeno mešanje med jedrno fazo in vodno raztopino ogrodnega polimera, posledica česar sta iztekanje jedrne faze in manjša učinkovitost mikrokapsuliranja SMES. Retencijo samomikroemulgirajočega jedra in posledično učinkovitost njegove vgradnje smo bistveno izboljšali z zgoščevanjem SMES s koloidnim SiO_2 ali belim voskom ob sočasnem dodatku CaCl_2 , ki je sprožil premreževanje ogrodnega polimera od znotraj navzven in s tem omejil mešanje na medfazi. Učinkovitost mikrokapsuliranja je odvisna tudi od sestave ovojnice. Mikrokapsule z najustreznejšimi morfološkimi lastnostmi ter ponovljivo in visoko učinkovitostjo vgradnje smo tako izdelali iz zmesi alginata in pektina v razmerju 1 : 3, ki je kot polnilo vsebovala 5 do 10 % laktoze. [3, 4] Ovrednotili smo tudi profil sproščanja furosemida iz mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom ter referenčnih mikrosfer (brez SMES v jedru), ki smo jih prej posušili v zvrtinčenih plasteh (slika 2). Obseg in hitrost sproščanja furosemida iz mikrokapsul sta bila bistveno večja kot iz referenčnih mikrosfer ter sta bila odvisna tako od sestave SMES in polimerne ovojnice kot medija sproščanja. [3, 4]



Slika 2: Profil sproščanja ZU iz mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom z 1 do 5 % furosemida in zgoščenim s koloidnim SiO_2 (CS) ali belim voskom (WW) ter iz referenčnih mikrosfer (brez SMES v jedru) z 1 % furosemida; pH = 3.

V nalogi smo raziskali in optimizirali postopek izdelave mikrokapsul s samomikroemulgirajočim jedrom s tehnologijo koekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane. Z vgradnjo furosemida v samomikroemulgirajoče jedro mikrokapsul smo izboljšali tako razapljanje kot tudi permeabilnost učinkovine skozi različne segmente črevesa podgane in monosloj celične linije Caco-2. Predstavljeni rezultati zato predstavljajo pomemben korak bližje k obvadovanju in robustnosti postopka pretvorbe tekočega SMES v trdne mikrokapsule, ki združujejo tako prednosti SMES kot trdnih farmacevtskih oblik in predstavljajo perspektiven sistem za peroralno dostavo učinkovin z neustreznimi biofarmacevtskimi lastnostmi.

Literatura

- [1] Zvonar A., Rozman B., Bešter Rogač M., Gašperlin M. Acta chim. slov. 2009, 56(1): 131-138.
- [2] Zvonar A., Kristl J., Kerč J., Ahlin Grabnar P. J. Microencapsulation 2009; 26(8): 748-759.
- [3] Zvonar A., Šturm K., Kristl A., Gašperlin M. Int. J. Pharm. 2010; 388 (1-2): 151-158.
- [4] Zvonar A., Gašperlin M. Die Pharmazie 2010; 65(5): 390-391.

Optimization of Technological Procedure and Evaluation of Microcapsules with Selfmicroemulsifying Core

ALENKA ZVONAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Mirjana Gašperlin, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The ability to develop an effective oral dosage form is crucial for the successful launch of a new active pharmaceutical ingredient (API) in the marketplace. For API to be well absorbed from the gastrointestinal tract, a number of potentially limiting factors must be overcome. These include appropriate stability and solubility in the gastrointestinal fluids, reasonable intestinal permeability, and resistance to presystemic metabolism within the enterocytes and the liver. Oral delivery therefore remains a serious challenge for many poorly water-soluble APIs due to limited oral bioavailability, high intra- and intersubject variability, and lack of dose proportionality. One of formulation strategies recently employed to develop effective oral dosage forms for APIs with poor biopharmaceutical properties are self-microemulsifying lipid-based systems (SMES). They are capable of forming fine o/w (micro) emulsion during the gentle agitation provided by the digestive motility of the stomach and intestine. SMES are normally prepared either as liquids or encapsulated in soft gelatin capsules. Due to high production costs and incompatibility problems with the shell of the capsules, new technological approaches are extensively investigated in order to develop solid formulations with SMES that would combine the advantages of liquid SMES with those of a solid dosage forms. The main goal of our work was therefore to optimize the technological procedure for preparation of Ca-alginate/pectinate microcapsules with self-microemulsifying core that would be suitable for oral delivery of drugs with poor solubility and biopharmaceutical properties.

Firstly, SMES loaded with two model APIs, poorly soluble celecoxib, and poorly soluble and poorly permeable furosemide, were developed and optimized in regard to drug solubilization capacity. Afterwards, the internal structures of the unloaded and celecoxib-loaded microemulsions, formed on dilution of SMES with aqueous phase (figure 1), were determined, and their influence on celecoxib release was examined. Microemulsions are thermodynamically stable; however, they are not an inert vehicle. Adding new component, e.g. API, may thus affect their phase behavior, therefore, the physical and chemical stability of celecoxib-loaded microemulsions was additionally confirmed. [1]

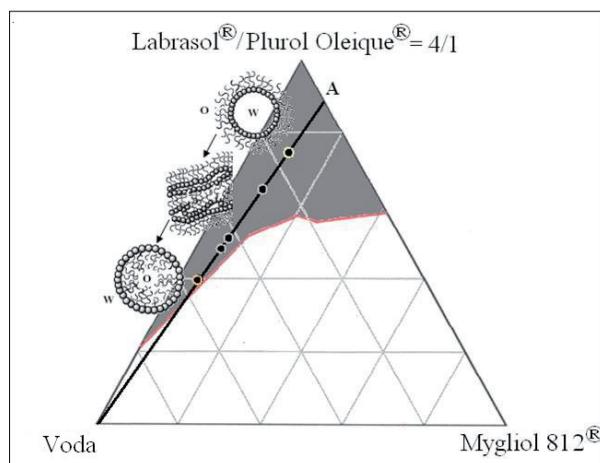


Figure 1: Pseudo-ternary phase diagram of the Miglyol 812[®]/Labrasol[®]/Plurol Oleique[®]/water system; dark area-microemulsions, white area- unstable emulsions, A-investigated dilution line. Structural transitions of microemulsions formed on a dilution line are presented schematically.

Secondly, selected SMES was evaluated for its impact on furosemide permeability through the different segments of rat small intestine and Caco-2 cell monolayers. The permeability of furosemide was shown

to be enhanced in the presence of 0,2% SMES, most probably due to some minor reversible openings of tight junctions, altered membrane fluidity and inhibition of efflux transporters involved in the intestinal secretion of furosemide.

Afterwards, we focused into optimization of microencapsulation process of SMES into Ca-alginate/pectinate matrix. An Inotech IE-50R encapsulator equipped with a concentric nozzle was used to transform liquid SMES to solid microcapsules by technique of liquid jet co-extrusion by vibrating nozzle technology [2,3]. Key process parameters were identified and optimized in regard to process yield. Self-microemulsifying core and shell forming phase were then optimized with respect to encapsulation efficiency, microcapsules morphology and drug release characteristics. The main challenge in production of microcapsules is to prevent the undesired mixing of the self-microemulsifying core with the aqueous shell forming phase, which results in core leakage and decreased encapsulation efficiency. The core retention and consequently encapsulation efficiency was considerably improved by thickening SMES with colloidal silica or white wax, together with addition of CaCl₂ that promoted cross-linking of the polymer in the shell phase from the inside out, thereby limiting the undesired mixing between the core and shell forming phase. The microencapsulation efficiency was also affected by the shell phase composition. Best shaped microcapsules with highest encapsulation efficiency were obtained from the shell forming phase with the alginic/pectin ratio of 1:3 containing 5-10% lactose. [3,4]

Finally, the drug release from microcapsules and reference microspheres (without SMES in the core), dried in a fluid bed system, was evaluated (figure 2). Drug release from microcapsules was considerably faster than from reference microspheres, and was influenced by the composition of SMES and polymeric shell as well as by release medium. [3,4]

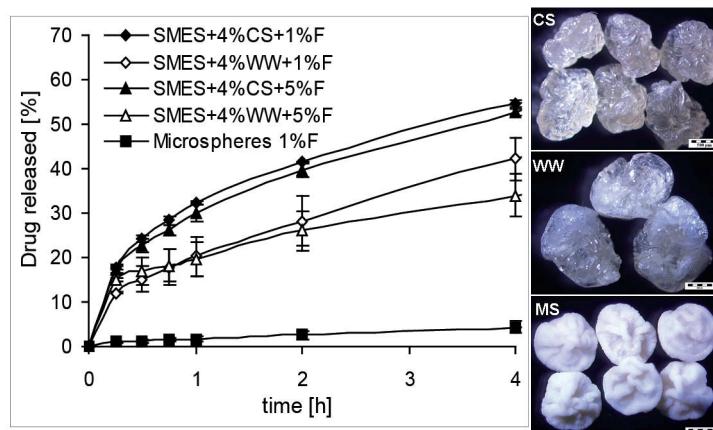


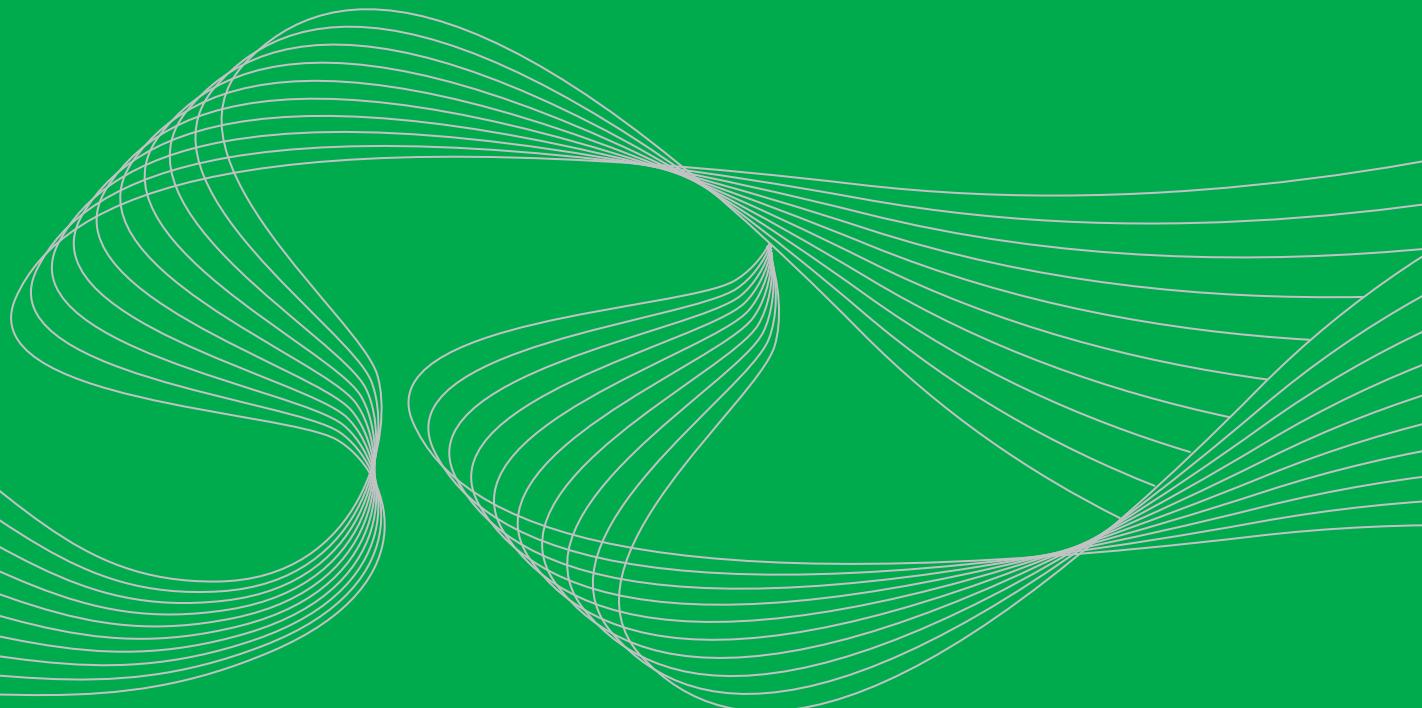
Figure 2: Drug release profile of microcapsules with SMES in the core (thickened with colloidal silica (CS) or white wax (WW) and containing 1-5 % furosemide) or reference microspheres (without SMES in the core) loaded with 1 % furosemide, at pH 3.

In conclusion, we have explored and optimized the production of microcapsules with self-microemulsifying core by technique of liquid jet co-extrusion by vibrating nozzle technology. In addition, we have improved the solubilization and permeability of furosemide through different segments of rat small intestine and through Caco-2 cell monolayers. Presented results therefore constituted an important step closer to a controlled and robust process of transforming liquid SMES to solid microcapsules, which merge the advantages of SMES with those of a solid dosage forms, and thus provide a promising alternative to ensure successful oral delivery of drugs with poor biopharmaceutical properties.

References

- [1] Zvonar A., Rozman B., Bešter Rogač M., Gašperlin M. Acta chim. slov. 2009; 56(1): 131-138.
- [2] Zvonar A, Kristl J, Kerč J, Ahlin Grabnar P. J. Microencapsulation 2009; 26(8): 748-759.
- [3] Zvonar A, Šturm K, Kristl A, Gašperlin M. Int. J. Pharm. 2010; 388 (1-2): 151-158.
- [4] Zvonar A, Gašperlin M. Die Pharmazie 2010; 65(5): 390-391.

