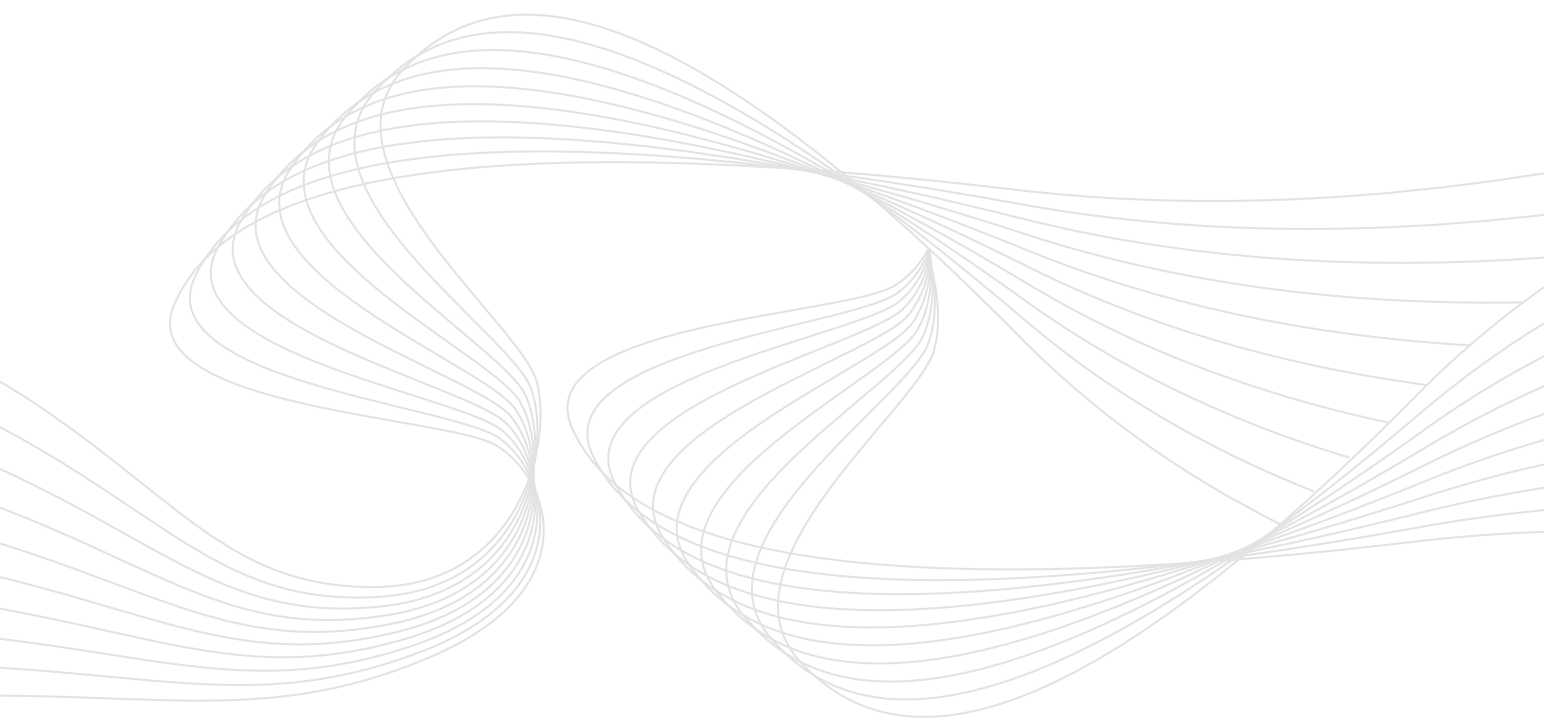


21. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 26. oktober 2011

**Častni odbor
41. Krkinih 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. **Danijel Rebolj**, *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
Krkinih nagrad**

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

Znanstveni odbor

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

Organizacijski odbor

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

**Glavni in odgovorni
urednik**

dr. **Miha Plevnik**

Recenzenti

Dunja Antonijevič, **Breda Barbič Žagar**, dr. **Primož Benkič**, **Pija Berus**, **Franci Bevec**, mag. **Marko Boh**, dr. **Sergeja Bombek**, **Tine Bračič**, **Polona Bukovec**, dr. **Nina Cimerman**, mag. **Lea Cvitkovič Maričič**, mag. **Andrej Ferlan**, dr. **Maja Florjanič**, **Andrej Gartner**, dr. **Aleš Gasparič**, mag. **Nada Gligorievska**, dr. **Ivan Gobec**, mag. **Mojca Golob**, **Grega Hudovornik**, mag. **Miran Hvalec**, dr. **Špelca Jenko**, dr. **Boštjan Jerman**, **Alen Jurčević**, mag. **Brane Kastelec**, **Jože Kastelic**, dr. **Davor Kidemet**, **Ksenija Kikelj**, dr. **Maja Kincl Skube**, **Matjaž Kirn**, dr. **Saša Kolarič**, **Ronald Erwin M. Korthouwer**, mag. **Helena Kotnik**, **Borut Kovačič**, **Irena Krajačič**, dr. **David Kralj**, mag. **Andrejka Kramar**, dr. **Zdenka Kranjc Gregorčič**, dr. **Vesna Krošelj**, **Simon Kukec**, dr. **Jernej Kužner**, dr. **Roman Lenaršič**, dr. **Alenka Leskovar**, mag. **Denise Leskovar**, mag. **Bronja Manček**, dr. **Tatjana Mateović Rojnik**, dr. **Marija Meleh**, mag. **Mateja Merslavič**, dr. **Špela Miklič**, **Mirjam Milharčič Simčič**, dr. **Anita Mlakar**, mag. **Marta Mohar**, mag. **Tamara Nemec**, **Dušanka Oblak Božič**, **Maja Oblak**, mag. **Vesna Pahor**, dr. **Matej Pavli**, dr. **Anica Pečavar**, dr. **Andreja Plaper**, mag. **Igor Plaper**, dr. **Miha Plevnik**, **Maja Preskar**, mag. **Aleša Punčuh Kolar**, mag. **Ivan Radež**, dr. **Nataša Rebolj**, **Marjeta Redek**, dr. **Aleš Rotar**, **Miloš Ružič**, **Nataša Savič**, dr. **Gregor Sedmak**, **Robert Sekereš**, dr. **Igor Simonič**, **Gordan Sladič**, **Janika Slanc Vovk**, dr. **Janez Smodiš**, dr. **Matej Smrkolj**, dr. **Polona Smrkolj**, **Tadej Stropnik**, dr. **Vida Škrabanja**, dr. **Natalija Škrbina Zajc**, dr. **Mojca Štaudohar Kozjan**, **Marko Štefanič**, dr. **Anton Štimac**, mag. **Neda Benički Švagelj**, dr. **Jaroslav Tihi**, dr. **Katja Trontelj**, **Sandra Turk**, mag. **Robert Ucman**, dr. **Tomaž Vaupotič**, dr. **Tina Virant Celestina**, **Tomislav Vrbanc**, dr. **Miha Vrbinc**, dr. **Franc Vrečer**, dr. **Jernej Zadnik**, dr. **Damjana Zupančič Božič**, dr. **Silvo Zupančič**, dr. **Rok Zupet**

VSEBINA | CONTENT

41. KRKINE NAGRADE

- 8 | Uvodne besede: **Aleš Rotar**, *predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad*
- 10 | **Krkini nagrajenci 2011**

21. SIMPOZIJ | ZBORNİK POVZETKOV

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

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

- 19 | **Ilija Ilić**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Študij kompresibilnosti in kompaktilnosti izbranih farmacevtskih ekscipientov
- 25 | **Črt Malavašič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Kiralni *N*-alkilirani diketopiperazini: sinteza, interakcije in uporaba
- 31 | **Jana Petković**, *Nacionalni inštitut za biologijo*
Mehanizmi toksičnega in genotoksičnega delovanja nanodelcev TiO₂
- 37 | **Roman Šink**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje, sinteza in kristalografske študije inhibitorjev ligaz Mur
- 43 | **Karmen Teskač Planjšek**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odgovorom

41. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Katja Berginc**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vpliv staranega etanolno-vodnega česnovega ekstrakta na intestinalne in jetrne prenašalce ter jetrni encim citokrom 3A4
- 52 | **Mojca Brunskole Švegelj**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Povezava med strukturo in delovanjem kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz in njihovih inhibitorjev
- 53 | **Bojana Mirković**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Regulacija endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B
- 54 | **Stane Pajk**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran
- 55 | **Nina Pirher**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Mehanizem signalizacije dvoverižne RNA prek receptorja TLR3
- 56 | **Suzana Štandeker**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Priprava in karakterizacija aerogelov SiO₂, modificiranih z organskimi funkcionalnimi skupinami, ter njihova uporaba v adsorpcijskih procesih
- 57 | **Tihomir Tomašič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Računalniško podprto načrtovanje in sinteza novih heterocikličnih zaviralcev ligaz Mur
- 58 | **Nace Zidar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje in sinteza heterocikličnih inhibitorjev ligaz MurC–E
- 59 | **Borut Zupančič**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Novi *P*-stereogeni difosfinski ligandi za asimetrično hidrogeniranje
- 60 | **Matej Živec**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje in sinteza peptidomimetičnih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana
- 61 | **Deborah Chiavalon, Sandra Žvar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Proučevanje pH ter mehanskega vpliva na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s podaljšanim sproščanjem
- 62 | **Aleksandra Čajić**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega izvlečka lubja navadne jelke (*Abies alba*)
- 63 | **Aleš Herman**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
In vitro raziskave metabolizma bazedoksifena z mikrosomi

- 64 | **Vesna Kuhelj**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Proučevanje vpliva vrste hipromeloze na reološke lastnosti izdelanih vodnih disperzij
- 65 | **Nina Mugoša**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Razvoj in validacija polarografske metode za določanje vsebnosti sledov tiosulfata v farmacevtskih učinkovinah
- 66 | **Gašper Ozimek**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Razvoj hitrega presejalnega testa za biosintezo salinomicina pri bakteriji *Streptomyces albus*
- 67 | **Dejan Pavlin**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Postopek priprave celic bakterij *Rhodococcus sp.* z visoko zmožnostjo ketoredukcije intermediatov ezetimiba
- 68 | **Teja Pavlin**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Mletje karvedilola s pomožnimi snovmi kot metoda rešetanja za izdelavo kokristalov
- 69 | **Benjamin Prek**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza dimetil 6-substituiranih piridin-3,4-dikarboksilatov in 2-substituiranih-4,5-bis(metoksikarbonil)piridin-*N*-oksidov
- 70 | **Andreja Radman**, *Institut Ruđer Bošković*
Priprava peptida s potencialno protitumorsko aktivnostjo
- 71 | **Mateja Ravnikar, Neža Rugelj**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vloga stereomikroskopije pri vrednotenju sproščanja učinkovine iz gastrozistentnih pelet
- 72 | **Petra Šenica, Biljana Temova**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Intestinalna absorpcija imatiniba in njegov aktivni transport s prenašalci P-gp, BCRP in OCT1 v eliminatorni smeri *in vitro*
- 73 | **Elena Šporar**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Razvoj modela za določanje velikosti delcev hidroksipropilmetilceluloze s spektroskopijo bližnjega infrardečega območja
- 74 | **Roman Štukelj**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Mikrovezikli, izolirani iz periferne krvi – klinično pomemben artefakt izolacije
- 75 | **Tanja Tavčar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vrednotenje strukture in citotoksičnosti tekočih kristalov za dermalno uporabo
- 76 | **Katja Čič, Darja Gačnik, Ajda Mavrić**, *Gimnazija Novo mesto*
Problematika neuporabnih zdravil

- 77 | **Manca Kavšček, Alja Ajdišek, Mateja Češnovar**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*
Lutein v ekstraktih iz nekaterih naravnih virov in v prehranskih dopolnilih
- 78 | **Jerca Kranjc, Breda Škedelj**, *Gimnazija Novo mesto*
Priljubljenost farmacevtskih oblik
- 79 | **Špela Prašnikar, Eva Udovič, Tina Lahne**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*
Timijanovo mleko – dragocena pomoč zeliščnega mleka pri negi mešane, mastne in nečiste kože
- 80 | **Ana Strgar, Ariadna Štorman**, *Gimnazija Vič, Ljubljana*
Ali pri vplivu antidepresivnih zdravil obstajajo razlike med spoloma?
- 82 | **Kazalo avtorjev**
- 83 | **Kazalo mentorjev/somentorjev**

UVODNE BESEDE | INTRODUCTORY WORDS



Pred letom dni smo praznovali štirideset let Krkinih nagrad. Kot vedno ob takih prelomnih dogodkih se je postavilo vprašanje, kako naprej. Gotovo je res, da sta razvoj znanosti in tehnike v današnjem času še posebej hitra. Ali sta tudi prelomna, ali bosta prinesla rezultate, sorazmerne vložku sredstev, časa, predvsem pa ustvarjalne moči tisočev raziskovalcev, je vprašanje, na katerega ni preprostega odgovora. Sklep o tem, ali je znanost v sedanjih prizadevanjih tako uspešna, kot se v poplavi novic in objav dosežkov zdi, je prepuščen življenju, ki bo uspehe raziskav potrdilo ali pa tudi ne. Vsekakor pa nam ob sicer nujnih vprašanjih o usmeritvi in uspešnosti raziskovalnega dela ne ostane nič drugega kot vztrajno in zavzeto širiti pogled, poglobljati znanje in predvsem prelivati zamisli in teorije v konkretne rezultate.

Zato smo v Krki sprejeli zavezo, da tudi v prihodnje po svojih močeh skrbimo za razvoj in raziskave, zavedajoč se odgovornosti do tistih, ki so od naših dosežkov in izdelkov odvisni – bolnikov, zdravnikov, farmacevtov, skratka vseh, ki sta nam zdravje in kakovostno življenje vodilo pri vsakdanjem delu. Raziskovalno delo mladih, ki šele vstopate v svet ustvarjalnosti, je sestavni del neprestanega obnavljanja zakladnice znanja. S temi nagradami Krka prispeva svoj delež odgovornosti in naporov za nadaljnji napredek. Nagrajenci ste tisti, ki ste pogumno stopili na isto pot, v Krki pa smo veseli, da smo pri vaših prvih korakih sodelovali. Želimo vam še veliko ustvarjalnih dosežkov, predvsem pa navdiha ob iskanju idej in vztrajnosti pri trdem delu, ki vas čaka.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Dr. Ales Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

A year ago Krka Prizes celebrated their 40th anniversary. Milestones like that always pose questions about where we are going. It is an indisputable fact that the advance of science and technology today is more rapid than ever. However, a question that remains to be answered and one that has no simple answer is whether the current developments in fact represent milestones, and whether they can generate results proportionate to the invested funds, time and the creative powers of thousands of researchers. The conclusion about whether science in its current endeavours is indeed as successful as the myriad of newsflashes make it appear is up to life to make; life will either reaffirm the scientific findings or dismiss them. In addition to addressing the urgent questions regarding the direction and merit of research work, there is nothing else we can do but be consistent and zealous in spreading our horizons, strengthening our knowledge and, mainly, transforming ideas and theories into real-life results.

Krka has therefore made a commitment to continue, to the best of its abilities, nurturing research and development, having in mind its responsibility to all those depending on our achievements and products – patients, doctors, pharmacists and all others involved in promoting health and quality of life in our everyday work. The research work taken on by young people who are only entering the world of creation represents a component part of the never ending effort to expand our treasury of knowledge. By honouring them with Krka Prizes, Krka has taken on its share of responsibility and invested into advancing progress. It is you, the Krka Prize winners, who have bravely stepped up for the challenge, while Krka is pleased to have supported you during your first steps. May there be many creative achievements down your path, in addition to inspiration in searching for ideas and perseverance in enduring the hard work that awaits you.


Dr Ales Rotar
President of the Krka Prize Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2011 | KRKA PRIZE WINNERS 2011

KRKINE NAGRADE ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Ilija Ilić	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Stane Srčič	2328
Črt Malavašič	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Jurij Svete	2329
Jana Petković	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Metka Filipič	2330
Roman Šink	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Anamarija Zega	2331
Karmen Teskač Planjšek	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Julijana Kristl	2332

KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO NALOGO | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Alja Ajdišek	<i>dijakinja</i>	Vojka Zupančič	2333
Katja Berginc	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Albin Kristl	2334
Mojca Brunskole Šveglj	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Jure Stojan Tea Lanišnik Rižner	2335
Deborah Chiavalon	<i>študentka farmacije</i>	Marija Bogataj	2336
Mateja Češnovar	<i>dijakinja</i>	Vojka Zupančič	2337

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Katja Čič	<i>dijakinja</i>	Marija Kovač Stanislava Florijančič	2338
Aleksandra Čajić	<i>magistrica farmacije</i>	Samo Kreft Damjan Janeš	2339
Darja Gačnik	<i>dijakinja</i>	Marija Kovač Stanislava Florijančič	2340
Aleš Herman	<i>magister farmacije</i>	Jurij Trontelj	2341
Manca Kavšček	<i>dijakinja</i>	Vojka Zupančič	2342
Jerca Kranjc	<i>dijakinja</i>	Miroslava Abazović Branka Klemenčič	2343
Vesna Kuhelj	<i>magistrica industrijske farmacije</i>	Franc Vrečer Saša Baumgartner	2344
Tina Lahne	<i>dijakinja</i>	Irena Kurajić	2345
Ajda Mavrić	<i>dijakinja</i>	Marija Kovač Stanislava Florijančič	2346
Bojana Mirković	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Janko Kos	2347
Nina Mugoša	<i>univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije</i>	Mitja Kolar Darinka Brodnjak Vončina Matej Stergar	2348
Gašper Ozimek	<i>univerzitetni diplomirani mikrobiolog</i>	Hrvoje Petković Vladimir Pokorny	2349
Stane Pajk	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Slavko Pečar Janez Štrancar	2350
Dejan Pavlin	<i>univerzitetni diplomirani biotehnolog</i>	Aleš Gasparič Romana Marinšek Logar	2351

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Teja Pavlin	<i>magistrica farmacije</i>	Odon Planinšek	2352
Nina Pirher	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Roman Jerala Mojca Benčina	2353
Špela Prašnikar	<i>dijakinja</i>	Irena Kurajić	2354
Benjamin Prek	<i>univerzitetni diplomirani kemik</i>	Branko Stanovnik	2355
Andreja Radman	<i>magistrica kemije</i>	Ivanka Jerić Vesna Petrović Peroković	2356
Mateja Ravnikar	<i>študentka farmacije</i>	Marija Bogataj	2357
Neža Rugelj	<i>študentka farmacije</i>	Marija Bogataj	2358
Ana Strgar	<i>dijakinja</i>	Alenka Mozer Gregor Majdič	2359
Petra Šenica	<i>študentka farmacije</i>	Simon Žakelj	2360
Breda Škedelj	<i>dijakinja</i>	Miroslava Abazović Branka Klemenčič	2361
Elena Šporar	<i>magistrica industrijske farmacije</i>	Franc Vrečer Sabina Devjak Novak	2362
Suzana Štandeker	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Zoran Novak Željko Knez	2363
Ariadna Štorman	<i>dijakinja</i>	Alenka Mozer Gregor Majdič	2364
Roman Štukelj	<i>univerzitetni diplomirani inženir živilske tehnologije</i>	Veronika Kralj Iglič Helena Abramovič	2365
Tanja Tavčar	<i>magistrica farmacije</i>	Mirjana Gašperlin	2366

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Biljana Temova	<i>študentka farmacije</i>	Simon Žakelj	2367
Tihomir Tomašič	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Lucija Peterlin Mašič	2368
Eva Udovič	<i>dijakinja</i>	Irena Kurajić	2369
Nace Zidar	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Danijel Kikelj	2370
Borut Zupančič	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Boris Šket Barbara Mohar	2371
Matej Živec	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Stanislav Gobec	2372
Sandra Žvar	<i>študentka farmacije</i>	Marija Bogataj	2373

UVOD | INTRODUCTION



Edini način, da spoznamo meje možnega, je, da se podamo onkraj njih v nemogoče.

Arthur C. Clarke

Današnja ekonomska in družbena situacija doma in v svetu je tudi priložnost in izziv za nove prebojne ideje, s katerimi lahko naredimo odločen korak iz trenutnega položaja v uspeh. Bistveni pogoj, da priložnost prepoznamo in jo izrabimo, pa je, da imamo znanje, željo in pogum iz znanega in naučenega vstopiti v neznano.

Mladi raziskovalci, ki so se prijavili na letošnji razpis za Krkine nagrade, so s kakovostjo in znanstveno vrednostjo svojih nalog dokazali, da znajo prepoznati priložnosti in da imajo pogum za hojo po neizhojenih poteh raziskovalnega in razvojnega dela.

Letošnje leto je ponovno potrdilo, da obstaja med mladimi raziskovalci velik interes za prijavo na razpis za Krkine nagrade, kar se je odrazilo tudi v visokem kakovostnem pragu za pridobitev Krkine nagrade.

V imenu Znanstvenega odbora Sveta sklada Krkinih nagrad in v svojem imenu se vsem prijavljenim zahvaljujem za trud, ki so ga vložili v raziskovalno delo in izdelavo nalog. Kakovost nalog in njihova znanstvena vrednost sta bili na visoki ravni, kar je dodatno otežilo izbor najboljših.

Zahvala gre tudi mentorjem in somentorjem, ki so mlade raziskovalce usmerjali na poti v »nemogoče«. Tudi letošnji izbor ne bi bil mogoč brez pomoči številnih strokovnjakov iz Krke, ki so naloge pregledali in ocenili, za kar se jim zahvaljujemo.

Vsem nagrajencem iskreno čestitamo in želimo, da bodo prejete nagrade samo še večja vzpodbuda za nadaljnje raziskave ter spreminjanje neznanega v znano in nemogočega v mogoče, kar bo dolgoročno prineslo tudi pozitivne učinke na gospodarsko rast Slovenije.

Izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.
predsednik Znanstvenega odbora Sveta sklada Krkinih nagrad

The only way to discover the limits of the possible is to go beyond them into the impossible.

Arthur C. Clarke

The present economic and social situation in Slovenia and in the world can be an opportunity and present a challenge to generate new breakthrough ideas that can help us take a decisive step away from the current state and towards success. However, we can only see and take such an opportunity provided we have the knowledge, aspirations and courage to leave the familiar and the known, and enter the unknown.

The young researchers that entered this year's Krka Prize competition have handed in theses of a quality and scientific merit that prove their authors can indeed spot an opportunity and have the courage to walk the untrodden paths of research and development work.

This year's competition has again reaffirmed that Krka Prizes have a wide appeal among young researchers, which was reflected in the high quality threshold set by the winning theses.

On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prize Fund Council as well as in my own name I would like to thank all the contestants for the efforts they invested in their research work and in compiling their theses. The quality and scientific merit of the entered theses were on a high level, which made it increasingly difficult to select the very best projects.

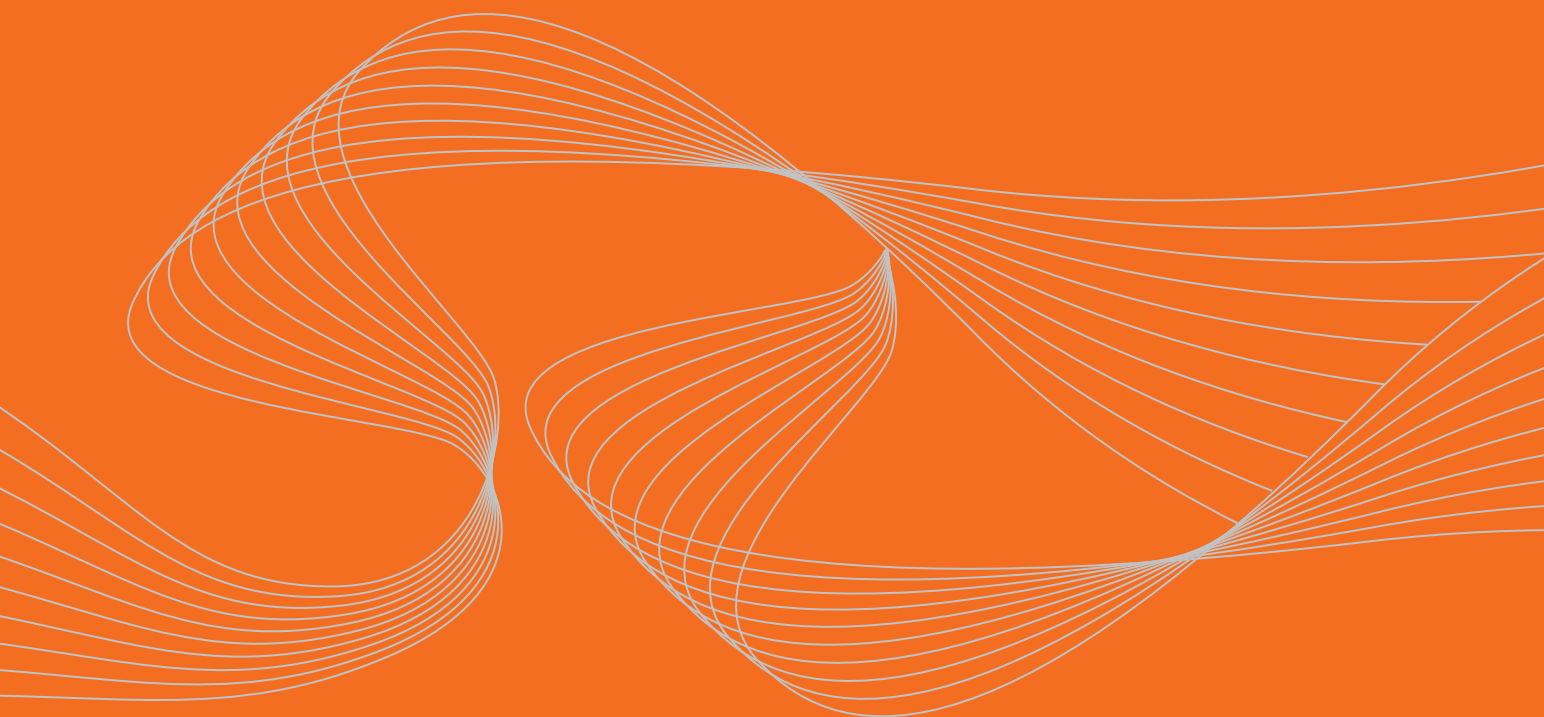
Let me also express our gratitude to the mentors and co-mentors, who guided their students on their way to reaching »the impossible«. As always, this year's selection would not have been possible without the numerous experts from Krka who examined and graded the theses, for which we sincerely thank them.

