



43. Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

43. Krkine nagrade | 43rd Krka Prizes

23. simpozij

Zbornik povzetkov

Poslanstvo

Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

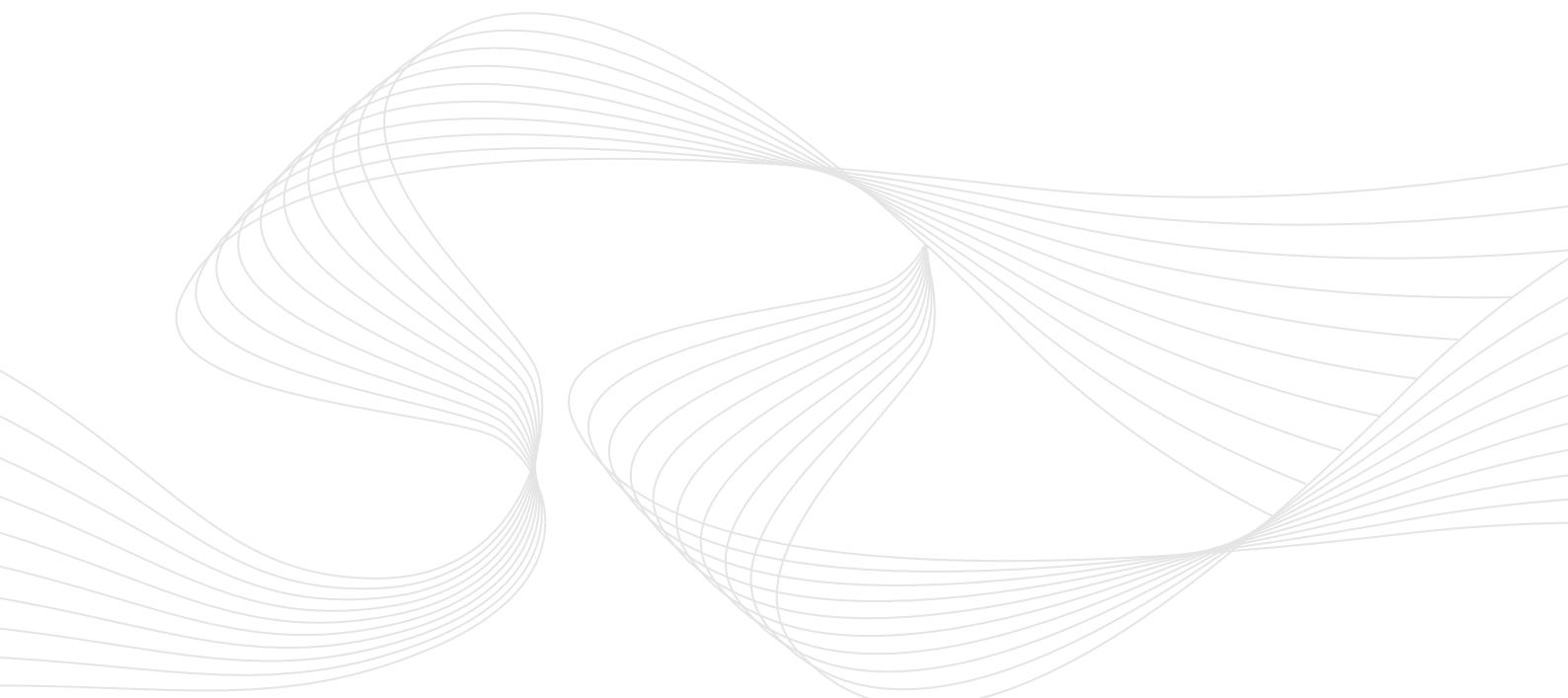
Spodbujamo mladostno zagnanost in stremljenje k odličnosti v raziskovalnem delu. Tlakujemo pot novim spoznanjem, ki bodo prispevala k novim izdelkom prihajajočih generacij.





23. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 18. oktober 2013



**Častni odbor
43. Krkinih nagrad**

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke akad. prof. dr. **Jože Trontelj**, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. **Ivan Svetlik**, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. **Danijel Rebolj**, rektor Univerze v Mariboru
Matjaž Tuš, predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
prof. dr. **Venčeslav Kaučič**, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. **Pavel Poredoš**, predsednik Slovenskega zdravniškega društva

**Svet Sklada
Krkinih nagrad**

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

Znanstveni odbor

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

mag. **Borut Anžič**, **Jože Arh**, **Nevenka Banovec**, **Breda Barbič Žagar**,
dr. **Primož Benkič**, dr. **Ana Bergant Simončič**, mag. **Marko Boh**, dr. **Žiga Bolta**,
dr. **Sergeja Bombek**, dr. **Blaž Brulc**, **Polona Bukovec**, dr. **Bojan Burja**, dr. **Nina Cimerman**, dr. **Aleš Curk**, dr. **Irena Čarman**, **Katja Čerpnjak**, mag. **Angela Čuk**, dr. **Boris Dular**, mag. **Tina Dular Meglič**, **Tamara Feuš**, doc. dr. **Aleš Gasparič**, dr. **Ivan Gobec**, mag. **Mojca Golob**, mag. **Anita Grandovec**, **Grega Hudovornik**, **Jernej Hvala**, mag. **Miran Hvalec**, dr. **Špelca Jenko**, dr. **Boštjan Jerman**, **Sonja Jurša Kšela**, **Saša Kajdič**, **Milena Kastelic**, dr. **Davor Kiđemet**, **Ksenija Kikelj**, **Matjaž Kirn**, **Alen Kljajić**, **Alenka Kmec**, dr. **Saša Kolarič**, **Jernej Kos**, mag. **Helena Kotnik**, dr. **Borut Kovačič**, **Irena Krajačič**, dr. **David Kralj**, mag. **Andrejka Kramar**, mag. **Alenka Kramarič**, dr. **Vesna Krošelj**,
mag. **Bojana Kržič**, **Andreja Kuhar**, dr. **Roman Lenarič**, dr. **Alenka Leskovar**,
mag. **Denise Leskovar**, mag. **Bronja Manček**, dr. **Tatjana Mateovič Rojnik**,
Matija Medved, dr. **Marija Meleh**, dr. **Špela Miklič**, **Mirjam Milharčič Simčič**,
mag. **Tamara Nemeč**, **Dušanka Oblak Božič**, **Maja Oblak**, **Uroš Ocepek**,
mag. **Irena Orel**, dr. **Renata Osolnik**, mag. **Vesna Pahor**, dr. **Matej Pavli**,
dr. **Anica Pečavar**, **Mitja Pelko**, dr. **Andreja Plaper**, mag. **Igor Plaper**, dr. **Miha Plevnik**, mag. **Ivan Radež**, dr. **Nataša Rebolič**, **Vojko Rebolič**, dr. **Tadej Recelj**,
Marjeta Redek, dr. **Aleš Rotar**, **Miloš Ružič**, **Robert Sekereš**, dr. **Igor Simonič**,
Gordan Sladič, dr. **Janez Smodiš**, dr. **Matej Smrkolj**, **Matej Stergar**, **Katarina Svetičič Gobec**, dr. **Leon Ščuka**, doc. dr. **Vida Škrabanja**, dr. **Anton Štimac**,
mag. **Neda Benički Švagelj**, dr. **Jaroslav Tihi**, dr. **Katja Trontelj**, mag. **Katja Trop**, mag. **Robert Ucman**, mag. **Sandra Urek-Blatnik**, dr. **Darko Uršič**,
mag. **Petra Vitezič**, dr. **Miha Vrbinc**, prof. dr. **Franc Vrečer**, dr. **Jernej Zadnik**,
dr. **Silvo Zupančič**, dr. **Rok Zupet**

VSEBINA | CONTENT

43. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Svetega Sklada Krkinih nagrad
- 10 | Krkini nagrajenci 2013

23. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | Franc Vrečer, predsednik Znanstvenega odbora

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

- 19 | Jure Bezenšek, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Nove sinteze karbocikličnih in heterocikličnih sistemov na osnovi adicij elektronsko revnih π -sistemov na enaminone
- 25 | Ana Kralj, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Nemčija
Sinteze in biološko ovrednotenje novih ligandov za z G-proteini povezan US28-receptor človeškega citomegalovirusa
- 31 | Simon Kukec, Krka, d. d., Novo mesto
Raziskave aglomeracije karvedilola s talinami v zvrtinčenih plasteh
- 37 | Mojca Lunder, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Zaščitni pleiotropni učinki nizkih odmerkov statinov in zaviralcev sistema renin-angiotenzin na delovanje srčno-žilnega sistema
- 43 | Ervin Šinkovec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Snovni transport in reakcijska kinetika z medfaznim prenašalcem kataliziranih reakcij v mikroreaktorju

43. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Leon Bedrač**, *Institut Jožef Stefan*
Jodove(I) spojine: Katalizatorji za jodiranje organskih molekul
- 52 | **Martin Gazvoda**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Intramolekularne reakcije diazenov in pretvorbe njihovih produktov
- 53 | **Mateja Hafner**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Vpliv atorvastatina in rosuvastatina na transkriptom človeških jeter ter mehanizmi delovanja posredovani z jedrnimi receptorji
- 54 | **Martina Hrast**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje in sinteza inhibitorjev ligaz Mur in ligaze D-alanil-D-alanin
- 55 | **Boštjan Markelc**, *Onkološki inštitut Ljubljana*
Vpliv elektroporacije in elektrokemoterapije na normalno in tumorsko žilje pri miših
- 56 | **Ana Novak**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza heterocikličnih analogov aminokislin in peptidov na osnovi 3-pirazolidinona
- 57 | **Romana Rošič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje, izdelava in vrednotenje biokompatibilnih nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja
- 58 | **Marko Trajkovski**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Zvijanje in prostorske strukture DNA G-kvadrupleksov
- 59 | **Uroš Trstenjak**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih inhibitorjev faktorja Xa in antagonistov GPIIb/IIIa kot potencialnih dualnih antitrombotičnih učinkovin
- 60 | **Tanja Vehovec**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Vpliv s funkcionalnostjo povezanih in ostalih lastnosti mikrokristalne celuloze na stabilnostni profil zdravilnih učinkovin
- 61 | **Anja Veronovski**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Sinteza in uporaba organskih biorazgradljivih aerogelov za kontrolirano sproščanje aktivnih substanc
- 62 | **Maja Krejan**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Modeliranje odločitvenega znana za pomoč pri promociji zdravil na recept
- 63 | **Ana Trkovnik Klun**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Študij stabilnosti učinkovine pramipeksola v prisotnosti pomožne snovi hidroksipropilmetilceluloze