40



Krkine nagrade na področju raziskovalnega dela
Krka Prizes for Achievements in Research

Povzetki
Abstracts

Razvoj analiznih metod za ugotavljanje ostankov antiparazitikov in nesteroidnih protivnetnih učinkov za vrednotenje prehoda v mleko ovc ter vpliva predelave na vsebnost v mlečnih izdelkih

JAN ANTONIĆ, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Vesna Cerkvenik-Flajs, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Iztok Grabnar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Razvili smo sodobne analizne metode za določanje ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora in raziskali vpliv inhibitorjev transportnih proteinov na farmakokinetiko izločanja iz krvne plazme v mleko in obstojnost veterinarskih zdravil med predelavo mleka v mlečne izdelke.

Hipoteze, da bi z modifikacijo izločanja avermektinov z uravnavanjem delovanja p-glikoproteina zmanjšali vsebnost avermektinov v mleku, kar bi omogočilo protiparazitno zdravljenje in profilaksos s širšim naborom učinkovin, nam zaenkrat ni uspelo potrditi.

Med termično in fermentacijsko predelavo mleka koncentracije njegovih ostankov z gledišča zakonodaje niso bile problematične.

Za potrebe državnega veterinarsko-sanitarnega nadzora v živilih živalskega izvora smo razvili presejalno in potrditveno analizno metodo za ugotavljanje ostankov devetih nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi z uporabo LC-MS/MS in jo ovrednotili v skladu z analizno zakonodajo v EU.

Development of Analytical Methods to Determine Antiparasitic and Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Residues to Study Drug Transport from Blood Plasma into Milk and to Assess the Influence of Milk Processing on Concentration Levels in Milk Products

JAN ANTONIĆ, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Vesna Cerkvenik-Flajs, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Iztok Grabnar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

We developed contemporary analytical methods to determine veterinary drug residues in food of animal origin and investigated the impact of inhibitors of transport proteins on pharmacokinetic parameters and stability of veterinary drugs during milk processing.

Despite successful p-glycoprotein modulation we did not confirm main hypothesis, which is that lower concentration levels in milk would enable the use of more anti-parasitic drugs for more efficient health care.

Eprinomectin proved to be a very stable substance during thermal and fermentation milk products manufacture. Concentration levels in milk and milk products were below maximum residue limits established by EU legislation.

We developed a screening and confirmatory analytical method for the purpose of official state residue monitoring of nine non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and blood plasma using LC-MS/MS. Method was fully validated according to EU legislation.

Priprava rekombinantnih človeških hidroksisteroid-dehidrogenaz in študije njihovih inhibitorjev

PETRA BROŽIČ, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Tea Lanišnik Rizner**, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Stanislav Gobec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD) katalizirajo stereospecifične redukcije karbonilnih in oksidacije hidroksilnih funkcionalnih skupin na steroidnem skeletu. Sodelujejo pri biosintezi in inaktivaciji vseh steroidnih hormonov, imajo pa tudi afiniteto do drugih substratov, kot so ketoprostaglandini, maščobne kisline, xenobiotiki itd. Ker so človeške HSD vpletene v različna patofiziološka stanja, so zanimive farmakološke tarče. Namen doktorskega dela je bil pripraviti rekombinantne HSD, poiskati njihove inhibitorje in proučiti povezavo med njihovo strukturo in delovanjem. Inhibitorje smo našli med spojinami, ki se že uporabljajo v terapiji (NSAID in progestini), med flavonoidi in derivati njihovega biosinteznega intermediata cimetne kisline, v komercialno dostopnih knjižnicah, ki smo jih računalniško presejali, v seriji derivatov ciklopantanov in med naključno izbranimi spojinami. Z računalniškim sidranjem najboljših inhibitorjev v aktivna mesta encimov smo predvideli njihov način vezave. Predstavljeni delo je temelj za nadaljnje iskanje spojin z večjo inhibitorno aktivnostjo in selektivnostjo do posamezne HSD. Selektivni inhibitor, ki bi vodil do zdravilne učinkovine, bi imel pred ostalimi spojinami prednost pri zdravljenju zaradi manjših sistemskih in lokalnih stranskih učinkov.

Preparation of Recombinant Human Hydroxysteroid Dehydrogenases and Study of their Inhibitors

PETRA BROŽIČ, Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: **Tea Lanišnik Rizner**, Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Stanislav Gobec**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) catalyze stereospecific reductions and oxidations of carbonyl and hydroxyl groups of the steroid skeleton, respectively. They are involved in biosynthesis and inactivation of all steroid hormones, and metabolism of other substrates, such as lipid acids, prostaglandins, xenobiotics, etc.... Due to their involvement in different pathophysiological conditions, they represent emerging therapeutic targets. The aim of the study was to prepare recombinant HSDs, to find their inhibitors, and to study their structure-activity relationships. We have found HSDs inhibitors among compounds that are already being used in the therapy (NSAIDs and progestins), among flavonoids and derivatives of the cinnamic acid, in commercially available compound libraries screened by computational methods, and among cyclopentane derivatives. For the best inhibitors, computational docking into the active sites of the studied enzymes was performed revealing the possible binding modes. The presented work is a good guideline for further searching for inhibitors with higher activity and selectivity. Selective HSD inhibitor that would lead to a drug development would represent a so-called selective intracrine modulator with less systemic and local side effects than other compounds and, therefore, the advantage in the therapy.

Gensko pogojene razlike med spoloma pri urejanju telesne teže in izraženosti genov v vmesnih možganih pri miših brez gena SF-1

TOMAŽ BÜDEFELD, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentor: Gregor Majdič, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Prepisovalni dejavnik – steroidogeni dejavnik 1 (steroidogenic factor 1, SF-1) – je ključen pri uravnavanju izražanja beljakovin, ki sodelujejo pri biosintezi steroidnih hormonov in drugih genov, pomembnih za razvoj in delovanje endokrinega sistema. Pri miših brez gena SF-1 (SF-1 knockout, SF-1 KO) spolne in nadledvične žleze propadejo v zgodnjem fetalnem obdobju pred začetkom biosinteze steroidnih hormonov, zato predstavlja poseben model za proučevanje genskih vplivov pri spolno dimorfнем razvoju možganov. Naše raziskave so pokazale na obstoj spolnih razlik v izraženosti nekaterih beljakovin v posameznih področjih vmesnih možganov pri miših seva C57BL/6J. V nekaterih primerih so bile opažene spolne razlike najverjetneje posledica vpliva spolnih hormonov ali spolnih kromosomov, v nekaterih primerih pa medsebojnega vpliva obeh dejavnikov. Pri miših brez gena SF-1 je uravnavanje energetske homeostaze spremenjeno, zaradi česar razvijejo debelost. Naše raziskave so pokazale, da je pri miših brez gena SF-1 povečana površina vlaken, ki vsebujejo presnovni peptid, soroden agoutijevi beljakovini (agouti related peptide, AgRP), in neuropeptid Y (neuropeptide Y, NPY) ter povečano število nevronov, ki vsebujejo presnovni peptid, povezan s kokainom in z amfetaminom (cocaine and amphetamine related transcript, CART), v območju ventromedialnega jedra hipotalamus (ventromedial hypothalamus, VMH). Po stradanju v njegovem jedru so imele miši brez gena SF-1 večjo imunoreaktivno površino peptidov AgRP, NPY in CART kot kontrolne miši divjega tipa. Izsledki na molekularni ravni so pokazali na vlogo jedra VMH pri razvoju debelosti pri miših brez gena SF-1.

Gene Dependent Sex Differences in Body Weight Regulation and Gene Expression in Diencephalon in SF-1 Knockout Mice

TOMAŽ BÜDEFELD, Veterinary faculty, University of Ljubljana
Supervisor: Gregor Majdič, Veterinary faculty, University of Ljubljana

Transcription factor steroidogenic factor 1 (SF-1) regulates expression of proteins involved in steroidogenesis and other genes important for development and function of endocrine system. Mice lacking SF-1 (SF-1 KO) are not exposed to endogenous steroid hormones due to regression of genital ridges early during development. Therefore SF-1 KO mice represent a unique model for studying gene dependent brain sexual differentiation. Our results showed different origins of sex differences in gene expression in various regions throughout mouse hypothalamus; the effect of steroid hormones or sex chromosomes alone or the effect of sex chromosomes and steroid hormones together. It has been described before, that SF-1 KO mice develop late onset obesity. To study the regulation of energy homeostasis at a molecular level we examined expression patterns of some metabolic peptides in hypothalamus. In the VMH region, agouti related peptide (AgRP), neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine related transcript (CART) content was increased in SF-1 KO mice due to disrupted cytoarchitecture of VMH. Changes in gene expression under fasting conditions were found only in the VMH region with higher AgRP and NPY immunoreactivity and number of CART immunoreactive neurons in dorsomedial part of VMH in fasted SF-1 KO mice. Our results further confirmed that altered VMH structure is likely the main cause for obesity in SF-1 KO mice.

Mehanizmi probiotičnega delovanja izbranih laktobacilov človeškega in živalskega izvora

BILJANA HACIN, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Alojz Ihan**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Bojana Bogovič Matijašić**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Probiotične kulture imajo dolgo zgodovino varne uporabe v prehrani ljudi, dodajajo pa jih tudi krmnim mešanicam za živali. Raziskave kažejo, da ima vsak probiotični sev specifičen način delovanja. Poleg seva človeškega izvora *L. gasseri* K7 smo v testih *in vitro* preizkusili še 12 izolatov iz odstavljenih prašičkov. Pet zanimivejših sevov, ki smo jih izbrali za testiranja preživetja v simuliranih pogojih prebavil, je pokazalo zadovoljivo odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolču. V testih tekmovanja za adhezijo na sluz človeškega in živalskega izvora sta *L. gasseri* K7 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 odstopala od ostalih testnih sevov po inhibiciji adhezije *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati poskusov na makrofagni celični liniji THP-1 so pokazali, da ob sočasni stimulaciji z LPS testni sevi zmanjšajo koncentracijo IL-8, IL-6 in TNF, kar kaže na njihovo sposobnost protivnetnega delovanja. V študiji *in vivo* na miših seva C57BL/6J smo ugotovili, da *L. gasseri* K7 preživi prehod skozi prebavila, jih začasno naseli in je varen za uporabo. Poleg tega spodbuja prirojeni imunski sistem gostitelja, kar je razvidno iz povečanja površine limfatičnega tkiva vitega in teščega črevesa in dviga tkivne koncentracije IgA-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa. Podatki, ki smo jih pridobili v poskusih *in vitro* in študiji *in vivo*, so dobra osnova za nadaljnje klinične raziskave in so nas pripeljali korak bližje k razvoju probiotičnega izdelka za ljudi in živali, z dobro poznanimi funkcionalnimi učinki.

Mechanisms of Probiotic Action of Selected Lactobacilli of Human and Animal Origin

BILJANA HACIN, Veterinary faculty, University of Ljubljana

Supervisor: **Alojz Ihan**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Bojana Bogovič Matijašić**, Biotechnical faculty, University of Ljubljana

Probiotic cultures have a long history of safe use in human and animal consumption. Research shows that every probiotic strain exhibits a specific mode of action. Apart from *L. gasseri* K7, 12 porcine isolates were chosen for further studies *in vitro*. Five strains showed good resistance against low pH and bile. In adhesion studies *L. gasseri* K7 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 showed superior ability to compete with *E. coli* and *S. aureus*. Tests employing the well established THP-1 cell line revealed the ability of selected strains to elicit an immune response and act anti-inflammatory, which was evident as down-regulation of IL-8, IL-6 and TNF after stimulation of cells with LPS. Our *in vivo* study on C57BL/6J mice confirmed that *L. gasseri* K7 survives the passage through the gastrointestinal tract and at least transiently colonizes the intestine. Effect on innate immunity was observed, as application of K7 resulted in proliferation of ileal and jejunal lymphatic tissue and in increased production of IgA in the ileum. Data obtained in our *in vitro* and *in vivo* studies represents a good basis for further clinical studies and has brought us a step further in the development of a probiotic product for human and animal consumption with well known functional effects for the consumer.

Vpliv katepsina X na migracijo in morfologijo limfocitov T prek regulacije integrinov

ZALA JEVNIKAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Janko Kos, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Migracija limfocitov T je temeljnega pomena za imunski nadzor in odziv. Integrin LFA-1 je prevladujoča adhezijska molekula limfocitov T in ima pomembno vlogo pri migraciji. Adhezija LFA-1 na njegov osnovni ligand ICAM-1 je nadzorovana s povezavo med citoplazmatskim repom integrinske podenote beta-2 in citoskeletom. Katepsin X, cisteinska karboksipeptidaza, spodbuja migracijo limfocitov T prek interakcije z LFA-1. Zaporedna cepitev aminokislin s konca C citoplazmatskega repa podenote beta-2 s katepsinom X poveča afiniteto LFA-1 za citoskeletalna proteina talin-1 in alfa-aktinin-1. Katepsin X tako omogoči postopen prehod med konformacijami LFA-1 z vmesno in visoko afiniteto do ICAM-1, kar je ključno za učinkovito migracijo limfocitov T. Limfociti T s povečanim izražanjem katepsina X tvorijo uropod, podaljšan izrastek na zadnjem delu celice, ki ima pomembno vlogo pri ameboidni migraciji in medceličnih interakcijah. S katepsinom X povzročene posttranslacijske spremembe LFA-1 predstavljajo nov mehanizem dinamične regulacije integrinov in vplivajo na številne funkcije limfocitov T. Razumevanje regulacije LFA-1 s katepsinom X je temelj za razvoj terapevtikov za zdravljenje avtoimunskeh in malignih bolezni, ki bodo vplivali na afiniteto LFA-1 in ne bodo imeli imunosupresivnih učinkov.