We extend our warmest congratulations to all Krka Prize winners and hope that the awards motivate them to do additional research and keep transforming the unknown into the known, and the impossible into the possible. In the long-run this is bound to have positive effects also on Slovenia's economic growth.



Assoc. Prof. Dr Franc Vrečer, MSc Pharm
President of the Scientific Committee Krka Awards Fund Council

41



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

Predstavitev nagrajencev
Presentation of prizewinners

Dr. ILIJA ILIĆ



»Tehnologija je bila vedno moja strast, študije procesov in mehanizmov pa so tesno povezane z radovednostjo in željo razumeti, kako v naravi kaj deluje,« svoje navdušenje nad raziskovalnim delom oriše dr. Ilija Ilić. Obenem poudarja, da mora biti tematika raziskovanja tudi aplikativna in neposredno uporabna v industriji. Zato ni naključje, da je njegovo primarno raziskovalno področje farmacevtska tehnologija.

»Ker so tablete najbolj pogosto uporabljena farmacevtska oblika, je vrhunska ekspertiza na tem področju nujna tudi zaradi močne domače farmacevtske industrije, ki ji na ta način želimo pomagati pri zagotavljanju konkurenčnosti na mednarodnih trgih,« pojasnjuje mladi znanstvenik iz Ljubljane, ki se je v nagrajeni doktorski nalogi ukvarjal s procesom tabletiranja. »Proučeval sem, kako se delci nekaterih izbranih in pogosto uporabljenih farmacevtskih sestavin med stiskanjem deformirajo in kakšne povezave nastajajo med njimi.«

Dr. Ilić je prepričan, da so visoka stopnja radovednosti, sistematičnost, delavnost, poštenost in integriteta lastnosti, ki jih mora imeti uspešen znanstvenik. Ob tem je vsekakor pomembna ustvarjalnost posameznika oziroma prava ideja, povezana z odlično realizacijo, ki lahko vodi k znanstvenemu preboju. »Ko človek razvije pravo ravnovesje med profesionalnim in zasebnim življenjem in mu pri tem uspe obdržati še nujno ambicioznost, lahko doseže marsikaj.«

»Med študenti in mladimi raziskovalci veljajo Krkine nagrade za izjemno prestižna priznanja, saj v svojem duhu gojijo multidisciplinarnost področij, ki je že v naravi farmacevtske stroke,« poudarja dr. Ilić in si šteje v veliko čast, da je med Krkinimi nagrajenci. »Nagrada je priznanje za dobro opravljeno raziskovalno delo, posebej pa me veseli, da prihaja iz okolja, ki ceni znanstveno odličnost in jo razume kot osnovo za praktično uporabnost pridobljenega znanja. Gre tudi za potrditev, da skupaj s sodelavci delamo v pravi smeri. Krkina nagrada mi prav zato predstavlja dodaten vir motivacije za nove izzive,« svojo misel strni ambiciozni raziskovalec, ki bo tudi v prihodnje odpiral nova raziskovalna področja in širil farmacevtsko tehnološko znanje.

Študij kompresibilnosti in kompaktilnosti izbranih farmacevtskih eksipientov

ILIJA ILIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Tablete so najpogostejše izbrana farmacevtska oblika s prednostmi tako za izdelovalca kot uporabnika. Direktno stiskanje je danes najbolj želena metoda izdelave tablet, pri tem pa mora imeti zmes za tabletiranje dobre pretočne lastnosti in dobro stisljivost. Te lastnosti običajno izboljšujemo s preoblikovanjem majhnih delcev v večje aglomerate v procesu vlažne ali suhe granulacije. Določanje pretočnih lastnosti prahov sledi dobro uveljavljenim, celo standardiziranim postopkom, od katerih so mnogi opisani v Evropski farmakopeji. V nasprotju s tem za določanje stisljivosti ni splošno sprejete in standardizirane metode. Za boljše razumevanje lahko opišemo stisljivost farmacevtskih prahov z dvema ločenima terminoma: kompresibilnost, kot sposobnost prahov za deformacijo delcev pod tlakom, in kompaktilnost, kot sposobnost prahov, da tvorijo mehansko močne kompakte. Kompresibilnost in kompaktilnost lahko določamo z uporabo različnih metod, modelov in njihovih kombinacij. S tega stališča je proces tabletiranja kompleksna operacija, ki zahteva poglobljeno poznavanje lastnosti materialov, še posebej njihovih mehanizmov deformacije.

V doktorski dizertaciji smo načrtovali s študijem kompresibilnosti in kompaktilnosti določiti mehanske lastnosti nekaterih izbranih polnil, ki se pogosto uporabljajo pri izdelavi tablet. Proučevali smo vpliv suhe (kompaktiranje in briketiranje) in vlažne granulacije (hitrovrtneči mešalnik in tehnologija z vrtinčenjem) na stisljivost zmesi za tabletiranje. Posebno pozornost smo posvetili analizi metodologije določanja teh mehanskih lastnosti. Za določitev kompresibilnosti smo aplicirali kombinacijo znotraj- in zunajmatrične metode z uporabo Hecklovega in modificiranega Walkerjevega modela. Proučevanje deformacijskih lastnosti materialov smo nadgradili z merjenjem mehanskih lastnosti posameznih delcev z uporabo nanoindentacije in slednje primerjali z rezultati, pridobljenimi na več delcih (in bulk). V aplikativnem delu doktorske naloge smo sprejeli izziv razvoja večenočne tablete, sestavljene iz pelet, obloženih z gastrozistentno oblogo, kot alternativo pelet, polnjenih v kapsule.

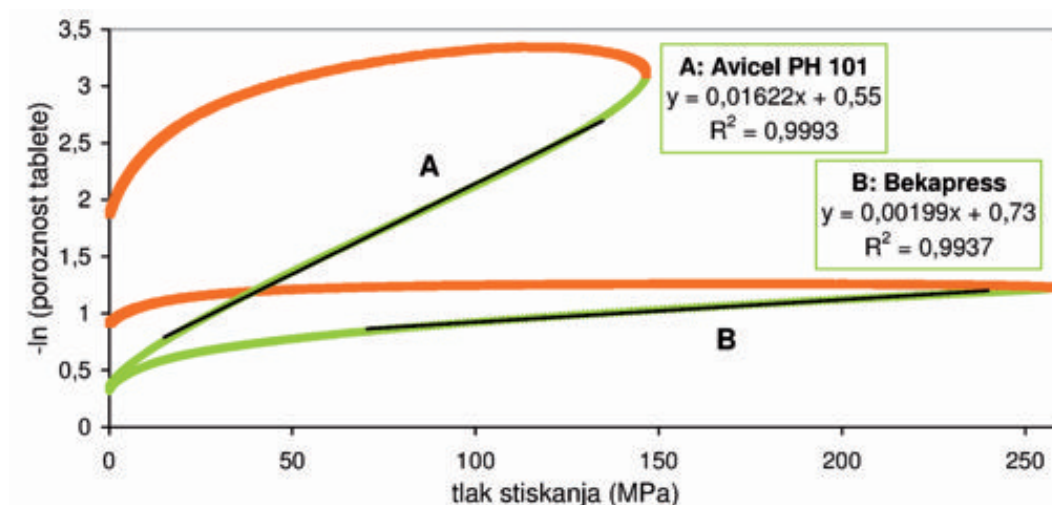
Najprej smo določili stisljivost sedmim različnim vrstam laktoz, večinoma namenjenim direktnemu stiskanju. Kompresibilnost smo merili z uporabo zunajmatričnega Hecklovega in Walkerjevega modela. Rezultati kompresibilnosti med modeloma so primerljivi, vendar Walkerjev model kaže večjo diskriminatorno moč rezultatov. Najbolj kompresibilna materiala sta bila Flowlac®-100, izdelan s sušenjem z razprševanjem, ter aglomeriran Tablettose® 100. Študija kompaktilnosti kaže, da je β -laktoza bistveno bolj kompaktilna kot α -laktoza in pri enakih pogojih stiskanja omogoča izdelavo tablet z večjo trdnostjo. Kompaktilnost laktoz smo proučevali z uporabo kompaktilnostnega profila in *Pr*-vrednosti. Slednji je od tlaka odvisen parameter, zato smo za njen izračun predlagali novo enačbo ter uvedbo limitne *Pr*-vrednosti, kar pomembno izboljša njeno praktično uporabnost.

Raziskovanje smo nadaljevali s študijem vpliva različnih aglomeracijskih procesov na pretočne lastnosti in stisljivost izdelanih zmesi za tabletiranje. Na enaki modelni placebo farmacevtski obliki smo izvedli štiri različne granulacijske postopke (vlažna granulacija: FBG = tehnologija z vrtinčenjem in HSG = hitrovrtneči mešalnik; suha granulacija: DGS = briketiranje in DGRC = valjno kompaktiranje) na polindustrijskem nivoju ter lastnosti izdelanih zrn primenjali z zmesjo za direktno tabletiranje (DC). Vlažno granulirani zmesi sta imeli v primerjavi z ostalimi zmesmi večjo povprečno velikost delcev in boljše pretočne lastnosti. V splošnem so bila vlažno granulirana zrnca bolj kompresibilna od suho granuliranih, kar pripisujemo dvojni obdelavi delcev in krajšemu kontaktnemu času, to pa omogoča krajši čas za deformacijo. Rezultate Hecklovega in Walkerjevega modela smo dodatno potrdili z meritvami sile stiskanja od položaja zgornjega pečata. Najboljšo kompaktilnost je imela FBG-zmes, najslabšo pa DGS-zrnca. Nepričakovano visoko natezno trdnost so imela DGRC-zrnca, kar pripisujemo manjši velikosti delcev in večjemu deležu najmanjših delcev v primerjavi z ostalimi zmesmi.

Z obetavnimi rezultati, doseženimi z uporabo zunajmatrične metode, se je naša pozornost osredotočila v znotrajmatrično metodo določanja kompresibilnosti. Za njeno točno izvedbo je treba upoštevati

reverzibilno elastično deformacijo pečatov in tabletirke, kar smo izmerili na posebej za to študijo izdelanih pečatih. Skupni odboj pečatov, vključno z obema pečatoma in blažilno vzmetjo pod spodnjim pečatom, je znašal 10,26 μm na 1 kN sile stiskanja. Skupni odboj pri sili stiskanja 28,3 kN, kar ustreza tlaku 250 MPa, je torej znašal 0,29 mm. Izmerjena vrednost pomembno vpliva na rezultate znotrajmatrične določitve kompresibilnosti, zato je upoštevanje odboja pečatov pri takšnih študijah nujno.

S kombinacijo znotraj- in zunajmatričnega Hecklovega in Walkerjevega modela smo proučevali deformacijske lastnosti izbranih polnil za izdelavo tablet: dve vrsti mikrokristalne celuloze, dve vrsti laktoze, koruzni škrob, izomalt in kalcijev hidrogenfosfat. Razlike med rezultati znotraj- in zunajmatričnega pristopa so bile posledica elastičnosti merjenega materiala. Ugotovili smo odlično ujemanje med elastičnostjo, določeno na nivoju posameznega delca z nanoindentacijo, in na nivoju več delcev, kar nakazuje na velik potencial nanoindentacije za boljše razumevanje deformacijskih mehanizmov. Pravilnejši rezultati kompresibilnosti so pridobljeni z zunajmatrično izvedbo, saj temeljijo na pokompresijskih dimenzijah, izmerjenih v relaksiranem stanju, v katerem z njimi delamo, jih pakiramo in pošljemo na tržišče. Na podlagi rezultatov obeh zunajmatričnih metod in indeksa elastične relaksacije lahko preiskovanim snovem pripišemo naslednje deformacijske lastnosti: mikrokristalna celuloza – visoka plastičnost, visoka elastičnost; koruzni škrob – srednja do visoka plastičnost, zelo visoka elastičnost; izomalt – srednja plastičnost, srednja elastičnost; laktoza – nizka do srednja plastičnost, srednja elastičnost in kalcijev hidrogenfosfat – nizka plastičnost/fragmentacija in srednja elastičnost.



Slika 1. Znotrajmatrični Hecklov profil za mikrokristalno celulozo (Avicel® PH 101) in kalcijev hidrogenfosfat (Bekapress®).

V aplikativnem delu doktorske dizertacije smo želeli razviti večeno tableto, sestavljeno iz gastrozistentnih pelet. Kombinirali smo različne pristope, na primer različne blažilne pomožne snovi in gastrozistentne polimere, spremenjeno obliko tablete in dodatno zaščitno oblogo. Za uspešen razvoj večeno farmaceutske oblike sta bili ključni oblika tablete in dodatna zaščitna obloga. Izdelana tableta je ustrezala farmakopejskim zahtevam glede sproščanja (9 % od dovoljenih 10 % modelne učinkovine, sproščene v kislem mediju), enakomernosti mase, vsebnosti in krušljivosti ter je kazala sprejemljivo trdnost za pakiranje.

Stisljivost materialov je predmet raziskav že več kot 50 let, vendar deformacijski in povezovalni mehanizmi še niso popolnoma razumljeni. V doktorski dizertaciji smo prišli do novih ugotovitev, ovrgli nekatere predpostavke o tabletiranju in postavili ustrezne temelje za nadaljnje raziskave na tem področju.

Study of Compressibility and Compactibility of Selected Pharmaceutical Excipients

ILIJA ILIĆ, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Stane Srčič, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Tablets are by far the most frequently used dosage form with advantages for both manufacturer and user. Direct compression is the preferred tablet production method, but requires that the tableting mixture has good flow properties and compaction properties. These are commonly enhanced by converting fine powders into larger agglomerates by the process of wet or dry granulation. Characterization of flow properties of solid particles follows well established, even standardized procedures, many of them described in European Pharmacopoeia. In contrast to this, for characterization of compaction properties, no widely accepted and standardized procedure is described. For clarification purposes, the compaction properties of pharmaceutical powders are separated into two distinct terms: compressibility as the powder's ability to deform under pressure and compactibility as the powder's ability to form mechanically strong compacts. Compressibility and compactibility can therefore be determined using different methods, models and combinations thereof. Due to this, the tableting process is a complex operation, which requires profound knowledge and elucidation of the material's properties in particular deformation mechanisms.

The purpose of this PhD thesis was to determine mechanical properties via compressibility and compactibility of some selected commonly used fillers in tablet production. We studied the effect of dry (roller compaction and slugging) and wet (high-shear and fluid-bed) granulation on compaction properties of the tableting mixtures. Particular emphasis was put into analysis of methodology for determination of mechanical properties. A combination of in-die and out-die Heckel and modified Walker model was used to determine compressibility. An effort was made to link and compare the results of deformation properties obtained on multiple particles at bulk level to the ones obtained on single particle level using nanoindentation. In the applicative part of the Thesis we have taken on the challenge of developing a multiple-unit tablet containing enteric-coated pellets as an alternative to capsule filling. Firstly, compaction properties of seven different types of lactose, mostly intended for direct compression were established. The compressibility was measured using out-die Heckel and Walker models. The compressibility results between both models are comparable, however, the Walker model showed better discriminative power. The most compressible materials were spray-dried Flowlac®-100 and agglomerated Tablettose® 100. Compactibility study revealed, that the β -lactose is much more compactible than α -lactose, allowing production of tablets with superior crushing strength. Compactibility of the lactose types was determined using compactibility profile and Pr value. The latter was found to be dependent on compression pressure, therefore a new equation was suggested resulting in an introduction of limit Pr' value, which greatly improves its practical usefulness.

The research was continued by studying the impact of various powder agglomeration processes on tableting mixture flow and compaction. Four different granulation methods (wet granulation: FBG = fluid-bed and HSG = high-shear; dry granulation: DGS = slugging and DGRC = roller compacting) of the same model placebo formulation produced at a semi-industrial scale were evaluated and compared with directly compressible (DC) mixture. Both wet granulated mixtures had larger particle size and better flow properties. In general, wet processed granules had superior compressibility compared to the dry granulated mixtures, whose lower compressibility was attributed to work hardening due to the double particle processing, but also to shorter contact times, allowing less time for deformation. The results of the Heckel and Walker models were additionally confirmed by using the force-displacement measurements. FBG mixture showed the best compactibility, while poorest was observed with DGS granules. The DGRC mixture produced tablets with unexpectedly high tensile strength which was attributed to smaller particle size and a higher proportion of fines compared to other mixtures.

With promising results achieved using out-die Heckel and Walker models the attention focused to in-die methodology for compressibility determination. To establish in-die data accurately, the reversible elastic

deformation of the punches and the tableting press should be taken into account. This contribution was measured using a custom made punches produced specifically for this study. Total punch deflection, which includes both punches and a spring mounted below the lower punch was measured at 10.26 μm per 1 kN of applied force. At compression force of 28.3 kN, corresponding to compression pressure of 250 MPa, total punch deflection was 0.29 mm. The measured value was found to have a great impact on the results of in-die compressibility determination, therefore punch deflection should be taken into account when performing this types of studies.

A combination of in-die and out-die Heckel and Walker models was applied for study of deformation properties of selected fillers commonly used for tablet production: two types of microcrystalline cellulose, two lactose types, corn starch, isomalt and dicalcium phosphate. The differences observed between the results of in-die and out-die approaches were found to be a consequence of material's elasticity. An excellent correlation between elastic determination on single particle level and multiple particle scale was demonstrated, proposing great potential of nanoindentation measurements for better elucidation of deformation mechanisms. The most correct compressibility results were obtained by out-die method, based on dimensions of the tablet in the post-compression relaxed state in which they are handled, packaged and marketed. Based on both out-die models and elastic relaxation index results the following deformation properties were attributed to the studied materials: microcrystalline cellulose – high plasticity; high elasticity; corn starch – medium to high plasticity, very high elasticity; isomalt – medium plasticity, medium elasticity; lactose – low to medium plasticity, medium elasticity and dicalcium phosphate – low plasticity/fragmentation and medium elasticity.

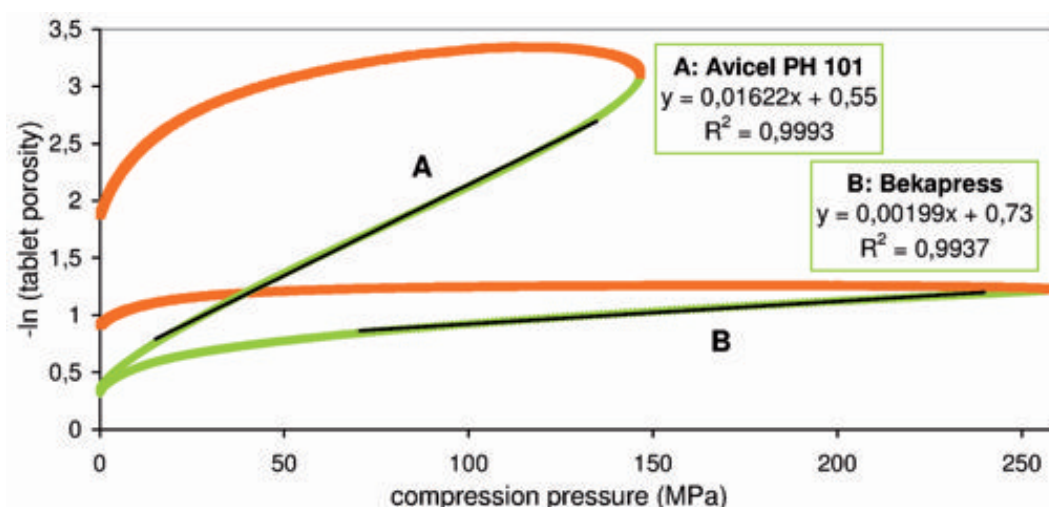


Figure 1: In-die Heckel profile of microcrystalline cellulose (Avicel® PH 101) and dicalcium phosphate (Bekapress®).

In the applicative part of the Thesis a multiple-unit tablet containing enteric-coated pellets was developed. Combinations of various approaches were used, i.e. application of different cushioning excipients and enteric coating polymers, changing the tablet shape and an additional protective coating. The tablet shape and an additional protective coating were the key elements enabling successful development of the multiple unit dosage form. The dosage form complied with Pharmacopoeial demands with regard to the dissolution (9 % out of 10 % model drug released in acidic medium), uniformity of mass, content, friability and showed sufficient hardness for packaging procedure.

Compaction has been extensively studied for over 50 years, however, the deformation and bonding mechanisms are still not fully understood. The presented PhD Thesis represents new insight, disproves some assumptions about tableting and paves the way for further research into the field.



Dr. ČRT MALAVAŠIČ

Dr. Črt Malavašič je prepričan, da je prvi pogoj za uspešno raziskovanje zanimanje za določeno področje, »tista pristna, včasih kar otroška radovednost, želja ugotoviti, kaj se med eksperimentom dogaja, in nato rezultate skrbno interpretirati ter razjasniti, zakaj se je nekaj zgodilo«. Kot še poudarja doktor znanosti iz Kranja, mora biti dober raziskovalec tudi vesten, natančen, izviren, sposoben opazovati in potrpežljiv.

Vse naštetto ga vodi na uspešni raziskovalni poti, ki jo je med študijem usmeril v heterociklično kemijo, svoj znanstveni potencial pa zdaj usmeril na delo v farmacevtskem podjetju. Ožje področje svojega raziskovanja, tj. obnašanje kiralnih diketopiperazinov v raztopini, je dr. Malavašič obravnaval tudi v nagrajeni doktorski nalogi, kjer je diketopiperazine uporabil kot kiralne solvatizirajoče reagente.

»Raziskovalno delo vsekakor terja celega človeka in se ne konča z odhodom iz laboratorija, ampak pomeni razmišljanje o delu in študij znanstvene literature tudi v prostem času,« pravi dr. Malavašič, ki obenem zatrjuje, da je treba znati potegniti tudi črto in si vsak dan odpočiti od znanstvenega dela. Tvrstni odklop najlaže doseže s telesno dejavnostjo, saj se kot nekdanji vaterpolski reprezentant še vedno nekajkrat na teden udeleži treninga. »Sprostim se tudi ob poslušanju glasbe in na kakšni kavici s prijatelji.«

»To, da industrija podeljuje nagrade za znanstvenoraziskovalno delo, je pohvalno in Krka bi morala imeti več posnemovalcev,« meni mladi znanstvenik in dodaja, da mora tovrstna nagrada raziskovalcu predstavljati spodbudo za nadaljnje delo. »Da sem med Krkinimi nagrajenci, mi pomeni osebno zadovoljstvo in seveda veliko priznanje za moje dosedanje raziskovalno delo, hkrati pa spodbudo za znanstveno delo v prihodnje. Nagrada potrjuje, da je tematika raziskovalnega dela aktualna, da je bilo delo korektno opravljeno in seveda dobro mentorsko vodeno.«

Kiralni *N*-alkilirani diketopiperazini: sinteza, interakcije in uporaba

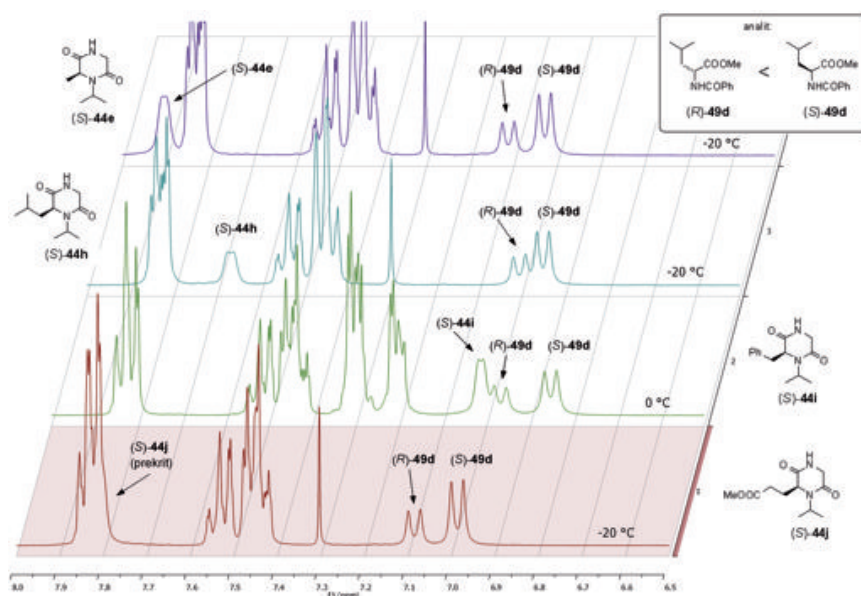
ČRT MALAVAŠIČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

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

(*S*)-1-benzil-6-metilpiperazin-2,5-dion in njegov regioizomer (*S*)-1-benzil-3-metilpiperazin-2,5-dion smo testirali kot kiralna solvativirajoča reagenta za nabor 12 racemnih *N*-benzoiliranih α -aminokislinskih estrov. Ugotovili smo, da je prva spojina primeren kiralni solvativirajoči reagent za derivate aminokislin z alkilnimi in aromatskimi stranskimi verigami in tudi metilnega estra valina, katerega aminska skupina je zaščitena s številnimi pogosto uporabljenimi zaščitnimi skupinami, pričakovano pa ni primeren reagent za β -funkcionalizirane aminokislino (asparaginska kislina, histidin, serin) in β -aminokislino. Določili smo tudi konstanto asociacije vsakega izmed enantiomerov *N*-benzoiil metilnega estra levicina in (*S*)-1-benzil-6-metilpiperazin-2,5-diona v devteriochloroformu.¹

Na osnovi (*S*)-1-benzil-6-metilpiperazin-2,5-diona smo s sistematičnim variiranjem C- in N-substituentov pripravili knjižnico 15 *N*-alkiliranih 2,5-diketopiperazinov, od teh pet z dvema centroma kiralnosti; pri tem smo razvili enostavno, učinkovito in hitro metodo *N*-monoalkiliranja aminokislinskih estrov hidrokloridov, in sicer reduktivno aminiranje z uporabo aldehydov ali ketonov in katalitskim hidrogeniranjem.² Vsi člani diketopiperazinske knjižnice delujejo kot kiralni solvativirajoči reagenti, najučinkovitejši med njimi je (*S*)-6-benzil-1-izopropilpiperazin-2,5-dion, najuporabnejši pa (*S*)-metil-3-(1-izopropil-3,6-dioksopiperazin-2-il)propanoat, ki sicer povzroči manjšo razliko kemijskih premikov amidnih protonov analita kot prvi, a za razliko od njega nima aromatskih protonov, ki lahko povzročijo prekrivanje opazovanih signalov v protonskem spektru.³

Neracemne 1,6-dialkil diketopiperazine lahko uporabimo za enostavno ugotavljanje enantiomerne sestave α -acilaminokislinskih estrov in sorodnih spojin z ¹H NMR. Na ta način smo določili enantiomerno sestavo Bz-Leu-OMe na 2 % natančno. Korelacija spremembe kemijskega premika amidnega protona α -acilaminokislinskih estrov v prisotnosti (*S*)-1,6-dialkil diketopiperazinov z absolutno konfiguracijo α -acilaminokislinskega estra nakazuje možnost uporabe omenjenih diketopiperazinov za določanje absolutne konfiguracije aminokislinskih derivatov (slika 1).³



Slika 1. Signali NH-protonov v NMR-spektru (CDCl_3 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$) enantiomerno obogatene spojine **49d** (prebitek *S*-enantiomera) v prisotnosti diketopiperazinov (*S*)-**44e,h-j**.