- 64 | **Katarina Brulc**, Krka, d. d., Novo mesto
Medprocesna analitika za spremljanje sinteze 1-hidroksi-3,5-dimetiladamantana s plinsko kromatografijo
- 65 | **Jaka Glavač**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza in pretvorbe derivatov 5-aminometil-3-pirazolidinona
- 66 | **Tina Grohar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Separacija in identifikacija flavonoidov v polietenglikolnem izvlečku lubja navadne jelke (*Abies alba*)
- 67 | **Verica Herak**, Krka, d. d., Novo mesto
Sinteza in karakterizacija potencialnih nečistot v farmacevtski učinkovini
- 68 | **Saša Kajdič**, Krka, d. d., Novo mesto
Študij nitrilaz in ketoreduktaz za izvedbo biotransformacij izbranih farmacevtskih intermediatov
- 69 | **Klemen Korasa**, Krka, d. d., Novo mesto
Študija uporabnosti meritev v napravi za spremljanje procesa oblaganja pelet
- 70 | **Simon Kovačič**, Krka, d. d., Novo mesto
Spremljanje interakcij zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi z mikrokalorimetrijo
- 71 | **Ana Lemovec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj samomikroemulgirajočega sistema na osnovi Gelucire® 44/14 in njegova pretvorba v trdno farmacevtsko obliko
- 72 | **Tina Snoj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv vgradnje hidrofilnih snovi na podaljšano sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet, izdelanih iz polivinilacetata in polivinilpirolidona v razmerju 4 : 1
- 73 | **Ožbej Zupančič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza nekaterih heterocikličnih sistemov iz 3-(dimetilamino)enaminonov ter določanje njihove strukture in lastnosti
- 74 | **Nika Žerdoner**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Proučevanje vpliva elektrolitov na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov in na sproščanje pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet
- 75 | **Maja Kuzma**, Krka, d. d., Novo mesto, TIPK d. o. o.
Od priprave zdravila Nalgesin S do njegovega e-oglaševanja v slovenskem znakovnem jeziku
- 76 | **Matija Čarman, Barbara Vrečer**, Gimnazija Novo mesto
Uporaba encimov v proizvodnji zdravilnih učinkovin

- 77 | **Tjaša Čeh, Jan Mehak, Veronika Novak**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*
Dokazovanje ostankov antibiotika Synulox LC (kombinacija amoksicilina in klavulanske kisline s prednizolonom – AKP) za zdravljenje mastitisa pri izredni uporabi zdravila
- 78 | **Urška Furar, Tina Grubar**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*
Lahko na osnovi skupnih fenolov napovemo vpliv ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) na tvorbo TNF- α ?
- 79 | **Luka Golob**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Primerjava izražanja MyD88 z mutanto MyD88 L265P v celicah HEK293T
- 80 | **Domen Jan, Gal Žvegelj**, *Gimnazija Jesenice*
Primerjava vsebnosti laktata v mišičnih vlaknih in v krvi pri športni aktivnosti
- 81 | **Neža Levičnik**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Poskus izolacije rekombinantnega proteina iz inkluzijskih telesc s kombinacijo površinsko aktivnih snovi sarkozila, Tritona X-100 in CHAPS
- 82 | **Anja Lobnik, Eva Lobnik**, *II. gimnazija Maribor*
Pasivno kajenje
- 83 | **Maja Mikec, David Simonič**, *Gimnazija Novo mesto*
Razvoj in optimizacija postopka redukcije aromatske nitrospojine z uporabo katalitskega hidrogeniranja
- 84 | **Alen Pavlič**, *Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija*
Samozdravljenje bolečine z zdravili brez recepta v osrednji in jugovzhodni Sloveniji
- 85 | **Luka Pozne, Matic Ramšak, Diana Slaček**, *Biotehniška šola Maribor*
Uporaba in učinkovitost antiparazitikov pri psih
- 86 | **Jernej Zorman**, *II. gimnazija Maribor*
Določanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti izbranih hranil s pomočjo Briggs-Rauscherjeve reakcije in CAA analize
- 88 | **Kazalo avtorjev**
- 89 | **Kazalo mentorjev in somentorjev**



Naloge, ki so prispele na letošnji razpis za Krkine nagrade, so na zanimiv način pokazale stanje na področju raziskovalnega dela mladih v naši državi. Seveda so med nalogami razlike, saj gre za zelo različne stopnje raziskav, od gimnazijskih do podiplomskih na doktorski stopnji. Vseeno pa je razvoj znanosti in tehnologije tisti, ki omogoča vedno višjo raven zahtevnosti, vedno bolj poglobljene raziskave ter najpomembnejše: vedno kompleksnejše znanje. Tudi v Krki bomo sledili temu toku, v naši vsakodnevni dejavnosti, kamor spadajo tudi razvoj in raziskave kot eden temeljev rasti podjetja. Odzvali pa se bomo tudi v okviru Krkinih nagrad. Desetletna tradicija nam narekuje občutljivost za spremembe in odgovornost do mladih raziskovalcev in njihovih mentorjev. Prav zaradi odgovornosti pri sporočanju, kaj je za kakovostno raziskovalno delo in dosežke res najpomembnejše, bomo v naslednjem obdobju še večjo pozornost namenili izvirnosti in ustvarjalnosti kot temeljema pri ocenjevanju in nagrajevanju prijavljenih nalog. Tehnološki napredek je prinesel vrsto pomembnih, prebojnih in tudi atraktivnih metod, ki olajšajo ali celo omogočijo določeno raziskavo. Vendar vemo, da sta za dosego ciljev odločilna ustvarjalna zamisel in trdo delo. Verjamemo, da je na teh temeljih zgrajena tudi naša skupna prihodnost.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

Research papers competing for the 2013 Krka Prizes award are an interesting reflection of the position in which young people involved in research in Slovenia find themselves. Naturally, papers differ greatly from one another as the level of research work ranges from high school to doctoral. Nonetheless, it is the progress of science and technology that enables increasingly more challenging and profound research and most importantly; increasingly complex knowledge. Also, we at Krka will follow this trend in our everyday activities that include research and development as one of the foundations of the company's growth. The Krka Prizes competition is also a way of responding to the trend. A ten-year tradition has made us sensitive to change and brought the responsibility towards young researchers and their mentors. Because we take responsibility in sending out a message on what brings good research and achievements, we will put a lot of attention on the uniqueness and creativity as the bases for marking and awarding the papers that entered the competition. However, we know that goals are achieved by having a creative idea and working hard. We believe that our future is built on these grounds.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2013 | KRKA PRIZE WINNERS 2013

KRKINE NAGRADOV ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Jure Bezenšek	doktor znanosti <i>s področja kemije</i>	Branko Stanovnik	2413
Ana Kralj	doktorica znanosti <i>s področja farmacije</i>	Markus Heinrich Nuška Tschammer Otto Phanstiel	2414
Simon Kukec	doktor znanosti <i>s področja farmacije</i>	Franc Vrečer Rok Dreu	2415
Mojca Lunder	doktorica znanosti <i>s področja medicinskih ved</i>	Gorazd Drevenshek Mišo Šabovič	2416
Ervin Šinkovec	doktor znanosti <i>s področja kemije</i>	Matjaž Krajnc	2417

KRKINE NAGRADOV ZA RAZISKOVALNO NALOGO | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Leon Bedrač	doktor znanosti <i>s področja kemije</i>	Jernej Iskra	2418
Martin Gazvoda	doktor znanosti <i>s področja kemije</i>	Slovenko Polanc	2419
Mateja Hafner	doktorica znanosti <i>s področja biotehnologije</i>	Damjana Rozman	2420
Martina Hrast	doktorica znanosti <i>s področja farmacije</i>	Stanislav Gobec	2421
Boštjan Markelc	doktor znanosti <i>s področja medicinskih ved</i>	Maja Čemažar Tomaž Jarm	2422

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Ana Novak	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Jurij Svetе	2423
Romana Rošic	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Julijana Kristl Saša Baumgartner	2424
Marko Trajkovski	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Janez Plavec	2425
Uroš Trstenjak	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Danijel Kikelj Janez Ilaš	2426
Tanja Vehovec	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Aleš Obreza Andrej Gartner	2427
Anja Veronovski	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Zoran Novak Željko Knez	2428
Maja Krejan	<i>magistra znanosti</i>	Vladislav Rajkovič	2429
Ana Trkovnik Klun	<i>magistra znanosti</i>	Helena Prosen Andrej Gartner	2430
Katarina Brulc	<i>magistra industrijske farmacije</i>	Jožko Cesar Anica Pečavar	2431
Jaka Glavač	<i>univerzitetni diplomirani kemik</i>	Jurij Svetе	2432
Tina Grohar	<i>magistra farmacije</i>	Samo Kreft	2433
Verica Herak	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Bogdan Štefane Davor Kiđemet	2434
Saša Kajdič	<i>univerzitetna diplomirana biokemičarka</i>	Polona Žnidaršič Plazl Aleš Gasparič	2435
Klemen Korasa	<i>magister farmacije</i>	Franc Vrečer Grega Hudovornik	2436

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Simon Kovačič	<i>univerzitetni diplomirani kemik</i>	Jurij Lah	2437
Ana Lemovec	<i>magistra farmacije</i>	Alenka Zvonar	2438
Tina Snoj	<i>magistra farmacije</i>	Saša Baumgartner	2439
Ožbej Zupančič	<i>magister farmacije</i>	Branko Stanovnik	2440
Nika Žerdoner	<i>magistra farmacije</i>	Saša Baumgartner Franc Vrečer	2441
Maja Kuzma	<i>diplomirana inženirka kemijske tehnologije</i>	Franc Požgan Bojan Mord Tina Ekar Likar Melita Jakopič	2442

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Matija Čarman	<i>dijak</i>	Tatjana Durmič	2443
Barbara Vrečer	<i>dijakinja</i>		2444
Tjaša Čeh	<i>dijakinja</i>	Jana Goršin Fabijan	2445
Jan Mehak	<i>dijak</i>	Anton Mehak	2446
Veronika Novak	<i>dijakinja</i>	Martina Žagar	2447
Urška Furar	<i>dijakinja</i>	Irena Kurajić	2448
Tina Grubar	<i>dijakinja</i>	Alojz Ihan	2449
Luka Golob	<i>dijak</i>	Monika Avbelj Nada Udovč Knežević	2450
Domen Jan	<i>dijak</i>	Katarina Trontelj	2451
Gal Žvegelj	<i>dijak</i>	Miha Pirih	2452
Neža Levičnik	<i>dijakinja</i>	Tomaž Bratkovič Nada Udovč Knežević	2453
Anja Lobnik	<i>dijakinja</i>	Katja Holnhaner Zorec	2454
Eva Lobnik	<i>dijakinja</i>	Vesna Masten Gubeljak	2455
Maja Mikec	<i>dijakinja</i>	Branka Klemenčič	2456
David Simonič	<i>dijak</i>	David Kralj	2457
Alen Pavlič	<i>dijak</i>	Dragica Budić Banović	2458
Luka Pozne	<i>dijak</i>	Kristina Dolinar Paulič	2459
Matic Ramšak	<i>dijak</i>		2460
Diana Slaček	<i>dijakinja</i>		2461
Jernej Zorman	<i>dijak</i>	Lovro Žiberna Sanja Cvar	2462



Če mi daste nalogo, ki ji lahko podarim nekaj svojega, ne bo več nalog; bo veselje, bo umetnost.