Cathepsin X Affects T Cell Migration and Morphology Through Integrin Regulation

ZALA JEVNIKAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Mentor: Janko Kos, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

T cell migration is essential for immune surveillance and response. Integrin LFA-1 is the predominant cell adhesion molecule present on T cells and is considered to play an important role in T cell migration. LFA-1 adhesion to its major ligand ICAM-1 is controlled by the association of the cytoplasmic tail of beta-2 subunit with the cytoskeleton. Cathepsin X, a cysteine carboxypeptidase promotes T cell migration by interaction with LFA-1. Sequential cleavage of C-terminal amino acids from the beta-2 cytoplasmic tail of LFA-1, by cathepsin X, enhances binding of the cytoskeletal proteins talin-1 and alpha-actinin-1. In this way, cathepsin X enables the stepwise transition between intermediate- and high-affinity conformations of LFA-1, an event that is crucial for effective T cell migration. Moreover, cathepsin X-overexpressing T cells exhibit polarised morphology with extended trailing edge protrusion, the uropod, which has an important role in T cell amoeboid migration and cell-cell interactions. LFA-1 post-translational modification by cathepsin X constitutes a novel mechanism for highly dynamic integrin regulation with a significant impact on the function of T cells. Our results reveal cathepsin X as a possible target for the design of therapeutics for treatment of autoimmune and malignant diseases aimed at modulating LFA-1 affinity while avoiding loss-of-function.

Identifikacija označevalcev in razvoj proteinskih biočipov za določanje proteoma in tipizacijo malignih tkiv

DAMJANA KASTELIC, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Radovan Komel, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Denis Pompon, Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, Francija

Kljud upadanju incidence je želodčni rak ena od najpogosteješih vrst raka in je tudi drugi najpogosteji vzrok z njim povezanih smrti. Glavna ovira za izboljšanje preživetja je pomanjkanje diagnostičnih označevalcev, s katerimi bi lahko določili stopnje razvoja bolezni. Za izolacijo specifičnih protiteles za nove označevalce želodčnega raka smo razvili izviren postopek izgradnje knjižnice laminih protiteles. Ta posebna vrsta protiteles je bila l. 1993 po naključju odkrita v serumu kamel in lam in ima specifične lastnosti v primerjavi s konvencionalnimi protitelesi. Omenjena rekombinantna knjižnica je bila diferencialno presejana s fagnim prikazom na zdravem in tumorskem želodčnem proteiniskem ekstraktu. Po selekciji je bila s skupino protiteles, ki so specifično prepoznala proteine, izražene v tumorskem tkivu, napravljena afinitetna kromatografija in posledična identifikacija tumorskih antigenov z masno spektrometrijo. Ob tem smo iz knjižnice protiteles še posebej izolirali protitelesa težke verige, ki specifično prepoznavajo izbrane pozname označevalce raka p53, Bcl-2 in VEGF, ter jih okarakterizirali glede njihovega izražanja, topnosti, specifičnosti in afinitete in jih uporabili pri poskusu izdelave prototipa diagnostičnega čipa.

Identification of Markers and Development of Protein Biochips for Characterisation of Proteome and Typing of Malignant Tissues

DAMJANA KASTELIC, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: Radovan Komel, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Denis Pompon, Center for Molecular Genetics, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

Despite a declining incidence, gastric cancer is one of the most common human type of cancers and the second most frequent cause of cancer-related death. The main barrier for improving the survival rate is the lack of diagnostic markers, able to determine developmental stages of the disease. In order to isolate binders for novel cancer markers, an original approach was developed for construction of a llama heavy chain antibody library. This special type of antibodies was discovered by serendipity in 1993 in the serum of llamas and camels and has specific characteristics compared to conventional antibodies. The mentioned recombinant library was differentially screened on healthy versus tumorous gastric protein extracts using phage display. After selection, a pool of antibodies recognising proteins in tumorous tissue was used for affinity chromatography and further identification of tumorous antigens using mass spectrometry. In addition, high affinity heavy chain antibodies specifically recognizing recombinant cancer biomarkers p53, Bcl-2 and VEGF were isolated from library and characterized in terms of expression, solubility, specificity and affinity and were used for intention of diagnostic microarray construction.

Kroženje ostankov zdravilnih učinkovin med čiščenjem vod

TINA KOSJEK, *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana*

Mentorica: Ester Heath, *Institut Jožef Stefan*

Somentor: Boris Kompare, *Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Univerza v Ljubljani*

Prisotnost ostankov zdravilnih učinkovin v okolju povzroča naraščajočo zaskrbljenost in prinaša nov izviv za čiščenje pitnih in odpadnih vod ter za njihovo ponovno uporabo. Učinkovitost čiščenja zdravilnih učinkovin na čistilnih napravah je vprašljiva, saj niso prirejene za odstranjevanje tovrstnih spojin. Nekatere zdravilne učinkovine se med čiščenjem pretvorijo v produkte razgradnje, katerih identiteta, kroženje in učinek na okolje in človeka so v večini primerov nepoznani, njihovo prepoznavanje pa temelji na uporabi sofisticiranih analiznih metod in instrumentov. Doktorsko delo vključuje razvoj analizne metode za določanje nekaterih razširjenih zdravilnih učinkovin (nesteroide protivnetne učinkovine, antiepileptik in hipolipemik) in medlaboratorijsko validacijo te metode. Razvito analizno metodo sem uporabila kot orodje za študijo biološke in abiotične razgradnje izbranih učinkovin na pilotnih sistemih, ki posnemajo procese čiščenja odpadne in pitne vode. Posebno sem se osredotočila na identifikacijo produktov razgradnje zdravilnih učinkovin, ki se tvorijo pri teh procesih. Med drugim sem ugotovila, da so vsaj trije izmed identificiranih produktov razgradnje bolj toksični kot izhodne spojine, kar je zaskrbljujoče in še dodatno podkrepi zastavljene cilje, tj. doseganje popolne mineralizacije obstojnih mikropolutantov med čiščenjem odpadne in pitne vode in s tem znatno zmanjšanje obremenitve okolja in tveganja za zdravje.

Occurrence, Fate and Removal of Pharmaceutical Residues in Water Treatment

TINA KOSJEK, *Jožef Stefan International Postgraduate School*

Supervisor: Ester Heath, *Jožef Stefan Institute*

Co-supervisor: Boris Kompare, *Faculty of Civil and Geodetic Engineering, University of Ljubljana*

The presence of pharmaceutical residues in surface waters is an emerging environmental issue that provides a new challenge to treatment systems for potable water, wastewater and water reuse. The removal of pharmaceuticals still only provides a partial indication of the efficiency of various treatment methods because of the possible generation of nontargeted toxic intermediates more resistant to degradation. When it comes to pharmaceutical residues many gaps exist in our knowledge regarding degradation mechanisms, the identity of transformation products, and their impact on and their fate in the environment. This doctoral thesis involves the development of an analytical method for determination of widespread pharmaceuticals (nonsteroidal antiinflammatory drugs, antiepileptic and hypolipidemic drugs) and an interlaboratory validation of this method. The analytical method was then used as a tool for studying biological and abiotic degradation of selected pharmaceuticals on pilot treatment systems that mimic processes occurring during water treatment. Particular emphasis was payed to identification of transformation products being formed during treatment processes, where at least three of them were found to be more toxic and hazardous than the parent compounds. Thus, with an aim of achieving complete mineralisation of both parent compounds and their transformation products, further development of treatment technologies, possibly involving additional and/or sequenced treatments, is needed.

Karakterizacija in optimizacija ionsko izmenjevalnih kromatografskih monolitov za izolacijo plazmidov

NIKA LENDEROKRAJNC, BIA Separations, d. o. o.

Mentor: Aleš Podgornik, BIA Separations, d. o. o.

Somentor: Boris Pihlar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Razvili smo novo nedestruktivno metodo za karakterizacijo ionsko izmenjevalnih (IEX) kromatografskih nosilcev. Metoda temelji na trajanju prehodne spremembe pH, ki nastane pri zaporednem črpanju pufrov z enakim pH, a različno ionsko močjo, skozi IEX-kromatografsko kolono in je neposredno merilo za ionsko kapaciteto kromatografskega nosilca. Metoda je uporabna za vse IEX-kromatografske kolone ne glede na njihovo obliko, volumen ali strukturo nosilca. Občutljivost in robustnost metode prilagajamo z izbiro vrste pufra, njegovega pH, koncentracije in pri šibkih IEX tudi temperature. S pomočjo nove metode in drugih že razvitih metod za karakterizacijo monolitov smo optimirali anionsko izmenjevalne (AEX) monolite in proučili procesne pogoje čiščenja velikih plazmidov (pDNA) do velikosti 93,9 kbp. Poleg velikosti por in množine AEX-skupin na površini monolita (ionske kapacitete nosilca) smo optimirali tudi sestavo vezavnega pufra. Presenetljivo je dinamična kapaciteta za vezavo velike pDNA močno naraščala s povečevanjem koncentracije NaCl v vezavnem pufru in ionsko kapaciteto nosilca. Na ločbo polinukleotidnih molekul na AEX-monolitih je vplivala predvsem ionska kapaciteta nosilca. Na osnovi dobljenih rezultatov je bil razvit proces čiščenja velikih pDNA na šibkih AEX-monolitih z različno ionsko kapaciteto.

Characterization and Optimization of Ion Exchange Chromatographic Monoliths for Plasmid Isolation

NIKA LENDEROKRAJNC, BIA Separations, d. o. o.

Supervisor: Aleš Podgornik, BIA Separations, d. o. o.

Co-supervisor: Boris Pihlar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

A new non-destructive method for characterization of ion exchange (IEX) chromatographic supports was developed. The method is based on the duration of transient pH change, formed by consecutive pumping of two buffer solutions having the same pH but differing in ionic strength through the IEX chromatographic column, which was shown to be directly proportional to the ionic capacity of the chromatographic support. The method is suitable for IEX chromatographic columns of any size, shape or structure. Sensitivity and robustness of the method can be adjusted by optimizing the buffer's type, pH, concentration and in the case of weak IEX temperature. Using this method together with other methods for characterization of monoliths, the optimization of anion exchange (AEX) monoliths and process conditions for purification of large plasmids with the size up to 93.9 kbp was performed. Besides the pore size and the amount of AEX groups on the monolith surface (ionic capacity) also the binding buffer composition was optimized. Surprisingly, the dynamic binding capacity for large plasmids increased significantly with increasing the NaCl concentration in binding buffer and the ionic capacity of the monolith. The ionic capacity also strongly influenced the polynucleotide molecule separation. Using these results the purification process of large pDNA was presented based on weak AEX monoliths with different ionic capacity.

Vezava FDDNP in kurkumina na agrete PrP^{Sc} in hiperfosforiliranega proteina tau pri izbranih nevrodegenerativnih boleznih

NINA MOHORKO, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Mara Bresjanac, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Grega Repovš, Filozofska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Delo obravnava vezavo kurkumina in FDDNP na patološko spremenjeni tau pri taupatijah in patološke oblike prionskega proteina (PrP^{Sc}) pri prionskih boleznih.

Nevrodegenerativne bolezni so progresivne bolezni osrednjega živčevja, kjer poleg odmiranja za posamezno bolezen značilnih skupin nevronov opazimo odlaganje patološko spremenjenih proteinov: hiperfosforiliranega tau pri taupatijah in PrP^{Sc} pri prionskih boleznih. Zdravil zanje še nimamo, tudi diagnostična sredstva so še v razvoju. Nekatere majhne molekule se lahko specifično vežejo v strukturo patoloških proteinov. Če imajo fluoroorne značilnosti, jih lahko uporabimo kot molekulske označevalce. Primera takih molekul sta kurkumin, naravna sestavina začimbe kurkume z močnimi protivnetnimi in protioksidativnimi lastnostmi, in FDDNP, sintetiziran kot označevalec za PET. Preverili smo sposobnost vezave kurkumina na hiperfosforilirani tau pri taupatijah, ki še ni bila opisana v literaturi, in njegovo vezavo na PrP^{Sc} v vzorcih prionskih boleznih, ki pa še ni bila natančno statistično analizirana. Prav tako smo preverili vezavo FDDNP na hiperfosforilirani tau in PrP^{Sc} ter jo primerjali z vezavo standardnih označevalcev. Obe molekuli sta se pokazali kot dobra označevalca patološko spremenjenega tau pri taupatijah in PrP^{Sc} pri prionskih boleznih.

Binding of FDDNP and Curcumin on the Aggregates of PrP^{Sc} and Hyperphosphorilated Protein Tau on Chosen Neurodegenerative Diseases

NINA MOHORKO, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: Mara Bresjanac, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Grega Repovš, Faculty of Arts, University of Ljubljana

The present work describes the labelling of hyperphosphorilated tau in tauopathies and pathological prion protein (PrP^{Sc}) in prion diseases with curcumin and FDDNP.

Neurodegenerative diseases are progressive disorders of the central nervous system, where we find pathologic protein aggregation. In tauopathies, hyperphosphorilated tau is aggregating, whereas in prion diseases, PrP^{Sc} aggregates. No effective medicines are available for the neurodegenerative diseases, yet, and the diagnostic methods are still being developed. Some small molecules are able to bind specifically into the structure of the aggregates of pathologically deposited proteins. The examples of such molecules are curcumin, a natural substance from the spice turmeric with potent antiinflammatory and antioxidant characteristics, and FDDNP, a molecule, synthesised as a PET probe. The binding of curcumin to hyperphosphorilated tau in tauopathies which has not been described, yet, and its binding on PrP^{Sc} in prion diseases, that has not been statistically verified, were examined. Further, the binding of FDDNP to hyperphosphorilated tau and PrP^{Sc} was examined and confronted with standard probes. Both, curcumin and FDDNP proved to be good molecular probes for hyperphosphorilated tau in tauopathies and PrP^{Sc} in prion diseases.