(S)-3-(1-izopropil-3,6-diksopiperazin-2-il)propanoil azid smo vezali na različne funkcionalizirane polimerne nosilce in tako pripravili stacionarne faze za kolonsko kromatografijo.

Literatura

1. Malavašič Č, Wagger J, Stanovnik B, Svete J. (S)-1-benzyl-3(6)-methylpiperazine-2,5-diones as chiral solvating agents for N-acylamino acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 2008; 19: 1557–1567.
2. Malavašič Č, Grošelj U, Golobič A, Bezenšek J, Stanovnik B, Stare K, Wagger J, Svete J. Synthesis and structure of novel (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones and (3S,6S)-1,3,6-trialkylpiperazine-2,5-diones. *Tetrahedron: Asymmetry* 2011; 22: 629–640.
3. Malavašič Č, Stanovnik B, Wagger J, Svete J. The effect of substituents on the chiral solvating properties of (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones. *Tetrahedron: Asymmetry* 2011; 22: 1364–1371.

Chiral *N*-Alkylated Diketopiperazines: Synthesis, Interactions and Application

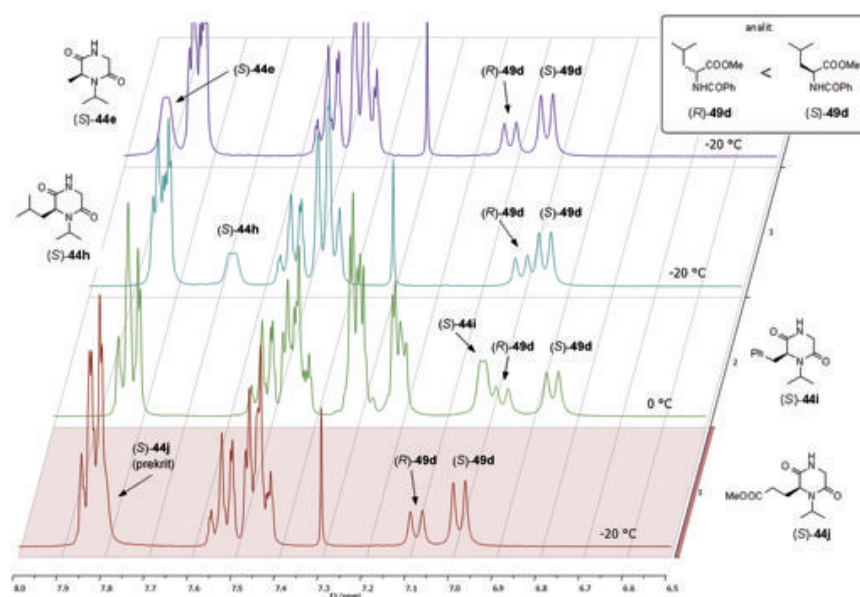
ČRT MALAVAŠIČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

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

(*S*)-1-benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione and its regioisomer, (*S*)-1-benzyl-3-methylpiperazine-2,5-dione, were tested as chiral solvating agents for 12 racemic α -acylamino acid esters. The former is appropriate chiral solvating agent for derivatives of amino acids with aliphatic and aromatic side chains and also valine methyl ester, *N*-acylated with several frequently used protecting groups, but not for β -functionalised amino acids (aspartic acid, histidine, serine) and β -amino acids. Association constant for each of the enantiomers of *N*-benzoyl leucine methyl ester and (*S*)-1-benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione in deuteriochloroform was determined.¹

A library of 15 *N*-alkylated 2,5-diketopiperazines, among them 5 with two centres of chirality, was prepared by systematic variation of C- and N-substituents of (*S*)-1-benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione. A simple, efficient and fast method of *N*-monoalkylation of amino acid esters hydrochlorides was developed, namely reductive amination by using aldehydes or ketones and catalytic hydrogenation.² All members of diketopiperazine library exhibit chiral solvating activity, (*S*)-6-benzyl-1-isopropylpiperazine-2,5-dione being the most effective and (*S*)-methyl 3-(1-isopropyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)propanoate the most suitable chiral solvating agent. The latter is causing smaller difference of the chemical shift of amidic protons of the analyte, but lacking aromatic protons, which can cause overlapping of the observed signals in proton spectra.³

Nonracemic 1,6-dialkyl diketopiperazines can be used for simple determination of enantiomeric composition of α -acylamino acid esters and related compounds by ¹H NMR. Enantiomeric composition of Bz-Leu-OMe with 2 % accuracy was determined this way. The correlation of change in chemical shift of amidic protons of α -acylamino acid esters in the presence of 1,6-dialkyl diketopiperazines indicated that the latter could also be suitable reagents for determination of absolute configuration of amino acid derivatives (Picture 1).³



Picture 1: Signals of NH protons in NMR spectra (CDCl_3 , -20°C) of enantiomerically enriched compound **49d** (*S*-enantiomer in excess) in the presence of diketopiperazines (*S*)-**44e,h-j**.

(S)-3-(1-isopropyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)propanoyl azide was attached to various functionalized polymer resins, forming stationary phases for column chromatography.

References:

1. Malavašič Č, Wagger J, Stanovnik B, Svete J. (S)-1-benzyl-3(6)-methylpiperazine-2,5-diones as chiral solvating agents for N-acylamino acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 2008; 19: 1557–1567.
2. Malavašič Č, Grošelj U, Golobič A, Bezenšek J, Stanovnik B, Stare K, Wagger J, Svete J. Synthesis and structure of novel (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones and (3S,6S)-1,3,6-trialkylpiperazine-2,5-diones. *Tetrahedron: Asymmetry* 2011; 22: 629–640.
3. Malavašič Č, Stanovnik B, Wagger J, Svete J. The effect of substituents on the chiral solvating properties of (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones. *Tetrahedron: Asymmetry* 2011; 22: 1364–1371.

Dr. JANA PETKOVIĆ



Dr. Jana Petković je naklonjenost naravoslovnim vedam kazala že v srednji šoli. Svojo usmeritev je potrdila s študijem mikrobiologije, ki je le še poglobil navdušenje nad naravoslovjem in jo pritegnil v znanstvene vode. Njena raziskovalna pot je bila vseskozi zahtevna in pestra, saj je ena izmed prvih v Sloveniji, ki se je začela ukvarjati s proučevanjem toksičnosti nanodelcev.

»Nanotehnologija že ima in bo tudi v prihodnje imela velik vpliv na naše življenje,« je prepričana raziskovalka. »Titanov dioksid, eden izmed najpogostejše uporabljenih nanodelcev, je zaradi zanimivih lastnosti vse bolj prisoten v našem življenju. Možnosti uporabe nanodelcev TiO_2 so izjemne in navdušujoče, vendar pri tem ne smemo zanemariti njihovih morebitnih škodljivih učinkov.« Kot poudarja, ugotovitve nagrajene doktorske naloge prispevajo k zapolnitvi vrzeli v znanju o vplivu nanodelcev na zdravje in okolje, prav tako lahko pomembno prispevajo k razvoju zakonodaje na področju uporabe nanomaterialov ter pri sestavi navodil za njihovo varno uporabo in ravnanje z njimi.

Raziskovalka, ki svoje delo vsekakor želi nadaljevati v znanosti, v nadaljnjih raziskavah toksičnosti nanodelcev, je vesela, da so njene ugotovitve tudi drugi prepoznali kot zanimive in koristne. To poleg objav in predavanj potrjuje tudi Krkina nagrada. Občutek, da njen trud ni bil zaman, je izjemen, hkrati pa je ponosna, da lahko med svoje dosežke od zdaj šteje tudi Krkino nagrado.

Prodorna znanstvenica bistvene lastnosti uspešnega raziskovalca vidi v vztrajnosti, prilagodljivosti, sistematičnosti in doslednosti. Znanstveni entuziazem in voljo do dela pa ji ohranja misel, da s svojimi rezultati prispeva k izpopolnjevanju znanja in izboljšanju varnosti in kakovosti življenja. »In ko človek čuti, da je njegovo delo pomembno za sočloveka in prihodnost, se oplemeniti tudi zasebno življenje,« poudarja dr. Jana Petković, ki ji prosti čas pomeni spoznavanje sebe in polnjenje baterij za nove izzive.

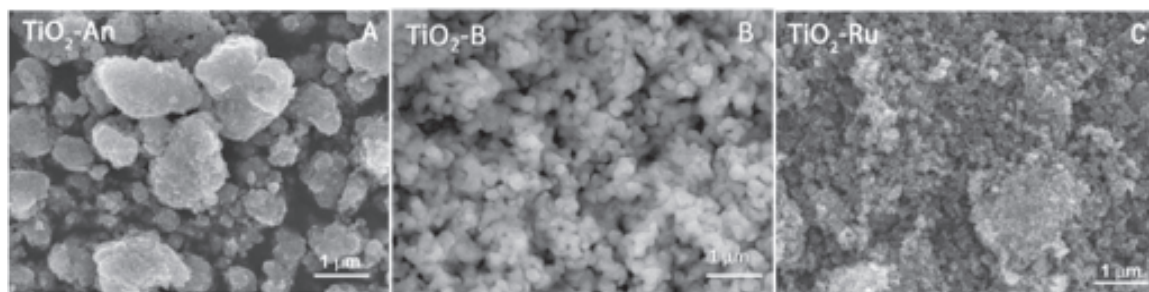
Mehanizmi toksičnega in genotoksičnega delovanja nanodelcev TiO_2

JANA PETKOVIĆ, Nacionalni inštitut za biologijo

Mentorica: Metka Filipič, Nacionalni inštitut za biologijo

Nanodelci imajo zaradi svojih dimenzij (< 100 nm) posebne lastnosti, ki omogočajo njihovo uporabo na najrazličnejših področjih. Zaradi vse večje proizvodnje in uporabe smo nanodelcem vedno bolj izpostavljeni, o njihovih učinkih na ljudi in okolje pa je zelo malo znanega. Uporaba titanovega dioksida (TiO_2) je zaradi njegove majhne toksičnosti izjemno široka. V zadnjih desetletjih se na številnih področjih, kot so kozmetika, živilska industrija, farmacija, papirna industrija, vse bolj uveljavlja uporaba nanodelcev TiO_2 . Vendar novejša raziskave kažejo, da lahko TiO_2 v obliki nanodelcev povzroča oksidativni stres, poškodbe DNK, vnetja, poškodbe jeter itn. Zaradi tega je bil naš cilj raziskati mehanizme potencialnega toksičnega in genotoksičnega delovanja delcev TiO_2 . Kot modelni celični sistem smo izbrali celično linijo človeškega hepatoma HepG2, kot modelne testne delce pa delce TiO_2 treh velikosti – dva nanovelikosti različnih kristalnih struktur (< 25 nm, anatazni: $\text{TiO}_2\text{-An}$; < 100 nm, rutilni: $\text{TiO}_2\text{-Ru}$) in enega podmikronske velikosti (~ 50 μm , anatazni podmikronski delci: $\text{TiO}_2\text{-B}$).

Pred toksikološkimi poskusi smo fizikalne lastnosti delcev dodatno okarakterizirali, kar je izjemno pomembno za pravilno interpretacijo rezultatov. Potrdili smo njihovo deklarirano velikost in kristalno obliko ter določili njihovo specifično površino, pri čemer je bila specifična površina nanodelcev več kot 10-krat večja ($\text{TiO}_2\text{-An}$ 129,3 m^2/g , $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ 116,7 m^2/g) od specifične površine delcev podmikronske velikosti ($\text{TiO}_2\text{-B}$ 8,6 m^2/g). Z elektronsko mikroskopijo in lasersko granulometrijo smo pokazali, da pri pogojih testiranja delci TiO_2 tvorijo aglomerate in agregate, katerih velikost je v mikrometrskem območju, vendar pa je bil delež delcev manjših velikosti večji pri $\text{TiO}_2\text{-An}$ kot pri $\text{TiO}_2\text{-Ru}$.



Slika 1. FEG-SEM posnetki $\text{TiO}_2\text{-An}$ (A), $\text{TiO}_2\text{-B}$ (B) in $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ (C).

Nanodelci $\text{TiO}_2\text{-An}$ in $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ kot tudi $\text{TiO}_2\text{-B}$ v sistemu s celicami HepG2 niso delovali citotoksično. Glede na to, da oksidativni stres velja za enega glavnih mehanizmov toksičnosti nanodelcev, smo raziskali vpliv nanodelcev TiO_2 na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), prelomov DNK in oksidativnih poškodb DNK. Oba tipa nanodelcev sta povzročila nastanek ROS in oksidacijo purinov, pri čemer je bil učinek $\text{TiO}_2\text{-An}$ močnejši od učinka $\text{TiO}_2\text{-Ru}$. Prelome DNK je povzročil le $\text{TiO}_2\text{-An}$. $\text{TiO}_2\text{-B}$ ni povzročil prelomov DNK in oksidativnih poškodb DNK. Oba tipa nanodelcev TiO_2 sta povzročila tudi povečano izražanje genov, ki se odzovejo na oksidativni stres, in genov, ki se odzovejo na poškodbe DNK, pri čemer je bil vpliv $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ močnejši od vpliva $\text{TiO}_2\text{-An}$. Nadalje smo pokazali, da oba tipa nanodelcev TiO_2 v celicah HepG2 povzročita povečano tvorbo znotrajceličnega glutathiona, ki ima pomembno vlogo pri zaščiti pred škodljivimi učinki ROS, in da je v celicah, v katerih smo znižali raven glutathiona, le $\text{TiO}_2\text{-An}$ povzročil nastanek prelomov DNK. Ti rezultati potrjujejo predpostavko, da nanodelci TiO_2 povzročajo genotoksične učinke prek oksidativnega stresa, ter kažejo, da se celice na izpostavljenost nanodelcem TiO_2 odzovejo z obrambnimi mehanizmi tako pri obrambi pred oksidativnim stresom kot tudi pri popravljanju poškodb DNK.

Pri tem je zanimivo, da je TiO_2 -Ru bolj aktiviral obrambne mehanizme kot TiO_2 -An, kar pojasnjuje nastanek manj ROS in manj poškodb DNK.

Procesi poškodb DNK in oksidativnega stresa so tesno povezani s procesom apoptoze. Zato nas je zanimalo, ali nanodelci TiO_2 v celicah HepG2 vplivajo na spremembe kazalnikov apoptoze. Ugotovili smo, da oba tipa nanodelcev TiO_2 vplivata na izgubo asimetrije celične membrane, vendar ob tem ne pride do spremembe mitohondrijskega membranskega potenciala. Oba tipa nanodelcev TiO_2 sta prav tako povečala izražanje genov, udeleženih pri aktivaciji apoptoze, pri čemer je bil TiO_2 -Ru močnejši aktivator izražanja genov kot TiO_2 -An. Ti rezultati nakazujejo, da nanodelci TiO_2 na procese apoptoze vplivajo tudi prek indukcije oksidativnega stresa.

S pomočjo mrež RT-qPCR smo raziskali vpliv TiO_2 -An, TiO_2 -Ru in TiO_2 -B na izražanje 94 genov, ki so povezani s celičnim odgovorom na stres (oksidativni stres, apoptoza, adhezija, proteoliza, popravljanje DNK, celična signalizacija, vročinski šok). Ugotovili smo, da so delci TiO_2 povzročili spremembe izražanja nekaterih genov antioksidantne obrambe, popravljanja DNK, proteolize, celične adhezije, apoptoze in genov, vključenih v odgovor na vročinski šok. To kaže, da tako nanodelci kot podmikronski delci TiO_2 lahko spremenijo potek signalnih poti in s tem vplivajo na osnovne celične procese.

Zaradi vse pogostejše uporabe fotokatalitskih lastnosti TiO_2 smo v vsakdanjem življenju vedno bolj izpostavljeni fotoaktiviranim delcem TiO_2 . Iz dosedanjih raziskav je znano, da se toksičnost in genotoksičnost TiO_2 v prisotnosti UV-žarkov povečata. Nas pa je zanimalo, ali se toksikološke lastnosti z UV-žarki obsevanih delcev TiO_2 razlikujejo od lastnosti neobsevanih delcev tudi v odsotnosti UV-sevanja. Zato smo anatazne nanodelce TiO_2 -An in podmikronske delce TiO_2 -B predobsevali z UV-žarki ter nato v odsotnosti UV-žarkov testirali njihovo citotoksičnost in genotoksičnost v primerjavi z neobsevanimi delci. Ugotovili smo, da se citotoksičnost in genotoksičnost z UV-žarki predobsevanih delcev drastično povečata ne glede na velikost delcev. To je pomembno novo odkritje, ki lahko tveganja zaradi izpostavljenosti delcem TiO_2 postavi v povsem novo luč. Upoštevajoč dejstvo, da je 90 % UV-žarkov, ki dosežejo površje Zemlje, v območju valovnih dolžin med 320 in 400 nm, se lahko skoraj ves v okolju prisoten TiO_2 fotoaktivira, s čimer postane nevarnejši od neobsevanega.

Te raziskave so prinesle pomembna nova spoznanja o mehanizmih toksičnega in genotoksičnega delovanja TiO_2 , ki bodo uporabna tako pri načrtovanju nadaljnjih toksikoloških raziskav kot tudi pri ocenjevanju tveganj in načrtovanju ustreznih preventivnih ukrepov pri izpostavljenosti ljudi.

Mechanisms of Toxicity and Genotoxicity of TiO₂ Nanoparticles

JANA PETKOVIĆ, *National Institute of Biology*
Supervisor: Metka Filipič, *National Institute of Biology*

Because of their small size, nanoparticles (<100 nm) have unique properties compared with their larger counterparts, which enable their applications in many areas. Lately, they are causing increased concern due to their greater production and potential release into the environment, while our knowledge on their potential adverse effects on humans and environment remains very limited. Titanium dioxide (TiO₂) is a widely used material, since the submicron-sized TiO₂ particles (>100 nm) have been classified as biologically inert. In the past decade submicron-sized TiO₂ particles are being constantly replaced with TiO₂ nanoparticles in many areas (production of cosmetics, food, paints, paper, etc.). However, recent studies have shown that nano-sized TiO₂ can cause oxidative stress, DNA damage, inflammation, liver damage etc. Due to that the aim of our study was to explore mechanisms of toxic and genotoxic potential of TiO₂ particles. As a test system we used human hepatoma cell line HepG2, and as model particles we used two sizes of TiO₂ nanoparticles with different crystalline structure (<25 nm, anatase: TiO₂-An, <100 nm, rutile: TiO₂-Ru) and one submicron size (~50 µm, anatase: TiO₂-B).

Before toxicological experiments we additionally characterized physical properties of TiO₂ particles, which is of extreme importance for correct interpretation of results. We confirmed their declared size and crystalline structure, and we also determined their specific surface area, which was 10x larger for TiO₂ nanoparticles (129,3 m²/g for TiO₂-An and 116,7 m²/g for TiO₂-Ru) in comparison with submicron-sized TiO₂ (8,6 m²/g for TiO₂-B). With the electron microscopy and laser granulometry we showed that under the applied exposure conditions the particles were agglomerated/aggregated, with the size of agglomerates/aggregates in the micrometer range. However, portion of smaller particles was higher in the case of the TiO₂-An than in TiO₂-Ru.

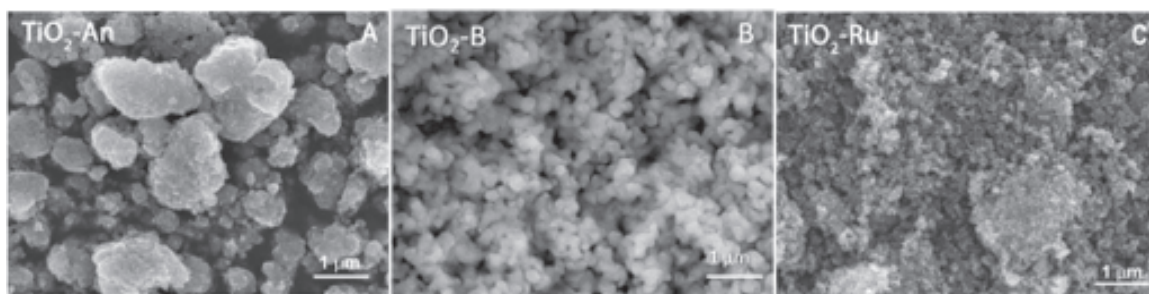


Figure 1: FEG-SEM images of the TiO₂-An (A), TiO₂-B (B) and TiO₂-Ru (C).

In test system with HepG2 cells TiO₂-An, TiO₂-Ru and TiO₂-B were not cytotoxic. Since it is generally believed that the toxicity of NPs is due predominantly to the oxidative stress, we studied influence of TiO₂-An and TiO₂-Ru on generation of intracellular reactive oxygen species (ROS), DNA strand breaks and oxidative DNA damage. Both types of nanoparticles caused increased production of ROS and oxidation of purines, with TiO₂-An being stronger inducer. Only TiO₂-An caused induction of DNA strand breaks, while TiO₂-B did not show any genotoxic potential. Both types of TiO₂ nanoparticles up-regulated mRNA expression of oxidative stress-related genes and DNA damage-responsive genes, with TiO₂-Ru being stronger inducer than TiO₂-An. Furthermore, we showed that both types of TiO₂ nanoparticles in HepG2 cells cause increase in the level of intracellular glutathione content, which has important role in cell protection against ROS. In glutathione depleted cells only TiO₂-An caused significant increase in DNA damage. These results confirm our assumption that oxidative stress is responsible for DNA damage caused by TiO₂ nanoparticles and they also show that cells respond to exposure to TiO₂ nanoparticles with triggering their oxidative stress- and DNA damage-defence mechanisms. It is interesting that exposure of HepG2 cells to TiO₂-Ru caused

stronger activation of defence mechanisms than exposure to $\text{TiO}_2\text{-An}$, which explains smaller amounts of ROS and lesser extent of DNA damage after exposure to $\text{TiO}_2\text{-Ru}$.

DNA damage and oxidative stress are narrowly connected to apoptosis. For this reason we wanted to see whether TiO_2 nanoparticles in HepG2 cells influence on changes in apoptosis markers. Results showed that both types of TiO_2 nanoparticles caused loss of cell membrane asymmetry, but none of them influenced mitochondrial membrane potential. Also both types of TiO_2 nanoparticles increased expression of genes, involved in activation of apoptosis, with $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ being more potent activator than $\text{TiO}_2\text{-An}$. These results indicate that TiO_2 nanoparticles influence on apoptosis through induction of oxidative stress.

Because of the lack of information on the molecular mechanisms of toxic potential of nano- and submicron-sized TiO_2 particles, we studied effects of $\text{TiO}_2\text{-An}$, $\text{TiO}_2\text{-Ru}$ and $\text{TiO}_2\text{-B}$ on the mRNA expression of 94 stress-response genes, which are involved in response to oxidative stress, apoptosis, adhesion, proteolysis, DNA repair, cell signalisation and heat shock. Results showed that TiO_2 particles caused changes in expression of certain genes, involved in antioxidant defence, proteolysis, DNA repair, cell adhesion, heat shock stress response and apoptosis. We have shown that both, nano- and submicron-sized TiO_2 particles can interfere with cellular signalling pathways and with these affect basic cellular processes.