Bliss Carman

Tako kot v preteklosti je tudi razpis za letošnje, že 43. Krkine nagrade prinesel dijakom srednjih šol in študentom vseh treh študijskih stopenj izjemno oziroma nalogu, v katero so lahko vnesli nekaj oziroma veliko svojega. Kakovost in število prispelih nalog dokazujeta, da kljub vsem izzivom v družbi ne manjka mladih, ki sprejemajo izzive razpisa in v svoje raziskovalno delo in pripravo nalog vgrajujejo obilo veselja, znanja in časa. Navdušenje mladih raziskovalcev in seveda tudi njihovih mentorjev se kaže v naraščajoči kakovosti in odličnosti nalog, s katerimi se potegujejo za Krkine nagrade.

Letošnje naloge so postavile nove mejnike tako po številu prijav kot po kakovosti. Vse, ki sodelujemo pri razpisu Krkinih nagrad in pri izboru najboljših nalog, še posebej veseli veliko prijav dijakov iz strokovnih srednjih šol in gimnazij. Zavidljiva je tudi kakovost nalog, tako s stališča raziskovalnih idej, ki so temelj nalog, kot s stališča eksperimentalne izvedbe. Spoznanja, ki so jih mladi raziskovalci pri tem pridobili, jim bodo gotovo koristila pri nadaljnjem študiju ali delu.

V imenu Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in v svojem imenu se zahvaljujem vsem raziskovalcem, ki so svoje naloge prijavili na razpis za 43. Krkine nagrade, in jim hkrati čestitam za opravljeno delo, ki potrjuje njihov raziskovalni polet.

Posebej se zahvaljujem vsem mentorjem in somentorjem, ki ste mlade raziskovalce usmerjali na neznanih in neshojenih poteh raziskovanja in znanosti. Iskrena hvala tudi vsem strokovnjakom iz Krke, ki ste naloge pregledali in ocenili ter s tem Znanstvenemu odboru omogočili izbor najboljših nalog.

Vsem prejemnikom Krkinih nagrad in priznanj iskreno čestitam v imenu članov Znanstvenega odbora in seveda v svojem imenu. Želim si, da bi vas prejete nagrade še dodatno spodbudile k uspešnemu razvoju vaših sposobnosti in uporabi pridobljenega znanja v študijskem in delovnem okolju.

Prof. dr. Franc Vrečer
predsednik Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad

Set me a task in which I can put something of my very self, and it is a task no longer; it is joy; it is art.

Bliss Carman

Like in the past, this year's 43rd Krka Prizes competition also challenged secondary school and tertiary level students to put something of themselves in their research papers. The quality and the number of papers in competition prove that despite all the challenges in today's society, there are a lot of young people who welcome the challenges of the competition and who put a lot of joy, knowledge and time into their research work. The excitement of young researchers and their mentors is reflected in the rising quality and excellence of papers that compete for Krka Prizes.

This year's Krka Prizes have set new milestones in the quality and number of applied research papers. All of us who take part in the Krka Prizes competition and in the selection of the best papers are very pleased with the high number of papers received from vocational secondary school and grammar school pupils. Similarly, in terms of research ideas, which form the basis of any research work, and the experiments, the quality of papers is of a very high standard. Findings which young researchers have acquired in this project will, no doubt, serve them well in their future studies and work.

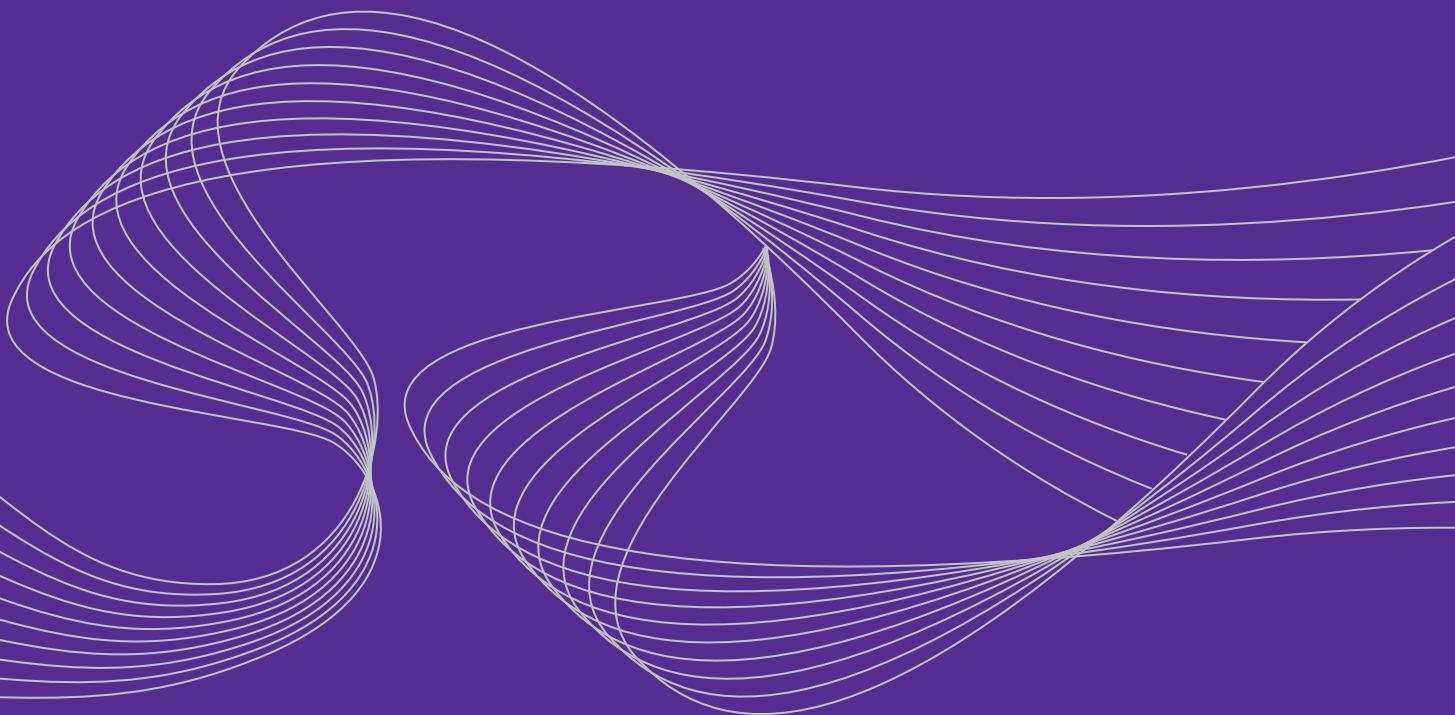
On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf I would like to thank all the researchers who submitted their papers to the 43rd Krka Prizes competition and congratulate them for their efforts, which have proven their research spirit.

I would especially like to thank all mentors and co-mentors who guided the young researchers on new and unpaved paths of research and science. I also thank all the experts from Krka who checked and assessed the papers thus enabling the Scientific Committee to select the very best.

So, congratulations to all the winners of Krka Prizes competition in my name and in the name of all the members of the Scientific Committee. I wish that these prizes serve as motivation to develop your abilities further and use the acquired knowledge in the academic and professional environment.

Prof. dr. Franc Vrečer
President of the Scientific Committee of the Krka Prizes Fund Council

43



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

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners



Dr. JURE BEZENŠEK

Dr. Jureta Bezenška je naravoslovje zanimalo že v osnovni šoli. Potem ko je končal Gimnazijo Novo mesto, se je zato odločil za študij na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Predčasno je diplomiral iz organske kemije in na isti smeri nadaljeval podiplomski študij, ki ga je uspešno končal marca 2013. Leta 2010 je vzporedno vpisal še magistrski študij menedžmenta na Ekonomski fakulteti, kjer je opravil vse študijske obveznosti, trenutno pa pripravlja magistrsko nalogo.

Področje njegovega raziskovanja je organska sinteza, ki se ukvarja s tem, kako iz manjših, enostavnih in poceni gradnikov na čim bolj enostaven način sestaviti večje in kompleksnejše molekule, ki naj bi v končni fazi imele neko aplikativno uporabo. V raziskovalni nalogi je proučeval reakcije enaminonov z elektronsko revnimi π -sistemi in nadaljnje pretvorbe nastalih produktov. Na podlagi strukture produktov, ki nastanejo pri reakciji med elektronsko revnimi acetileni in enaminoni, je ugotovil, da pri [2+2] cikloadiciji nastanejo ustrezni butadieni. Uspešno jih je cikliziral do 2-substituiranih piridinov in piridin N-oksidov. Pri tej metodi gre za novo sintezno pot omenjenih sistemov, ki pokriva široko paleto substituentov, ki jih lahko uvedemo na mesto 2. Nato je proučeval reakcije enaminonov z elektronsko revnimi aza analogi acetilenov – dialkil azadikarboksilati. Ugotovil je, da v tem primeru poteka aza Michaelova adicija. Nastale aza Michaelove adukte je uspešno pretvoril v ustrezne 2-imidazolonske sisteme in uporabnost metode testiral s totalno sintezo zdravilne učinkovine enoksimon in njenih H-, Cl-, Br- in SO₂Me-analogov.

Krkaš, ki se je pred kratkim zaposlil v Oddelku za kemijo v Kemijskem razvoju, pravi, da mora biti raziskovalec teoretično dobro podkovan in vztrajen pri svojem delu. Poudarja, da ga neuspeh ne sme odvrniti od dela, ampak ga mora dodatno spodbuditi. Kemija je namreč sestavljena iz številnih neuspešnih poskusov, zato prinašajo uspešni poskusi toliko večje zadovoljstvo. Raziskovalec mora biti zbran, dosleden in pozoren na malenkosti, ki lahko vplivajo na potek reakcije.

Ko se odmakne od delovnega okolja, se mu velikokrat porodijo najboljše ideje. Zelo rad potuje in hodi v gore. Letos se je že tretjič odpravil na trekking v Himalajo in prišel v bazni tabor najvišje gore sveta, kar si je od nekdaj zelo želel.