Dejavniki virulence uroseptičnih sevov *Escherichia coli* ter možnost uporabe kolicinov – novih protimikrobnih snovi v boju proti okužbam urinarnega trakta

MATIJA RIJAVEC, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Darja Žgur-Bertok, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Najpogosteji povzročitelj okužb urinarnega trakta so uropatogeni sevi *Escherichia coli*, ki lahko vdrejo v krvni obtok in povzročajo sepso. V našem delu smo se osredotočili na proučevanje glavnih dejavnikov virulence (adhezinov, toksinov, USP, sistemov privzema železa, t. i. sideroforjev, kapsul in povečane odpornosti proti serumu), replikacijskih regij plazmidov, sposobnosti tvorbe biofilma in kolicinov pri 105 uroseptičnih izolatih *E. coli*. Izolati, ki so bili uvrščeni v filogenetsko skupino B2, so imeli bistveno več dejavnikov virulence kot izolati iz ostalih skupin. Poleg tega so bili manj odporni proti antibiotikoma ciprofloxacinu ter kombinaciji trimetoprima in sulfametoksazola. Izolati, odporni proti temu dvema antibiotikoma, so bili tudi pogosteje vzrok za bolnišnične okužbe. Pri imunsko neoslabljenih bolnikih so bili pogostejši izolati, ki so imeli več dejavnikov virulence. Več kot polovica preiskovanih izolatov je bila sposobna tvorbe biofilma. Pojav in širjenje odpornosti proti antibiotikom postaja vedno večja težava. Ena izmed možnih alternativ so kolicini. Kolicini E6, E7, K in M so učinkovito inhibirali rast uroseptičnih izolatov *E. coli* tako na trdnem kot v tekočem gojišču. Z ustrezno kombinacijo kolicinov je bilo mogoče preprečiti rast kar 98 % preiskovanih izolatov. Ob izpostavljanju uroseptičnih izolatov *E. coli* v tekočem gojišču kolicinom smo že po 24 urah gojenja opazili pojav odpornih izolatov.

Virulence Factors of Uroseptic *Escherichia coli* Strains and Possible Use of Colicins as New Antimicrobials Against Urinary Tract Infections

MATIJA RIJAVEC, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Darja Žgur-Bertok, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

The most common cause of urinary tract infections are uropathogenic *Escherichia coli*, which can also enter the bloodstream and cause sepsis. In our work we focused on major virulence factors (adhesins, toxins, USP, systems of iron uptake, so called siderophores, capsule and serum resistance), plasmid replication regions, ability to form biofilm and colicins in 105 uroseptic *E. coli* isolates. Isolates that belonged to the phylogenetic group B2 had a much higher virulence potential than isolates from other groups. In addition, they had lower levels of resistance to the antibiotics ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Isolates resistant to those antibiotics were associated with nosocomial infections. Isolates from noncompromised patients had greater virulence potential. More than half of the investigated isolates were capable of biofilm production. The appearance and spread of antimicrobial resistance is an increasing problem. One of the possibilities receiving renewed attention are colicins E6, E7, K and M. Using appropriate colicin combinations it was possible to inhibit growth of 98% of the treated isolates. However, when uroseptic *E. coli* isolates were exposed in liquid medium to colicins, emergence of resistant isolates was observed already after 24 hours of cultivation.

Indukcija tolerogenih dendritičnih celic in regulatornih limfocitov T *in vitro*

URBAN ŠVAJGER, Zavod RS za transfuzijsko medicino
Mentor: Matjaž Jeras, Zavod RS za transfuzijsko medicino

Pomembnost dendritičnih celic (DC) v imunologiji se je v zadnjih letih dodatno povečala zaradi ugotovitev, da DC poleg vzpostavitve močnih antigensko (Ag) specifičnih odzivov celic T pomembno prispevajo tudi k vzpostavitvi in ohranjanju imunske tolerance. Nezrele in tolerogene DC ob predstavljivosti Ag-naivnim limfocitom T namesto nastanka efektorskih celic vrst Th1 in Th2 izzovejo nastanek regulatornih limfocitov T, ki nato prek različnih mehanizmov prispevajo k vzpostavitvi in vzdrževanju periferne tolerance. Natančno razumevanje mehanizmov, ki narekujejo nastanek oziroma omogočajo pridobitev tolerogenih DC in regulatornih limfocitov v laboratorijskih pogojih, predstavlja temelj izrabe teh izjemno potencialnih celičnih orodij za prihodnjo uporabo pri celičnih terapijah imunske pogojenih bolezni, kot so avtoimunske bolezni in rak. Pri tem smo odkrili izjemen potencial niflumske kisline (NFA) in resveratrola, ki sta že v μM -količinah zavrla odziv DC na zorenje in povzročila njihov tolerogen fenotip. V nadaljevanju smo raziskave posvetili podrobnejšim mehanizmom, ki narekujejo delovanje DC. Pri tem smo se osredotočili na funkcijo katepsina X za optimalno aktivacijsko stanje DC, vezavo površinskega lektina DC SIGN s specifičnimi ligandi med diferenciacijo DC ter mehanizme, ki omogočajo nepričakovano imunosupresivno delovanje velikih odmerkov IFN- γ .

Induction of Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory T Lymphocytes *in vitro*

URBAN ŠVAJGER, Blood transfusion centre of Slovenia
Supervisor: Matjaž Jeras, Blood transfusion centre of Slovenia

The importance of dendritic cells (DCs) in immunology has gained increased recognition during the last years due to discoveries, that besides inducing potent Ag specific effector T cell responses, DCs also largely contribute to the induction and maintainance of immune tolerance. Whilst presenting Ag to naive T cells, immature and tolerogenic DCs orchestrate the generation of regulatory T cells instead of Th1 or Th2 effector T cells, which then further contribute to peripheral tolerance maintainance. Precise understanding of mechanisms, that contribute to generation of tolerogenic DCs and regulatory lymphocytes in laboratory conditions, represent the basis for the use of such potential cellular tools in terms of future cell therapy use for treating immune-mediated conditions like autoimmune diseases and cancer. In this context we have discovered an outstanding potential of niflumic acid (NFA) and resveratrol, which were able to inhibit the maturation of DCs and caused their tolerogenic phenotype in μM concentrations. In the next step, we have focused our research on specific mechanisms that orchestrate the function of DCs. In this manner, we have examined the role of cathepsin X for optimal DC activation, ligation of surface lectin DC SIGN during DC differentiation, as well as mechanisms that allow the unexpected immunosuppressive role of high dose IFN- γ .

Uporaba računalniško podprte procesne tehnike za integracijo industrijskih procesov

HELA TOKOŠ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehniko, Univerza v Mariboru

Mentorka: Zorka Novak Pintarič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehniko, Univerza v Mariboru

Procesna integracija je učinkovito orodje, ki podjetjem omogoča, da proizvodnjo prilagodijo načelom trajnostnega razvoja, saj lahko tako zmanjšajo porabo sveže vode, toplote in električne energije. Uporaba v realnih industrijskih primerih pogosto zahteva različne modifikacije modelov, ki jih moramo prilagoditi dejanskemu stanju v proizvodnji, da bi dobili uporabne rezultate za podjetje. V doktorski disertaciji smo se osredotočili na zmanjšanje porabe treh najpomembnejših virov, tj. vode, toplote in električne energije, ter na kvantitativno oceno trajnostnih kazalcev. Pri integraciji vodnega sistema smo osnovni model iz literature nadgradili, tako da omogoča neposredno uporabo vode med šaržnimi in kontinuirnimi procesi, namestitve zbiralnikov za uporabo vode v poznejših obdobjih in namestitve šaržnih ali kontinuirnih čistilnih naprav na mestu nastajanja odpadnih tokov. Za integracijo vodnih sistemov več obratov smo razvili večnivojski pristop, ki temelji na uporabi razvitih modelov. Pri toplotni integraciji šaržnih procesov smo v časovni načrt splošnega modela vključili tudi procese brez temperaturnih sprememb, omogočili cepljenje tokov in definirali ekonomsko namensko funkcijo. Za industrijski primer smo razvili poenostavljen matematični model za študijo možnosti različnih poligeneracijskih sistemov in izbor optimalnega. Analiza trajnostnih kazalcev in sestavljenega kazalca trajnostnega razvoja je potrdila pozitiven vpliv procesne integracije na trajnostni razvoj podjetja.

Computer Aided Process Engineering for Integration of Industrial Processes

HELA TOKOŠ, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: Zorka Novak Pintarič, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Process integration is an efficient tool which enables the reduction of freshwater as well as heat and electricity consumption in existing plants according to the principles of sustainable development. However, mathematical models often need several modifications in large-scale industrial applications in order to suit the specific needs of industrial environment and to generate useful results for the company. The thesis is focused on reduction of three most important resources, i.e. water, heat and electricity, and evaluation of the sustainability indices as well. In case of water network integration the basic model selected from the literature is modified to enable direct water re-use between continuous and batch processes, installation of storage tanks for water re-use in subsequent time intervals, and installation of local wastewater treatment units at the production site. For integration of the total water network a sequential multilevel strategy was proposed based on the developed models. In case of heat integration of batch processes the scheduling of the basic model is extended with processes without temperature changes and possibility of streams splitting, in addition an economic objective function was defined. For industrial case study a simplified mathematical model was developed to perform feasibility studies of several polygeneration systems and select the optimal one. Analysis of the sustainability indicators and the composite index of sustainable development confirmed the positive impact of process integration on the sustainable development of the company.

Raziskava stabilnosti enalaprilijevega maleata in termodinamska protolitskih ravnotežij te učinkovine v vodnih raztopinah

REBEKA TOPORIŠIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Jurij Lah, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

S stresnim preizkušanjem stabilnosti zdravilne učinkovine enalaprilijevega maleata (EM) v trdnem stanju in v raztopini smo proučevali kemijsko in fizikalno stabilnost omenjene učinkovine. Pri preizkušanju kemijske stabilnosti EM smo z analizno metodo HPLC določali razgradne nečistoče EM, ki so nastale pod različnimi stresnimi pogoji. Na dobljenih HPLC-kromatogramih je bilo eluiranih več razgradnih produktov, strukture nekaterih eluiranih vrhov so že znane, nekaj pa jih do sedaj še ni bilo ovrednotenih. Identifikacijo neznanih razgradnih produktov enalaprila po pospešenem testiranju stabilnosti smo izvedli z analizno tehniko UPLC-MSⁿ Orbitrap. Iz rezultatov analiz masne spektrometrije je razvidno, da štiri do sedaj še neidentificirane nečistoče predstavljajo oksidacijske produkte, ena pa je bila identificirana kot nova razgradna nečistoča enalaprila.

Pri preizkušanju fizikalne stabilnosti EM smo uporabili metodo izotermne titracijske kalorimetrije (ITC). Analizirali smo neobremenjen vzorec EM in vzorce, izpostavljeni površani temperaturi. Rezultati analiz so pokazali, da lahko ITC uporabimo kot komplementarno metodo HPLC pri določanju stopnje razgradnje EM. Omogoča nam tudi pridobivanje precej bolj zapletenih, do sedaj še neraziskanih termodinamskih značilnosti EM za lažje razumevanje obnašanja raztopin EM na molekularnem nivoju. Z modelsko analizo titracijskih krivulj, merjenih pri višjih temperaturah, smo določili termodinamske parametre protonacije/deprotonacije EM v vodi. Določitev termodinamičnih lastnosti raztopin EM je omogočila napoved prisotnosti različnih zvrsti v odvisnosti od temperature, koncentracije EM in pH, kar je pomembno za razumevanje njegovega biološkega učinkovanja.

Stability of Enalapril Maleat and Thermodynamics of Protolitic Equilibria of this Substance in Aqueous Solutions

REBEKA TOPORIŠIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Jurij Lah, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Stress stability testing and force degradation were used to determine the chemical and physical stability of enalapril maleate (EM) and to find a drug degradation pathway. The degradation impurities, formed under different stress conditions, were investigated by HPLC. The validated method was used to determine the degradation impurities in samples after stress stability testing and force degradation of EM. HPLC analysis showed a number of degradation impurities of which several have already been determined, but some of them were not yet characterized. UPLC-MSⁿ, Orbitrap has been used to identify new degradation impurities of EM after force degradation. It was found that four new impurities are oxidation products and one was identified as a new degradation impurity.

When testing physical stability of EM isothermal titration calorimetry (ITC) has been used. Solutions of EM kept at room temperature was titrated and results were compared to the titration curves obtained from titration of solutions of EM which were exposed to higher temperature for a different period of time. Results have shown that ITC can be used as a complementary method to HPLC when determining the level of degradation of EM. At the same time the results have allowed us to obtain not yet investigated thermodynamic properties of EM and thus improving our understanding of behavior of EM in solution on molecular level. The obtained thermodynamic properties of EM in solution enabled us to predict temperature, concentration and pH dependence of concentrations of different EM species which may improve our molecular understanding of biological activity of EM.

Zlivanje celic *in vitro* z elektropermeabilizacijo

KATJA TRONTELJ, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Damijan Miklavčič, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Vladka Čurin Šerbec, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Zlivanje celic je metoda, s katero dobimo zlite celice in njihove produkte, ki so uporabni v biotehnologiji in medicini. Elektrofuzija je najpogosteje zastopana metoda za indukcijo zlivanja. Celice se zlivajo z destabilizacijo membrane in sočasnim zagotavljanjem medsebojnega stika dveh celic. Uporabo tako dobljenih hibridnih celic določajo v glavnem lastnosti starševskih celic, v veliki meri pa je odvisna od učinkovitosti zlivanja. V nalogi smo za različne vrste celic proučili nekatere od mnogih dejavnikov, ki vplivajo na elektrofuzijo (parametri električnega polja in ozmolarnost medija) ter dognanja uporabili v eksperimentih priprave hibridomov. Da bi izboljšali metode, smo izdelali novo koničasto komoro za elektroporacijo celic v suspenziji, ki omogoča dovajanje pulzov v različnih smereh. Izpeljali smo tudi metodo za vzpostavljanje stika med celicami (ti. modificirano metodo pritrjevanja) in jo uporabili za zlivanje mielomskeh fizijskih partnerjev s človeškimi limfociti B. V teh poskusih smo uspeli pripraviti mišje-humane heterohibridome. Učinkovitost zlivanja smo detektirali z metodo dvojnega obarvanja s fluorescentnimi barvili in jo primerjali z metodo štetja klonov pri običajnem postopku priprave hibridomov.