Because of the growing number of applications of TiO_2 photocatalysis, in our daily life we are more and more often exposed to photocatalytically (with UV) activated anatase particles of TiO_2 . Studies have shown that in the presence of UV irradiation toxicity and genotoxicity of TiO_2 is higher. In our study we wanted to see whether toxicological properties of UV-irradiated TiO_2 particles differ from non-irradiated in the absence of UV irradiation. Because of that we pre-irradiated anatase nano- and submicron-sized TiO_2 particles with UV and then, after the UV irradiation has been discontinued, we tested their cyto- and genotoxicity in comparison with non-irradiated particles. We have shown that cyto- and genotoxic potential of UV pre-irradiated TiO_2 anatase particles drastically increases, irrespective of the particle size. This is important new discovery which gives us a whole new perspective on the consequences and risks of exposure to TiO_2 particles. Considering that ~90% of the UV light that reaches the surface of the earth shows a UV spectrum with wavelengths of 320–400 nm, almost all of the TiO_2 present in the environment that is not specifically protected from this UV can be photo-activated, and become potentially more dangerous in comparison to non-photo-activated TiO_2 .

Results of our study have contributed important new insights into mechanisms of toxicity and genotoxicity of TiO_2 , and warrants further studies as it has important implications for environmental and human health risk assessment and preventive actions to limit human exposure.

Dr. ROMAN ŠINK



»Kemija me je od nekdaj zanimala in z veseljem sem vsako leto obiskoval kemijske krožke ter se udeleževal tekmovanj,« se svojih začetkov spominja Preglov nagrajenec in zlati maturant iz Zagorja. Raziskovalno pot zdaj že dobro desetletje nadaljuje na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani.

Dr. Roman Šink je prepričan, da mora biti raziskovalec pri svojem delu predvsem zbran in vztrajen, včasih pa tudi malce trmast, da se prebije do želenega cilja. »Pomembno je, da znaš improvizirati in potegniti tudi iz na prvi pogled neuspešnih poskusov kaj koristnega.« To mu je uspelo tudi v nagrajeni doktorski nalogi, katere osnovno poslanstvo je bila predstavitev problematike proti antibiotikom odpornih bakterij.

»V nalogi smo na akademski ravni načrtovali in sintetizirali spojine, ki bi lahko učinkovale kot nova protibakterijska zdravila na do sedaj slabo izkoriščenih tarčah. Pomembna odkritja so novi zaviralci bakterijskih encimov iz družine ligaz Mur. Moj najpomembnejši prispevek so novi strukturni podatki o vezavi teh zaviralcev na aktivno mesto encima MurD, predstavljeni z novimi kristalnimi strukturami visoke ločljivosti,« razlaga znanstvenik, ki svoje delo nadaljuje v okviru mednarodnega projekta, katerega cilj je razviti nova zdravila za zdravljenje tuberkuloze. »Trenutno je vsa moja raziskovalna energija usmerjena v ta projekt, in če se bo moje ime kdaj omenjalo v povezavi z novo odkritim zdravilom, bo to izjemen uspeh.«

Mladi raziskovalec, ki se v prostem času najraje druží s prijatelji, hodi v hribe in smuča, ocenjuje, da v Sloveniji manjka povezav med industrijo in fakultetami ter ostalimi izobraževalnimi ustanovami. Kot pravi, je Krka, ki s svojimi nagradami nagrajuje trud raziskovalcev na začetku kariere, lahko zgled drugim podjetjem. »Zelo sem ponosen, da sem del izbrane družbe Krkinih nagrajencev. To mi daje osebno zadovoljstvo, saj je bilo moje raziskovalno delo opaženo in prepoznano kot dobro tudi zunaj meja fakultete.«

Načrtovanje, sinteza in kristalografske študije inhibitorjev ligaz Mur

ROMAN ŠINK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Anamarija Zega, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Bakterijska rezistenca postaja vse večji problem, saj ne poznamo več praktično nobenega bakterijskega seva, ki še ni razvil rezistence proti protibakterijskim učinkovinam. Zaradi pojava rezistentnih in multirezistentnih bakterij je veliko raziskav usmerjenih v identifikacijo in validacijo novih tarč, na katere bi lahko delovale nove protibakterijske učinkovine. Peptidoglikan je esencialna komponenta bakterijske celice in skupaj z biosintezniimi potmi, po katerih nastaja, predstavlja zelo privlačno tarčo za načrtovanje protibakterijskih učinkovin. Biosinteza peptidoglikana se začne v citoplazmi bakterije, kjer se sintetizirajo prekursorji, ki se prenesejo skozi citoplazemsko membrano in vgradijo v obstoječi peptidoglikan. Znotrajcelični encimi, med katere spadajo encimi iz družine ligaz Mur, so slabo izkoriščeni kot tarče za nove protibakterijske učinkovine.

V okviru doktorske dizertacije smo na podlagi dejstva, da *N*-acilhidrazoni delujejo protibakterijsko, sintetizirali knjižnico spojin z *N*-acilhidrazonskim skeletom in odkrili spojino, ki deluje protibakterijsko in zavira ligazi MurC in MurD iz bakterije *E. coli*, in še nekaj spojin, ki zavirajo ligazo MurC (tabela 1).¹

Ker lahko spojine, ki imajo v strukturi *N*-acilhidrazonski strukturni element, nespecifično zavirajo encime, smo v literaturi ta problem podrobno raziskali in ob upoštevanju modifikacij v testnih sistemih ugotovili, da naše spojine specifično zavirajo ligaze Mur.²

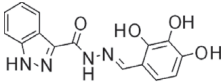
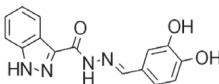
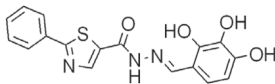
Zaviralec	 1	 3	 24
IC ₅₀	123 μM (MurC) 230 μM (MurD)	332 μM (MurC)	32 μM (MurC)
MIC	128 μg/ml (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)	> 128 μg/ml (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)	64 μg/ml (<i>S. aureus</i>)

Tabela 1. *N*-acilhidrazonski zaviralci ligaz Mur.

V drugem delu doktorske dizertacije smo načrtovali zaviralce ligaz Mur z aminosulfonilsečninskim strukturnim elementom, ki je mimetik difosfatnega strukturnega elementa, prisotnega v nukleotidnih substratih, ki vstopajo v encimske reakcije, ki jih katalizirajo ligaze Mur. Zato smo sintetizirali knjižnico aminosulfonilsečnin,³ ki bi potencialno zavirale ligaze Mur. Biološki testi niso potrdili napovedi, pridobljenih s sidranjem v aktivno mesto encimov, saj nobeni spojini nismo določili vrednosti IC₅₀, nižje od 500 μM.

V tretjem delu doktorske dizertacije smo z metodo makromolekularne kristalografije neposredno določili način vezave zaviralcev na aktivno mesto ligaze MurD. S kristalografskimi študijami smo razrešili sedem novih kristalnih struktur visoke ločljivosti ligaze MurD v kompleksu s tiazolidin-2,4-dionskimi in rodaninskimi spojinami, ki imajo v strukturi D-glutaminsko kislino, in naftalensulfonamidi, ki imajo v strukturi rigidiziran mimetik D-glutaminske kisline.⁴⁻⁷

Ugotovili smo, da se rodaninski in tiazolidin-2,4-dionski obroč vežeta na vezavno mesto uracila nukleotidnega substrata (slika 1A).⁴

Kristalna struktura z rigidiziranim mimetikom D-glutaminske kisline nam je razkrila, da karboksilni skupini 4-amino-cikloheksil-1,3-dikarboksilnega dela zasedata identično mesto kot karboksilni skupini produkta encimske reakcije MurD UMAG (slika 1B).⁵

Poleg kristalov ligaze MurD z zaviralcem v aktivnem mestu smo pripravili tudi kristale MurD pri

Figure 1 consists of two panels, A and B, showing the crystal structure of the 100S ribosome. Panel A shows the 100S ribosome with the 16S rRNA in purple and 23S rRNA in light blue. Panel B shows the 100S ribosome with the 16S rRNA in purple and 23S rRNA in light blue. Both panels show the 100S ribosome structure with various helices and residues labeled.

V doktorski dizertaciji smo dokazali, da *N*-acilhidrazoni zavirajo ligaze Mur in delujejo šibko protibakterijsko. S kristalnimi strukturami visoke ločljivosti kompleksa ligaze MurD z zaviralcem smo razkrili podrobnosti vezave zaviralcev na aktivno mesto ligaze MurD. Razrešili smo prvo kristalno strukturo ligaze MurD v kompleksu z zaviralcem, ki v strukturi nima glutaminske kisline, temveč njen rigidiziran mimetik. Razsvetlili smo katalitični mehanizem ligaze MurD in definirali novo potencialno mesto za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin. Rezultati, dobljeni v doktorski dizertaciji, dajejo spodbudna izhodišča za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo zaviralcev ligaz Mur in s tem tudi novih protibakterijskih učinkovin.

1. Šink, R.; Kovač, A.; Tomašić, T.; Rupnik, V.; Boniface, A.; Bostock, J.; Chopra, I.; Blanot, D.; Peterlin Mašič, L.; Gobec, S.; Zega, A. Synthesis and Biological Evaluation of N-Acylhydrazones as Inhibitors of MurC and MurD Ligases. *ChemMedChem*. 2008, 3: 1362–1370.
2. Šink, R.; Gobec, S.; Pečar, S.; Zega, A. False positives in the early stages of drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 2010, 17: 4231–4255.
3. Šink, R.; Zega, A. Simple and effective preparation of amino sulfonylureas from amino acids: application to the synthesis of amino sulfonylurea-containing peptidomimetics. *Tetrahedron Lett.* 2008, 49: 3943–3945.
4. Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Rupnik, V.; Kovač, A.; Turk, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Zega, A.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. Discovery of Novel 5-Benzylidenethiazolidine and 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Inhibitors of MurD Ligase. *J. Med. Chem.* 2010, 53: 6584–6594.
5. Sosič, I.; Barreateau, H.; Simčič, M.; Šink, R.; Cesar, J.; Zega, A.; Golič Grdadolnik, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Amoroso, A.; Joris, B.; Blanot, D.; Gobec, S. Second-generation sulfonamide inhibitors of MurD. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46: 2880–2894.
6. Tomašić, T.; Zidar, N.; Šink, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Mašič, L. Structure-based design of a new series of D-Glutamic acid-based inhibitors of bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD). *J. Med. Chem.* 2011, 54: 4600–4610.
7. Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Kovač, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. New 5-Benzylidenethiazolidin-4-one Inhibitors of Bacterial MurD Ligase: Design, Synthesis, Crystal Structures, and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, v tisku.
8. Šink, R.; Kotnik, M.; Zega, A.; Barreateau, H.; Gobec, S.; Blanot, D.; Dessen, A.; Contreras-Martel, C. Domain flexibility regulates ligand recognition in MurD ligase. *Poslan v objavo*.

Design, Synthesis and Crystallographic Studies of Inhibitors of Mur Ligases

ROMAN ŠINK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Anamarija Zega, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Bacterial resistance has become a major concern in public health since, basically, for every antibacterial drug a bacterium exists that has developed resistance to it. Because of the appearance of resistant and multi-resistant bacteria a lot of effort is put into finding and identifying new antibiotic targets. Bacterial cell wall, consisting of peptidoglycan, is an essential part of bacteria which, together with its biosynthetic pathways, constitutes an attractive target for new antibacterial drugs. Biosynthesis of peptidoglycan originates in the cytoplasm with the synthesis of peptidoglycan precursors that are transported across the cytoplasmic membrane and then incorporated into existing peptidoglycan. So far, targeting of the cytoplasmic enzymes, among which are the enzymes of Mur ligase family, has not resulted in many new antibacterial drugs.

Since *N*-acylhydrazones have been described as antibacterial agents, we designed and synthesized a series of compounds based on published *N*-acylhydrazone structures with antibacterial activity. The most successful compound of the series expressed weak antibacterial activity and inhibited *E. coli* MurC and MurD with some other *N*-acylhydrazones inhibited MurC (Table 1).¹ *N*-acylhydrazone scaffold is reported as being problematic, since *N*-acylhydrazones exhibit non-specific inhibition. Possible mechanisms of non-specific inhibition were identified, based on literature reports, together with procedures for excluding non-specific inhibition in the assay system.²

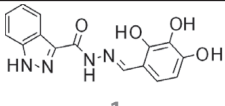
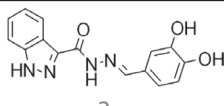
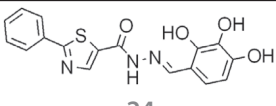
Inhibitor	 1	 3	 24
IC ₅₀	123 μM (MurC) 230 μM (MurD)	332 μM (MurC)	32 μM (MurC)
MIC	128 μg/ml (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)	> 128 μg/ml (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)	64 μg/ml (<i>S. aureus</i>)

Table 1: *N*-acylhydrazone inhibitors of Mur ligases

Aminosulfonylurea has been reported as a mimetic of the diphosphate moiety. Since ATP and nucleotide substrates that enter the reactions catalyzed by Mur ligases include the diphosphate moiety in their structures, we designed and synthesized a series of aminosulfonylureas as potential inhibitors of Mur ligases.³ We predicted the binding mode of these compounds with docking studies, but when compounds were assayed for biological activity none exhibited an IC₅₀ below 500 μM.

We investigated the binding mode of Mur ligase inhibitors by X-ray crystallography and solved seven co-crystal structures of *E. coli* MurD complexed with thiazolidine-2,4-dione and rhodanine inhibitors containing glutamic acid in their structures and naphthalenesulfonamide inhibitors containing rigid glutamic acid mimetic in the structure.⁴⁻⁷ Thiazolidine-2,4-dione and the rhodanine ring were found to bind into the uracil binding pocket for the nucleotide substrate of MurD (Figure 1A).⁴ The structure of MurD complexed to naphthalenesulfonamide inhibitor containing a rigid mimetic of glutamic acid revealed that the carboxylic groups of the 4-amino-cyclohexyl-1,3-dicarboxylic moiety bind in the same manner as those of UMAG – the product of the reaction catalyzed by MurD (Figure 1B).⁵

We crystallized MurD at different conditions and discovered two new MurD structures that were not in line with expectations – a *semi*-closed structure of apo MurD and a *semi*-open structure of MurD with substrates bound in its active site. We proved that binding of the substrates is not necessarily obligatory for the rigid body C-terminal domain rotation.⁸

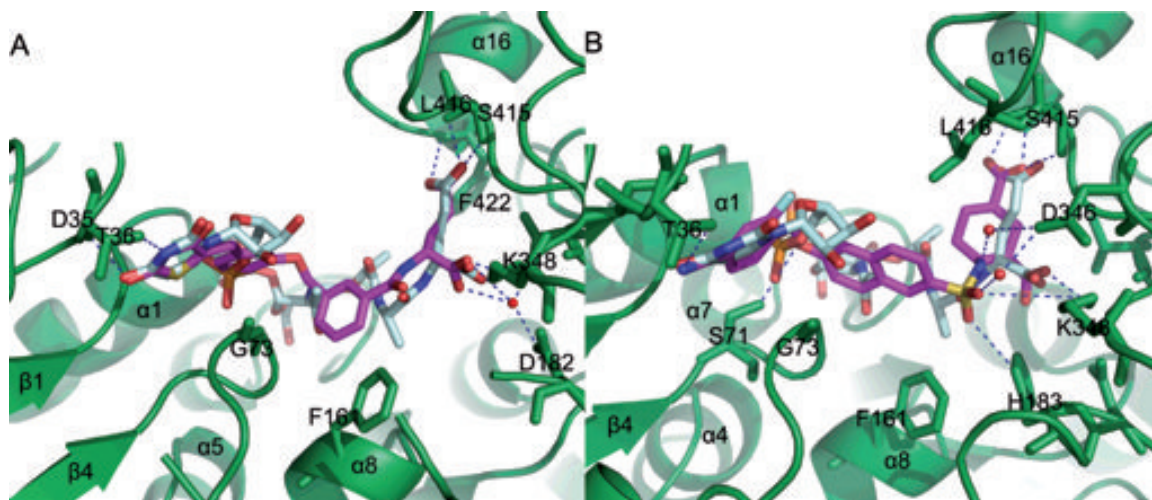


Figure 1. Crystal structures of: A: thiazolidine-2,4-dione based inhibitor; B: naphthalene-sulfonamide inhibitor of MurD.

Within the doctoral thesis we proved that *N*-acylhydrazones inhibit Mur ligases and express mild antibacterial activity. The novel high resolution co-crystal structures and the first co-crystal structure of MurD complexed to an inhibitor that does not contain glutamic acid in its structure provide new structural understanding of the binding mode of MurD inhibitors. We obtained new understanding of the catalytic mechanism and defined a new potential drug target within the enzyme. The above results constitute a promising starting point for further development and optimization of Mur ligases inhibitors and hence the new antibacterial drugs.

References

- Šink, R.; Kovač, A.; Tomašić, T.; Rupnik, V.; Boniface, A.; Bostock, J.; Chopra, I.; Blanot, D.; Peterlin Mašič, L.; Gobec, S.; Zega, A. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Acylhydrazones as Inhibitors of MurC and MurD Ligases. *ChemMedChem*. 2008, 3: 1362–1370.
- Šink, R.; Gobec, S.; Pečar, S.; Zega, A. False positives in the early stages of drug discovery. *Curr. Med. Chem*. 2010, 17: 4231–4255.
- Šink, R.; Zega, A. Simple and effective preparation of amino sulfonylureas from amino acids: application to the synthesis of amino sulfonylurea-containing peptidomimetics. *Tetrahedron Lett*. 2008, 49: 3943–3945.
- Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Rupnik, V.; Kovač, A.; Turk, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Zega, A.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. Discovery of Novel 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Inhibitors of MurD Ligase. *J. Med. Chem*. 2010, 53: 6584–6594.
- Sosič, I.; Barreateau, H.; Simčič, M.; Šink, R.; Cesar, J.; Zega, A.; Golič Grdadolnik, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Amoroso, A.; Joris, B.; Blanot, D.; Gobec, S. Second-generation sulfonamide inhibitors of MurD. *Eur. J. Med. Chem*. 2011, 46: 2880–2894.
- Tomašić, T.; Zidar, N.; Šink, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Mašič, L. Structure-based design of a new series of D-Glutamic acid-based inhibitors of bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD). *J. Med. Chem*. 2011, 54: 4600–4610.
- Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Kovač, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. New 5-Benzylidenethiazolidin-4-one Inhibitors of Bacterial MurD Ligase: Design, Synthesis, Crystal Structures, and Biological Evaluation *Eur. J. Med. Chem*. 2011. In print.
- Šink, R.; Kotnik, M.; Zega, A.; Barreateau, H.; Gobec, S.; Blanot, D.; Dessen, A.; Contreras-Martel, C. Domain flexibility regulates ligand recognition in MurD ligase. In print.



Dr. KARMEN TESKAČ PLAJSŠEK

Nanotehnologijo, primarno področje njenega raziskovanja, je Ptujčanka dr. Karmen Teskač Plajnšek začela poglobljeno spoznavati in raziskovati na Fakulteti za farmacijo, kjer je tudi doktorirala. Kot se v svojem pozitivnem razmišljanju rada pošali, gre za področje, ki po obsegu ni prav nič »nano«, saj več, kot vemo, še več spet ne vemo.

»Nanotehnologija in predvsem njeni produkti (nanodelci) so na eni strani navdušujoči, po drugi strani pa vzbujajo strah,« meni raziskovalka, ki je pri svojem dosedanjem delu preresetala kar nekaj kritičnih točk na poti razvijanja terapevtskih nanodelcev. »Osnovno sporočilo moje doktorske naloge je, da so samo tisti nanodelci, ki so netoksične sestave in katerih lokalizacijo v biološkem sistemu poznamo, uporabni za dostavo zdravilnih učinkovin na obolelo mesto in tako lahko neposredno povečajo terapevtski učinek.«

Tudi zdaj, ko je zamenjala delovno okolje, kot farmacevtka trdno zagovarja varstvo in zdravje ljudi, zato ji je v veselje sodelovati pri razvoju in pripravi produkta, ki ustreza njenim načelom. »Vedno novi izzivi me ob uspešnem delu nagradijo tudi z osebnim zadovoljstvom,« pravi doktorica znanosti, ki razloge za raziskovalno pot pripisuje tudi svoji vztrajnosti, usmerjenosti k uporabnim rezultatom, odprtosti za predloge in sodelovanju z raziskovalci z drugih področij. Ob delovno natrpanih dnevih ji veliko pozitivne energije, spodbud in razumevanja dajeta tudi mož in sin.

Krkine nagrade vidi kot gonilno silo številnih raziskovalnih del, ki po eni strani odgovarjajo na številna vprašanja, po drugi pa odpirajo nova, ki so izziv naslednjim generacijam. »Veseli me, da Krkine nagrade dopuščajo pristop najrazličnejšim raziskovalcem in tako podpirajo interdisciplinarno delo. Nagrada mi pomeni veliko potrditev, da je opravljeno raziskovalno delo dobro in zanimivo tudi več kot le meni in mentorici prof. dr. Julijani Kristl, ki je z neprestanim bdenjem okvir tega nanotehnološkega mozaika.«

Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odgovorom

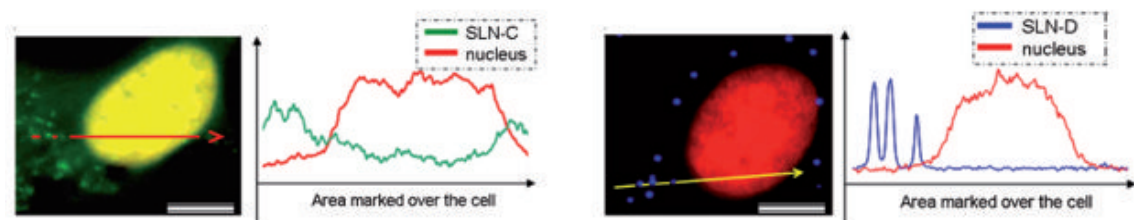
KARMEN TESKAČ PLANJŠEK, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

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

Nanodelci (ND) so sistemi nanometrskih velikosti, ki so se v zadnjih letih pokazali kot pomembna novost v sodobni medicini tako v preventivi kot diagnostiki in zdravljenju. Paleta ND je danes zelo pestra in prav tako številne so tudi tehnike za njihovo vrednotenje: fotonska korelacijska spektroskopija, Dopplerjeva anemometrija, elektronska mikroskopija, mikroskopija na atomsko silo, diferenčna dinamična kalorimetrija idr. Kljub številnim prednostim lahko ND zaradi edinstvenih lastnosti (majhnost, velika površina, povečana površinska reaktivnost) hitro preidejo mejo citotoksičnosti.

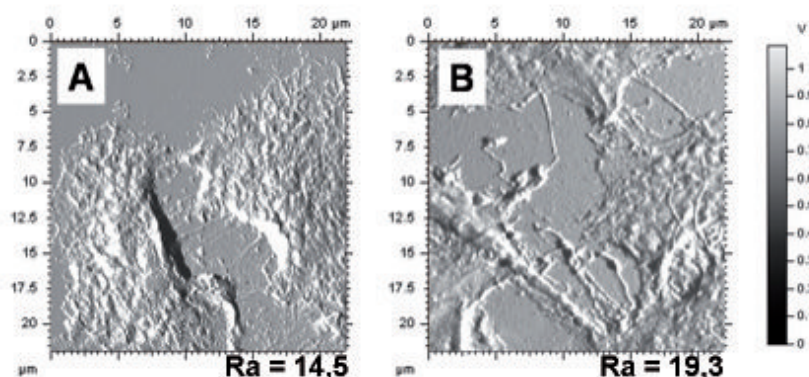
Pri proučevanju anorganskih ND (ZnO in TiO_2) ter organskih ND (trdni lipidni nanodelci, SLN), stabiliziranih z različnimi površinskimi molekulami, smo ugotovili, da ND TiO_2 in SLN, stabilizirani z lutolom, na celicah niso povzročili pomembnejših neželenih učinkov. Nasprotno pa so ND ZnO in SLN, stabilizirani s tiloksapolom, povzročili citotoksičen učinek, izražen kot slabša celična rast, preživetje, metabolna aktivnost, radikalski status, spremenjena morfologija celic ter poškodbe DNK, ki se je stopnjeval s časom izpostavljenosti in povečevanjem koncentracije ND.^{1,2}

Potem ko smo opredelili toksikološki profil ND, lahko nadaljujemo z njihovo aplikacijo v biološki sistem, predvsem z dostavo zdravilne učinkovine (ZU) na mesto delovanja.³ Spremljanje SLN na njihovi poti v znotrajcelično področje smo realizirali z učinkovitim fluorescenčnim označevanjem SLN ter celičnih struktur in z napredno tehniko mikroskopiranja (slika 1).⁴



Slika 1. Pomen ustreznega fluorescenčnega označevanja ND za njihovo uspešno znotrajcelično vizualizacijo. Grafa ob slikah prikazujeta spreminjanje fluorescence (zeleno – SLN-C, modro – SLN-D, rdeče – jedro) na območju, ki je na sliki označeno s puščico (*levo*). SLN, pobarvani s 6-kumarinom (SLN-C), so težje razpoznavni zaradi hitrega prehajanja barvila iz ND (na grafu kot široki piki zelene fluorescence) (*desno*). Nasprotno pa so SLN, pobarvani s 14-DACA (SLN-D), razločno vidni (*na grafu kot ločeni piki modre fluorescence*), saj se barvilo zadrži v ND. Merilo je 10 μm .