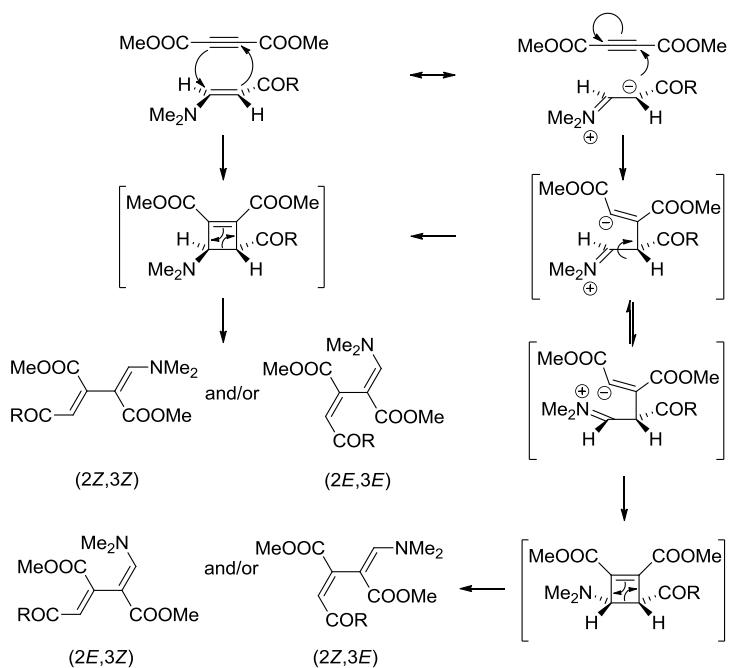
Krkine nagrade so za mlade raziskovalce velika motivacija, da svoje delo opravijo čim bolj kakovostno in vestno. Dr. Jure Bezenšek je nagrado prejel že kot srednješolec in jo dojema kot najprestižnejšo v slovenskem prostoru, ki jo mladi raziskovalec lahko dobi od industrijskega podjetja. »Ideja Krkinih nagrad se mi zdi zelo pozitivna in bi morala imeti več posnemovalcev, saj je v Sloveniji podobnega sodelovanja med industrijo in akademskim svetom malo. Nagrada je potrditev mojega dela in mi daje nov zagon za nadaljnje raziskovanje.«

Nove sinteze karbocikličnih in heterocikličnih sistemov na osnovi adicij elektronsko revnih π -sistemov na enaminone

JURE BEZENŠEK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

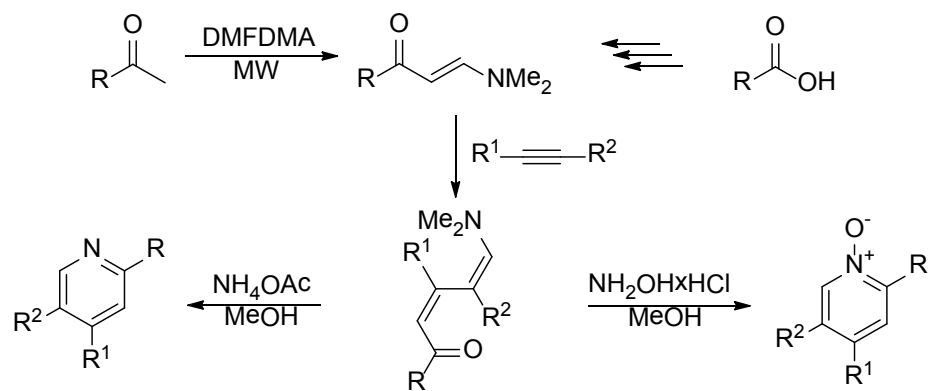
Mentor: Branko Stanovnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Proučevali smo reakcije enaminonov z elektronsko revnimi π -sistemi in nadaljnje pretvorbe nastalih produktov. Na podlagi strukture produktov, ki nastanejo pri reakciji med elektronsko revnimi acetileni in enaminoni, smo ugotovili, da poteka [2+2] cikloadicija in ne Michaelova adicija. Reakcija se je pokazala kot zelo splošna pri variiranju substituentov na enaminonih, saj so enaminoni reagirali z alifatskimi, aromatskimi, heteroaromatskimi in metalocenskimi substituenti. Reagirali so tudi aciklični, eksociklični in endociklični enaminoni. Potek reakcije smo predlagali kot kaskado reakcij, pri kateri v prvi stopnji z [2+2] cikloadicijo med elektronsko revnim acetilenom in enaminonom nastane ciklobuteinski intermediat, ki se v drugi stopnji odpira do ustreznega butadienskega produkta. Na podlagi eksperimentalnih podatkov smo ugotovili, da obe stopnji pretvorbe zelo verjetno potekata po ionskem in ne po pericikličnem mehanizmu (slika 1).



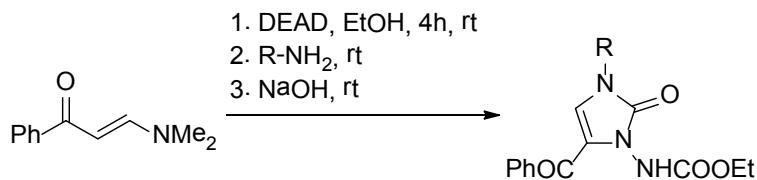
Slika 1. Predpostavljena reakcijska shema nastanka butadienov.

Nastale butadiene smo uspešno ciklizirali do ustreznih 2-substituiranih piridinov in piridin N-oksidov. Pokazalo se je, da je opisana metoda nova sintezna pot omenjenih sistemov, ki pokriva široko paletto substituentov, ki jih lahko uvedemo na mesto 2. Velika prednost metode je, da sinteza izhaja iz lahko dostopnih metil ketonov, ki jih v 3 stopnjah pretvorimo v 2-substituirane piridin in piridin N-oksidne sisteme. Prav tako predstavlja močno alternativo raznim kovinsko kataliziranim reakcijam, t. i. cross-coupling reakcijam (slika 2).



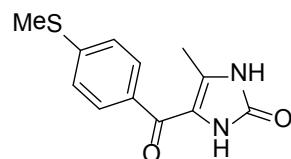
Slika 2. Nova sintezna metoda 2-substituiranih piridinov in 2-substituiranih piridin *N*-oksidov.

V drugem delu smo se posvetili študiju reakcij enaminonov z elektronsko revnimi aza analogi acetilenov – dialkil azadikarboksilati. Ugotovili smo, da v tem primeru poteka aza Michaelova adicija in ne [2+2] cikloadicija. Nastale aza Michaelove adukte smo nato uspešno pretvorili v ustrezne 2-imidazolonske sisteme (slika 3).



Slika 3. Nova sintezna metoda 2-imidazolonskih sistemov.

Na podlagi omenjenih reakcij smo razvili sintezno strategijo 2-imidazolonskih sistemov, ki dopušča variiranje substituentov na vseh štirih mestih v obroču. Uporabnost metode smo testirali s totalno sintezo zdravilne učinkovine enoksimon in njenih H-, Cl-, Br- in SO2Me-analogov (slika 4).



Slika 4. Enoksimon

Novel Syntheses of Carbocyclic and Heterocyclic Systems Based on Additions of Electron-Poor π -Systems to Enaminones

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

The reactions of enaminones with electron-deficient π -systems and further transformations of the isolated products have been studied. On the basis of the structures of the products, which have been isolated after the reaction of electron-poor acetylenes with enaminones, we have concluded that the reaction proceeded as a [2+2] cycloaddition and not as a Michael addition. The reaction was extremely susceptible to variations of substituents on enaminones. [2+2] Cycloaddition took place on aliphatic, aromatic, heteroaromatic and metallocenic as well as on acyclic, exocyclic and endocyclic enaminones. Formation of the products, which were isolated after the reaction of electron-poor acetylene with enaminones, was rationalized as a cascade reaction in which the formation of cyclobutene intermediate by [2+2] cycloaddition occurs in the first step and, in the next step ring opening of cyclobutene ring takes place. On the basis of experimental facts, we have concluded that both steps of the reaction cascade must proceed by ionic and not by pericyclic mechanism (Figure 1).

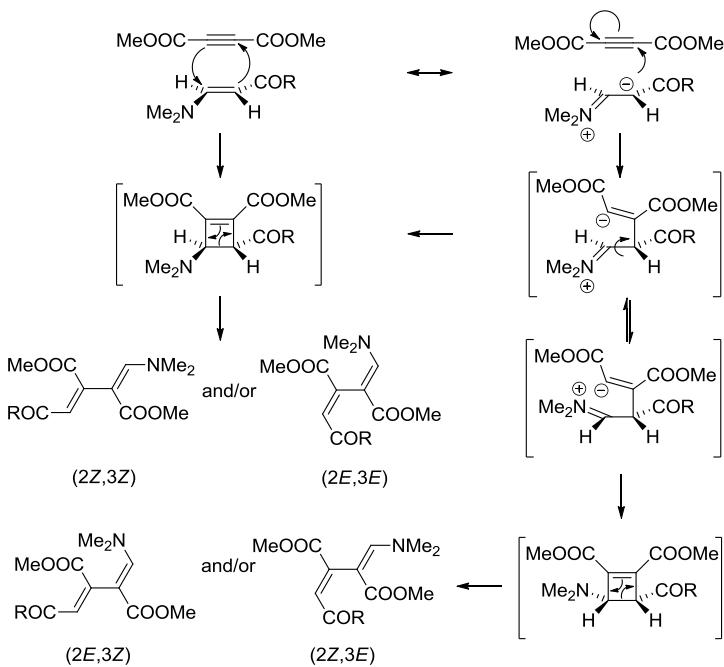


Figure 1. Proposed reaction scheme for the formation of butadienes.

Isolated butadienes were successfully cyclized to the corresponding pyridine and pyridine *N*-oxide systems. This new synthetic strategy for the formation of the above mentioned systems tolerates a wide variety of substituents at position 2. The biggest advantage of this method is that it begins from widely accessible methyl ketones, which are transformed into pyridine and pyridine *N*-oxide systems in three steps only. This synthetic method is also a valuable alternative to various metal catalysed cross-coupling reactions (Figure 2).

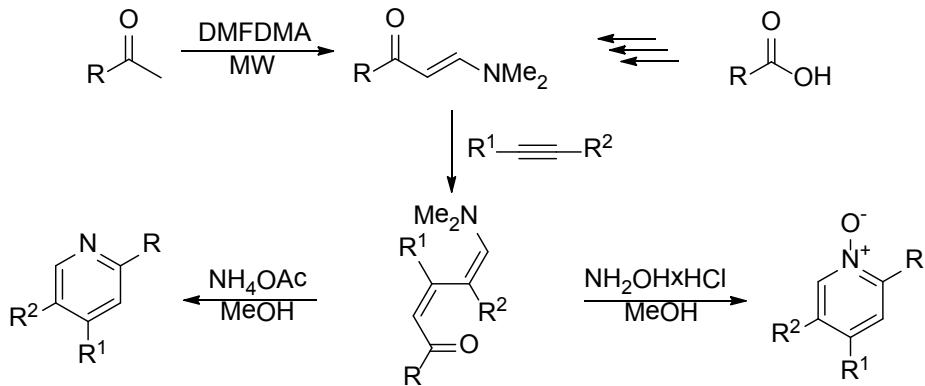


Figure 2. Novel synthesis method of 2-substituted pyridine and 2-substituted pyridine *N*-oxide systems.

The second part of the study focused on the reactions of enaminones with dialkyl azadicarboxylates as electron-poor aza analogues of acetylenes. We have found that this reaction proceeds as an aza-Michael addition and not as a [2+2] cycloaddition. The isolated aza-Michael adducts were then successfully transformed into the corresponding 2-imidazolone ring systems (Figure 3).

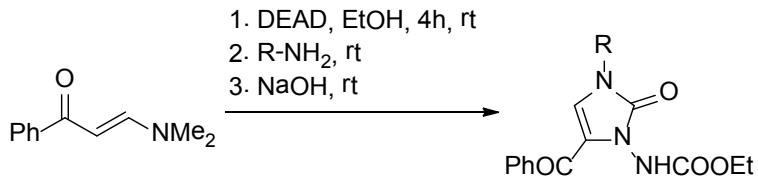


Figure 3. Novel synthesis method of 2-imidazolone ring systems.