Cell Fusion *In vitro* by Means of Electroporation

KATJA TRONTELJ, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Damijan Miklavčič, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: Vladka Čurin Šerbec, Blood Transfusion Centre of Slovenia

Cell fusion is a method investigated intensively for its products are used for different purposes in biotechnology and medicine. Electrofusion is a common method for induction of cell fusion, where cells that are destabilized by means of high voltage electric pulses and are at the same time in close contact, fuse. The use of the hybrid cells is defined by the properties of the parental cells; however, it is limited by the yield of the method for cell fusion. In this work some of the many parameters that influence cell fusion were studied for different cells (electric field parameters and medium osmolarity) and results were used in the experiments for hybridoma production. To improve the method new pipette tip chamber was designed for electroporation of cells in suspension with electric pulses in different directions. A contact method (modified adherence method) was developed and used for fusing myeloma fusion partner cells and human lymphoblasts B. In this experiments mouse – human heterohybridoma were produced. Fusion yield was detected with double staining method and comparison between double staining method and clone counting method in production of hybridoma was made.

Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi

BERNARDA BEVC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Aleš Obreza, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Stopnja razvoja strokovne terminologije kaže na razvitost stroke in jezika, ki omogoča tvorbo tudi najbolj zahtevnih znanstvenih izrazov. Strokovno utemeljeno, enotno, nedvoumno in uporabno poimenovanje je zlasti znotraj farmacevtske stroke zelo pomembno. Strokovnjaki z različnih področij farmacije bi pri svojem delu morali uporabljati enotno veljavno strokovno terminologijo. Tako bi zmanjšali ali celo odpravili nevarnost napak, ki se lahko pojavi pri zamenjavah. Številni podobni izrazi in sopomenke delujejo nepregledno, lahko celo zavajajoče.

Slovenski farmacevtski terminološki slovar, ki je v fazi nastajanja, bo pokril vsa bistvena področja farmacije, med njimi tudi področje pomožnih snovi.

Slovar pomožnih snovi temelji na veljavni Evropski farmakopeji in Slovenskem dodatku k Evropski farmakopeji Formularium Slovenicum. Vsebuje veljavno slovensko, latinsko in angleško ime pomožne snovi ter ustrezne sopomenke v posameznem jeziku, poleg njih pa tudi kemijsko naravo spojin in opis fizikalno-kemijskih lastnosti. Vključuje podatke o vlogi pomožne snovi v zdravilu oziroma njeni uporabi v tehnoloških procesih. Podatki so bili pridobljeni iz že navedene farmakopeje in slovenskih dodatkov ter druge verodostojne farmacevtske literature in nekaterih spletnih virov. Tako se je oblikoval nabor, ki uporabniku ponuja najpomembnejše informacije o določeni pomožni snovi, mu pomaga odpraviti dvome in nejasnosti ter osvetliti pot do rešitve strokovnih težav.

Slovenian Pharmaceutical Terminology of Excipients

BERNARDA BEVC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Aleš Obreza, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Level of professional terminology development shows the ability of language to form even the most demanding scientific expressions. Expertly substantiated, uniform, unequivocal and useful nomenclature is especially important in pharmaceutical science. Experts from different fields of pharmacy should use an uniform and valid professional terminology. In this way they could reduce or even eliminate the possibility of mistakes that can be caused by switching words. Many similar expressions and synonyms seem unclear, to the point of being misleading.

Slovenian pharmaceutical terminological dictionary, which is in the process of being completed, is going to cover all the essential fields of pharmacy, among them the field of excipients.

Based on the valid European Pharmacopoeia and Slovenian Addendum to the European Pharmacopoeia (Formularium Slovenicum) a dictionary of excipients has been created. It contains valid Slovene, Latin and English names and respective synonyms, chemical nature of compounds and description of physicochemical properties. It includes data about the role of individual excipient in medicaments and/or the usage in technological processes. Data has been acquired from the already quoted pharmacopoeia and Formularium Slovenicum as well as from other credible pharmaceutical literature and some internet sources. In this way a system has been formed that provides the user with the most relevant information about a specific excipient, helps clear out any doubts or uncertainties and eases the resolution to professional problems.

Študij vpliva parametrov kristalizacije na velikost delcev produkta

MONIKA BREZOVAR, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Radovan Stanislav Pejovnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Alen Kljajić, Krka, d. d., Novo mesto

V diplomskem delu smo podrobneje proučevali šaržno kristalizacijo molekule topljenca (topljenec A) iz topila (etanol) s prevladajočim mehanizmom spontane nukleacije. Diplomsko delo obsega študij krivulje topnosti molekule v izbranem topilu, ocene možnih izkoristkov kristalizacijskih procesov in preverjanje nekaterih vplivov procesnih parametrov kristalizacije na velikost primarnih delcev topljenca ter določitev območja povprečnih velikosti primarnih delcev produkta. Prav tako smo analizirali možnostobarjanja topljenca A z dodatkom ustreznega antitopila (vode).

S spremenjanjem hitrosti ohlajanja, hitrosti dodajanja antitopila (vode) in hitrosti mešanja smo pokazali na možnost kontrolirane in ponovljive priprave primarnih delcev topljenca želenih velikosti znotraj velikostnega območja med 10 in 30 µm. Z eksperimenti smo potrdili izračunane izkoristke kristalizacijskih procesov. Uvedli smo kristalizacijo sekundarnega produkta, ki omogoča več kot 95-odstotni skupni izkoristek.

Influence of Process Parameters on Particle Size of Product

MONIKA BREZOVAR, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Radovan Stanislav Pejovnik, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Alen Kljajić, Krka, d. d., Novo mesto

The research work was focused on batch crystallization process of solute A using ethanol as crystallization media and without any seeds of solute A added (spontaneous nucleation). The solubility and nucleation curve of solute A in ethanol was determined experimentally. Data were used to calculate the theoretical yields of crystallization process. Water as anti-solvent media for the secondary crystallization of solute A from ethanol was also used. Influence of different process parameters on the average size of primary particles formed was studied.

The influence of the cooling rate, the flow of water added to crystallization media (use of anti-solvent) and the speed of the mixer used. The controlled crystallization processes were performed and practical yields defined for the efficient preparation of solute A with defined average size of primary particles, between 10 and 30 µm. For the efficient use of developed crystallization process the recovery of secondary product was also applied and consequently 95% overall yield was achieved.

Optimizacija izdelave disperzije nanodelcev TiO₂ in ugotavljanje varnosti na celični liniji keratinocitov

TEJA BREZOVAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Julijana Kristl**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Petra Kocbek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Nanodelci (ND) TiO₂ se pogosto uporabljam kot pigment ali UV-filter v pripravkih za dermalno uporabo, tako da izpostavitev tem ND pogosto traja dalj časa. Podatki o njihovi varnosti so še zelo pomanjkljivi. S kombinacijo 10-minutnega soniciranja v ultrazvočni kadički in 10-minutnega pulznega soniciranja v ledeni kopeli z uporabo UZ-sonde nam je uspelo pripraviti disperzijo ND TiO₂ z najmanjšo povprečno velikostjo delcev (pribl. 500 nm), kjer jih je bila večina v obliki agregatov, ki so bili približno 20-krat večji od deklarirane velikosti. V nadaljevanju smo določili koncentracije ND, ki so se po kraji izpostavitev (do 72 ur) izkazale za »varne«, sledila pa je trimesečna izpostavitev. Ugotovili smo, da po tem času ND TiO₂ tudi v največji testirani koncentraciji (10 µg/ml) niso citotoksični in ne povzročajo signifikantnih razlik v morfološki celic ter ne sprožijo znatno pogosteje celične smrti, ne vodijo do povečanega nastajanja radikalov v celicah, niti povečanja mitochondrialne aktivnosti. Je pa pri koncentraciji 10 µg/ml prišlo do signifikantnega zmanjšanja števila celic v primerjavi s kontrolo, kar nas je pripeljalo do sklepa o citostatičnem delovanju. Potrdili smo vstop ND TiO₂ v celice, kjer jih najdemo v obliki agregatov, predvsem v endosomih celic. Prisotnost ND TiO₂ v kulturi je vodila v povečanje števila nanotubularnih struktur, ki se raztezajo med celicami, kar je za keratinocite še ne opisana ugotovitev, ki pa lahko nakazuje transformacijo celic iz normalnih v rakave.

Optimization of TiO₂ Nanoparticles Dispersion Preparation and Assessment of its Safety on Keratinocyte Cell Line

TEJA BREZOVAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Julijana Kristl**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-Supervisor: **Petra Kocbek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Nanoparticles of TiO₂ are often used as a dye or UV-filter in preparations for dermal use and dermal exposure often lasts for a long time, but information regarding its safety is deficient. With sonification in an ultrasonic bath (10 min) and pulse sonication on ice bath using an ultrasonic probe (10 min) we were able to produce dispersion of NPs with the smallest average particle size (approx. 500 nm), most of which were present as aggregates, 20-times bigger than the size declared. In addition, we determine the concentration which, after a short exposure time (up to 72 h) proved to be "safe", followed by the three-month *in vitro* exposure. It was shown that NPs of TiO₂ in the highest concentration tested (10 mg/mL) after three months exposure are not cytotoxic and do not cause significant differences in the cell morphology and do not trigger a significantly increased cell death. NPs did not significantly increased intracellular formation of free radicals, nor an increase in mitochondrial activity. But at a concentration of 10 mg/mL occurred significant reduction in cell number compared with the control, which led us to the conclusion of the cytostatic action of NPs. We confirmed the entry of NPs into the cells, where they are present in the form of aggregates, mainly located in the endosomes. The presence of NPs in culture leads to increased number of nanotubular structures that extend between the cells, which has not been described for keratinocytes previously, but may indicate the transformation of normal cells into cancer cells.

Vpliv procesnih spremenljivk na velikost mikrodelcev in izkoristek procesa s tehnologijo razprševanja s strjevanjem

MARKO HANŽELIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Stanko Srčič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Ilija Ilić, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Osnovni namen naloge je izdelovanje mikrodelcev s procesom tehnologije razprševanja s strjevanjem (spray-congealing spray-chilling spray-cooling). Glavni poudarek je bil na proučevanju procesnih parametrov za nadzorovanje velikosti in optimizaciji izkoristka za industrijsko uporabo. Izdelati smo želeli relativno velike mikrodelce z uniformno določenim premerom med 125 in 500 mikrometri s čim večjim izkoristkom izdelave. Veliki delci so zaželeni zaradi boljših pretočnih lastnosti in lažjega formuliranja v končno farmacevtsko obliko, npr. tableto ali kapsulo. Pokazali smo, da je mogoče uspešno razprševati relativno velike vzorce (tudi do 100 gramov) Gelucire® 50/13 ter izdelati mikrodelce z velikim, do 95-odstotnim, skupnim izkoristkom. Ugotovili smo, da se velikost mikrodelcev s povečevanjem hitrosti dovajanja taline povečuje. Pri veliki hitrosti dovajanja taline so mikrodelci sicer večji, vendar je lepljenje na steno procesne komore bolj izraženo, zato je skupni izkoristek izdelave manjši. Z odvijanjem kapice šobe zožamo kot razprševalnega stožca, kar podaljša pot kapljic, izboljša skupni izkoristek in zoži širino porazdelitve izdelanih mikrodelcev, kar je zaželeno. Z zniževanjem tlaka razprševanja se poveča povprečni premer mikrodelcev. Ugotovimo lahko, da na velikost mikrodelcev in izkoristke procesa razprševanja s strjevanjem bistveno vplivata predvsem kot in tlak razprševanja, še posebej slednji se zdi najpomembnejši dejavnik procesa, manj izrazito vlogo pri optimizaciji pa ima hitrost pretoka taline.

Influence of Process Variables on Microparticle Size and Process Yield Using Spray Congealing Technology

MARKO HANŽELIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Stanko Srčič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-Supervisor: Ilija Ilić, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The intention of this work was to develop a method for preparation of microparticles using spray congealing (also spray-chilling, spray-cooling) technology. The basic objective of this work was to investigate process parameters that control the microparticle size and optimization of process yield for large-scale production. The desired microparticle size was from 125 to 500 µm in diameter and the preparation process should have high production yield. Large microparticles are preferred due to better flowability and more convenient formulation into a dosage form, such as tablet or capsule. Spray congealing technology enabled the production of microparticles with diameters from 125 to 500 µm with high total yield up to 95 percent. Microparticle size increased with increased liquid feed rate. Although the microparticles were bigger at higher liquid feed rates, the adherence to the process chamber wall was more pronounced at these conditions, which lowered total process yield. Width of spray cone was lowered by unscrewing the nozzle cap, which lead to increased fly path of molten droplets, an increase of total process yield and a narrower microparticle size distribution, which is preferred. Lower atomization pressure increased the average microparticle size. It can be concluded that microparticle size and process yields using spray congealing process are mainly influenced by spray cone width and atomization pressure, especially the latter seems to be the most important process parameter during spray congealing, while liquid feed rate had a less pronounced influence on the process.