Slike smo ovrednotili kvalitativno in kvantitativno z določanjem kolokalizacije SLN in določenih celičnih struktur (lizosomov, mitohondrijev, jedra, aktina) in z analizo njihovih profilov jakosti fluorescence. Ugotovili smo, da SLN hitro prehajajo skozi celične membrane, se dinamično gibajo po znotrajceličnem prostoru in se lokalizirajo pretežno ob jedru. Majhen delež SLN zaide med aktinske filamente, v mitohondrije in tudi v nanotubularne medcelične povezave. Izkazalo se je tudi, da imajo celice, ki so jim bili dodani ND, več nanotubularnih medceličnih povezav od kontrolnih (slika 2).⁵



Slika 2. AFM-slika celic, ko so bile 24 ur izpostavljene SLN (B). V primerjavi s kontrolnimi celicami (A) imajo več nanotubularnih medceličnih povezav, kar potrjuje tudi analiza hrapavosti površine (average roughness, Ra).

Šele tisti ND, ki so primerne (netoksične) sestave in koncentracije in katerih znotrajcelično lokalizacijo poznamo, so uporabni kot dostavni sistemi za ZU. Veliko obetajoča naravna učinkovina, ki je učinkovita predvsem pri visoki radikalski gostoti, je resveratrol (RSV). Intrinzične lastnosti RSV, ki slabijo njegovo biološko uporabnost (slaba vodotopnost, fotoobčutljivost idr.), smo obšli z vgrajevanjem RSV v lipofilne ND (npr. SLN, liposome). Pri proučevanju celičnega odziva na prisotnost samega RSV in dostavljenega s pomočjo ND smo pri slednjih poleg povečane celične obrambe v stresni situaciji ugotovili še prispevek nanodostavnega sistema na dveh nivojih. Najprej smo z ND zaščitili sam RSV pred zunanjimi »uničevalnimi« dejavniki, potem pa smo zaščitili tudi celice pred visoko koncentracijo RSV, ki deluje citotoksično.⁶⁻⁸

Če povzamemo, v doktorskem delu je teoretično (uvod) in praktično (poglavja 1–8) predstavljena pot do idealnih ND. Ti so hkrati netoksični, se locirajo na želeno mesto v biološkem okolju, prenesejo ZU na določeno znotrajcelično mesto (najbolje na mesto delovanja ZU), ohranijo terapevtsko učinkovitost vgrajene ZU ter zmanjšajo njeno morebitno toksičnost.

Literatura

1. Kristl J, Teskač K, Milek M, Mlinarič-Raščan I. Surface active stabilizer Tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells. *Toxicol appl pharmacol* 2008; 232 (2): 218-225.
2. Kocbek P, Teskač K, Eedani-Kreft M, Kristl J. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small* 2010; 6 (17): 1908-1917.
3. Teskač K, Kocbek P, Erdani Kreft M, Kristl J. Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin. Sprejet za objavo v *Zdravniškem vestniku*.
4. Teskač Plajnshek K, Kristl J, Pajk S, Pečar S, Srčič S. A novel fluorescent probe for more effective monitoring of nanosized drug delivery systems within the cells. Poslan v objavo.
5. Teskač Plajnshek K, Erdani Kreft M, Govedarica B, Srčič S, Kristl J. Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their transfer between cells over tunneling nanotubes. Pripravljen za objavo.
6. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int j pharm* 2008; 363 (1-2): 183-191.
7. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramovič Z, Šentjurs M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur j pharm biopharm* 2009; 73 (2): 253-259.
8. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int j pharm* 2010; 390 (1): 61-69.

Interplay Between Surface Characteristics of Nanoparticles, Cellular Uptake and Biological Response

KARMEN TESKAČ PLAJSŠEK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Julijana Kristl, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Nanoparticles (NPs) are nanosized systems, which have been shown as an important novelty in a medicine on the area of prevention, diagnostic and treatment. The pallet of NPs is very colorful and various are also techniques for their characterization: photon correlation spectroscopy, Doppler anemometry, electron microcopy, atomic force microscopy (AFM), differential dynamic calorimetry, etc. Despite of numerous advantages of NPs, they can quickly cross the limit of cytotoxicity due to their unique characteristics (size, large surface area, higher surface reactivity).

In a study of inorganic NPs (ZnO and TiO₂) and organic NPs (solid lipid nanoparticles - SLN), stabilized with different surface molecules, we discovered, that NPs of TiO₂ and SLN, stabilized with lutrol, cause any significant undesired effects on the cells. Contrary, NPs of ZnO and SLN, stabilized with tyloxapol, caused cytotoxic effect, expressed as worse cell growth, viability, metabolic activity, radical status, cell morphology and DNA injury, which elevated with time of exposure to the NPs and concentration of NPs.^{1,2}

After determination of toxicological profile of NPs, we can continue with their application in biological system, especially to deliver a drug to its action site.³ Accompanying of SLN on their way into intracellular area was realized by efficient fluorescent labeling of SLN and cellular structures and by using of advanced microscopic technique (Figure 1).⁴

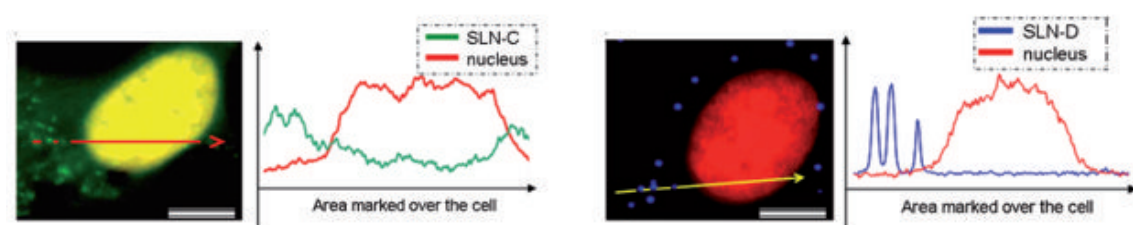


Figure 1: Importance of appropriate fluorescence labeling of NPs for their successful intracellular visualization. Graphs, next to the pictures, represent relative fluorescence intensity of nanoparticles (green – SLN-C, blue – SLN-D) and nuclei (red) regarding the arrow marked on the fluorescence picture. (left) SLN, labeled with 6-coumarin (SLN-C) are difficult to recognize due to the fast releasing of label outside (on the graph seen as broad peaks of green fluorescence). (right) Oppositely, SLN labelled with 14-DACA (SLN-D) are distinctly seen (on the graph as sharp separated peaks of blue fluorescence). Bar is 10 μ m.

The images were evaluated qualitatively and quantitatively – by determining co-localization of SLN and defined cellular structures (lysosomes, mitochondria, nuclei, actin) and by analysis of their fluorescence intensity profiles. We found out that SLN quickly cross over the cell membrane, move dynamically in intracellular space and finally localize near the nuclei. Low percentage of SLN was integrated between actin fibres and mitochondria, moreover, some SLN were found also in the nanotubular intercellular connections. Moreover, it was shown, that cells treated with SLN have more nanotubular intercellular connections in comparison to non-treated cells (Figure 2).⁵

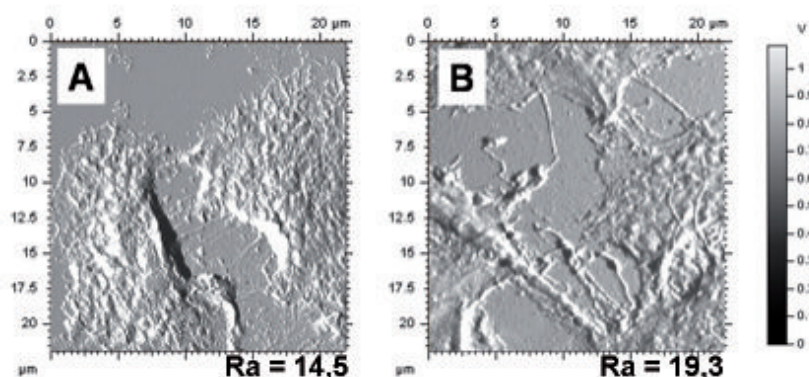


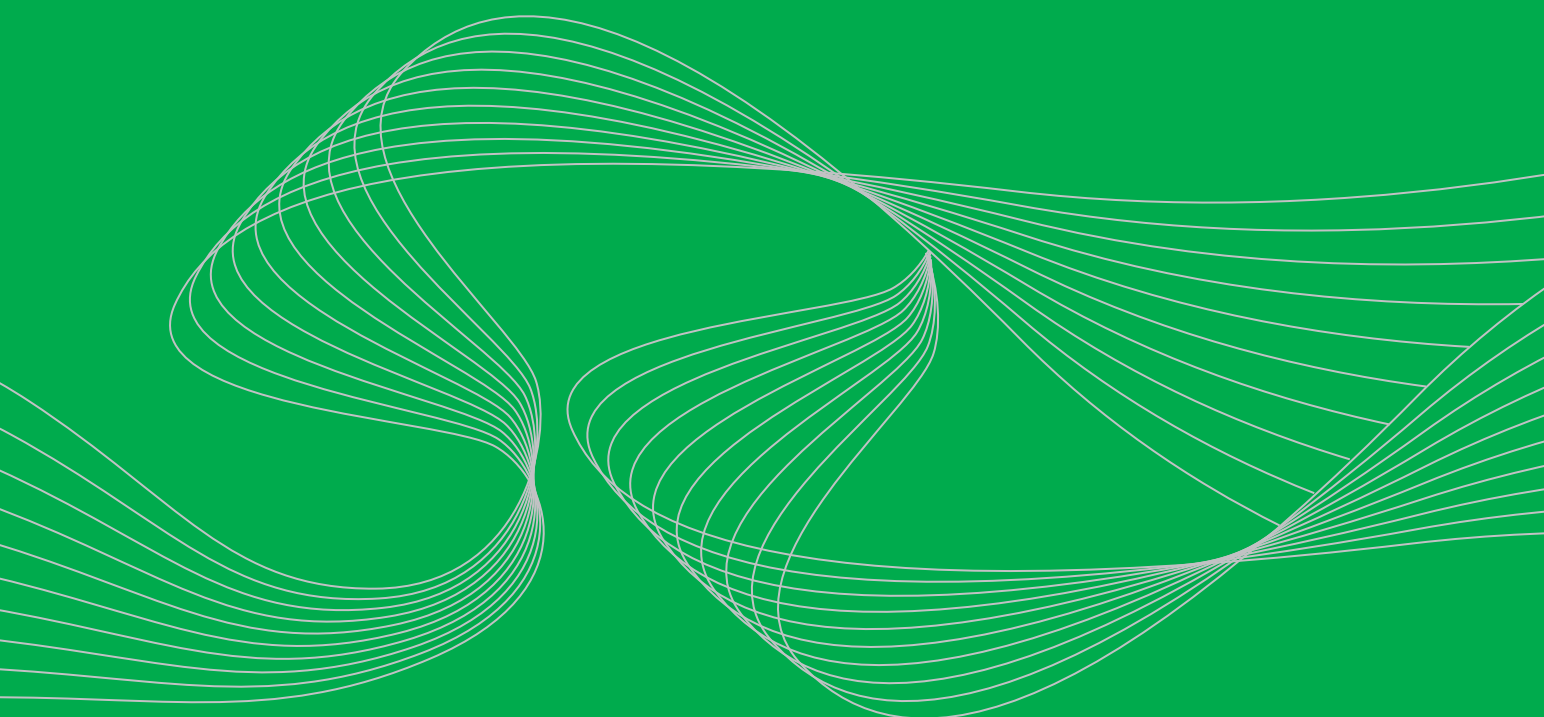
Figure 2: AFM imaging of cells untreated (A) or treated with SLN for 24 hours (B). The latter is showing more tunneling nanotubes in comparison to the control, what proved also roughness analysis (Ra - average roughness).

NPs, composed from nontoxic ingredients and which cellular localization is known, are useful as delivery systems for a drug. Much-promising natural compound, resveratrol (RSV), that is effective on the area of high radical density, has some intrinsic properties, which weakening bioavailability of RSV. That can be solved by incorporation of RSV into lipophilic NPs (SLN or liposomes). Contrary to RSV alone, RSV in NPs strengthens defense system of the cells against stress. NPs contributed also on two more levels. The first is the protection of RSV against external degradative factors and second, NPs protect the cells against high concentration of RSV, which acts cytotoxic.⁶⁻⁸

To sum up, in doctoral dissertation the theoretical (Introduction) and practical (Chapters 1-8) way up to the ideal NPs is presented. Those NPs are simultaneously nontoxic, localizing on desired space in biological environment, deliver a drug on specific intracellular site (desired is the action site of a drug), keep therapeutic efficiency of a drug and lowered its potential toxicity.

1. Kristl J, Teskač K, Milek M, Mlinarič-Raščan I. Surface active stabilizer Tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells. *Toxicol appl pharmacol* 2008; 232 (2): 218-225.
2. Kocbek P, Teskač K, Eedani-Kreft M, Kristl. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small* 2010; 6 (17): 1908-1917.
3. Teskač K, Kocbek P, Erdani Kreft M, Kristl J. Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin. In print.
4. Teskač Plajnšek K, Kristl J, Pajk S, Pečar S, Srčič S. A novel fluorescent probe for more effective monitoring of nanosized drug delivery systems within the cells. In print.
5. Teskač Plajnšek K, Erdani Kreft M, Govedarica B, Srčič S, Kristl J. Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their transfer between cells over tunneling nanotubes. In print.
6. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int j pharm* 2008; 363 (1-2): 183-191.
7. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramovič Z, Šentjurc M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur j pharm biopharm* 2009; 73 (2): 253-259.
8. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int j pharm* 2010; 390 (1): 61-69.

41



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

Povzetki
Abstracts

Vpliv staranega etanolno-vodnega česnovega ekstrakta na intestinalne in jetrne prenašalce ter jetrni encim citokrom 3A4

KATJA BERGINC, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Albin Kristl, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Sestavine prehranskih dodatkov, ki lahko vplivajo na usklajeno delovanje encimov in prenašalcev, lahko pomembno zaznamujejo predsistemiški metabolizem peroralno apliciranih učinkovin. Poraba česnovih pripravkov skokovito narašča, mehanizmi farmakokinetičnih interakcij med njimi in predpisanimi zdravili, o čemer poroča literatura, pa še niso pojasnjeni. V predstavljenem delu smo zato s pomočjo *in vitro* metod spremljanja permeabilnosti in metabolizma učinkovin, namenjenih kardiovaskularnim bolnikom, diabetikom ter virusno okuženim bolnikom, ovrednotili in pojasnili vzroke, odgovorne za spremenjeno absorpcijo, distribucijo in metabolizem učinkovin. Ugotovili smo, da se v prisotnosti lipofilnih spojin z žveplom in nekaterih flavonoidov iz staranega etanolno-vodnega česnovega ekstrakta značilno povečajo aktivnosti absorptivnih in eliminatornih prenašalcev v črevesju, encim citokrom 3A4 pa se inhibira tako v prebavilih kot v jetrih. Proučevani česnov pripravek vpliva tudi na eliminatorne prenašalce v hepatocitih, s čimer se spremeni izpostavljenost učinkovin metabolnim encimom in posledično izločanje učinkovine oziroma njenih metabolitov bodisi v žolč bodisi v plazmo. Končni učinek česnovih pripravkov na plazemske profile peroralno apliciranih učinkovin bo tako odvisen od afinitete izbrane učinkovine do posameznih prenašalcev in encimov. Obravnavani mehanizmi interakcij so podrobneje prikazani na primeru dveh protivirusnih učinkovin, darunavirja in sakvinavirja.

The Impact of Aged Garlic Extract on Intestinal and Hepatic Transporters and Hepatic Cytochrome 3A4

KATJA BERGINC, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

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

Changes of transporter-enzyme interplay in the presence of food supplements can profoundly affect the first-pass metabolism of perorally administered drugs. Because the consumption of garlic supplements is growing, so is the number of case reports on pharmacokinetic interactions with the prescribed therapy, whose mechanisms have not yet been fully explained. By monitoring *in vitro* permeability and metabolism of drugs, intended for cardiovascular, diabetic and virally infected patients, we aimed to explain the processes leading to changes of drug absorption, distribution and metabolism. Lipophilic sulfur containing compounds and flavonoids from aged garlic extract significantly increased the activities of intestinal absorptive and secretory transporters, while they inhibited cytochrome 3A4 enzyme in the liver and intestine. The activity of eliminatory transporters in hepatocytes changed too, influencing the exposure of drugs to the hepatic metabolism and consequently the distribution of parent drug or its metabolites into the bile or plasma. The final effect of garlic supplements on drug plasma profile will thus depend on the drug's preferences for individual transporters and enzymes. These interaction mechanisms were demonstrated in the presented thesis with the use of two antiviral drugs (darunavir and saquinavir).

Povezava med strukturo in delovanjem kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz in njihovih inhibitorjev

MOJCA BRUNSKOLE ŠVEGELJ, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Jure Stojan, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Somentorica: Tea Lanišnik Rižner, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Encimi naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) sestavljajo raznoliko skupino proteinov, ki so zaradi vpletenosti v številne (pato)fiziološke procese zanimiva tarčna mesta za razvoj novih zdravilnih učinkovin. Proučevali smo odnos med zgradbo in delovanjem ter inhibitorje dveh SDR-predstavnikov – 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (17 β -HSDcl) in trihidroksinaftalen reduktaze (3HNR) iz glive *Curvularia lunata* (teleomorf *Cochliobolus lunatus*). Razrešili smo kristalno zgradbo štirih oblik 17 β -HSDcl in proučevali njegovo dimerizacijo. Opredelili smo katalitične lastnosti obeh encimov in z metodo usmerjene mutageneze razložili razlike v njuni substratni specifičnosti. Inhibitorje encimov 17 β -HSDcl in 3HNR smo iskali med naključno izbranimi spojinami, spojinami, podobnimi substratom, in znanimi inhibitorji, na novo sintetiziranimi spojinami ter spojinami, izbranimi z visokozmogljivim računalniškim reševanjem. S svojim delom smo prispevali k boljšemu splošnemu razumevanju delovanja SDR-encimov. Z inhibitorji encimov s konstantami inhibicije v nizkem mikromolarnem in nanomolarnem koncentracijskem območju smo postavili dobro izhodišče za nadaljnji razvoj inhibitorjev, zlasti antimikotikov s selektivnim mehanizmom delovanja, ki bi se lahko uporabljali za zdravljenje okužb s temno pigmentiranimi glivami.

Structure/Function Relationship of Short-chain Dehydrogenases/Reductases and their Inhibitors

MOJCA BRUNSKOLE ŠVEGELJ, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Supervisor: Jure Stojan, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Co-supervisor: Tea Lanišnik Rižner, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) constitute a diverse protein family. Due to their involvement in numerous (patho)physiological processes they represent emerging pharmacological targets. In the present study we studied the structure/activity relationship and inhibitors of two SDR members – 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSDcl) and trihydroxynaphthalene reductase (3HNR) from the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). We have refined four crystal structures of 17 β -HSDcl and studied its dimerization. In addition, we have characterized catalytical properties of both enzymes and explained the differences in their substrate specificities by site-directed mutagenesis. We have searched for inhibitors of 17 β -HSDcl and 3HNR among structurally diverse compounds, substrate analogues, compounds similar to known inhibitors of the studied enzymes, *de novo* synthesized compounds and compounds selected by high-throughput virtual screenings. Our study contributed to a better understanding of the SDR enzymes in general. Inhibitors of the enzymes with affinity constants in the low micromolar and nanomolar concentration range are promising starting points for the development of more potent inhibitors, especially antimycotics with selective mechanism of action, that could be used for the treatment of infections of dark pigmented fungi.

Regulacija endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B

BOJANA MIRKOVIĆ, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Mentor: Janko Kos, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Lizosomska cisteinska proteaza katepsin B je atraktivna tarča za zdravljenje raka, saj so njena spremenjena aktivnost, izražanje in lokalizacija povezani s procesom nastanka in razvoja raka. Katepsin B vsebuje poseben strukturni element, ki se imenuje zaporna zanka, zaradi česar lahko deluje kot eksopeptidaza in endopeptidaza. Medtem ko eksopeptidazno aktivnost povezujejo s fiziološkim delovanjem encima znotraj lizosomov, endopeptidazno aktivnost povezujejo z razgradnjo beljakovin zunajceličnega matriksa, ki je predpogoj za invazijo in metastaziranje tumorskih celic in angiogenezo. V sklopu doktorske dizertacije smo uspešno dosegli specifično regulacijo aktivnosti katepsina B z uporabo monoklonskega protitelesa 2A2, antibiotika nitroksolina in 4,6-bis(benziltio)-1,3,5-triazin-2(1H)-onov. Našteti agensi so prek selektivne inhibicije endopeptidazne aktivnosti katepsina B zmanjšali razgradnjo zunajceličnega matriksa in s tem invazijo celic v 2D in 3D *in vitro* modelih tumorske invazije. Na podlagi dobljenih rezultatov predlagamo omenjene inhibitorje kot potencialne učinkovine za zdravljenje raka in ostalih bolezni s povečano endopeptidazno aktivnostjo katepsina B. V sklopu doktorske dizertacije smo 4-aminofenole identificirali in okarakterizirali kot nov razred promiskuitetnih inhibitorjev, ki lahko z nespecifično oksidativno inaktivacijo proteaz, kot so katepsin B in drugi cisteinski katepsini, povzročijo lažno pozitivne zadetke pri visoko zmogljivem rešetanju.

Regulation of Endopeptidase and Exopeptidase Activity of Cathepsin B

BOJANA MIRKOVIĆ, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*
Supervisor: Janko Kos, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Lysosomal cysteine protease cathepsin B is an attractive drug target for treatment of cancer, since its altered activity, expression and localization are associated with processes of tumor initiation and progression. Due to the presence of a unique structural element called the occluding loop, cathepsin B can possess exopeptidase and endopeptidase activity. Whilst the first is associated with physiological function of the enzyme within the lysosomes, the latter is usually associated with degradation of extracellular matrix proteins – a process required for tumor invasion, metastasis and angiogenesis. In our study we have successfully accomplished the specific regulation of cathepsin B activity with the use of monoclonal antibody 2A2, antibiotic nitroxoline and 4,6-bis(benzylthio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ones. The aforementioned agents selectively inhibit cathepsin B endopeptidase activity in this way impairing significantly the degradation of extracellular matrix and consequently the invasion of cells in 2D and 3D *in vitro* models of tumor invasion. The results suggest a possible use for the identified inhibitors in the treatment of cancer and other diseases associated with increased cathepsin B endopeptidase activity. Additionally, we have identified and characterized 4-aminophenols as a new class of promiscuous inhibitors which by nonspecific oxidative inactivation of proteases, such as cathepsin B and other cysteine cathepsins, cause false positive hits in high-throughput screening campaigns.

Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran

STANE PAJK, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Slavko Pečar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Janez Štrancar, Institut Jožef Stefan Ljubljana

Produkti oksidacije holesterola, oksisteroli, lahko nastajajo endogeno po encimski ali neencimski oksidaciji holesterola, del pa jih dobimo s hrano. Nekateri oksisteroli – predvsem tisti, ki nastajajo pri neencimski oksidaciji, npr. med lipidno peroksidacijo – imajo citoksične lastnosti in jih povezujejo z iniciacijo in progresijo mnogih obolenj, med drugim z aterosklerozo, Alzheimerjevo boleznijo, Chronovo boleznijo, diabetesom in osteoporozo. Namen doktorskega dela je bil raziskati, kako posamezni oksisteroli vplivajo na strukturiranost modelnih membran, ter sočasno pripraviti nova molekulska orodja, ki bi omogočila podobne raziskave na bioloških membranah. Vpliv posameznih oksisterolov smo proučevali z elektronsko spinsko resonanco (ESR) tako, da smo del holesterola v liposomih postopoma zamenjevali z oksisterolom in liposome nato označili s primernim spinskim označevalcem. Na podlagi rezultatov smo predpostavili mehanizem vpliva oksisterolov na modelne membrane in testirane oksisterole razvrstili po jakosti vpliva. Sočasno smo pripravili amfifilne spinske sonde za proučevanje dinamike in urejenosti polarnih glav ter dvojne sonde, ki v eni molekuli združujejo nitroksid in fluorofor. Fluorofor nam tako daje informacijo o lokaciji sonde in lateralni distribuciji, sočasno pa nam nitroksid poroča o dinamiki in urejenosti znotraj lipidnega dvosloja.

Influence of some Cholesterol Oxidation Products on the Structure of Model Membranes

STANE PAJK, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Slavko Pečar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Janez Štrancar, Jožef Stefan Institut Ljubljana

Cholesterol oxidation products - oxysterols may arise endogenously following enzymatic or nonenzymatic oxidation of cholesterol, while some are taken up from food. Some oxysterols, especially those that are produced nonenzymatically, for example generated during lipid peroxidation, have cytotoxic properties and are associated with the initiation and progression of many diseases; some of them are atherosclerosis, Alzheimer's disease, Chron disease, diabetes and osteoporosis. The aim of the study was to research in detail how selected oxysterols influence properties of model membranes and preparation of molecular tools that would enable similar research in biological membranes. Influences of oxysterols on membrane properties were studied with ESR spectroscopy on liposomes by gradually supplementing cholesterol in liposomes with selected oxysterol, followed by labeling of liposomes with appropriate spin label. Based on the results from these experiments we proposed underlying mechanisms of observed structural changes to the membranes and sorted tested oxysterols depending on the degree of influence on membrane properties. At the same time we prepared amphiphilic spin probes in order to study structural and dynamic properties of polar heads and double probes that contain nitroxide and fluorophore in the same molecule. Fluorophore gives us information on the location of probes and its lateral distribution, while the nitroxide reports on the dynamics and order within the lipid bilayer.