On the basis of the above mentioned reactions, a new synthetic method was established which allows variation of all four substituents in the 2-imidazolone ring. The applicability of this method was tested on the total synthesis of enoximone and its H, Cl, Br and SO₂Me analogues (Figure 4).

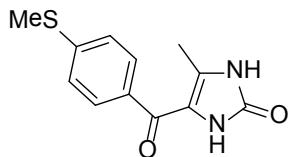


Figure 4. Enoximone.



Dr. ANA KRALJ

Dr. Ana Kralj, zlato maturantko s kranjske gimnazije, je od nekdaj zelo zanimalo naravoslovje, zato je študij nadaljevala na Fakulteti za farmacijo. V diplomski nalogi se je ukvarjala z nanotehnologijo, v doktorski nalogi pa se je osredotočila na sintezno kemijo in celično biologijo, ki jo je končala na katedri za kemijo in farmacijo Fakultete za naravoslovje in tehniko v Erlangnu v Nemčiji.

Primarno področje njenega raziskovanja je farmacevtska kemija. V raziskovalni nalogi je sintetizirala nove ligande za izbrane z G-proteinom povezane receptorje (GPCR) in testirala njihovo učinkovitost v celični kulturi. Tudi med trimesečno izmenjavo na Univerzi Centralne Floride v Orlandu je večino časa posvetila sintezi novih substanc. Te so učinkoviti zaviralci viralnega kemokinskega receptorja, ki je kodiran v DNK človeškega citomegalovirusa (HCMV) in sodeluje pri njegovi razširitvi po organizmu in v številnih bolezenskih zapletih, povezanih z okužbo z njim. Te okužbe so zelo razširjene, zato je razvoj novih protivirusnih učinkovin zelo zaželen. Pri sintezi novih ligandov se ni osredotočila le na njihovo učinkovitost na US28-receptor, ampak je želeta izboljšati tudi sintezni proces, ki bi pripeljal do preprostih in pocenih izhodnih substanc in reagentov ter omogočil kratke in robustne sintezne postopke z velikimi izkoristki.

»Mladi raziskovalec mora verjeti v to, kar počne, in se popolnoma predati svojemu delu. Bistvenega pomena sta tudi doveznost za nove ideje in pripravljenost za sodelovanje. Le uigrane ekipe raziskovalcev dosegajo dobre rezultate.«

»Razvoj in raziskave so gonilo gospodarstva, zato je združevanje akademskega sveta z industrijo izrednega pomena. Tega se očitno zavedajo tudi tujci, saj so se Krkine nagrade zelo razveselili tako moji nemški kot tudi ameriški mentorji. Veseli me, da Krka ceni naše delo in dosežke,« še poudarja dr. Ana Kralj, ki se je po dobrih treh letih študija pred kratkim vrnila v Slovenijo.

Sinteze in biološko ovrednotenje novih ligandov za z G-proteini povezan US28-receptor človeškega citomegalovirusa

ANA KRALJ, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Nemčija

Mentor: Markus Heinrich, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Nemčija

Somentorica: Nuška Tschammer, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Nemčija

Somentor: Otto Phanstiel, Univerza Centralne Floride, Orlando, ZDA

US28 je z G-proteini povezan receptor (GPCR), kodiran v DNK človeškega citomegalovirusa (HCMV). Odvisno od geografske regije je s HCMV okužene 40 do 100 % celotne populacije. Čeprav je latentna okužba asimptomatska, lahko pri imunsko oslabljenih gostiteljih vodi v hude in smrtno nevarne bolezni. Okužba s HCMV je povezana s številnimi kroničnimi vnetnimi boleznimi, kot je ateroskleroza, z rakom in zavrnitvijo transplantatov. Ugrabitev gostiteljevega znotrajceličnega signalnega sistema je osnovni del virusnih invazijskih strategij in tu je vloga viralnih GPCR-jev izredno pomembna.

US28-receptor je do zdaj najbolje okarakterizirani viralni GPCR. Zaradi visoke homologije s človeškimi kemokinskimi receptorji lahko celo veže nekatere kemokine. Njegovo konstitutivno signaliziranje se učinkovito vključuje v znotrajcelični signalni sistem gostitelja in omogoča virusno preživetje, razširitev po organizmu, v nekaterih primerih pa vodi celo v onkogenezo in poslabšanje srčno-žilnih bolezni. S tega vidika je US28-receptor izredno zanimiva farmakološka tarča. Naš cilj je bil sintetizirati ligande, ki bi zavrlji konstitutivno aktivnost tega viralnega GPCR-ja.

Pri proučevanju modulacije prek US28 posredovane aktivacije signalnih poti z mitogenom aktiviranimi proteinskih kinaz (MAPK) nam je uspelo identificirati parcialne inverzne agoniste US28-receptorja z dihidroizokinolinonsko in tetrahidroizokinolinsko osrednjo strukturo, ki so bili enako oziroma bolj aktivni kot že znani inverzni agonist US28-receptorja VUF2274. Dizajn teh ligandov je bil navdihnen s strukturo ligandov za CXCR3-receptor, saj je US28 kar 28-odstotno sekvenčno homologen temu človeškemu kemokinskemu receptorju. Z uporabo encimske katalize oziroma reakcije enantioselektivne makrociklizacije s pomočjo kiralnega auksiliarja nam je uspelo dokazati, da dihidroizokinolinonsko osnovno strukturo US28-ligandov lahko dobimo v enantiomerno obogateni oziroma potencialno čisti obliki.

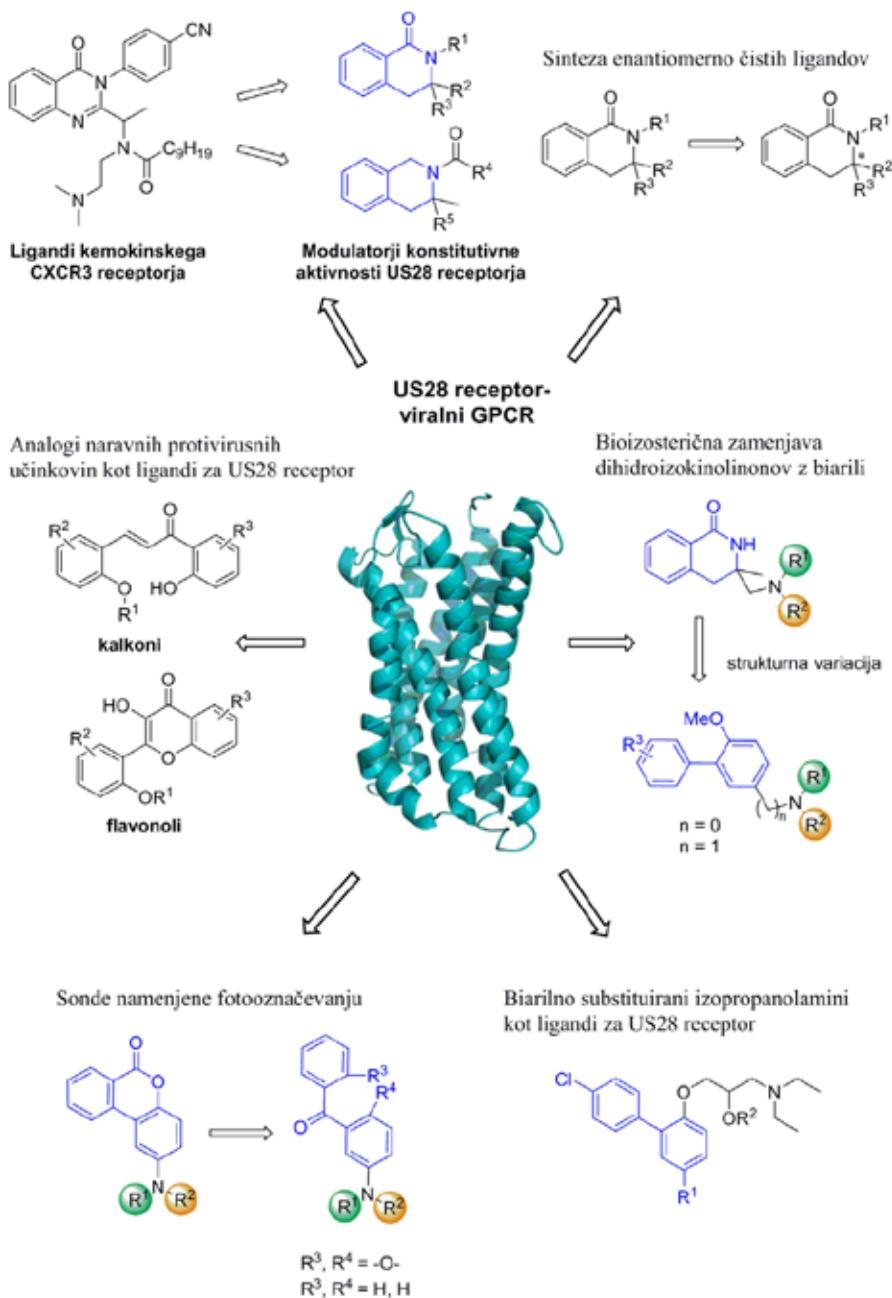
Ker je bil naš splošni cilj pri pripravi novih potencialnih ligandov za US28-receptor izkoristiti nedavno razvite učinkovite sintezne strategije z možnostjo širokega izbora substratov, se je v nadaljevanju porodila ideja za zamenjavo dihidroizokinolinonske enote z bifenili. Ta struktturna variacija je vodila v identifikacijo polnih inverznih agonistov za US28-receptor. V naši skupini so bili razviti optimirani pogoji za radikalско sintezo biarilov iz preprostih prekurzorjev v enem reakcijskem koraku in brez dodatnih zaščitnih skupin. Unikatna struktura bifenilov dodatno ponuja možnost variacije torzijskih kotov z uvedbo primernih substituentov na *ortomestu* glede na aril-arilno vez. Tudi bifenilno substituirani izopropanolaminski ligandi so bili karakterizirani kot delni inverzni agonisti US28-receptorja.

Pozornost smo usmerili tudi k naravnim protivirusnim učinkovinam. Številni naravno prisotni predstavniki flavonoidov so učinkoviti proti nekaterim herpesvirusom, vključno s človeškim citomegalovirusom, in celo vplivajo na ekspresijo kemokinskih receptorjev in njihovo interakcijo s kemokini. V prvotnem skriningu substanc s flavonoidno strukturo, ki so bile poslane z Univerze Centralne Floride, so bile tri substance iz razreda kalkonov in flavonolov karakterizirane kot modulatorji konstitutivne aktivnosti US28-receptorja.

Zato, da bi raziskali strukturno-aktivnostno odvisnost teh ligandov in seveda tudi izboljšali njihovo učinkovitost na US28, smo sintetizirali še 17 analogov prvotnih zadetkov in ovrednotili njihovo biološko učinkovitost.

Ne nazadnje smo izvedli prve poskuse načrtovanja fotolabilnih sond, namenjenih identifikaciji bližnjih aminokislin US28-receptorja na mestu vezave novosintetiziranih ligandov.