Vrednotenje obnašanja gastrorezistentnih pelet s testi sproščanja in stereomikroskopijo

ALENKA JAKLIČ in JASNA JEREV, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Aleš Mrhar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Testiranje sproščanja *in vitro* je eden izmed najpomembnejših načinov biofarmacevtskega vrednotenja farmacevtskih oblik. Z omenjenim testom določimo kinetiko in profil sproščanja. Sočasno s procesom sproščanja potekajo tudi drugi procesi, ki jih lahko ovrednotimo s stereomikroskopsko tehniko. Pri tem se osredotočimo predvsem na spremembe na površini farmacevtskih oblik, raztopljanje, razpad obloge in nastanek difuzne plasti. Z omenjenima tehnikama smo vrednotili vpliv pH in pufrske kapacitete na obnašanje gastrorezistentnih pelet, v katerih je bila vgrajena učinkovina paracetamol. Oba parametra sta kazala vpliv na procese, saj sta jih ob povečanih vrednostih pospešila. Na osnovi rezultatov lahko rečemo, da sta metodi, s katerima smo oblike proučevali, komplementarni. Z uporabo obeh pridobimo natančnejši in obširnejši vpogled v procese, ki tečejo ob izpostavitvi gastrorezistentnih oblik umetnemu črevesnemu mediju, kot samo z uporabo testiranja sproščanja.

Evaluation of the Behaviour of Enteric Coated Pellets by Dissolution/Release Testing and Stereomicroscopy

ALENKA JAKLIČ and JASNA JEREV, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Aleš Mrhar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Dissolution/release testing is the most important biopharmaceutical test for the evaluation of dosage forms. The method determines kinetics of dissolution and drug release profile. However, simultaneously with release, also other processes take place, such as changes on dosage form surface, disintegration and development of diffusion layer. These can be evaluated by the stereomicroscopic technique. In the scope of present work, paracetamol was incorporated into enteric-coated pellets and all processes mentioned above were evaluated under simulated conditions of gastro-intestinal tract. pH and buffer capacity were determined to have a great impact on behaviour of enteric-coated pellets, whether examined by release testing or stereomicroscopy. By adopting both methods we get more precise and broader insight into the processes that occur when enteric-coated dosage form is exposed to artificial intestinal medium, then by applying release testing only. The results obtained are complementary.

[2+2] Cikloadicije (dimetilamino)enaminonov na dimetyl acetilendikarboksilat

TANJA KOLEŠA, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Branko Stanovnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Proučevali smo [2+2] cikloadicije med enaminoni in dimetyl acetilendikarboksilatom (DMAD). Najprej smo pripravili vrsto izhodnih (dimetilamino)methylidenskih spojin. Novim smo z rentgensko analizo monokristalov in/ali NMR-spektroskopskimi metodami določili konfiguracijo okoli dvojne vezi. Karbonilna in dimetilaminska skupina sta ob dvojni vezi v vseh primerih orientirani *trans*. Pri reakcijah enaminov z DMAD so regioselektivno nastali (2E,3E)-2-[(dimetilamino)methylidene]-3-(substituirani) sukcinati ter dva 4-(dimetilamino)buta-1,3-dien-1,2,3-trikarboksilata. Strukture smo določili z 2D-HMBC NMR-spektroskopijo.

Pri reakciji 1,3-dimetilbarbiturne kisline z DMFDA je poleg kondenzacije amid acetala potekla še izmenjava dimetilaminske skupine z novo molekulo 1,3-dimetilbarbiturne kisline. Nastal je 5-((1,3-dimetil-2,4,6-trioxohexahydropirimidin-5-il)methilen)-1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trion. Tudi ta je reagiral z DMAD, pri čemer je nastal (Z)-2,3-(disubstituiran)sukcinatni derivat.

Pri reakciji DMAD z (dimetilamino)methylidenskim derivatom 2-acetyl-2-thiazolina smo poleg pričakovanega manjšinskega produkta [2+2] cikloadicije/retro-elektrrociklizacije izolirali tudi biciklični (*E*)-dimethyl 6-(2-(dimetilamino)vinil)-5-okso-2,3,5,7a-tetrahydropyrrolo[2,1-b]thiazole-7,7a-dikarboksilat. Analogen biciklični produkt je nastal tudi neposredno iz 2-acetyl-2-thiazolina. Pri reakciji DMAD z nenasičenim (dimetilamino)methylidenskim analogom 2-acetyl-2-thiazola pa je nastal le pričakovani (2E,3E)-2-[(dimetilamino)methylidene]-3-(substituiran)sukcinatni derivat.

[2+2] Cycloadditions of (Dimethylamino)enaminones to Dimethyl Acetylene-dicarboxylate

TANJA KOLEŠA, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Branko Stanovnik, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

We were studying [2+2] cycloadditions of enaminones to dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD). First, the starting (dimethylamino)methylidene compounds were prepared. The configuration around the double bond in the new compounds was determined using single crystal X-ray analysis and/or NMR spectroscopic methods. In all cases, the carbonyl and the dimethylamino groups are positioned *trans* around the C=C double bond. Then, (dimethylamino)methylidene derivatives were reacted with DMAD, thereby yielding regioselectively (2E,3E)-2-[(dimethylamino)methylidene]-3-(substituted)succinates and 4-(dimethylamino)buta-1,3-diene-1,2,3-tricarboxylates. The structures were confirmed by 2D-HMBC NMR spectroscopy.

Reaction of 1,3-dimethylbarbituric acid with DMFDA gave the corresponding condensation product, followed by *in situ* displacement of its dimethylamino group by unreacted 1,3-dimethylbarbituric acid to yield 5-((1,3-dimethyl-2,4,6-trioxohexahydropirimidin-5-yl)methylene)-1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, which also reacted with DMAD and gave the (Z)-2,3-(disubstituted)succinate.

Reaction of DMAD with (dimethylamino)methylidene derivative of 2-acetyl-2-thiazoline gave the expected minor [2+2] cycloaddition/retro-electrocyclization product and the major bicyclic compound (*E*)-dimethyl 6-(2-(dimethylamino)vinyl)-5-oxo-2,3,5,7a-tetrahydropyrrolo[2,1-b]thiazole-7,7a-dicarboxylate. Analogous bicyclic compound was also obtained directly from 2-acetyl-2-thiazoline and DMAD as the sole reaction product. However, the reaction of DMAD with the unsaturated (dimethylamino)methylidene derivative, prepared from 2-acetyl-thiazole, furnished only (2E,3E)-2-[(dimethylamino)methylidene]-3-(substituted)succinate.

Študij kompleksov med kationsko učinkovino in polianionskimi karagenani za doseganje pritejenega sproščanja

PETRA KOS, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Ksenija Kogej**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Saša Baumgartner**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Proučevali smo interakcije med λ -, ι - in κ -karagenani ter modelno kationsko učinkovino doksazosinijevim mesilatom (DM). S potenciometrično metodo smo narisali izoterme vezanja DM na karagenane v različnih eksperimentalnih pogojih: v vodnih medijih z različnimi ionskimi močmi in pri dveh temperaturah. V ta namen smo prvič pripravili posebno membransko elektrodo, ki je bila selektivna za doksazosinijev kation. Rezultati so pokazali, da je obseg vezave DM največji na λ -karagenan, sledi ι -karagenan, najmanjša pa je vezava na κ -karagenan. Pri višji temperaturi (37 °C) je vezanje v primerjavi s sobno temperaturo (25 °C) slabše. Prisotnost elektrolitov v mediju prav tako zmanjša obseg vezave doksazosina na karagenane. Vezanje DM na karagenane smo proučevali tudi ob prisotnosti hidroksipropilmetylceluloze (HPMC). Ugotovili smo, da HPMC sterično ovira interakcije med DM in karagenani in močno zmanjša obseg kompleksacije. Ker se v prebavnem traktu izločajo različne površinsko aktivne snovi, ki lahko vplivajo na dostavo učinkovine iz farmacevtske oblike, smo proučili še vpliv natrijevega lavrilsulfata (SDS) na nastanek kompleksa in potrdili, da SDS v dovolj veliki koncentraciji razgradi komplekse.

Study of complexes between cationic drug and poly-anionic carrageenans for modified drug release

PETRA KOS, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Ksenija Kogej**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Saša Baumgartner**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

In our study we focused on characterization of interactions between λ -, ι - and κ -carrageenan (CARRs) and model cationic active substance, doxazosine mesylate (DM). Binding isotherms of DM to CARRs were determined in aqueous and buffer media of different ionic strengths and at two different temperatures, using potentiometric method. For this purpose a special membrane electrode selective for doxazosine cation was prepared for the first time. The results indicated that the extent of DM binding to CARRs has the following order: $\lambda > \iota > \kappa$. In media with higher ionic strengths and at higher temperature (37°C) the interactions were considerably weaker in comparison with the interactions in water at room temperature (25°C). The binding of DM to CARRs was additionally investigated in the presence of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). As it was shown, HPMC sterically hampers the interactions between DM and CARRs and hence the complexation is diminished. Due to the presence of various surfactants in human gastrointestinal tract delivery of an active ingredient from the pharmaceutical formulation may be altered. Therefore the effect of sodium lauryl sulfate (SDS) on complexation was studied. It was demonstrated that SDS at sufficiently high concentration leads to complex degradation.

Baktericidna učinkovitost srebra s hialuronatom

TAMARA REPEC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Peter Bukovec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Elizabeta Tratar Pirc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Hialuronska kislina spada med proteoglikane in je sestavljena iz ponavljačih se disaharidnih enot N-acetyl-D-glukozamina in D-glukoronske kisline. V razredčenih vodnih raztopinah hialuronatna veriga, obdana z vodnimi molekulami, zavzame obliko naključnega klobčiča.

Mnoge raziskave so pokazale, da je elementarno srebro učinkovito sredstvo pri baktericidnem delovanju. Tako elementarno srebro kot srebrovi ioni reagirajo s celično membrano bakterije in jo tako uničijo. V človeškem organizmu srebro kaže minimalno toksičnost. Ker se elementarni delci srebra v raztopini (koloidno srebro) lahko združijo v večje skupke, se s tem zmanjša baktericidna učinkovitost. Hialuronatne verige bi lahko služile kot ogrodje, na katero se vključijo srebrovi delci (nano srebro).

Namen raziskovalnega dela je bil pripraviti hialuronatne suspenzije s srebrom in trdne filme (tanke plasti), v katerih je različno množinsko razmerje med srebrom in hialuronatom (od 1 : 10 do 1 : 100), ter preizkusiti njihovo protimikrobnlo delovanje na bakteriji *Escherichia coli* (laboratorijski sev DH5α) in na sporah glive *Aspergillus niger*. Za dobro baktericidno delovanje je pomembno množinsko razmerje med srebrom in hialuronatom.

Bactericidal Efficiency of Silver with Hyaluronate

TAMARA REPEC, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Peter Bukovec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Elizabeta Tratar Pirc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Hyaluronic acid (HA) is a proteoglycan composed of repeating disaccharide units; each unit is composed of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid. In a water solution HA is surrounded by water molecules and takes the form of a random coil.

It is well known that elemental silver is an effective antibacterial agent. Elemental silver as well as silver ions interact with the cell membrane and destroy it in the process. In the human body silver has shown minimal toxicity. Due to the agglomeration of elemental silver in aqueous solutions, its bactericidal efficiency decreases. Hialuronate chains could serve as a net to support nano silver particles.

The purpose of this study was to prepare hyaluronate suspensions with silver and solid thin films, where silver and hyaluronate were in different molar ratios (from 1 : 10 to 1 : 100). Materials prepared in such manner were antimicrobial tested on *Escherichia coli* (chain DH5α) and on spores of fungi *Aspergillus niger*. Molar ratios between silver and hyaluronate are important parameters in bactericidal efficiency.

Učinkovitost razkužil na delovnih površinah

URŠKA RIBIČ, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Hrvoje Petković, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Barbara Jeršek, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

V farmacevtski industriji je zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti okolja izrednega pomena. Namensko naloge je bil preveriti učinkovitost dveh razkužil, ki se uporablja za razkuževanje proizvodnega okolja - to sta Apesin Rapid in dezinfekcijski sprej. Njuno učinkovitost smo preverili s standardno metodo (SIST EN 1040:2001 za baktericidno delovanje, SIST EN 1275:2001 za fungicidno delovanje in SIST EN 14347:2005 za sporocidno delovanje) in z metodo umetne kontaminacije na nerjavečih ploščah, ki najbolje simulira delovne površine v proizvodnji. Razkužili smo testirali na različnih mikroorganizmih.

Efficiency of Disinfectants on Working Surfaces

URŠKA RIBIČ, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Hrvoje Petković, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Barbara Jeršek, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Providing a microbial irreproachability of the working environment in pharmaceutical industry is of great importance. The main aim of this diploma work was to evaluate the efficiency of two disinfectants, Apesin Rapid and Apesin disinfection spray, which are regularly used for the disinfection of the working environment and each of them has a different active ingredient. The efficiency of disinfectants was evaluated by the standardized method SIST EN 1040:2001 for bactericidal, SIST EN 1275:2001 method for fungicidal, and EN 14347:2005 method for sporicidal efficiency. These methods were compared to the method of artificial contamination on stainless steel surfaces which simulates worktops in the real industrial environment. Both disinfectants were tested by a number of selected test-microorganisms.

Simulacija prehoda gastrorezistentnih pelet skozi želodec in študij raztpljanja z aparaturom USP IV

TANJA SEVER, Krka, d. d., Novo mesto

Mentorica: Marija Bogataj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Na biološko uporabnost učinkovin vpliva prehod peroralnih farmacevtskih oblik skozi gastrointestinalni trakt. Kinetika želodčnega praznjenja pelet je lahko zelo kompleksna in variabilna. Namen naloge je bil proučiti vpliv časa zadrževanja gastrorezistentnih pelet v kislem mediju in vpliv različnih pH-vrednosti kislega medija na sproščanje učinkovine iz oblik A in B. Tako smo simulirali vpliv časa zadrževanja pelet v želodcu ter inter- in intrasubjektivno variabilnost želodčnega pH. Sproščanje učinkovine iz gastrorezistentnih pelet poteka po kinetiki 1. reda. Oteženi povprečni profil sproščanja smo izračunali na osnovi profilov sproščanja ob različnih časih zadrževanja pelet v kislem mediju in upoštevanja kinetike praznjenja pelet iz želodca. Ugotovili smo, da daljši, ko je čas izpostavljenosti pelet kislemu mediju, večji je razpad učinkovine in manjša je količina sproščene učinkovine. Višji, kot je pH kislega medija, krajični čas izpostavljenosti pelet kislemu mediju je potreben, da se pojavi razlike med oblikama. Razlike oteženih povprečnih profilov med oblikama se pojavijo, ko so pelete izpostavljene kislom medijem z višjim pH.