Mehanizem signalizacije dvoverižne RNA prek receptorja TLR3

NINA PIRHER, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Mentor: Roman Jerala, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: Mojca Benčina, Kemijski inštitut Ljubljana

Naravna imunost je prva obramba gostitelja ob vdoru škodljivih mikroorganizmov v telo. Celice naravne imunosti prepoznavajo tujke z receptorji, specifičnimi za mikrobne molekulske vzorce. Med temi receptorji je družina TLR (toll-like receptors). Naloga receptorja TLR3 je vezava dvoverižne RNA, ki je značilna za nekatere viruse. Vezava dvoverižne RNA (dsRNA) na podkvasto ektodomeno TLR3 omogoči njegovo aktivacijo, ta pa aktivacijo transkripcijskih dejavnikov. Slednji omogočajo izražanje genov za interferone in citokine vnetja ter s tem imunski odziv proti virusni okužbi. Razkritje kristalne strukture in usmerjena mutageneza zapisa za človeški TLR3 sta pokazala, da se dsRNA veže na skupino pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov C-končnega dela ektodomene. Z usmerjeno mutagenezo posameznih aminokislinskih ostankov smo dokazali obstoj N-terminalnega vezavnega mesta. Naš model vezave temelji na obstoju dveh vezavnih mest in vezavi minimalne dolžine dsRNA 21 baznih parov. TLR3 aktivira tudi siRNA, ki natanko ustreza razdalji med vezavnima mestoma. S tem sproži vnetje, kar omejuje uporabo RNA-interference v terapevtske namene. Potrdili smo vpletenost TLR3 v odziv proti siRNA in pripravili osnovo za iskanje inhibitorjev, kot so specifična protitelesa, ki inhibirajo aktivacijo TLR3 s siRNA, ne pa tudi protivirusne obrambe.

The Mechanism of Double Stranded RNA Signalling Through Receptor TLR3

NINA PIRHER, *National Instituta of Chemistry Ljubljana*

Supervisor: Roman Jerala, National Instituta of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Mojca Benčina, National Instituta of Chemistry Ljubljana

Innate immunity is the first line of defence against invasive microorganisms. Cells of the innate immune system identify microbial molecular patterns with a set of receptors. Among them there is the family of Toll-like receptors (TLR). One of them, TLR3 senses double-stranded RNA, which is characteristic of some viruses. dsRNA binding to the horse-shoe shaped TLR3 ectodomain causes its dimerisation, which induces the activation of transcription factors, initiating production of interferons and inflammatory cytokines. The discovery of the crystal structure and point mutations of human TLR3 led to the discovery of a C-terminal binding site. Using point mutations of single amino acid residues, we proved the existence of a second, N-terminal binding site. We propose a new binding model, based on two binding sites and a dsRNA minimum length of 21 bp. TLR3 is also activated by siRNA, which has exactly the length to bind to both binding sites. With activating TLR3 siRNA is causing unwanted side-effects in the therapeutic use of RNA interference. By studying TLR3 activation mechanisms we came across its importance in inflammation directed against siRNA and showed the way for finding suitable inhibitors such as antibodies, which inhibit TLR3 activation by siRNA but do not impair sensing of viral infections.

Priprava in karakterizacija aerogelov SiO₂, modificiranih z organskimi funkcionalnimi skupinami, ter njihova uporaba v adsorpcijskih procesih

SUZANA ŠTANDEKER, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

Mentor: **Zoran Novak**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

Somentor: **Željko Knez**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

Pripravili smo različne aerogele SiO₂, modificirane z organskimi funkcionalnimi skupinami, ki smo jih vnesli na površino aerogelov z vključevanjem različnih koprekursorjev v standardno sol-gel sintezo. Z vnosom metilne skupine na površino smo pripravili aerogele SiO₂ različne stopnje hidrofobnosti ter aerogele z amino ali merkaptio funkcionalnimi skupinami. Odlične lastnosti aerogelov, dobljene s sol-gel sintezo, smo ohranili s sušenjem s superkritičnim (SC) CO₂. Stopnjo hidrofobnosti aerogelov smo določili z merjenjem kontaktnega kota (θ) med kapljico vode in površino aerogela. Karakterizacijo aerogelov smo izvedli tudi z uporabo FTIR-ja, DSC/TGA-ja, sorpcijo N₂ ter SEM-a. Tako smo opazovali vpliv modifikacije na lastnosti modificiranih aerogelov SiO₂, ki smo jih uporabili v adsorpcijskih procesih za odstranjevanje različnih toksičnih organskih spojin ali ionov težkih kovin iz vode. Na podlagi rezultatov meritev adsorpcijske kapacitete lahko trdimo, da so različni modificirani aerogeli SiO₂ v primerjavi s konvencionalnimi adsorbenti zelo učinkoviti.

Preparation and Characterization of Silica Aerogels Modified with Organic Functional Groups and their Use in Adsorption Processes

SUZANA ŠTANDEKER, *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor*

Supervisor: **Zoran Novak**, *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor*

Co-supervisor: **Željko Knez**, *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor*

Silica monolith aerogels modified with different organic functional groups were prepared by incorporating different co-precursors in standard sol-gel synthesis. Prepared were aerogels with different degree of hydrophobicity by introducing methyl functional group on surface or aerogels with amino or mercapto functional groups. Excellent properties of aerogels, obtained with the sol-gel synthesis, were preserved with supercritical drying with CO₂. The degree of hydrophobicity of the aerogels was tested by measuring the contact angle (θ) of a water droplet with the aerogel surface. The aerogels were characterised by FTIR, DSC/TGA, nitrogen sorption and SEM measurements. The influence of aerogels chemical modification on their properties was also studied. Those modified silica aerogels can be used in adsorption processes for removing different toxic organic compounds or heavy metal ions from water. Adsorption capacity measurements show that such modified hydrophobic silica aerogels are excellent adsorbents and compared to conventional adsorbents exhibit very high adsorption capacities.

Računalniško podprto načrtovanje in sinteza novih heterocikličnih zaviralcev ligaz Mur

TIHOMIR TOMAŠIČ, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Lucija Peterlin Mašič, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Pojav multirezistentnih bakterij predstavlja vedno večji problem pri zdravljenju infekcijskih okužb, saj nam v boju proti nekaterim odpornim sevom že primanjkuje učinkovitih zdravilnih učinkovin. Zaradi tega sta nujna razvoj in odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin, ne samo s širokim spektrom delovanja, ampak tudi s ciljanim delovanjem na najodpornейše patogene seve bakterij. Od ATP odvisne ligaze Mur (MurC-MurF), ki sodelujejo v znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, gradnika bakterijske celične stene, so pomembne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Potencialne ATP-kompetitivne zaviralce ligaz Mur smo iskali v kemijskih knjižnicah spojin s pomočjo virtualnega rešetanja in odkrili 1,3,5-triazinske dualne zaviralce ligaz MurC in MurD. S pomočjo strukturno podprtega načrtovanja in molekulskega modeliranja smo načrtovali spojine, ki bi zavirale delovanje encimov kot analogi nukleotidnega substrata ali produkta encimske reakcije. Odkrili smo zaviralce ligaz MurD in/ali MurE, ki imajo v svoji strukturi 5-benzilidentiazolidin-4-onski obroč in D-glutaminsko kislino in zavirajo encima v nizkem mikromolarnem območju ter delujejo protibakterijsko proti *Staphylococcus aureus* in njegovemu proti meticilinu odpornemu sevu (MRSA). Predstavljeno delo je temelj za nadaljnjo optimizacijo zaviralcev ligaz Mur z izboljšano protibakterijsko aktivnostjo.

Computer-aided Design and Synthesis of Novel Heterocyclic Inhibitors of Mur Ligases

TIHOMIR TOMAŠIČ, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Lucija Peterlin Mašič, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Emergence of multidrug resistant bacterial strains constitutes a concerning problem in the treatment of infectious diseases. Development of novel effective antibacterial drugs acting on previously unexploited targets is therefore essential to fight the drug-resistant bacteria. ATP-dependent Mur ligases (MurC-MurF), which catalyse the intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis, an important bacterial cell wall polymer, represent viable targets for the design of antibacterial drugs with novel mechanism of action. Virtual screening of available chemical libraries was used to discover ATP-competitive inhibitors of Mur ligases and resulted in 1,3,5-triazines acting as dual inhibitors of MurC and MurD ligases. By using structure-based drug design and molecular modelling, we have designed potential inhibitors of Mur ligases acting as analogues of the nucleotide substrates or products of the enzymatic reaction. Compounds bearing 5-benzylidenethiazolidin-4-one ring and D-glutamic acid moiety were found to inhibit MurD and/or MurE ligases in the low micromolar range and possessed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and its methicillin-resistant strain (MRSA). The presented work is a good foundation for further optimisation of Mur ligase inhibitors with improved antibacterial activity.

Načrtovanje in sinteza heterocikličnih inhibitorjev ligaz MurC–E

NACE ZIDAR, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Danijel Kikelj, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Encimi, ki so udeleženi v zapletenem in za bakterijo značilnem procesu sinteze peptidoglikanske stene, so zanimiva tarča za razvoj protibakterijskih učinkovin. V citoplazemskih stopnjah biosinteze peptidoglikana sodeluje skupina ligaz Mur (MurC–MurF), ki katalizirajo zaporedje štirih reakcij, pri katerih pride do pretvorbe UDP-*N*-acetilmuraminske kisline v UDP-*N*-acetilmuramoil-pentapeptid. V okviru raziskovalne naloge smo se ukvarjali z načrtovanjem, sintezo in biološkim vrednotenjem novih inhibitorjev encimov MurC–E. Kot osnovo pri načrtovanju smo uporabili strukture naravnih substratov in produktov ter tridimenzionalne zgradbe aktivnih mest encimov. Uporabljali smo klasične farmacevtsko-kemijske pristope in računalniške metode za virtualno reševanje in sidranje molekul v aktivno mesto encimov. V okviru sinteznega dela smo razvili pot za pripravo nesubstituiranega 3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-2-ona in nov, enostaven način za tvorbo 5-fenil-1*H*-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4(3*H*,5*H*)-dionov. Pripravili in biološko ovrednotili smo več serij inhibitorjev encima MurD s 5-benzilidentiazolidin-4-onskim osnovnim skeletom in razrešili tri kristalne strukture kompleksov MurD-inhibitorjev. Pridobljeni biološki rezultati nakazujejo odnos med strukturo in delovanjem, ki skupaj s šibko protibakterijsko aktivnostjo predstavlja dobro osnovo za nadaljnje strukturne izboljšave.

Design and Synthesis of Heterocyclic Inhibitors of MurC–E Ligases

NACE ZIDAR, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Danijel Kikelj, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*,

Enzymes involved in the biosynthesis of peptidoglycan, an essential bacterial cell-wall polymer, are among the most important targets for the development of antibacterial drugs. Mur ligases (MurC–MurF) are a group of cytoplasmic enzymes that catalyze four consecutive reaction steps in the synthesis of the peptidoglycan building block UDP-*N*-acetylmuramoyl-pentapeptide, starting from UDP-*N*-acetylmuramic acid. We have worked on the design, synthesis and biological evaluation of new small-molecule inhibitors of MurC–E enzymes. Compounds were designed based on the structures of natural substrates and products and the tridimensional architectures of enzymes active sites. Traditional medicinal chemistry approaches as well as computer aided virtual screening and molecular docking methods were used for design and preparation of inhibitors. In the course of our synthetic work, we discovered the first successful synthesis of 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-one and a new, simple way for the preparation of novel 5-aryl-1*H*-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(3*H*,5*H*)-diones. We have prepared and biologically evaluated several series of 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of MurD enzyme. The high-resolution X-ray crystal structures of MurD cocrystallized with three new inhibitors were obtained. Structure-activity relationships derived from biological data, together with a weak antibacterial activity, provide a valuable starting point for further optimization and offer a good prospect for the development of an effective antibacterial drug.

Novi *P*-stereogeni difosfinski ligandi za asimetrično hidrogeniranje

BORUT ZUPANČIČ, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Mentor: Boris Šket, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Barbara Mohar, Kemijski inštitut Ljubljana

P-stereogen ligand DiPAMP smo modificirali tako, da smo na njegova *P*-*o*-anizilna obroča dodajali različne substituentne, kot so MeO, *i*PrO, TMS, Ph, *t*Bu ali zlit benzenov obroč. Iz takšne poglobljene študije smo identificirali izboljšane ligande, ki so vodili do povišane enantioselektivnosti in povečane katalitske aktivnosti. Tak je *P*-(2,3,4,5-tetra-MeO-C₆H)-substituirani ligand, ki smo ga poimenovali 4MeBigFUS. Strukturo njegovega Rh-kompleksa smo določili z rentgensko kristalno difrakcijsko analizo. V večletnem laboratorijskem raziskovalnem delu v povezavi s serijo ligandov R-SMS-Phos nam je uspelo učinkovito asimetrično hidrogenirati različne tipe olefinskih substratov, pri čemer se je kot pomembna pokazala razvejanost strukture R-skupin. V nadaljevanju raziskovalnega dela smo združili pridobljeno znanje iz študije vključevanja substituentov na *P*-*o*-anizila in ugoden vpliv razvejane narave R-skupin serije R-SMS-Phos na katalizo. Iz takšne nadaljnje študije smo identificirali seriji ligandov 2RBigFUS in 3RBigFUS, ki sta pokazali še boljšo aktivnost in enantioselektivnost kot ligandi iz začetnih, zgoraj omenjenih študij.

Novel *P*-stereogenic Diphosphine Ligands for Asymmetric Hydrogenation

BORUT ZUPANČIČ, *National Institute of Chemistry Ljubljana*

Supervisor: Boris Šket, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Barbara Mohar, National Institute of Chemistry Ljubljana

We have modified the *P*-stereogenic DiPAMP ligand by incorporating various substituents onto its *P*-*o*-anisyl rings, for example MeO, *i*PrO, TMS, Ph, *t*Bu or fused benzene ring. From such in-depth study improved ligands which led to increased enantioselectivities and enhanced catalyst activity were identified, such as the *P*-(2,3,4,5-tetra-MeO-C₆H)-substituted ligand which we dubbed 4MeBigFUS. The structure of its Rh-complex was determined by X-ray crystal diffraction analysis. In our continuous laboratory research work regarding R-SMS-Phos ligand series, efficient asymmetric hydrogenation of various olefinic substrates was attained testifying the importance of branching structure of the R-groups. In a second research phase, we combined the knowledge gained from the study of incorporating substituents onto *P*-*o*-anisyl and beneficial impact on catalysis of the branching nature of R in R-SMS-Phos. From this study, series of 2RBigFUS and 3RBigFUS exhibited even more enhanced activity and enantioselectivity compared to the initial above studies.

Načrtovanje in sinteza peptidomimetičnih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana

MATEJ ŽIVEC, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

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

Bakterijska rezistenca postaja vse večji problem, saj so številni klinično pomembni bakterijski sevi razvili odpornost proti večini obstoječih protimikrobnih zdravil. Ena od najpomembnejših tarč pri razvoju novih učinkovin je bakterijski peptidoglikan, esencialna in specifična komponenta bakterijske stene. Ligaze Mur imajo pomembno vlogo pri sintezi citosolnega prekursorja peptidoglikana. V okviru doktorskega dela smo s peptidomimetičnim pristopom ter poznavanjem reakcijskega mehanizma in strukture produkta reakcije načrtovali nove peptidomimetične spojine kot potencialne inhibitorje ligaze MurE. Spojini z metilenaminskim fragmentom sta izkazovali zmerno inhibitorno aktivnost in predstavljata izhodišče za nadaljnji razvoj novih inhibitorjev. Med možnimi postopki za sintezo metilenaminskih derivatov, kot tudi sekundarnih aminov nasploh, je tudi Fukuyama-Mitsunobujev postopek. Na podlagi tega postopka smo razvili nov, industrijsko uporaben sintezni postopek za pripravo pramipeksola, učinkovine, ki se uporablja pri zdravljenju Parkinsonove bolezni in sindroma nemirnih nog. Sodelovali smo tudi pri razvoju novih reverzibilnih inhibitorjev bakterijskih transpeptidaz. Te so tarča β -laktamskih antibiotikov, ki so eno najpomembnejših orožij v boju z bakterijskimi infekcijami in katerih terapevtska uporabnost je zaradi razvoja številnih mehanizmov rezistence resno ogrožena.

Design and Synthesis of Peptidomimetic Inhibitors of Peptidoglycan Biosynthesis

MATEJ ŽIVEC, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Stanislav Gobec, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Bacterial resistance is becoming a serious healthcare problem since most of the clinically relevant bacterial strains have developed resistance to most of the currently available antibiotics. Peptidoglycan, an essential and specific component of the bacterial cell wall, is one of the most important targets for the development of new antibacterials. Mur ligases play an important role in the synthesis of the cytosolic precursor of peptidoglycan. In this thesis we present the design and synthesis of new peptidomimetics as potential inhibitors of MurE. The compounds were designed based on the structure of the reaction product and the reaction mechanism of the enzyme. Two compounds with the methyleneamino core were identified as moderate inhibitors, making them a starting point for further development of new inhibitors. One of the possible procedures for the preparation of methyleneamino analogues, as well as secondary amines in general, is the Mitsunobu-Fukuyama procedure. Based on this procedure we were able to develop a novel and industrially acceptable process for the preparation of pramipexole, a drug used for the treatment of Parkinson's disease and restless foot syndrome. We were also involved in the development of new reversible inhibitors of bacterial transpeptidases. They are the targets of β -lactam antibiotics, one the most useful drugs for the therapy of bacterial infections. The development of several mechanisms of resistance to this class of antibiotics poses serious threat to their future usefulness.

Proučevanje pH ter mehanskega vpliva na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s podaljšanim sproščanjem

DEBORAH CHIAVALON, SANDRA ŽVAR, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

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

Cilj raziskovalne naloge je bil proučiti vpliv pH želodčnega medija na sproščanje natrijevega diklofenakata iz tablet s podaljšanim sproščanjem. Pri delu smo uporabili pretočni sistem s steklenimi kroglicami. Profile sproščanja smo primerjali s profili, dobljenimi z aparaturo z vesli (USP 2). Poskuse smo izvajali eno uro v umetnem želodčnem mediju (pH medija od 1 do 3), nato pa smo jih nadaljevali v umetnem črevesnem mediju (pH = 6,8). Ugotovili smo, da z nižanjem pH umetnega želodčnega medija pride do večjega zamika v začetku sproščanja učinkovine in podaljšanja časa, ki je potreben za sprostitvev 50 % zdravilne učinkovine. S primerjavo rezultatov, dobljenih s pretočnim sistemom s steklenimi kroglicami in USP 2, smo ugotovili, da se dobljeni profili med seboj precej razlikujejo. Zaradi prisotnosti večjega mehanskega vpliva pri sistemu s steklenimi kroglicami v primerjavi z aparaturo z vesli pride do hitrejšega sproščanja natrijevega diklofenakata iz farmacevtske oblike, pH umetnega želodčnega medija pri uporabi obeh aparaturo pa ima enak vpliv na sproščanje učinkovine: višji, kot je pH medija, krajši je zamik v začetku sproščanja učinkovine iz tablete oziroma hitrejšje je sproščanje.

Investigation of pH and Mechanical Influence on the Dissolution of Diclofenac Sodium from Tablets with Prolonged Release

DEBORAH CHIAVALON, SANDRA ŽVAR, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

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

The aim of this study was to investigate the influence of gastric pH on the dissolution of diclofenac sodium from tablets with prolonged release. In our work we used the peristaltic movement simulating stirring device for dissolution testing. The dissolution profiles obtained with this method were compared with those obtained with the paddle apparatus USP 2. The dosage form was exposed to a simulated gastric fluid for one hour (pH from 1 to 3), and then to a simulated intestinal fluid (pH=6.8). We observed that by decreasing the simulated gastric fluid pH, the lag time and half time of dissolution increase. The comparison of the dissolution profiles shows differences between the two methods. These differences are mostly due to greater mechanical impact of the peristaltic movement simulating stirring device on the tablets, leading to faster dissolution. The simulated gastric fluid pH influence is equal in both systems: the higher pH of the medium, the shorter lag time and/or faster dissolution is observed.

Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega izvlečka lubja navadne jelke (*Abies alba*)

ALEKSANDRA ČAJIĆ, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Samo Kreft, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Somentor: Damjan Janeš, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

V okviru diplomskega dela smo izvedli karakterizacijo in identifikacijo komponent izvlečka lubja navadne jelke, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno aktivnost. Pripravili smo izvlečke jesenskega lubja in dveh vzorcev različno starega posušenega spomladanskega lubja. Za najbolj kakovostnega (največji izkoristek izolacije in antioksidativna aktivnost, določena z DPPH-metodo) se je pokazal izvleček svežega spomladanskega lubja, zato smo delo nadaljevali z njim. Z optimizirano preparativno HPLC-metodo smo nato zbirali posamezne frakcije, ki smo jih ovrednotili z nekaterimi testi. Prisotnost proantocianidinov in njihovo vsebnost v frakcijah smo dokazali z vanilin/HCl-metodo, vsebnost polifenolov v frakcijah pa s Folin-Ciocalteaujevo metodo. S TLC-analizo z orositvenim reagentom za flavonoide s polietilenglikolom 4000 smo izključili prisotnost flavonov in flavonolov v frakcijah. Z DPPH-metodo za določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin smo ugotovili, da vse frakcije, razen frakcije 7, kažejo antioksidativno aktivnost. Frakcija 7 kaže prooksidativno aktivnost. Pokazalo se je, da so za antioksidativno aktivnost izvlečka odgovorne polifenolne spojine. Frakcije smo analizirali tudi z LC/MS. Kot vir ionizacije smo uporabili negativno in pozitivno ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI). Z masno spektrometrijo smo v izvlečku lubja navadne jelke identificirali tri flavan-3-ole in tri dimere proantocianidinov, in sicer katehin, epikatehin, (epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)katehin oziroma (epi)katehin-(epi)galokatehin in (epi)katehin-(epi)katehin. Prisotnost katehina in epikatehina smo določili tudi s HPLC in TLC.

Characterization and Experiment to Identify Components of Antioxidative Silver Fir Bark (*Abies Alba*) Extract

ALEKSANDRA ČAJIĆ, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Samo Kreft, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Co-supervisor: Damjan Janeš, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

In this work we have characterized and identified components of silver fir bark extract that are responsible for its antioxidant activity. Extracts of an autumn bark and two samples of dried spring bark of different age were prepared. Fresh spring bark extract displayed the best quality (the highest efficiency of isolation and antioxidant activity according to the DPPH method), so we continued our research with it. Individual fractions were gathered by the means of preparative HPLC method. Fractions were analysed with different tests. The content of proanthocyanidins and their presence in fractions were proven with the vanillin/HCl method as well as the presence of polyphenols in fractions with the Folin-Ciocalteau method. TLC analysis with spray reagent for flavonoids was used to prove the absence of flavons and flavonols in fractions. DPPH method for estimating antioxidant activity of polyphenols has proven that all fractions but number 7 showed antioxidant activity. Fraction 7 indicated prooxidant activity. Polyphenols are responsible for antioxidant activity of the extract. Fractions were analysed with LC/MS as well. Negative and positive electrospray ionization (ESI) was used as the source of ionization. Mass spectrometry helped us identify three flavan-3-ols and three dimers of proanthocyanidins in silver fir bark extract: catechin, epicatechin, (epi)gallocatechin, (epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin, (epi)gallocatechin-(epi)catechin or (epi)catechin-(epi)gallocatechin and (epi)catechin-(epi)catechin. The presence of catechin and epicatechin was proved also with HPLC and TLC.

In vitro raziskave metabolizma bazedoksifena z mikrosomi

ALEŠ HERMAN, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Jurij Trontelj, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Bazedoksifen je nova učinkovina, ki je bila v Evropi registrirana šele pred kratkim. Strukturno je zelo podoben raloksifenu in naj bi se ravno tako uporabljal za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze. Pri terapiji z raloksifenom so opazili pomembne interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov, kar je bilo povezano tudi z različno učinkovitostjo terapije pri bolnicah. Eden od vzrokov za variabilnost farmakokinetike raloksifena je relativno pogost polimorfizem v genu za metabolični encim UGT1A1, ki raloksifen konjugira z glukuronsko kislino. Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti, kateri organ (jetra, pljuča, ledvice, tanko črevo) največ prispeva k celotnemu metaboličnemu očistku raloksifena in bazedoksifena in ali genetski polimorfizem *UGT1A1*28* pomembno vpliva na hitrost metabolične inaktivacije bazedoksifena, kar je naša raziskovalna skupina že ugotovila za strukturno podoben raloksifen. Z uporabo mikrosomov kot *in vitro* modela smo ugotovili, da so jetra najpomembnejši organ za metabolizem raloksifena in bazedoksifena. Z uporabo genotipiziranih jetrnih mikrosomov za polimorfizem *UGT1A1*28* pa smo ugotovili, da ta polimorfizem pomembno vpliva na hitrost glukuronidiranja bazedoksifena z encimom UGT1A1, saj je intrinzični očištek pri genotipu *UGT1A1*28/*28* mnogo manjši kot pri genotipu *UGT1A1*1/*1*.