Dihidroizokinolinoni in tetrahidroizokinolini
kot inverzni agonisti US28 receptorja



Slika 1. Shematski prikaz področij raziskovalnega dela.

Synthesis and Biological Evaluation of New Ligands for the G-Protein Coupled US28 Receptor of Human Cytomegalovirus

ANA KRALJ, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Germany

Supervisor: **Markus Heinrich**, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Germany

Co-supervisor: **Nuška Tschammer**, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Germany

Co-supervisor: **Otto Phanstiel**, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando, Florida

US28 is a G-protein coupled receptor (GPCR) encoded in DNA of human cytomegalovirus (HCMV). Depending on the geographical region 40 to 100% of the population was proved to be HCMV positive. Although the latent infection is asymptomatic, it can lead to severe and life-threatening diseases in immunodeficient hosts. HCMV infection is associated with a number of chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis, cancer and transplant rejection. The hijacking of a host intracellular signalling machineries is the fundamental part of the viral host-evasion strategies and here the viral GPCRs play a very important role.

US28 receptor is so far the best characterized viral GPCR. Due to the high homology with human chemokine receptors, it can even bind several chemokines. Its constitutive signalling couples efficiently to the hosts' signalling networks and enhances viral survival, dissemination and in some cases causes oncogenesis or cardiovascular diseases. This makes the US28 receptor a very interesting pharmacological target and our goal was to synthesize ligands that would reverse the constitutive signalling of this viral GPCR.

Assessing the modulation of US28-mediated activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways, we were able to identify partial inverse agonists of US28 receptor with dihydroisoquinolinone and tetrahydroisoquinoline core structures that showed functional activity equal or superior to the known US28 inverse agonist VUF2274. The design of these ligands was inspired by the structure of the known CXCR3 receptor ligands, since US28 possesses 28% sequence homology with the human chemokine CXCR3 receptor. Moreover, by using enzyme catalysis or an enantioselective macrocyclisation reaction employing a chiral auxiliary, we were additionally able to demonstrate that dihydroisoquinolinone core structures of US28 receptor ligands can be obtained in enantiomerically enriched or potentially even enantiomerically pure forms.

Since our general goal regarding the preparation of new potential US28 receptor ligands was to exploit recently developed efficient synthetic strategies with a broad substrate scope, we considered the replacement of the dihydroisoquinolinone unit for a biphenyl scaffold. This structural change resulted in ligands with full inverse agonism at US28 receptor. In our group, optimized conditions for radical biaryl synthesis were developed, where biaryls are obtained from the very simple precursors in one reaction step and without any protecting group strategy. The unique nature of biphenyl unit additionally offers the possibility to vary its dihedral angle through the introduction of suitable substituents in *ortho*-position to the aryl-aryl bond. Ligands with biphenyl substituted isopropanolamine structure were also characterized as partial inverse agonists of US28 receptor.

Further, we paid attention to natural antiviral agents. Many naturally occurring representatives of flavonoids not only possess antiviral activity against several herpesviruses, including human cytomegalovirus, but also influence the expression of chemokine receptors and can prevent their interactions with chemokines. Within the screening of flavonoid structure based compounds sent from the University of Central Florida, three compounds from the classes of chalcones and flavonols were characterized as modulators of US28 receptor constitutive activity. In order to investigate structure-activity relationships of these compounds

as well as to improve their activity at US28, several analogues of the first hits were synthesized and biologically evaluated.

Last but not least, the first attempts to develop photoexcitable probes were made which could enable determination of the proximate amino acids in the binding pocket of newly synthesized ligands.

Dihidroizokinolinoni in tetrahidroizokinolinini
kot inverzni agonisti US28 receptorja

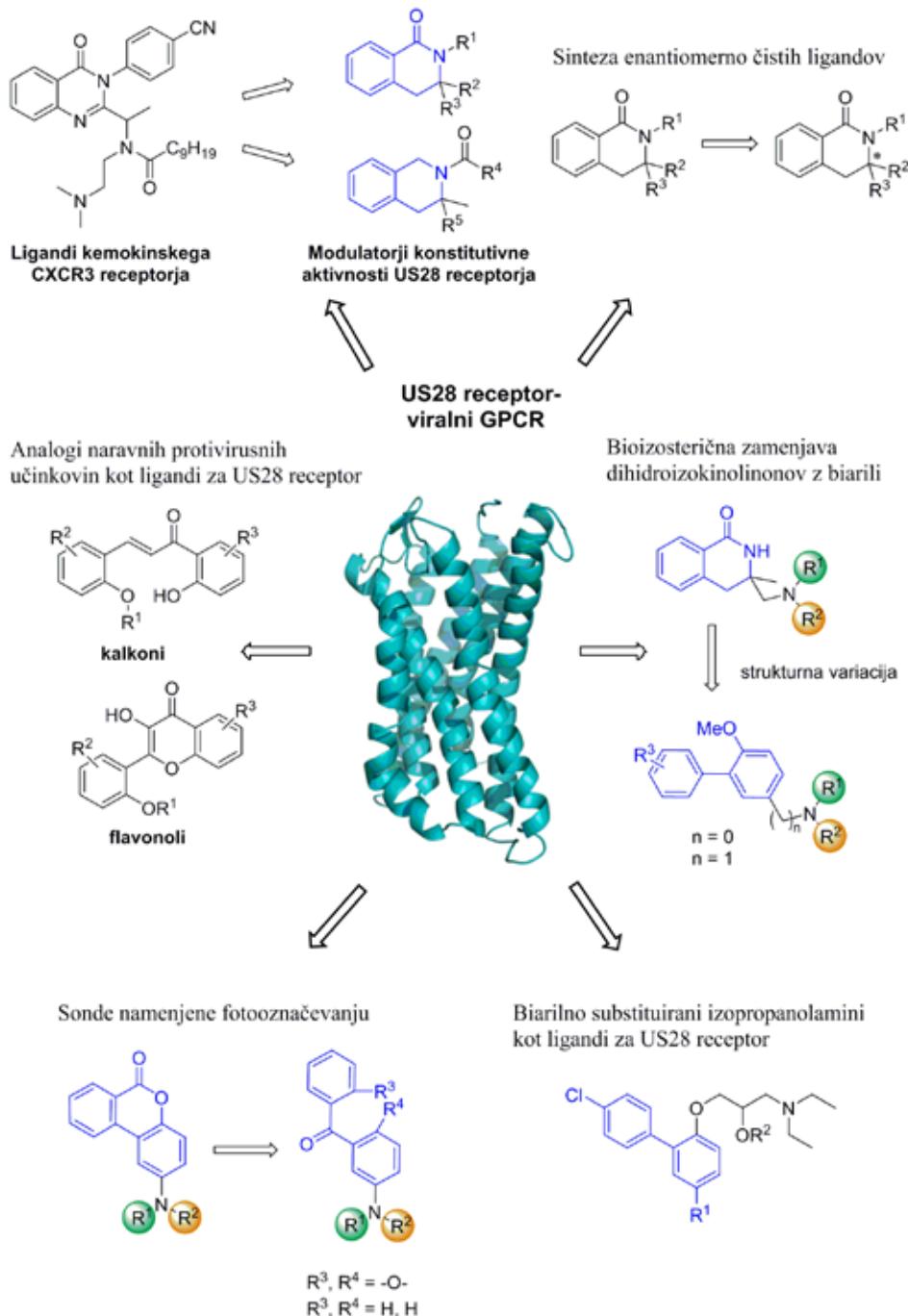


Figure 1: Objective of the research work.



Dr. SIMON KUKEC

Dr. Simon Kukec je po koncu šolanja na novomeški gimnaziji leta 2003 nadaljeval izobraževanje na Fakulteti za farmacijo. Med študijem je bil tudi demonstrator na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, Katedri za farmacevtsko kemijo in Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko. Leta 2008 je diplomiral in se zaposlil v Krki v Oddelku za farmacevtsko tehnologijo v Farmacevtskem razvoju. Septembra 2009 se je vpisal na doktorski študij ob delu in ga decembra 2012 tudi uspešno končal.

Krkaš primarno raziskuje farmacevtsko tehnologijo, ki po svoji naravi povezuje proučevanje različnih naravoslovnih ved. V nagrajeni raziskovalni nalogi se je osredotočil na študij industrijsko uporabne granulacije s talinami, ki predstavlja alternativo klasičnim vlažnim postopkom granuliranja. Na ta način se lahko izognemo uporabi topil in energijsko potratni fazi sušenja med tehnološkim postopkom izdelave granul, ki so največkrat predstopnja izdelave tablet ali kapsul. S postopkom aglomeriranja s talinami hidrofilnih pomožnih snovi z nizkim tališčem je znatno pospešil hitrost raztopljanja težko topne modelne zdravilne učinkovine in izboljšal njene farmacevtsko-tehnološke lastnosti za izdelavo tablet. V raziskovalno nalogu je vključil področje načrtovanja eksperimentov in procesnih analiznih tehnologij. V razvoju in proizvodnji zdravil nam slednje ponujajo učinkovite pristope k razumevanju in nadzorovanju tehnoških procesov ter omogočajo nenehno izboljševanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti končnega izdelka, tj. zdravila.

Dolenjec pravi, da mora biti uspešen raziskovalec vedoželen, vztrajen, sistematičen, delaven, prilagodljiv in zagnan. Pomembne lastnosti so še naravnost k uporabnim rezultatom, odprtost za konstruktivne predloge kolegov in zavedanje, da tudi neuspešni poskusi vodijo do končnega cilja. »Svoje znanje je treba nenehno širiti prek sodelovanja s strokovnjaki na sorodnih in drugih znanstvenih področjih, saj se na ta način povečuje tudi nabor raziskovalnih idej.« Te se mu velikokrat porodijo tudi zunaj delovnega časa, ki ga najraje preživilja s svojo ženo ob pogovoru, gledanju filmov, obisku koncertov in kulturnih prireditev. Že od nekdaj se rad ukvarja tudi s športom, predvsem z nogometom, kolesarjenjem in planinarjenjem.