The Simulation of Gastric Emptying of Pellets and Dissolution Study with Apparatus USP IV

TANJA SEVER, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Marija Bogataj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The transit of the oral dosage forms through the gastrointestinal tract has a great impact on the drug bioavailability. The kinetics of the gastric emptying of the pellets can be very complex and variable. The research was carried out in order to evaluate two effects: firstly the influence of time interval during which the enteric coated pellets are retained in the acid medium and secondly, the influence of various pH values of acid medium on the drug release from forms A and B. The drug release from the enteric coated pellets is described by the kinetics of the first order. Weighted average release profiles were calculated from release profiles of pellets at different retention time in acid medium. The kinetics of gastric emptying was also considered when calculating weighted average release profiles. It was shown that the longer the retention of the pellets in acid medium the greater is the degradation of the drug and consequently the amount of the released drug is smaller. The differences in release profile between forms A and B seem to be more obvious when pellets are exposed to a higher pH medium for a longer time. The difference is also shown regarding the weighted average profile; the higher the pH of the medium the greater is the difference between the forms.

Sinteza potencialnih nečistoč v farmacevtski učinkovini

JERNEJKA VOVKO, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Marijan Kočevar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Anton Štimac, Krka, d. d., Novo mesto

V diplomskem delu je opisana sinteza vseh možnih stereoizomerov farmacevtske učinkovine ezetimib, (3R,4S)-1-(4-fluorofenil)-3-[(S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksi-fenil)azetidin-2-on, in sicer zmes štirih trans izomerov (3RS,4SR)-1-(4-fluorofenil)-3-[(RS)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksifenil)azetidin-2-onov (trans-8+trans-9) in zmes štirih cis izomerov (3RS,4RS)-1-(4-fluorofenil)-3-[(RS)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksifenil)azetidin-2-onov (cis-8+cis-9). Ključno stopnjo sinteze predstavlja Staudingerjeva cikloadicija metil 4-(kloroformil)butirata (1) z N-[4-(benziloksi)benziliden]-4-fluoroanilinom (2a) do azetidinonov 3. S primerno izbiro topila je bilo mogoče izvesti cikloadicijo z večjo ali manjšo trans selektivnostjo, kar mi je omogočilo selektivno sintezo trans- in cis-serije azetidinonov 3. Nato sledi pretvorba estrske skupine v 4-fluorofenil ketonske derivate 5 prek Weinrebovih amidov 4. Končni izomeri ezetimiba 8 in 9 nastanejo z redukcijo karbonilne skupine ketonov 5 z NaBH_4 in z naslednjim katalitskim debenziliranjem zmesi alkoholov 6 in 7 v prisotnosti Pd/C in vodika. Po enaki poti sem pripravila tudi zmes trans izomerov "desfluoroezetimiba" (3RS,4SR)-1-fenil-3-[(RS)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksifenil)azetidin-2-on (trans-15+trans-16).

Synthesis of Potential Impurities in the Active Pharmaceutical Ingredient

JERNEJKA VOVKO, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Marijan Kočevar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Anton Štimac, Krka, d. d., Novo mesto

In this work a synthesis of all possible stereoisomers of an active pharmaceutical ingredient ezetimibe, (3R,4S)-1-(4-fluorophenyl)-3-[(S)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-propyl]-4-(4-hydroxyphenyl)azetidin-2-one, is described: a mixture of four trans-isomers (3RS,4SR)-1-(4-fluorophenyl)-3-[(RS)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropyl]-4-(4-hydroxy-phenyl)azetidin-2-ones (trans-8+trans-9) and, separately, a mixture of four cis-isomers (3RS,4RS)-1-(4-fluorophenyl)-3-[(RS)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-propyl]-4-(4-hydroxy-phenyl)azetidin-2-ones (cis-8+cis-9). A key stage of the synthesis represents Staudinger cycloaddition of methyl 4-(chloroformyl) butyrate (1) with N-[4-(benzyloxy)benzylidene]-4-fluoroaniline (2a) providing azetidinones 3. With a suitable choice of solvent it was possible to carry out the cycloaddition with an excellent to moderate trans-selectivity, which gave me the opportunity to selectively synthesize either trans- or cis- series of azetidinones 3. Ester group of 3 was further transformed into 4-fluorophenyl ketone derivatives 5 via Weinreb amides 4. Final isomers of ezetimibe 8 and 9 were obtained by the reduction of keto groups of 5 with NaBH_4 , followed by catalytic debenzylation of a mixture of alcohols 6 and 7 in the presence of Pd/C and hydrogen. In the same way I prepared a mixture of trans-isomers of "desfluoroezetimibe" (3RS,4SR)-3-[(RS)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropyl]-4-(4-hydroxyphenyl)-1-phenylazetidin-2-one (trans-15+trans-16).

Optimizacija pogojev testov sproščanja teofilina iz cilindričnih farmacevtskih oblik

ANJA ZALETAL in **KATJA LOŽAR**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Marija Bogataj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Izhodišče za raziskovalno naloge so predstavljale cilindrične farmacevtske oblike, izdelane na Fakulteti za farmacijo v Trstu. Sestavljene so bile iz notranjega hidrofilnega in zunanjega lipofilnega dela. Namen dela je bil najti optimalne pogoje za poskus sproščanja teofilina iz teh farmacevtskih oblik ter pridobiti rezultate, ki bi predstavljeni najboljšo podlago za dobro *in vitro in vivo* korelacijo. Za primerjavo smo uporabili podatke o absorpcijskih profilih, pridobljenih v raziskovalni študiji na prostovoljcih, ki je bila izvedena na Fakulteti za farmacijo v Trstu. Poskuse sproščanja smo v večini izvajali na modificiranem pretočnem sistemu, prvega pa smo izvedli na aparatu USP 2. Parametri, ki smo jih spremajali, so bili: hitrost mešanja mešala, volumen medija za sproščanje, velikost čaše, količina steklenih kroglic in vrsta medija za sproščanje. S poskusi smo dobili orientacijske podatke o obnašanju oblike in količini sproščene učinkovine. V končni seriji poskusov smo se osredotočili na parameter, ki opredeli vpliv mehanskega stresa, ki smo ga ponazorili s količino steklenih kroglic. Trenda vpliva količine steklenih kroglic ni bilo mogoče potrditi. Iz podatkov poskusov končne serije smo opredelili *in vitro in vivo* korelacijo. Najboljše ujemanje absorpcijskih profilov in profilov sproščanja smo ugotovili pri poskusu z uporabo 20-gramske kroglice. Ugotovili smo dobro korelacijo za vsako obliko posebej, korelacija med absorbirano frakcijo in odstotkom sproščene učinkovine pa je bila različna.

Optimisation of Conditions for Evaluation of Theophylline Release from Cylindric Dosage Forms

ANJA ZALETAL in **KATJA LOŽAR**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Marija Bogataj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The aim of this work was to find the optimal conditions for the release testing of the active substance from cylindrical co-extrudate dosage forms, developed at the Faculty of Pharmacy, Trieste. They consisted of two concentric extruded matrices: an inner one, hydrophilic in character; and an outer matrix, lipophilic in character. Both parts contained theophylline. Optimisation of the conditions of release experiments represented the aim of this work. For comparison, absorption profiles were taken, calculated from the data acquired from previous research studies on volunteers at the Faculty of Pharmacy, Trieste. With the exception of the first test, which was carried out on the USP 2 apparatus, all the other tests were performed on the modified flow-through system. The parameters of optimisation were the stirrer speed, volume of the media, the beaker size, the quantity of glass beads and the composition of media. In the final series of experiments the focus was on a single parameter, which showed the impact of mechanical stress (the quantity of glass beads). No trend of impact of the quantity of glass beads on the release of active substance could be seen from the obtained results. The correlation between absorbed fractions of theophylline and percentages of released theophylline was evaluated. The best correlation was obtained when 20g glass beads were used in release experiment. The correlation between absorbed fractions and percentages of released drug for each dosage form was good, however differences in corellation were observed for short and long dosage forms.

Problematika neuporabnih zdravil

MAJA BAHOR, NATAŠA PLUT, NINA ŠTRAVS, Gimnazija Novo mesto

Mentorka: Miroslava Abazović, Dolenjske lekarne Novo mesto

Somentorka: Stanislava Florjančič, Gimnazija Novo mesto

V svoji raziskovalni nalogi smo se hotele seznaniti s problematiko neuporabnih zdravil in ugotoviti, kako ljudje ravnajo z njimi.

Za začetek smo poiskale podatke o zdravilih na splošno. V ta del smo vključile tudi racionalno rabo zdravil, ki lahko bistveno vpliva na to, da ostaja manj neporabljenih zdravil. Ta so namreč nevarna za okolje.

Ta problem lahko zmanjšamo tudi tako, da zdravila oddamo v zbirni center izvajalca javne komunalne službe, v lekarni, specializirani prodajalni ali zbiralcu odpadnih zdravil v občasnih akcijah zbiranja odpadnih zdravil. Veletrgovci nato poskrbijo, da so ta zdravila pravilno uničena in da minimalno škodijo okolju. Poleg sežiganja v sežigalnicah so inovativna ideja za še učinkovitejšo predelavo odpadkov plazma konverterji.

Izvedle smo tudi anketo, s katero smo že zelele preveriti ozaveščenost ljudi o ravnanju z zdravili.

Da bi dokazale nevarne vplive zdravil na okolje, smo izvedle tudi eksperimentalni del, test strupenosti na vodnih bolhah. Uporabile smo metodo določanje akutne toksičnosti z *Daphnia magna Straus*.

Problematic of Unused Medications

MAJA BAHOR, NATAŠA PLUT, NINA ŠTRAVS, Gymnasium Novo mesto

Supervisor: Miroslava Abazović, Dolenjske lekarne Novo mesto

Co-supervisor: Stanislava Florjančič, Gymnasium Novo mesto

In our research assignment we wanted to find out the problems of unused medications and also what people do with them.

In the beginning we had to find some basic information about medications. In this part of the research we also wrote about rational usage of medications, which leads to disposal of unused medications. Because of their substances unused medications represent a big danger to the environment and consequently to human beings.

People can reduce this problem by a correct disposal of unused medications. They should be given to specialised municipal disposal units, to drugstores or specialized stores or at certain times to collectors of unused medications. Afterwards the retailers will commit themselves to a proper destruction of the unused medications and so reduce the environmental impact of such medications to a minimum. Besides burning in incinerators, plasma converters present an innovative solution for providing a more efficient reprocessing of disposals. There are also useful side effects and one of them is providing hydrogen.

We have put nine questions in a poll. With it we obtained information about how people treat unused medications.

To prove the dangerous effects on the environment we made an experiment, testing of toxic substances on a cladoceran freshwater water flea (*Daphnia magna Straus*).

Tehnološko nezahtevna priprava visokoučinkovitih fotokatalitskih tankih plasti na aluminiju za razgradnjo ibuprofena v vodi

MATEJ ČELIK, Laboratorij za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici

Mentor: **Urh Černigoj**, Laboratorij za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici

Somentor: **Marko Kete**, Laboratorij za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici

Somentorica: **Silvana Štucin**, Gimnazija Nova Gorica

Namen moje naloge je bila izdelava immobiliziranega fotokatalizatorja na osnovi TiO_2 za čiščenje vode, onesnažene s farmacevtskimi sredstvi, ki jih TiO_2 razgradi do CO_2 in H_2O . V praksi se trenutno uporablja suspenzija TiO_2 , ki zahteva zamudno in drago filtracijo, ki se ji z mojo metodo izognemo. Meritve sem izvajal v fotoreaktorju, v katerega sem namestil s TiO_2 prevlečene aluminijaste ploščice, potopljene v prezračevano vodno raztopino ibuprofena. Razgradnjo sem spremjal s HPLC in z merjenjem skupnega organskega ogljika v vzorcu. Ponovna uporaba istih ploščic je pokazala, da se je hitrost razgradnje prepovolila, kar pomeni, da je prišlo do zastrupljanja katalizatorja. Sklepal sem, da je za padanje fotokatalitske aktivnosti kriv stik TiO_2 z aluminijem. S skupnim delom več raziskovalcev smo razvili osnovno zaščito aluminija na osnovi SiO_2 , na katerega smo brez težav nanesli tanke plasti TiO_2 . Fotokatalitska aktivnost tako pripravljenih tankih plasti se iz ponovitve v ponovitev ne zmanjšuje, s čimer smo obenem dokazali, da je aluminij glavni krivec pasivacije TiO_2 in da lahko na enostaven in poceni način pripravimo visokoaktivne in dalj časa delujoče tanke plasti.

Uncomplicated Preparation of Highly Active Photocatalytical Films on Aluminium for Decomposition of Ibuprofen in Water

Matej Čelik, Laboratory for Environmental Research, University of Nova Gorica

Supervisor: **Urh Černigoj**, Laboratory for Environmental Research, University of Nova Gorica

Co-supervisor: **Marko Kete**, Laboratory for Environmental Research, University of Nova Gorica

Co-supervisor: **Silvana Štucin**, Gymnasium Nova Gorica

The aim of work was to produce an immobilised photocatalysator on the TiO_2 basis used for purifying water polluted by pharmaceutical products which will be decomposed into CO_2 , and H_2O . Currently TiO_2 suspensions are used, demanding time and money-consuming filtration which my metod avoids. The measurements were carried out using the photoreactor with aluminium plates coated with TiO_2 film dipped into aerated water solution of ibuprofen. Decomposition was recorded by HPLC and TOC method. Reuse of plates showed that the rate of decomposition halves, which indicates catalyst intoxication probably due to the contact between TiO_2 and Al. In cooperation with other researchers the protective film based on SiO_2 was developed. The photocatalytical activity of so prepared plates is stable. This proves that aluminium was the main cause for passivation of TiO_2 and that we are able to produce cheap, highly active long-lasting TiO_2 films.