In vitro Studies of Bazedoxifene Metabolism with Microsomes

ALEŠ HERMAN, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Jurij Trontelj, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Bazedoxifene is a new drug that has only recently been registered in Europe. Structurally it is very similar to raloxifene and should also be used for treatment and prevention of osteoporosis in postmenopausal women. During treatment with raloxifene, significant interindividual differences in plasma concentrations of raloxifene and its metabolites were observed, which have further been associated with different efficacy of therapy in patients. One of the reasons for variability in the pharmacokinetics of raloxifene is the relatively common polymorphism in the gene encoding the metabolic enzyme UGT1A1, which conjugates raloxifene with glucuronic acid. In this research, we aimed to determine which organ (liver, lung, kidney, small intestine) is the most important for metabolism of raloxifene and bazedoxifene and to determine if the genetic polymorphism *UGT1A1*28* affects the rate of bazedoxifene's metabolic inactivation as has been shown for raloxifene. Using microsomes as an *in vitro* model, we determined that the liver is the most important organ for the metabolism of raloxifene and bazedoxifene. By using hepatic microsomes, genotyped for polymorphism *UGT1A1*28*, we found that this polymorphism significantly affects the rate of bazedoxifene glucuronidation by the enzyme UGT1A1 as the intrinsic clearance in the *UGT1A1*28/*28* genotype is severely reduced compared to the *UGT1A1*1/*1* genotype.

Proučevanje vpliva vrste hipromeloze na reološke lastnosti izdelanih vodnih disperzij

VESNA KUHELJ, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

V okviru naloge smo proučevali različne tehnike določanja navidezne viskoznosti različnim tipom polimera hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) ter znotraj teh tipov polimere različnih molekulskih mas. Rezultati naših meritev govorijo o veliki variabilnosti lastnosti navidezne viskoznosti polimera HPMC tako med serijami istega proizvajalca kot med obema proizvajalcema. Tehnike določanja navidezne viskoznosti s kapilarnim in rotacijskim viskozimetrom so dokaj zastarele in nam ne dajo podatka o lastnosti vzorca, prav tako so zelo odvisne od reološke zgodovine vzorca. Bolj celosten pogled na lastnosti vzorca dobimo z določanjem viskoelastičnih lastnosti vzorca z oscilacijsko reometrijo. Oscilacijska reometrija ima velik potencial v farmacevtski industriji, saj bi njena uporaba v kontroli kakovosti na ponovljiv način dala viskoelastične lastnosti preiskovanega polimera HPMC. Na ta način bi lahko ločili ustrezne serije HPMC od neustreznih. Kot je znano, so specifikacijske meje dokaj široke in tako omogočajo različne »kakovosti« znotraj določenega substitucijskega tipa HPMC.

Investigation of Hypromellose Type on the Rheological Properties of Prepared Aqueous Dispersions

VESNA KUHELJ, Krka d. d., Novo mesto

Supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka d. d., Novo mesto

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

We have focused on various techniques of the determination of apparent viscosity of various types of HPMC and also polymers of different molecular masses within these types of HPMC in the present study. The results of our measurements show a great variability in the apparent viscosity of the HPMC polymer between two batches of the same manufacturer as well as between two different manufacturers of HPMC. Both techniques, i.e. the use of the capillary viscometer and rotational viscometer, intended for the determination of apparent viscosity are obsolete. They cannot give information on sample properties and highly depend on the rheological history of the sample. Determination of viscoelastic properties by the oscillatory method gives a better review of sample properties. The oscillatory rheometry has a great potential in the pharmaceutical industry as its use in the quality control would repeatedly give viscoelastic characteristics of the investigated HPMC polymer. In this way, the suitable batches of HPMC could be separated from the unsuitable batches. It is known that the specification limits are quite wide and allow various degrees of quality within a specific substitution type of HPMC.

Razvoj in validacija polarografske metode za določanje vsebnosti sledov tiosulfata v farmacevtskih učinkovinah

NINA MUGOŠA, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Mitja Kolar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentorica: Darinka Brodnjak Vončina, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentor: Matej Stergar, Krka, d. d., Novo mesto

Namen diplomske naloge je bil razviti in validirati polarografsko metodo za določanje vsebnosti sledov tiosulfata v farmacevtskih učinkovinah, ki spadajo v kemijsko skupino prazolov. Tiosulfat se pojavlja v sintezni shemi kot nečistota. Vsebnost tiosulfata smo določali z diferencialno pulzno polarografijo (DPP) in kapljajočo živosrebrno elektrodo (KŽE). Za nosilni elektrolit smo uporabili fosfatni pufer s pH 6,0. Sledove smo iskali v šestih različnih realnih vzorcih. Validirali smo analizno metodo ter določili linearnost, točnost, natančnost, ponovljivost, mejo zaznave, mejo določanja in stabilnost. Iz rezultatov je razvidno, da so sledovi tiosulfata vidni samo pri dveh vzorcih. Dokazali smo, da je analizna metoda primerna in uporabna za določanje tiosulfata v farmacevtskih učinkovinah.

Development and Validation of Polarographic Method for Thiosulphate Determination in Pharmaceutical Products

NINA MUGOŠA, Krka, d.d., Novo mesto

Supervisor: Mitja Kolar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

Co-supervisor: Darinka Brodnjak Vončina, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

Co-supervisor: Matej Stergar, Krka, d. d., Novo mesto

Purpose of this diploma thesis was to develop and validate the polarographic method for thiosulphate determination in pharmaceutical substances, which belong to the chemical group called prazols. In the synthesis scheme the thiosulphate appears as an impurity. We have determined its content with differential pulse polarography (DPP) and dropping mercury electrode (DME). Phosphate buffer pH 6.0 has been used as the supporting electrolyte. We have analysed six different real samples. We have validated the analytical method, determined the linearity, accuracy, precision, repeatability, limit of detection, limit of quantification and stability. Thiosulphate traces were found in only two of the samples. We have concluded that this analytical method is appropriate and useful for the thiosulphate determination in pharmaceutical substances.

Razvoj hitrega presejalnega testa za biosintezo salinomicina pri bakteriji *Streptomyces albus*

GAŠPER OZIMEK, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Hrvoje Petković, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Vladimir Pokorny, Krka, d. d., Novo mesto

Salinomycin je polietrski antibiotik, ki ga producira streptomiceta *Streptomyces albus*. Uporablja se kot kokcidiostatik v reji brojlerjev. V diplomskem delu smo razvili in optimizirali hitri presejalni test za selekcijo visokodonosnih sevov *Streptomyces albus* v 50-mililitrskih kivetah, ki so vsebovale 5 ml gojišča. Najprej smo optimizirali postopek priprave inokuluma. Sledila je optimizacija produkcijskega gojišča in procesa biosinteze v kivetah. Ker je tako optimizirana metoda omogočila testiranje bistveno večjega števila kolonij produkcijskega seva, smo za potrebe lažje in hitrejše analize prilagodili tudi analitski postopek za določanje vsebnosti salinomicina v bioprocesni brozgi. Na koncu smo še preverili, ali obe spremenjeni metodi delujeta. Izvedli smo postopek mutageneze seva *Streptomyces albus* z mutagenim sredstvom. V manjšem poskusu smo testirali okoli 100 kolonij in njihov donos na koncu bioprocesa primerjali z izhodnim sevom. Izolirali smo 16 kolonij z večjim donosom salinomicina v primerjavi z izhodnim sevom.

Development of a High-throughput Screening Method for Biosynthesis of Salinomycin with Bacteria *Streptomyces albus*

GAŠPER OZIMEK, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Hrvoje Petković, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Vladimir Pokorny, Krka, d. d., Novo mesto

Salinomycin is a polyether antibiotic, produced by *Streptomyces albus*. It is used as a coccidiostatic in breeding broilers. In this study we developed and optimised a high-throughput screening method for selection of *Streptomyces albus* in 50 ml cuvettes, containing 5 ml of growth medium. We have optimized process for development of seed culture, during the first part of the study. Further, we optimized the fermentation medium for the production stage and scaled down the process for salinomycin biosynthesis to the 50ml cuvettes. Considering that the optimized screening method significantly increased output, analytical procedure for salinomycin quantification became bottleneck, thus analytical procedure had to be re-optimized. Finally, we have evaluated optimized method by carrying out limited mutagenesis experiment of *Streptomyces albus* culture using a mutagene. In a rather size-limited experiment we tested around 100 colonies and compared their productivity against parent strain. Among colonies evaluated, 16 displayed higher yield of salinomycin compared to the parent strain.

Postopek priprave celic bakterij *Rhodococcus sp.* z visoko zmogljivostjo ketoredukcije intermediatov ezetimiba

DEJAN PAVLIN, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto

Somentorica: Romana Marinšek Logar, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mikroorganizme, ki izražajo ketoreduktazno delovanje, lahko uporabimo v industriji za sintezo optično aktivnih alkoholov iz ustreznega ketona ali s stereospecifično redukcijo aldehidnega racemata. V našem primeru smo izboljšali postopek redukcije EBK1 v EBZ2 ter poiskali nov, patentno neodvisen mikroorganizem, ki je reduciral ketoskupino intermedijata ezetimiba EBK1 v EBZ2. Glede na rezultate poskusov redukcije EBK1, navedene v patentni prijavi WO 2009/032264 A1, smo stopnjo redukcije izboljšali za osemkrat in poleg znane bakterije *Rhodococcus fascians* (DSM 20669) našli drug mikroorganizem, ki reducira EBK1 v EBZ2 – bakterijo *Rhodococcus rhodochrous* (DSM 43302). Ta reducira EBK1 v EBZ2 z velikim izkoristkom (82,5-odstotnim). Uporabili smo rastoče in mirujoče celice. Konverzija je bila sicer boljša pri rastočih celicah, vendar smo se v nadaljevanju raziskave osredotočili predvsem na izboljšanje konverzije EBK1 v EBZ2 z mirujočimi celicami. Uporaba mirujočih celic ima veliko prednosti, kot so manjša zahtevnost dela, zmanjšanje možnosti kontaminacij med procesom biotransformacije, možnost natančnega odmerjanja svežih mirujočih celic z znano aktivnostjo v reakcijsko zmes. Celice obeh vrst *Rhodococcus* smo obdelali na različne načine, da bi povečali permeabilnost ter s tem omogočili lažji prehod substrata skozi celično membrano. Obdelali smo jih s toluenom, tritonom X-100 in ultrazvokom. S povečanjem prehodnosti membrane pa nismo izboljšali redukcije, saj smo z obdelavo celic žal uničili njihov sistem za regeneracijo kofaktorjev NADH in NADPH, potrebnih za delovanje ketoreduktaz.

Preparation of *Rhodococcus sp.* Cells with High Ketoreduction Potential of Ezetimibe Intermediates

DEJAN PAVLIN, Krka d. d., Novo mesto

Supervisor: Aleš Gasparič, Krka d. d., Novo mesto

Co-supervisor : Romana Marinšek-Logar, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Microorganisms with ketoreductive activity can be used in industry for synthesis of optically active alcohols from the corresponding ketone or by stereospecific reduction of corresponding racemic aldehyde substrate. In our experiment, we improved reduction and found, patent independent microorganism with high ketoreductive activity on the ezetimibe intermediate EBK1. According to patent WO 2009/032264 A1, we improved reduction 8-times and found, beside known *Rhodococcus fascians* (DSM 20669), bacteria *Rhodococcus rhodochrous* (DSM 43302) which reduces EBK1 into EBK2 with high efficiency (82.5%). We applied growing and resting cells in our experiments. Conversion with growing cells was better, but we focused to improve conversion on resting cells, because resting cells have many advantages, like less difficult work, reduction of contamination during biotransformation process, possibility of adding fresh resting cells into reaction mixture, etc. Both *Rhodococcus* cells were treated with toluene, triton X-100 and ultrasonic device, for easier passage of substrate through cell membrane. In our experiment, we were not able to improve conversion with mechanical and chemical treatment, because we disabled cell system for regeneration of cofactors NADH and NADPH, necessary for active keto reductase.

Mletje karvedilola s pomožnimi snovmi kot metoda rešetanja za izdelavo kokristalov

TEJA PAVLIN, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Odon Planinšek, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Znanih je veliko postopkov, s katerimi aktivni učinkovini spremenimo fizikalno-kemijske lastnosti. V zadnjih letih so se kot dodatna možnost, ki lahko pomembno spremeni nekatere farmacevtske značilnosti zdravilne učinkovine, pojavili farmacevtski kokristali, ki prinašajo tudi nove možnosti na področju intelektualne zaščite. Priprava kokristalov z mletjem trdih komponent velja za metodo prve izbire pri rešetanju kokristalov, saj lahko na ta način eksperimentalno v kratkem času pripravimo veliko novih kokristalov. V sklopu diplomske naloge smo z mletjem karvedilola in pomožnih snovi, ki so predstavljale potencialne tvorilce kokristalov, pripravili vzorce za rešetanje kokristalov. Pripravljene mlete zmesi smo vrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo, ki velja za učinkovito metodo pri rešetanju in odkrivanju novih kokristalov. V primerih, kjer smo v DSC-spektru zaznali spremembo tališča v primerjavi s tališčem učinkovine ali pomožne snovi, smo mlete zmesi ovrednotili tudi z infrardečo spektroskopijo in rentgensko praškovo difrakcijo. Rezultati teh analiz kažejo na nastanek treh kokristalov karvedilola: karvedilol in benzojska kislina v razmerju 1 : 1, karvedilol in oksalna kislina v razmerju 1 : 1 ter karvedilol in salicilna kislina v razmerju 1 : 1. Naredili smo tudi študijo raztapljanja in primerjali hitrost raztapljanja kokristala z zdravilno učinkovino in s fizikalno zmesjo. Ugotovili smo, da kokristalizacija karvedilola s pomožnimi snovmi izboljša raztapljanje te učinkovine, tako v mediju s pH 1,2 kot tudi v fosfatnem pufru s pH 6,8.

Solid-state Grinding of Carvedilol with Excipients as a Method for Cocrystal Screening

TEJA PAVLIN, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Odon Planinšek, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

There is variety of different strategies when attempting to alter the chemical and physical solid-state properties of APIs. In recent years, pharmaceutical cocrystals have emerged as an additional option with the potential to regulate important pharmaceutical properties and also to provide highly relevant intellectual property implications. The solid-state grinding approach to prepare cocrystals is well established as a method of first choice; experimentally it offers preparation of many potential cocrystals in a short time. In the scope of this dissertation, we used solid-state grinding of carvedilol and pharmaceutically acceptable excipients as cocrystal formers, and prepared samples for cocrystal screening. Prepared samples were characterized with established methods for characterization of cocrystals including differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction. Results of all analyses indicate that we have succeeded in preparing following cocrystals: carvedilol : benzoic acid = 1:1, carvedilol : oxalic acid = 1:1 and carvedilol : salicylic = 1:1. We also performed dissolution studies and compared dissolution rates of cocrystals and physical mixtures in comparison with pure active ingredient. We concluded that cocrystallization of carvedilol with excipients improves its dissolution in medium with pH 1.2 and in phosphate buffer of pH 6.8.

Sinteza dimetil 6-substituiranih piridin-3,4-dikarboksilatov in 2-substituiranih-4,5-bis(metoksikarbonil)piridin-*N*-oksidov

BENJAMIN PREK, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

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

V naši raziskovalni skupini smo raziskali novo sintezo dimetil 6-substituiranih piridin-3,4-dikarboksilatov in 2-substituiranih-4,5-bis(metoksikarbonil)piridin-*N*-oksidov. Izhodne spojine so bili različni karbociklični in heterociklični metil ketoni. Te smo z DMFDMA ali TBDMAM pod vplivom mikrovalov pretvorili v ustrezne 3-(dimetilamino)-1-(substituirane)prop-2-en-1-one. Z ^1H NMR-spektroskopijo smo določili *trans* konfiguracijo vinilnih protonov ob novonastali dvojni vezi. V naslednji stopnji sinteze smo produkte, dobljene z DMAD v reakciji [2 + 2] cikloadicije, z naslednjo retroelektrociklizacijo pod vplivom mikrovalov pretvorili v (2*E*, 3*E*)-dimetil-2-[(dimetilamino)metilen]-3-[2-substituirane]sukcinat, katerih strukturo smo določili z ^1H - ^{13}C HMBC NMR-spektroskopijo. V zadnji stopnji sinteze pripravimo dimetil 6-substituirane piridin-3,4-dikarboksilate s ciklokondenzacijo, ki poteče, ko raztopini sukcinata v metanolu dodamo aminijev acetat. Če raztopini sukcinata v metanolu dodamo hidroksilamin hidroklorid, pa po končani reakciji, ki tudi poteka pri sobni temperaturi, izoliramo 2-substituirane-4,5-bis(metoksikarbonil)piridin-*N*-oksido. Strukturo končnih produktov smo določili z ^1H NMR-spektroskopijo, elementno CHN-analizo in rentgensko difrakcijsko analizo.

Synthesis of Dimethyl 6-substituted Pyridine-3,4-dicarboxylates and 2-substituted-4,5-bis(methoxycarbonyl)pyridine-*N*-oxides

BENJAMIN PREK, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

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

In our research, we explored a novel synthesis of 6-substituted pyridine-3,4-dicarboxylates and 2-substituted-4,5-bis(methoxycarbonyl)pyridine-*N*-oxides. The starting compounds were various carbocyclic and heterocyclic methyl ketones, which we converted to 3-(dimethylamino)-1-(substituted) prop-2-ene-1-ones with DMFDMA or TBDMAM upon heating under microwave irradiation. The configuration of the vinyl protons round the newly formed double bond was determined using ^1H NMR spectroscopy, and was found to be *trans* in all cases. The next step in our synthesis was microwave induced [2 + 2] cycloaddition of the formed products to DMAD which was followed by retro-electrocyclisation to give (2*E*, 3*E*)-dimethyl-2-[(dimethylamino)methylene]-3-[2-substituted]succinates. The structures of our newly formed products were determined with ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectroscopy. When ammonium acetate was added to a solution of succinates in methanol at room temperature, cyclocondensation took place. Dimethyl 6-substituted pyridine-3,4-dicarboxylates were formed in good yields. 2-Substituted-4,5-bis(methoxycarbonyl)pyridine-*N*-oxides were prepared analogously, with the addition of hydroxylamine hydrochloride to a solution of succinates in methanol, also at room temperature and in good yields. The structures of the final products were determined using ^1H NMR spectroscopy, elemental analysis and X-ray analysis.

Priprava peptida s potencialno protitumorsko aktivnostjo

ANDREJA RADMAN, *Institut Ruđer Bošković*

Mentor: **Ivanka Jerić**, *Institut Ruđer Bošković*

Somentorica: **Vesna Petrović Peroković**, *Naravoslovno-matematička fakulteta, Univerza v Zagrebu*

Metionin-enkefalin (Met-enkefalin) kot opioidni rastni dejavnik (OGF) sodeluje pri celičnih delitvah, angiogenezi, celjenju ran in preprečevanju razvoja tumorskih celic, vendar je njegova glavna pomanjkljivost občutljivost za encimsko hidrolizo v telesu. Za izboljšanje lastnosti smo v štirih sintetičnih korakih pripravili peptidne analoge OGF iz L-fenilalanina in L-tirozina. V treh molekulah je na prvem mestu L-fenilalanin, v četrti pa tirozin. Razlika med tema dvema aminokislinama je v odsotnosti hidroksilne skupine v parapoložaju fenila, stranske veje fenilalanina, ki znatno poveča lipofilnost molekule. Za protitumorsko aktivnost je ključna prisotnost metionina v peptidnih molekulah. Z uvedbo zaščitne skupine Boc in aktiviranjem karboksilne skupine z uporabo kombiniranega anhidrida ali aktivnega estera ter kondenzacijo s posebnimi aminokislinami/dipeptidom/tripeptidom so bili pripravljeni produkti, iz katerih so bile s hidrolizo pridobljene končne spojine.

Synthesis of Peptides with Potential Antitumor Activity

ANDREJA RADMAN, *Ruđer Bošković Institute*

Supervisor: **Ivanka Jerić**, *Ruđer Bošković Institute*

Co-supervisor: **Vesna Petrović Peroković**, *Faculty of Science, University of Zagreb*

The native opioid growth factor, methionine-enkephaline, plays role in cell proliferation and tissue organization during development, cellular renewal, wound healing, and angiogenesis, but also in cancer. OGF suffers from drawbacks that include rapid degradation in biological fluids wherein the active compound very rapidly hydrolyzes into inactive form. To obtain more selective peptides with improved or novel activity profiles, within the framework of this thesis new peptide analogues of OGF are synthesized. Compounds are prepared through four reaction steps. In three compounds L-phenylalanine is at position 1, while in fourth molecule at position 1 is L-tyrosine. Presence of methionine seems critical for the antitumor activity. Boc protected amino acids are activated using mixed anhydride method or active ester method. Products are prepared by coupling reaction between N-terminal protected amino acid and second amino acid/dipeptide/tripeptide. The desired compounds are obtained by the hydrolysis of the protection group in the last step of the synthesis.

Vloga stereomikroskopije pri vrednotenju sproščanja učinkovine iz gastrozistentnih pelet

MATEJA RAVNIKAR, NEŽA RUGELJ, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Mentorica: Marija Bogataj, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Namen raziskovalne naloge je bil opredeliti vlogo stereomikroskopije pri vrednotenju testov sproščanja. Z obema metodama smo ugotavljali, kako na sproščanje modelne učinkovine iz gastrozistentnih pelet ter na nabrekanje in raztapljanje peletne obloge vplivajo naslednji parametri: koncentracija simuliranega želodčnega in črevesnega medija, čas zadrževanja v simuliranem želodčnem mediju in pH simuliranega črevesnega medija. Ugotovili smo, da koncentracija simuliranega želodčnega medija ne vpliva bistveno na sproščanje učinkovine iz naših gastrozistentnih pelet, medtem ko se je pri vseh ostalih parametrih pokazal znaten vpliv. Nekateri vplivi so bolj vidni na profilih sproščanja, drugi pa na stereomikroskopskih posnetkih, zato menimo, da sočasna uporaba obeh metod prispeva k boljšemu vrednotenju sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike.

The Role of Stereomicroscopy in Evaluation of Drug Dissolution from Enteric-coated Pellets

MATEJA RAVNIKAR, NEŽA RUGELJ, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*
Supervisor: Marija Bogataj, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

The aim of our research work is to define the role of stereomicroscopy in the evaluation of dissolution testing. With both methods the influence of the following parameters on drug dissolution from the enteric-coated pellets and coating's swelling was studied: concentration of simulated gastric and intestinal fluid, residence time in a simulated gastric fluid and pH of simulated intestinal fluid. We found that the concentration of simulated gastric fluid does not significantly affect the release of the active ingredient from our enteric-coated pellets, while all other parameters show a great influence. Some of the effects can be seen more clearly on the drug release profiles while others can be better observed from the stereomicroscopic images, so we believe that simultaneous use of both methods contributes to a better evaluation of drug release process.

Intestinalna absorpcija imatiniba in njegov aktivni transport s prenašalci P-gp, BCRP in OCT1 v eliminatorni smeri *in vitro*

PETRA ŠENICA, BILJANA TEMOVA, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Simon Žakelj, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Imatinib je inhibitor encima tirozin kinaza in zdravilo prve izbire pri terapiji kronične mielonične levkemije in gastrointestinalnega stromalnega tumorja. Transportni proteini lahko igrajo pomembno vlogo pri ADME imatiniba. Znano je, da je aktivnost OCT1 bistvena za privzem imatiniba v tarčne celice. Isti prenašalci so locirani na bazolateralni membrani enterocitov in so odgovorni za ponovni privzem imatiniba iz krvi v črevesno sluznico. Na apikalni strani enterocitov so locirani efluksni proteini, med katere uvrščamo P-gp in BCRP, ki lahko preprečijo absorpcijo imatiniba v kri, saj ga po prihodu v celico transportirajo nazaj v črevesni lumen. Namen najine raziskovalnega naloge je bil oceniti intestinalni aktivni transport imatiniba, definirati regije tankega črevesa z največjimi vrednostmi permeabilnostnih koeficientov v obeh smereh in karakterizirati prispevek prenašalnih proteinov k absorpciji in eliminaciji imatiniba. Določali smo navidezne permeabilnostne koeficiente imatiniba prek tankega črevesa podgane na modificiranih Sweetana-Grassovih difuzijskih celicah. S pomočjo različnih *in vitro* pogojev in inhibitorjev smo določali prenašalne proteine, odgovorne za aktivni transport imatiniba. V svoji raziskovalni nalogi smo potrdili vpliv P-gp in BCRP na ADME imatiniba in njun aditivni prispevek v pogojih *in vitro*. Menimo, da je delovanje omenjenih apikalno lociranih prenašalcev skupaj z bazolateralno lociranim OCT1 sinergistično.

Intestinal Absorption of Imatinib and its Active Transport by P-gp, BCRP and OCT1 in the Eliminatory Eirection *In vitro*

PETRA ŠENICA, BILJANA TEMOVA, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Simon Žakelj, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Imatinib is a tyrosine kinase inhibitor that is effective in the treatment of chronic myeloid leukemia and advanced gastrointestinal stromal tumor. Intestinal transport proteins may play an important role in ADME of imatinib. It is well known that OCT1 is essential for imatinib uptake into the target cells. The same transporters are also located at the basolateral membrane of enterocytes, reuptaking imatinib from the blood to the intestinal mucosa. On the other hand, efflux proteins located at the apical membrane, P-gp and BCRP, may prevent the absorption of imatinib into the blood, by transporting it back to the intestinal lumen during drug absorption. Our purpose was to evaluate the intestinal active transport of imatinib, to define the region of the small intestine with highest permeability coefficient of imatinib in both directions and to characterize the contribution of transport proteins to the absorption and elimination of imatinib. We measured apparent permeability coefficients of imatinib through small rat intestine in varying *in vitro* conditions using modified Sweetana-Grass diffusion chambers. This study shows that P-gp and BCRP are both involved in the ADME of imatinib and their contributions are additive in *in vitro* conditions. Together these two apical transporters appear to have a synergistic relationship with the active transport mediated by OCT1 located on the basolateral membrane of enterocytes.