»Krkine nagrade zelo spoštujem in visoko cenim, saj z dolgoletno tradicijo prepoznavajo in nagrajujejo znanstveno odličnost mladih raziskovalcev. Prepričan sem, da se tako krepi nujno potrebna povezava med akademskim svetom in gospodarstvom. Vsak raziskovalec si želi, da njegov znanstveni dosežek prepozna tudi gospodarstvo, saj se s tem njegova uporabnost nekoč lahko uresniči tudi v praksi. Vidno mesto med Krkinimi nagrajenci dojemam kot veliko priznanje za moje dosedanje raziskovalno delo. Krkina nagrada me navdaja s ponosom, pomeni mi veliko spodbudo in dodatno motivacijo za nadaljnje razvojno-raziskovalne izzive.«

Raziskave aglomeracije karvedilola s talinami v zvrtinčenih plasteh

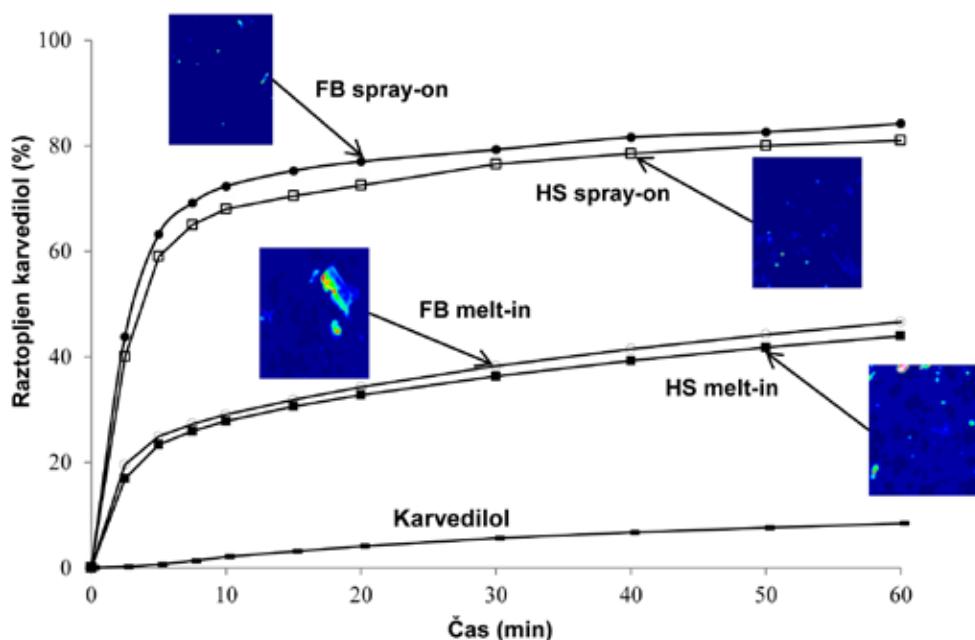
SIMON KUKEC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Rok Dreu, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Aglomeracija s talinami je danes tako z znanstvenega kot z aplikativnega vidika vedno bolj razširjena metoda za aglomeriranje prahov, pri čemer je objavljenih bistveno manj raziskav o uporabi vrtinčnoslojnega kot hitrovrečega granulatorja. Lastnosti aglomeriranega produkta so zelo odvisne od številnih parametrov, kar zahteva zelo dobro poznavanje mehanizmov rasti aglomeratov ter določitev kritičnih oziroma ključnih parametrov formulacije/procesa, ki najbolj vplivajo na lastnosti končnega produkta. Področja načrtovanja eksperimentov (DoE) in procesno analiznih tehnologij (PAT) nam danes ponujajo učinkovite načine, kako razumeti in tudi nadzorovati procese ter tako kontinuirano izboljševati kakovost izdelka, kar seveda spodbuja njihovo implementacijo v razvoju in raziskavah zdravil ter kasneje v proizvodnji farmacevtskih izdelkov.

V prvem sklopu doktorske naloge smo z aglomeracijo izbrane in v vodi slabo topne modelne zdravilne učinkovine karvedilol s talinami hidrofilnih veziv znatno izboljšali hitrost njegovega razapljanja in tem dokazali, da na obseg povečanja hitrosti vplivata tako vrsta uporabljenega veziva kot način njegovega dodajanja. V nasprotju s pričakovanji smo potrdili, da obseg povečanja hitrosti razapljanja karvedilola iz granul ni odvisen od uporabljeni opreme, kar omogoča zamenljivost vrtinčnoslojnega in hitrovrečega granulatorja. Z različnimi postopki (vrsta in način dodajanja veziva, tip opreme) nam je z uporabo instrumentalnih tehnik za realnočasovno merjenje velikosti granul uspelo doseči primerljivo porazdelitev velikosti delcev granulata. Z metodo ramanskega mapiranja smo potrdili svoja predvidevanja, da je za hitrost razapljanja karvedilola bistvenega pomena razprostirjanje hidrofilnega veziva po površini delcev zdravilne učinkovine.



Slika 1. Hitrost razapljanja čistega karvedilola in karvedilola iz granul, izdelanih z različnimi postopki aglomeriranja s talinami. Dodani so XY-posnetki granul z ramanskim mikroskopom.

Optimizirali smo proces *in situ* granulacije s talinami v zvrtinčenih plasteh, pri čemer smo uporabili središčni mešani eksperimentalni načrt in analizo odgovornih površin. Na ta način smo določili vpliv formulacijskih (delež veziva) in procesnih (temperatura vhodnega zraka in končna temperatura produkta) parametrov v proučevanem sistemu in tudi njihove optimalne vrednosti. V nadaljevanju smo na optimiziranem poskusu uspešno izvedli prenos tehnologije iz laboratorijskega merila v pilotno merilo (10-kratni faktor povečave) in dokazali ustreznost pristopa za povečavo serije.

Osredotočili smo se tudi na implementacijo instrumentalnih tehnik za realnočasovno merjenje velikosti delcev (FBRM in SFT) granulata med procesom rasti. Obe tehniki nam omogočata proučevanje evolucije rasti granul med procesom *in situ* granulacije s talinami v zvrtinčenih plasteh, pri čemer lahko prilagajamo procesne parametre in definiramo končno točko procesa glede na ciljno velikost delcev granulata. V nadaljevanju smo pokazali tudi potencial teh realnočasovnih tehnik za enostavnejše in učinkovitejše definiranje procesnih parametrov pri študiju povečave serije s primerljivo večjo opremo.

V zadnjem sklopu smo za izdelavo večenotne farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem težko topnega karvedilola uporabili kombinacijo aglomeriranja (hidrofilno vezivo) in oblaganja (lipidni materiali) s talinami. Ugotovili smo, da ima začetna temperatura strjevanja snovi za oblaganje največjo vlogo za uspešno izvedbo oblaganja s talinami teh snovi. Potrdili smo, da količina nanosa oblage in lipofilnost lipidnega materiala za oblaganje v največji meri določata kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine iz takšnih dostavnih sistemov.

Rezultati našega eksperimentalnega dela prispevajo k večjemu razumevanju aglomeriranja in oblaganja s talinami. Z izborom ustreznega tipa in tudi načina dodajanja veziva z nizkim tališčem lahko dosežemo tako pospešeno kot upočasnjeno sproščanje zdravilne učinkovine iz trdne farmacevtske oblike. Vključitev analizne metode ramanskega mapiranja in realnočasovnih tehnik za merjenje velikosti delcev je novost na področju aglomeracije s talinami v zvrtinčenih plasteh. Omogoča nam poglobljeno študijo razumevanja in tudi nadzorovanja teh procesov v povezavi s ciljnimi fizikalno-kemijskimi in biofarmacevtskimi lastnostmi produkta, kar nam seveda odpira nove možnosti za nadaljnjo optimizacijo procesov aglomeriranja s talinami v zvrtinčenih plasteh.

Study of Carvedilol Fluid Bed Melt Agglomeration

Simon Kukec, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Rok Dreu, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Nowadays, melt agglomeration is an increasingly popular method for agglomeration of pharmaceutical powders both from scientific as well as applied perspectives where significantly less research have been published on using fluid bed compared to high shear granulators. Agglomerated product properties are highly dependent on many parameters which require a very good understanding of agglomerate growth and identification of critical or key formulation/process parameters having the greatest influence on the properties of the final product. Design of experiments (DoE) and process analytical technology (PAT) offer effective approaches to understanding as well as controlling the processes and therefore continuous improvement of the product quality. This encourages their implementation in the research and development, and later in the manufacture of pharmaceutical products.

In the first part of the PhD thesis, the dissolution rate of a chosen poorly water soluble model drug, i.e. carvedilol, was significantly improved through melt agglomeration of the drug using hydrophilic binders, where the extent of improvement was influenced by the type and method of binder addition. Contrary to our expectations, the extent of improved dissolution rate of carvedilol from granules was proven to be independent from the equipment which allows interchangeability between fluid bed and high shear granulators. The comparable granule particle size was achieved with a variety of procedures (type of binder and method of its addition, type of equipment) using instrumental techniques for the real-time particle size measurement. By using the Raman mapping method we confirmed our prediction that the hydrophilic binder spreading over the surface of particles of the drug is essential for the dissolution rate of carvedilol.

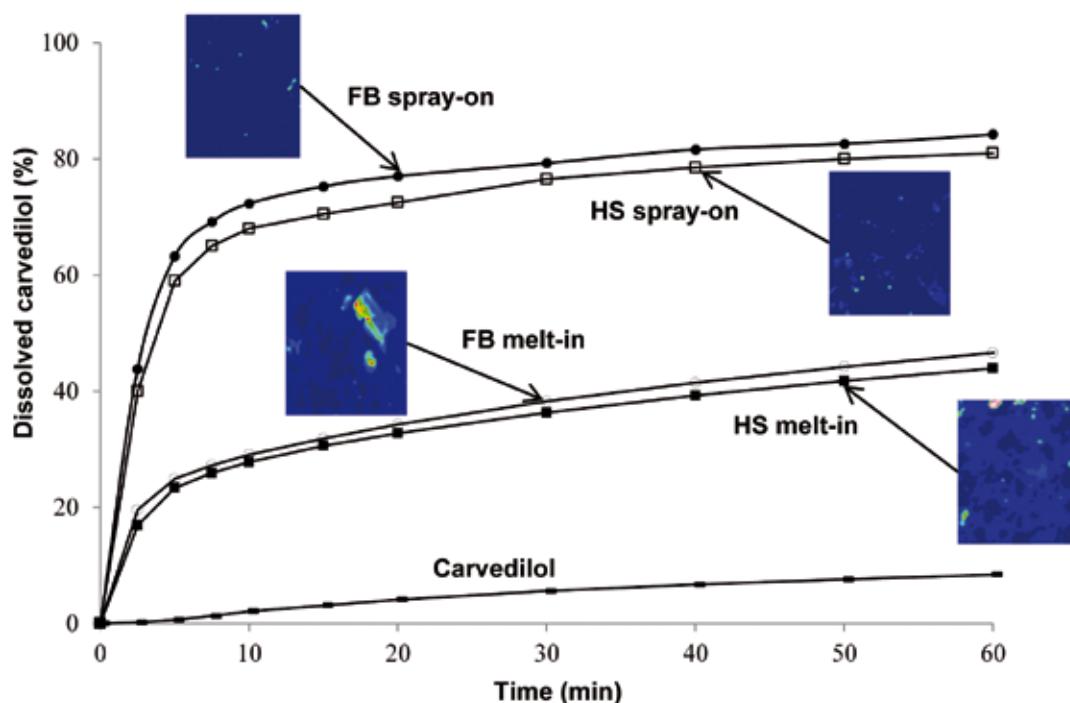


Figure 1. Dissolution rate of pure carvedilol and agglomerated carvedilol using different procedures of melt granulation. Raman XY scans of granules are added.