Rezistenca pri glivah

KARIN JURGLIČ, NIKA LUŽAR, NINA URBIČ, *Srednja elektro šola in tehniška gimnazija, Šolski center Novo mesto*
Mentorica: **Valentina Mavrič Klenovšek**, *Srednja elektro šola in tehniška gimnazija, Šolski center Novo mesto*

Kraljestvo gliv sestavlja pesta skupina evkariontskih organizmov z razvito celično steno in heterotrofnim načinom pridobivanja organskih snovi. Za človeka imajo glice več različnih vlog: so vir hrane, vir učinkov za zdravljenje bolezni, povzročiteljice okužb na človeku, živalih in rastlinah. Tako v kmetijstvu kot v zdravstvu se pojavlja glivične okužbe, ki jih v kmetijstvu zatiramo s fungicidi, v medicini pa z antimikotiki. Kljub širokemu naboru fungicidnih in antimikotičnih učinkov z zelo raznolikimi mehanizmi delovanja njihovo uporabo pogosto omejuje rezistenca (odpornost). Da bi preverili ta pojav, smo v raziskovalni nalogi uporabili 5 fungicidov (Cosan, Dithane, Antracol, Bakreni Antracol in Switch) ter dve antimikotični zdravili (Daktarin in Canesten). Vzorce gliv smo prinesli iz sadovnjaka in vinograda, kandido pa smo izolirali iz ust. Te glive smo gojili na gojiščih, ki smo jim dodali antibiotike in izbrane fungicide. Pojav odpornosti smo opazili pri uporabi Cosana in Dithana. To sta fungicida na žveplovi osnovi, ki ju precej uporablja v naših vinogradih. Med antimikotičnimi zdravili smo odpornost opazili pri uporabi Canestena. Široka uporaba antimikotikov in fungicidov v preventivne namene je vzrok za pospešen razvoj odpornosti, kar se je potrdilo tudi v našem primeru. Odpornost gliv je postala razširjen problem v današnjem gospodarstvu. Nastala pa je predvsem zaradi neupoštevanja navodil za uporabo fungicidov.

The Fungi Resistance

KARIN JURGLIČ, NIKA LUŽAR, NINA URBIČ, *Secondary School of Electrical Engineering and Technical Gymnasium, School Center Novo mesto*
Supervisor: **Valentina Mavrič Klenovšek**, *Secondary School of Electrical Engineering and Technical Gymnasium, School Center Novo mesto*

The fungi kingdom comprises a variety of eukaryotic organisms which have developed a cell wall and are capable of acquiring organic material. The fungi are used for different purposes: as a source of food, source of substance for treating diseases. What is more, they represent the cause for human, animal and plant infections. Therefore we are faced with a number of fungi infections in agriculture where like in medicine we try to suppress them with the use of fungicides and in medicine with the use of antimiotics. Despite the wide range of fungicidal and antimicotic substances and many different ways of using them, their use is unfortunately often limited by the resistance(immunity). To verify this phenomenon, in our research project we have used five fungicides: Cosan, Dithane, Antracol, copper Anacol, Switch and two antimicotic drugs (Daktarin and Canesten).The samples of the fungi we have been using were brought from the orchards, vineyards, and fruit, except for Candida which was isolated from our mouths. These fungi were grown on our bio farms, to which we have added some antibiotics and fungicides. The resistance was observed in the case of Dithane and Cosane. These are sulfur-based fungicides, which are mostly used in our vineyards. Among antimicotic drugs the resistance was observed with the use of Canesten. Wide use of antimicotic drugs and fungicides as a preventive measure is found to be the cause for the rapid development of resistance, which was confirmed in our survey(case). Fungal resistance has become a widespread problem in today's economy. It is mainly caused due to failure to comply with the instructions of fungicides.

Združimo moči v boju proti diabetesu – tihemu ubijalcu

TINA KEGL, II. gimnazija Maribor

Mentorka: Vesna Hojnik, II. gimnazija Maribor

V raziskovalni nalogi je obravnavana zelo razširjena in nevarna bolezen diabetes, ki jo zaradi njene zahrbtnosti imenujemo tudi tihi ubijalec. Predstavljeni so glavni vzroki, simptomi in tipi diabetesa, njegovi akutni in kronični zapleti ter analizirane možnosti zdravljenja. Na osnovi proučevanja pisnih virov je samostojno narejena primerjava zdravil in načinov zdravljenja. Na osnovi opravljene raziskave ter analize ankete in intervjujev so prikazani argumenti, ki potrjujejo hipotezo, da diabetes ni pod popolnim človekovim nadzorom. Predstavljeni so predlogi, kako bi lahko vsak človek aktivno sodeloval v boju proti diabetesu. V ta namen so samostojno izdelani diagrami simptomov za pravočasno diagnosticiranje posameznih tipov diabetesa in njegovih zapletov, kar je ključnega pomena za uspešno zdravljenje. Dani so predlogi diabetikom, njihovim sorodnikom in priateljem ter diabetologom, da bi lahko učinkovito združili svoje moči v boju proti diabetesu. Predlagana je vzgoja zdravega načina življenja na vseh stopnjah izobraževanja, da bi se spremenila miselnost ljudi in resnično na pravo mesto postavila skrb za zdravje, ki v veliki meri vpliva na trajnostni razvoj človeške družbe. Dobljena spoznanja v okviru naloge kažejo, da bi bilo v prihodnje smiselno raziskati tudi vpliv onesnaževanja okolja na pojav diabetesa ter vzroke za razlike med načinom zdravljenja v državnih in zasebnih ambulantah v Sloveniji in drugod po svetu.

Join Forces in Fight Against Diabetes – the Silent Killer

TINA KEGL, II Gymnasium Maribor

Supervisor: Vesna Hojnik, II Gymnasium Maribor

The research work deals with widely spread and dangerous illness diabetes, which is called the silent killer because of its insidiousness. The main reasons, symptoms and types of diabetes, its acute and chronic complications are presented and the possibility of medical treatment are analysed. On the basis of the study of literature, the comparison of medicaments and medical treatments is presented. On the basis of research, questionnaire and interview analysis, arguments are discussed which confirm the hypothesis that the diabetes isn't under full human control. Proposals, related to the possibility to achieve active cooperation of each person in the fight again the diabetes, are presented. In this manner, diagrams of symptoms for timely diagnosis of several types of diabetes and its complications are elaborated. This is the key factor to successful medical treatment. Suggestions for diabetics, their relatives and friends as well for the doctors are formed. It is very important to incorporate all means in the fight against diabetes. The education of healthy life style on all degrees of educations is suggested. It is important to change personal responsibility with respect to health, which has a great influence on sustainable development of human society. The findings of this work shows also that it would be reasonable to investigate also the influence of pollution on the diabetes and the sources for differences in the procedures of medical treatment in public and private ambulances in Slovenia and worldwide.

Prehranska dopolnila pri psih in mačkah

MERCEDES VITEK, MIRJAM PUŠAVEC, GREGOR HROVAT, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Marjeta Redek, Krka, d. d.

Somentorica: Stanislava Florijančič, Gimnazija Novo mesto

V svoji raziskovalni nalogi smo si zadali cilj, da predstavimo prehrano in prehranska dopolnila pri psih in mačkah.

Na začetku je teoretični del. V njem smo podrobneje proučili pojem zdrave in pravilne prehrane naših ljubljenčkov, bolezni, povezane s prehrano, ter vpliv vitaminov, mineralov in drugih prehranskih dopolnil na zdrav razvoj in delovanje organizma. Psi in mačke namreč za to potrebujejo zdravo in uravnoteženo prehrano, ki vsebuje vse potrebne hrnilne snovi. Beljakovine skrbijo za ohranjanje čvrstosti mišičnega tkiva, ogljikovi hidrati predstavljajo vir energije, prav tako maščobe, ki imajo še dodatno naložbo pri ohranjanju zdrave kože in dlake. Vitaminji in minerali omogočajo nekatere osnovne kemične reakcije, vlaknine zagotavljajo pravilno delovanje prebavil, vodo pa naši ljubljenčki potrebujejo za presnovne procese, ki potekajo v vseh delih telesa.

V drugem delu naloge predstavljamo anketo, s katero smo želeli ugotoviti, kdaj in kakšna prehranska dopolnila ljudje uporabljajo v prehrani svojega psa ali mačke. Povprašali smo jih tudi po boleznih ozziroma bolezenskih znakih, ki so se morebiti pojavili pri njihovem ljubljenčku. Po mnenju o uporabnosti prehranskih dopolnil smo šli tudi k veterinarju, ogledali pa smo si še ponudbo prehranskih dopolnil in hrane višje kakovosti v lekarni za živali in v specializirani trgovini ter svoje ugotovitve tudi zapisali.

Dietary Supplements in Dog and Cat Diet

MERCEDES VITEK, MIRJAM PUŠAVEC, GREGOR HROVAT, Gimnazija Novo mesto

Supervisor: Marjeta Redek, Krka, d. d.

Co-supervisor: Stanislava Florijančič, Gymnasium Novo mesto

The main aim of our project work is to present food and dietary supplements in dog and cat diet.

We begin with the theory. First, we analyzed the idea of healthy pet food, food-related diseases and illnesses, the effect of vitamins, minerals and other food supplements needed for healthy growth and development of the body. What cats and dogs need to stay healthy is a balanced diet which contains all the necessary nutrients. Proteins help to keep the muscles and tissues firm, carbohydrates and fats are a source of energy, and fats especially are essential for healthy skin and coat. Vitamins and minerals enable some of the basic chemical reactions, fiber help with digestion and there is also water which our pets need for metabolic processes that take place in all parts of the body. In the second part of our project, we carried out a questionnaire in order to find out about the frequency and the type of food supplements owners use in dog or cat diet. We also asked them about the diseases or symptoms they might have noticed in their pets. We asked a vet's opinion about the practical use of food supplements and went to animal pharmacies and specialist shops to study the offer of food supplements and premium pet food. Our project work records all our findings and conclusions.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

51	Jan Antonić	61	Urban Švajger
19	Tanja Bagar	62	Hela Tokoš
77	Maja Bahor	63	Rebeka Toporišič
25	Ana Bergant Simončič	64	Katja Trontelj
65	Bernarda Bevc	79	Nina Urbič
66	Monika Brezovar	81	Mercedes Vitek
67	Teja Brezovar	75	Jernejka Vovko
52	Petra Brožič	14	Franc Vrečer
53	Tomaž Büdefeld	76	Anja Zaletel
78	Matej Čelik	43	Alenka Zvonar
54	Biljana Hacin		
68	Marko Hanželič		
81	Gregor Hrovat		
69	Alenka Jaklič		
31	Žiga Jakopin		
69	Jasna Jereb		
55	Zala Jevnikar		
79	Karin Jurglič		
56	Damjana Kastelic		
80	Tina Kegl		
70	Tanja Koleša		
71	Petra Kos		
57	Tina Kosjek		
58	Nika Lendero Krajnc		
76	Katja Ložar		
79	Nika Lužar		
59	Nina Mohorko		
37	Matej Pavli		
77	Nataša Plut		
81	Mirjam Pušavec		
72	Tamara Repec		
73	Urška Ribič		
60	Matija Rijavec		
8	Aleš Rotar		
74	Tanja Sever		
77	Nina Štravs		

KAZALO MENTORJEV/SOMENTORJEV

77	Miroslava Abazović	62	Zorka Novak Pintarič
38, 71	Saša Baumgartner	69	Aleš Obreza
20	Mojca Benčina	66	Radovan Stanislav Pejovnik
74, 76	Marija Bogataj	73	Hrvoje Petković
54	Bojana Bogovič Matijašić	58	Boris Pihlar
59	Mara Bresjanac	58	Aleš Podgornik
72	Peter Bukovec	56	Denis Pompon
26	Janez Cerkvenik	81	Marjeta Redek
51	Vesna Cerkvenik-Flajs	59	Grega Repovš
78	Urh Černigoj	32	Marija Sollner Dolenc
64	Vladka Čurin Šerbec	68	Stanko Srčič
77, 81	Stanislava Florijančič	70	Branko Stanovnik
44	Mirjana Gašperlin	75	Anton Štimac
52	Stanislav Gobec	78	Silvana Štucin
51	Iztok Grabnar	72	Elizabeta Tratar Pirc
57	Ester Heath	38	Franc Vrečer
80	Vesna Hojnik	60	Darja Žgur Bertok
54	Alojz Ihan		
68	Ilija Ilić		
61	Matjaž Jeras		
73	Barbara Jeršek		
78	Marko Kete		
66	Alen Kljajić		
67	Petra Kocbek		
75	Marijan Kočevar		
71	Ksenija Kogej		
56	Radovan Komel		
57	Boris Kompare		
55	Janko Kos		
67	Julijana Kristl		
63	Jurij Lah		
52	Tea Lanišnik Rižner		
53	Gregor Majdič		
79	Valentina Mavrič Klenovšek		
64	Damijan Miklavčič		
69	Aleš Mrhar		

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Lektoriranje Ksenija Kosem
Marta Anžlovar

Produkcija Petra Dular Muhič
Andrej Petek

Tisk Bograf tiskarna d.o.o.

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

www.krkinenagrade.si



www.krkinenagrade.si