Razvoj modela za določanje velikosti delcev hidroksipropilmetilceluloze s spektroskopijo bližnjega infrardečega območja

ELENA ŠPORAR, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentorica: Sabina Devjak Novak, Krka, d. d., Novo mesto

V raziskovalni nalogi smo se posvetili vrednotenju spektroskopskih lastnosti hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) v povezavi z njenimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (velikost delcev in substitucijski tip). Z bližnjo infrardečo spektroskopijo (NIR) smo želeli proučiti možnost vrednotenja velikosti delcev polimera HPMC. Uporabili smo serije HPMC substitucijskih tipov 2208 in 2910, ki se v farmacevtski industriji največ uporabljata za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet. Na prvi stopnji smo s sejalno analizo vsako serijo ločili na posamezne frakcije velikosti delcev. V nadaljevanju smo z NIR posneli spektre teh frakcij in z lasersko difrakcijo določili dejansko velikost delcev. Dobljene vrednosti in spektralne podatke smo obdelali s program Opus Quant2 in pripravili modele, ki so statistično gledano imeli dobro napovedno moč za napovedovanje velikosti delcev HPMC. Možnosti za optimizacijo NIR so velike, modeli pa kažejo na njen velik potencial za implementacijo v in-/on-line procese. Razvili smo tudi kvalitativni model in dokazali, da bi ga lahko uporabili kot hitro metodo za vrednotenje ustreznosti serij HPMC kot farmacevtske surovine.

Developing of Model for Determination of Particle Size Hydroxypropyl-methylcellulose by Near-infrared Spectroscopy

ELENA ŠPORAR, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Co-supervisor: Sabina Devjak Novak, Krka, d. d., Novo mesto

The focus of our research was on the evaluation of spectroscopic properties of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in relation to its physico-chemical properties (particle size and substitution type). The possibility of prediction of the HPMC particle size was examined by near-infrared spectroscopy (NIR) technique. We investigated the HPMC batches of 2208 and 2910 substitution types, which are the most commonly used types of HPMC in the manufacture of hydrophilic matrix tablet. In the first stage we obtained different particle size ranges by using the sieving analysis. The spectra of these fractions were recorded using NIR spectrometry and further along measured by laser diffraction to determine the actual particle size. The obtained value and spectral data were analyzed using the program Opus Quant2. In addition we set up the models that had statistically good predictive power for evaluating the HPMC particle size. The mentioned technique has a wide potential for optimization and the models that were set are a good indicator of great NIR potential for implementation in in/on-line processes. A qualitative model for evaluation of quality of HPMC was developed which can be used as a fast method of evaluation of quality of HPMC batches as a pharmaceutical raw material.

Mikrovezikli, izolirani iz periferne krvi – klinično pomemben artefakt izolacije

ROMAN ŠTUKELJ, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Veronika Kralj Iglič, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Helena Abramovič, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mikrovezikli (MV) so z membrano obdani nanodelci, ki nastanejo v procesu brstenja celičnih membran. V sklopu raziskovalne naloge smo ugotavljali razlike v koncentraciji MV v izolatih iz krvi v populacijah bolnikov z rakom prebavnih organov, drugih bolezni prebavnih organov in zdravih oseb. Proučevali smo tudi vpliv s holesterolom in maščobami bogatega obroka na koncentracijo MV v izolatih iz krvi zdravih prostovoljcev v povezavi s koncentracijo krvnega holesterola. Ugotovili smo, da je v izolatih iz krvi bolnikov z rakom prebavnih organov statistično pomembno več MV kot v izolatih iz krvi bolnikov z drugimi boleznimi prebavil (za 37 %, $p = 0,012$) in kot v izolatih iz krvi zdravih oseb (za 48 %, $p = 0,0002$). Ugotovili smo tudi znatno (50-odstotno) in statistično pomembno ($p = 0,010$) povečanje števila MV po obroku. Metoda izolacije mikroveziklov iz krvi je občutljiva za temperaturo in dinamiko izolacije. Ugotovili smo, da je koncentracija MV v izolatih manjša, če je temperatura med celotnim postopkom izolacije višja, iz velikosti MV in oblike fragmentov v izolatih pa sklepamo, da velik del MV v izolatih nastane po odvzemu krvi med postopkom izolacije. Rezultati kažejo, da so izolirani MV klinično relevanten parameter, ki odraža predvsem lastnosti krvnih celic, iz katerih izhajajo.

Microvesicles Isolated from Peripheral Blood - Clinically Relevant Artefacts of Isolation

ROMAN ŠTUKELJ, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Supervisor: Veronika Kralj-Iglič, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Supervisor: Helena Abramovič, *Biotechnical Faculty, University of Ljubljana*

Microvesicles (MVs) are membrane – enclosed nanoparticles which are created in the budding process of cell membranes. Within this work we studied differences in concentration of MVs in isolates from blood of patients with gastrointestinal cancer, other gastrointestinal diseases and healthy subjects. We studied the *post - prandial* effect on the concentration of MVs in isolates in relation to blood cholesterol. We found that the concentration of MVs is considerably and statistically significantly increased in patients with gastrointestinal cancer with respect to patients with other gastrointestinal diseases (for 37 %, $p = 0.012$) and with respect to healthy subjects (for 48 %, $p = 0.0002$). We found a considerable (50 %) and statistically significant ($p = 0.010$) *post – prandial* increase of the concentration of MVs in blood isolates of healthy subjects. Method for the isolation of MVs from blood is sensitive to the temperature and dynamics of isolation. The concentration of MVs was higher when the temperature during the isolation was lower. It is indicated also from the size and shape of particles found in the isolated material that an important pool of MVs is created *in vitro*, after the blood sampling in the isolation process. Results show that isolated MVs present a clinically relevant parameter which reflects properties of cells from which they derive.

Vrednotenje strukture in citotoksičnosti tekočih kristalov za dermalno uporabo

TANJA TAVČAR, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Mirjana Gašperlin, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Liotropni tekoči kristali se v farmaciji uporabljajo kot nosilni sistemi za različne aplikacije. Zaradi ugodne konsistence, velike sposobnosti solubilizacije, termodinamične stabilnosti in enostavne izdelave so za dermalno dostavo učinkovin primerni predvsem tekoči kristali z lamelarno strukturo. V nalogi smo vrednotili notranjo strukturo in potencialno citotoksičnost tekočih kristalov, sestavljenih iz lecitina in Tweena 80 kot emulgatorske zmesi, izopropilmiristata kot oljne faze in bidestilirane vode kot hidrofilne faze. Strukturno smo proučevali z diferenčno dinamično kalorimetrijo in ozkokotnim rentgenskim sipanjem. S slednjo metodo smo potrdili lamelarno strukturo tekočih kristalov, ki se je ohranila tudi pri temperaturi na površini kože. Vpliv tekočih kristalov na proliferacijo celic in s tem potencialno citotoksičnost smo določali na celični liniji keratinocitov s testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze. Pri treh testiranih koncentracijah so celice izkazovale signifikantno večjo proliferacijo v primerjavi s pozitivno kontrolo. Z mikroskopom na atomsko silo smo proučevali morfologijo keratinocitov po izpostavitvi tekočim kristalom in ugotovili, da morfološke spremembe celic nastopijo že pri subtoksičnih koncentracijah tekočih kristalov.

Structure and Cytotoxicity Characterisation of Liquid Crystals for Dermal Application

TANJA TAVČAR, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Supervisor: Mirjana Gašperlin, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Lyotropic liquid crystals are used as drug delivery systems for different pharmaceutical applications. Those with lamellar structure are especially suitable for dermal application due to their appropriate consistency, great solubilization properties, thermodynamic stability and easy preparation. In diploma We evaluated structure and potential cytotoxicity of liquid crystals consisting of lecithin and Tween 80 as surfactants, isopropyl myristate as oil phase and bidistilled water as hydrophilic phase. Structure was evaluated with differential scanning calorimetry and small angle x-ray scattering. With latter method lamellar structure was confirmed and was preserved at skin surface temperature. Effect of liquid crystals on cell proliferation and with that potential cytotoxicity was determined on keratinocyte cell line with mitochondrial dehydrogenase activity assay. Cell proliferation was significantly higher at three concentrations tested compared to positive control. Morphology of keratinocytes after exposure to liquid crystals was observed under the atomic force microscope. Yet at subtoxic concentrations of liquid crystals effects on cell morphology were observed.

Problematika neuporabnih zdravil

KATJA ČIČ, DARJA GAČNIK, AJDA MAVRIČ, *Gimnazija Novo mesto*

Mentorica: **Marija Kovač**, *Gimnazija Novo mesto*

Somentorica: **Stanislava Florijančič**, *Gimnazija Novo mesto*

Cilj raziskovalne naloge je bil seznaniti se s problematiko neuporabnih zdravil. Naloga je sestavljena iz teoretičnega in empiričnega dela. V teoretičnem delu smo se seznanili z glavnimi značilnostmi zdravil, opozorili na nepravilno odlaganje zdravil v okolje in se osredotočili na ravnanje z neuporabnimi zdravili. Naredili smo tudi intervju v Lekarni Novak (Novo mesto) in v Dolenjskih lekarnah (Novo mesto). Empirični del predstavlja anketa, s pomočjo katere smo se seznanili s poznavanjem problematike neuporabnih zdravil med ljudmi. Neuporabna zdravila so zdravila, ki so končnemu uporabniku ostala po uporabi, ki jim je potekel rok trajanja in ki so zaradi neustreznega hranjenja spremenila videz, vonj, agregatno stanje ipd. Za okolje so nevarna. Iz ankete in pogovora smo ugotovili, da je ozaveščenost o nevarnosti in pravilnem odlaganju čedalje večja, tretjina anketirancev pa neuporabna zdravila odvrže v smeti. Upamo, da smo s svojo raziskovalno nalogo ozavestili prav te.

Problematic of Unused Medications

KATJA ČIČ, DARJA GAČNIK, AJDA MAVRIČ, *Novo mesto Gymnasium*

Supervisor: **Marinka Kovač**, *Novo mesto Gymnasium*

Co-supervisor: **Stanislava Florijančič**, *Novo mesto Gymnasium*

The objective of our research was to acquaint ourselves with the problem of unused medications. Our research consists of two parts - theoretical and empirical. In the theoretical part we studied the main characteristics of medications; we also highlighted the improper disposal of medications in the environment and focused on the handling of unused medications. We made an interview at Lekarna Novak (Novo mesto) and Dolenjske lekarne (Novo mesto). The empirical part consists of a survey to acquaint ourselves with the knowledge of people on the problem of unused medicines. Unused medicines are drugs and drug residues that are left after the end of user's application, expired drugs and useless products that are changed in appearance, odor, physical state, etc. due to improper storage. These are dangerous for the environment. From the survey and interviews we found that awareness of the proper disposal is getting better. However, there is still a third of respondents to dispose of unused dustbin. With this research project we hope that we will aware people of unused medications issue.

Lutein v ekstraktih iz nekaterih naravnih virov in v prehranskih dopolnilih

MANCA KAVŠČEK, ALJA AJDIŠEK, MATEJA ČEŠNOVAR, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Mentorica: **Vojka Zupančič**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Lutein je zdravju koristen naravni rumeni karotenoidni pigment. Je antioksidant, ki ima pomembno vlogo pri procesu gledanja. Namen raziskovalne naloge je bil identificirati lutein v nekaterih prehranskih dopolnilih in njegovo vsebnost primerjati z vsebnostjo v nekaterih naravnih rastlinskih virih. Preveriti smo želeli tudi, kako različna ekstrakcijska topila vplivajo na sestavo ekstraktov. S petimi različnimi topili smo ekstrahirali šest naravnih virov luteina. Ekstrakte smo analizirali s tankoplastno kromatografijo (TLC). Za primerjavo smo izbrali devet prehranskih dopolnil z luteinom in jih prav tako analizirali s TLC. Kromatograme smo med seboj primerjali in ugotovili, da se sestave ekstraktov posameznih rastlinskih virov luteina v različno polarnih topilih med seboj precej razlikujejo. Na podlagi dobljenih rezultatov domnevamo, da je vsebnost luteina v prehranskih dopolnilih v skladu z deklarirano vrednostjo. Rezultati raziskovalne naloge kažejo, da izmed izbranih rastlinskih virov vsebuje največ luteina ognjič, sledita pa mu rdeča paprika in špinača.

Lutein in Extracts from Some Plants and in Dietary Supplements

MANCA KAVŠČEK, ALJA AJDIŠEK, MATEJA ČEŠNOVAR, *Grm Novo mesto - Centre of Biotechnology and Tourism, Agriculture School Grm and Biotechnical Gymnasium*

Supervisor: **Vojka Zupančič**, *Grm Novo mesto - Centre of Biotechnology and Tourism, Agriculture School Grm and Biotechnical Gymnasium*

Lutein is a natural yellow carotenoidic pigment which helps maintain our health. Lutein has been proven to be the antioxidant which plays an important role in preserving our eyesight. The aim of research was to identify lutein in some dietary supplements and compare its presence with the quantity of lutein in some plants. We also wanted to find out the effects of a solvent type used in extraction, on the composition of the extracts. The extraction of lutein from six natural sources was performed and five different types of solvents were used. The extracts were analysed with the use of the thin-layer chromatography (TLC). For the comparison nine dietary supplements with lutein were used and analysed with TLC method. Chromatograms were compared. We found out that the composition of the extracts taken from plants in different types of solvents differ significantly. On the basis of the obtained results we assume that the quantity of lutein in tested dietary supplements agrees with quantity declaration. The results show that among all the plants tested, calendula contains the most lutein, followed by red pepper and spinach.

Priljubljenost farmacevtskih oblik

JERCA KRANJC, BRED A ŠKEDELJ, *Gimnazija Novo mesto*

Mentor: Miroslava Abazović, *Dolenjske lekarne*

Somentorica: Branka Klemenčič, *Gimnazija Novo mesto*

Svetovni trg nam ponuja veliko različnih farmacevtskih oblik. Zdravila in prehranske dodatke jemlje veliko ljudi vseh starostnih skupin. Farmacevtske izdelke največkrat jemljemo za lajšanje bolečin, ob prehladih in za zniževanje telesne temperature. Večina teh zdravil vsebuje zdravilne učinkovine, kakršna je paracetamol. Z raziskovalno nalogo smo želeli raziskati, katere farmacevtske oblike potrošniki največkrat izberejo in kako pogosto jih jemljejo, kaj je vzrok za njihovo izbiro, s katerimi farmacevtskimi oblikami so imeli največ težav pri jemanju in kakšne so bile te težave. Rezultati so pokazali, da ljudje najraje jemljejo filmsko obložene tablete, saj imajo z njihovim jemanjem najmanj težav. Najmanj priljubljene farmacevtske oblike so svečke, zaradi neprijetne uporabe, in neobložene tablete, zaradi neželenih učinkov in okusa. Kljub množičnemu oglaševanju imajo pri izbiri zdravila najpomembnejšo vlogo lastne izkušnje ter mnenja prijateljev in znancev. Potrošniki tako raje uporabljajo preverjene farmacevtske oblike, čeprav so morebiti na tržišču tudi oblike, ki so za uporabo primernejše, pri sproščanju zdravilnih učinkovin pa učinkovitejše.

Friendliness of the Dosage Forms

JERCA KRANJC, BRED A ŠKEDELJ, *Novo mesto Gymnasium*

Supervisor: Miroslava Abazović, *Dolenjske lekarne*

Co-supervisor: Branka Klemenčič, *Novo mesto Gymnasium*

These days there are a lot of different pharmaceutical forms available on the market. A large number of people from all age groups use drugs and food supplements. Most of the time some sort of pharmaceutical product is used to relief pain, for colds or to lower body temperature. These drugs usually contain active substances like paracetamol. We wanted to find out which are the pharmaceutical forms that users mostly use, what makes them decide for that form, which pharmaceutical forms are the most troublesome and what were the difficulties with their use. Results showed us that people are most likely to use film-coated tablets, because they cause the least trouble to swallow. The least user-friendly pharmaceutical forms are rectal suppositories, due to unpleasant use and tablets that are not film-coated, due to side effects and bad taste. Despite mass advertising the most important factor in deciding which pharmaceutical form to take are our own experience and an opinion from our friends and acquaintances. So consumers are more likely to use pharmaceutical forms that they already know, even if there are other forms on the market, that are more user-friendly and with active substances release being more effective.

Timijanovo mleko – dragocena pomoč zeliščnega mleka pri negi mešane, mastne in nečiste kože

ŠPELA PRAŠNIKAR, EVA UDOVIČ, TINA LAHNE, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Mentorica: Irena Kurajić, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Na biotehniški gimnaziji v Novem mestu smo raziskovali protibakterijsko delovanje dveh vrst timijanovega eteričnega olja, izdelali različne vrste timijanovega mleka in preizkusili primernost 0,05-odstotnega timijanovega mleka za nego kože na obrazu deklet, starih od 16 do 19 let. S pomočjo difuzijskega antibiograma smo ugotovili, da je povprečni premer inhibicijske cone za olje proizvajalca iz Ljubljane znašal kar 29,6 mm za bakterijo *Staphylococcus aureus* in 15,9 mm za bakterije vrste *Escherichia coli*. Kljub temu nobena vrsta timijanovega mleka (z 0,05 do 0,5 % timijanovega eteričnega olja) ni delovala niti na omenjeni vrsti bakterij niti na 24 bakterijskih izolatov s površine kože. Po desetdnevnem *in vivo* testiranju 0,05-odstotnega timijanovega mleka na koži obraza se je pokazalo, da je kar 9 od 11 testnih deklet občutilo izboljšanje. Pripravek zmanjšuje izločanje maščobe na koži, kožo pomirja in jo naredi mehkejšo. Katera od sestavin pripravka na koži dejansko učinkuje, bi bilo treba še raziskati.

Thyme Herbal Milk - Valuable Skin Care Help for Mixed, Oily and Impure Skin

ŠPELA PRAŠNIKAR, EVA UDOVIČ, TINA LAHNE, *Grm Novo mesto - Centre of Biotechniques and Tourism, Agricultural School Grm and Biotechnical Gymnasium*

Supervisor: Irena Kurajić, *Grm Novo mesto - Centre of Biotechniques and Tourism, Agricultural School Grm and Biotechnical Gymnasium*

We studied the antibacterial effects of 2 kinds of thyme essential oil, produced different types of thyme herbal milk and tested the appropriateness of 0,05 % thyme herbal milk for facial skincare of girls aged 16 to 19 years. With the help of a diffusion antibiogram we came to the result that an average inhibition zone diameter of the oil, made by a manufacturer from Ljubljana, is 29.6 mm for the bacterium *Staphylococcus aureus* and 15.9 mm for the bacterium *Escherichia coli*. However, no kind of thyme herbal milk (with 0.05 % up to 0.5 % of thyme essential oil) had either effect on the before mentioned kinds of bacteria or on 24 skin surface bacterial isolates. A ten day »*in vivo*« testing of 0.05 % thyme herbal milk on facial skin showed that 9 of 11 girls felt the improvement of their skin condition. The blend reduces skin fat secretion, soothes skin and makes it smoother. The actual effect of blend constituents should be investigated furthermore.

Ali pri vplivu antidepresivnih zdravil obstajajo razlike med spoloma?

ANA STRGAR, ARIADNA ŠTORMAN, Gimnazija Vič, Ljubljana

Mentorica: Alenka Mozer, Gimnazija Vič, Ljubljana

Somentor: Gregor Majdič, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ženske in moški se razlikujemo. Velikokrat pa pozabimo, da so razlike med spoloma prisotne tudi v možganih, in zato ne pomislimo, da bi lahko zdravila učinkovala različno tudi glede na spol bolnika. Tudi nekatere psihične bolezni se pojavljajo različno pogosto glede na spol. Prav zaradi tega je pomembno, da poznamo delovanje možganov in vzroke za nastanek teh bolezni. V raziskovalni nalogi smo se posvetili ugotavljanju razlik v učinkovanju antidepresivnih zdravil glede na spol. V uvodu smo predstavili hipoteze in cilje naloge. Raziskovanje nam je omogočila Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani. Testiranja so potekala pod vodstvom zunanjega mentorja, prof. dr. Gregorja Majdiča. V teoretičnem delu smo na kratko opisali možgane in njihovo delovanje ter spolne razlike v možganih. Posebno pozornost smo posvetili živčnima prenašalcema dopaminu in serotoninu, saj oba vplivata na nastanek depresije in anksioznosti. Depresija in anksioznost spadata med najpogostejše duševne bolezni. Najpogostejše se ju zdravi z različnimi terapijami in zdravili (npr. antidepresivi). Med antidepresive spada tudi fluoksetin, ki smo ga uporabili za testiranje. Vanj je bilo vključenih 35 miši, od tega 17 kontrolnih (8 samic in 9 samcev) in 18 miši, ki so s pitno vodo dobivale fluoksetin (9 samic in 9 samcev). Opravljeni so bili trije testi obnašanja: test dvignjenega labirinta v obliki križa (EPM), test odprtega polja (OF) in test prisilnega plavanja (FST). Vse miši so bile testirane po prej navedenem vrstnem redu. Testa EPM in OF sta bila izvedena za ugotavljanje anksioznosti, test FST pa za prepoznavanje depresiji podobnega obnašanja.

Is there a Sex Difference in Antidepressant Effects?

ANA STRGAR, ARIADNA ŠTORMAN, Vič Gymnasium, Ljubljana

Supervisor: Alenka Mozer, Vič Gymnasium, Ljubljana

Co-supervisor: Gregor Majdič, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Different mental diseases occur at different rates in men and women. That is why it is important to know how brain functions and the reasons for occurrences of these diseases. But we often forget that the differences between the genders are also present in the brain itself. Because of that we do not consider that drugs might have a different influence gender wise. In our study, we focused on determining the differences in the effect of antidepressants on men and women. In the introduction we set the hypotheses and goals of the study. The research was conducted at Veterinary Faculty of University of Ljubljana. The testing was performed under the guidance of external mentor prof. dr. Gregor Majdič. In the theoretical part we briefly described the brain and its function. Furthermore we described the gender differences. We gave special attention to nerve transmitters, dopamine and serotonin, because they both have an influence on the formation of depression and anxiety disorder, which are two of the most common mental illnesses. They are often treated with various therapies and medicaments (for instance antidepressants). We used an antidepressant fluoxetine for our study. Our testing included 35 mice, 17 control mice (8 females and 9 males) and 18 mice (9 females and 9 males) who received fluoxetine with drinking water. Three behavioural tests were performed with these mice: elevated plus maze test (EPM), open field test (OF) and Porsolt forced swimming test (FST). All mice were tested in described order. The tests EPM and OF were implemented for diagnosis of anxiety disorder, while the test FST was implemented for the recognition of depression like behaviour.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

77	Alja Ajdišek	70	Andreja Radman
51	Katja Berginc	71	Mateja Ravnikar
52	Mojca Brunskole Švegelj	8	Aleš Rotar
61	Deborah Chiavalon	71	Neža Rugelj
62	Aleksandra Čajić	80	Ana Strgar
77	Mateja Češnovar	72	Petra Šenica
76	Katja Čič	78	Breda Škedelj
76	Darja Gačnik	37	Roman Šink
63	Aleš Herman	73	Elena Šporar
19	Ilija Ilić	56	Suzana Štandeker
77	Manca Kavšček	80	Ariadna Štorman
78	Jerca Kranjc	74	Roman Štukelj
64	Vesna Kuhelj	75	Tanja Tavčar
79	Tina Lahne	72	Biljana Temova
25	Črt Malavašič	43	Karmen Teskač Planjšek
76	Ajda Mavrić	57	Tihomir Tomašić
53	Bojana Mirković	79	Eva Udovič
65	Nina Mugoša	14	Franc Vrečer
66	Gašper Ozimek	58	Nace Zidar
54	Stane Pajk	59	Borut Zupančič
67	Dejan Pavlin	60	Matej Živec
68	Teja Pavlin	61	Sandra Žvar
31	Jana Petković		
55	Nina Pirher		
79	Špela Prašnikar		
69	Benjamin Prek		

KAZALO MENTORJEV/SOMENTORJEV

78	Miroslava Abazović	52	Tea Lanišnik Rižner
74	Helena Abramovič	80	Gregor Majdič
64	Saša Baumgartner	67	Romana Marinšek Logar
55	Mojca Benčina	59	Barbara Mohar
61, 71	Marija Bogataj	80	Alenka Mozer
65	Darinka Brodnjak Vončina	56	Zoran Novak
73	Sabina Devjak Novak	54	Slavko Pečar
32	Metka Filipič	57	Lucija Peterlin Mašič
76	Stanislava Florijančič	66	Hrvoje Petković
67	Aleš Gasparič	70	Vesna Petrović Peroković
75	Mirjana Gašperlin	68	Odon Planinšek
60	Stanislav Gobec	66	Vladimir Pokorny
62	Damjan Janeš	20	Stane Srčič
55	Roman Jerala	69	Branko Stanovnik
70	Ivanka Jerić	65	Matej Stergar
58	Danijel Kikelj	52	Jure Stojan
78	Branka Klemenčič	26	Jurij Svete
56	Željko Knez	59	Boris Šket
65	Mitja Kolar	54	Janez Štrancar
53	Janko Kos	63	Jurij Trontelj
76	Marija Kovač	64, 73	Franc Vrečer
74	Veronika Kralj Iglič	38	Anamarija Zega
62	Samo Kreft	77	Vojka Zupančič
51	Albin Kristl	72	Simon Žakelj
44	Julijana Kristl		
79	Irena Kurajić		

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Lektoriranje Ksenija Kosem

Produkcija Petra Dular Muhič
Andrej Petek

Tisk Bograf tiskarna d.o.o.

Izdajatelj Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija
natisnjeno v nakladi 300 izvodov

www.krkinenagrade.si