We optimized the process of *in situ* fluid bed melt granulation using central composite design and response surface methodology. In this way, we determined the influence of formulation (binder content) and process (inlet air and the product endpoint temperature) parameters on the studied system, and also their optimal values. Furthermore, we have successfully carried out the transfer of technology from the laboratory into pilot scale (scale-up factor of 10 times) on the optimized experiment and demonstrated the adequacy of scale-up approach.

We also focused on the implementation of instrumental techniques for real-time granule particle size measurement (FBRM and SFT) during the process. Both techniques allow us to study the evolution of granule growth during the process of *in situ* fluid bed melt granulation, whereby process parameters can be adjusted and granulation endpoint defined based on the target granule particle size. The potential of these real-time techniques was further demonstrated for simpler and more efficient definition of process parameters during scale-up study with comparable equipment.

In the last part of our work, the combination of melt agglomeration (hydrophilic binder) and melt coating (lipid-based materials) was used for the preparation of a multi-particulate dosage system of poorly water-soluble carvedilol. It was found that the onset solidification point of a coating material is the most important characteristic for obtaining the successful melt coating process. It was confirmed that the drug release kinetics from such delivery systems is largely determined by coating weight gain and lipophilicity of the lipid coating material.

The results of the presented experimental work contribute to a deeper understanding of melt agglomeration and coating processes. By selecting an appropriate type and method of addition of a low-melting binder, both immediate as well as sustained drug release from a solid dosage form may be achieved. The implementation of the Raman mapping method and real-time particle size measurement techniques, which represent a novelty in fluid bed melt granulation, allows us to study an in-depth understanding as well as controlling of these processes in relation to the aimed physicochemical and biopharmaceutical properties of the final product. This provides an opportunity for a further optimization of fluid bed melt agglomeration processes.



Dr. MOJCA LUNDER

Dr. Mojca Lunder se je raziskovalnega dela prvič lotila v zadnjem letniku gimnazije, resneje pa se z njim ukvarja od petega letnika študija medicine. Raziskovalno pot je po končanem dodiplomskem študiju medicine nadaljevala kot mlada raziskovalka na Medicinski fakulteti in na Kliničnem oddelku za žilne bolezni ter novembra lani zagovarjala doktorsko nalogo. Proučuje preprečevanje srčno-žilnih bolezni, s čimer se je ukvarjala že v doktorski nalogi.

Njeno primarno področje raziskovanja je srčno-žilni sistem (preventiva srčno-žilnih bolezni, staranje arterijskega sistema, ateroskleroza). »Za to področje sem se odločila, ker se mi je zdelo zelo zanimivo, saj so srčno-žilne bolezni pogoste in predstavljajo velik zdravstveni problem v državah razvitega sveta. Poleg tega se področje mojega raziskovanja dopolnjuje in prepleta s področjem mojega strokovnega dela, tj. specializacijo iz interne medicine,« je pojasnila.

V nagrajeni doktorski nalogi je proučevala inovativen preventivni pristop k srčno-žilnim boleznim. Osredotočila se je na spremljanje parametrov žilne odzivnosti oziroma funkcionalno-morfoloških lastnosti arterijske stene. Te nastajajo s staranjem arterijskega sistema in so predstavnja za razvoj srčno-žilnih bolezni, prisotne pa so tudi že pri zdravih preiskovancih srednjih let. Potrdila je učinkovitost pristopa, saj so se po enomesečnem zdravljenju s statinom, zavircem sistema renin-angiotenzin ali njuno kombinacijo v majhnem odmerku funkcionalno-morfološke lastnosti arterijske stene pomembno izboljšale. Arterije so se pomladile, postale bolj odzivne in zaščitene pred nastankom srčno-žilnih bolezni. Pozitivni učinek pa ne izgine s prenehanjem terapije, temveč traja še 6 do 10 mesecev po koncu terapije, ko se lastnosti arterijske stene počasi vrnejo na izhodiščno stanje.

»Znanstvenoraziskovalno delo pogosto zahteva veliko odrekanja, kar se kaže predvsem v pomanjkanju prostega časa in druženja z družino in prijatelji. Zato mora imeti uspešen raziskovalec interes in motivacijo za raziskovanje. Biti mora tudi radoveden, potrpežljiv, predan, vztrajen, pripravljen žrtvovati čas za raziskovanje in sposoben delati v timu,« je še poudarila mlada mamica.

»Krka s Krkinimi nagradami povezuje raziskovalne ustanove, kar se mi zdi zelo pozitivno. Je eno redkih podjetij, ki prepozna odlična dela na področju raziskovanja in jih tudi nagradi. Zavedate se, da so uspešni mladi raziskovalci temelj prihodnosti in jih tako spodbujate k raziskovalnemu delu. Krkina nagrada mi pomeni zelo veliko priznanje za trud, ki sem ga vložila v raziskovalno delo. Je pa tudi velika spodbuda za naprej,« je še dodala dr. Mojca Lunder.

Zaščitni pleiotropni učinki nizkih odmerkov statinov in zaviralcev sistema renin-angiotenzin na delovanje srčno-žilnega sistema

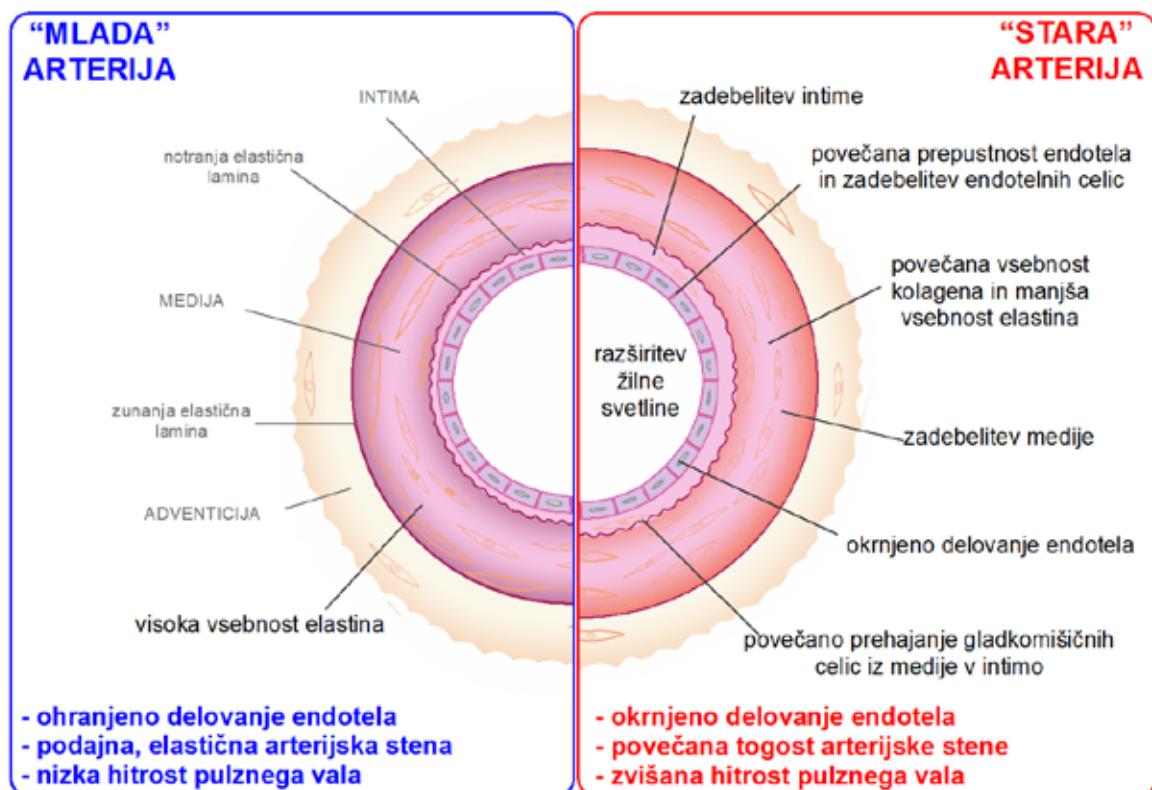
MOJCA LUNDER, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Gorazd Drevetišek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Mišo Šabovič**, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Preprečevanje in zdravljenje srčno-žilnih bolezni je pomembno napredovalo, kljub temu pa omenjene bolezni v razvitih državah še vedno spadajo med najpogosteje vzroke obolenosti in umrljivosti. Zato so nujne nove strategije za njihovo preprečevanje. V nalogi smo proučevali nov, izviren preventivni pristop k preprečevanju srčno-žilnih bolezni. Najpomembnejša novost v primerjavi z obstoječimi pristopi je v neposredni zaščiti arterijske stene oziroma izboljšanju delovanja arterij in ne v preprečevanju oziroma zdravljenju dejavnikov tveganja, ki imajo na arterijsko steno le posreden vpliv. Proučevali smo učinkovitost statinov in zaviralcev sistema renin-angiotenzin, za katere je znano, da imajo zaščitne pleiotropne učinke na srčno-žilni sistem oziroma na arterijsko steno. Nizke odmerke teh zdravil smo uporabili zato, da bi se izognili njihovi osnovni klinični indikaciji in stranskim učinkom in da bi dosegli le zaščitne pleiotropne učinke.

S pomočjo predkliničnih in kliničnih raziskav smo potrdili ugoden učinek nizkih, subterapevtskih odmerkov statinov in zaviralcev receptorjev za angiotenzin ter njune kombinacije na srčno-žilni sistem. V predkliničnih raziskavah smo potrdili takojšnje (akutno) in dolgotrajno (kronično) zaščitno pleiotropno delovanje atorvastatina in losartana v nizkih odmerkih ter njune kombinacije na srčno-žilni sistem podgane prek izboljšanja relaksacijske sposobnosti torakalne aorte in zmanjšanja ishemično-reperfuzijske okvare izoliranega srca. Pokazali smo tudi, da atorvastatin in losartan v nizkih odmerkih, še posebno pa njuna kombinacija, povečajo izražanje endotelne sintetaze dušikovega oksida in zmanjšajo izražanje receptorja za endotelin. V kliničnih raziskavah, v katere so bili vključeni zdravi preiskovanci srednjih let, smo potrdili, da so pri velikem deležu preiskovancev že prisotne funkcionalno-morfološke spremembe arterij (slika 1), kljub temu da imajo izračunano nizko tveganje za srčno-žilne bolezni. Fluvastatin in valsartan v nizkem odmerku sta po kratkotrajni (enomesečni) terapiji izboljšala funkcionalno-morfološke lastnosti arterijske stene, in sicer sta izboljšala razširitevno sposobnost nadlaktne arterije ter zmanjšala lokalno togost karotidne arterije in hitrost pulznega vala na karotidni arteriji. Kombinacija je bila učinkovitejša kot posamezni zdravili, saj je po kratkotrajni (enomesečni) terapiji najbolj izboljšala funkcionalno-morfološke lastnosti arterijske stene. Učinek posameznih zdravil je bil prisoten še do 6 mesecev po koncu terapije, učinek kombinacije pa dlje – do 10 mesecev po koncu terapije.



Slika 1. Shematski prikaz funkcionalno-morfoloških lastnosti arterijske stene, ki so posledica staranja arterijskega sistema (»stara« arterija). Na sliki je prečni prerez arterije. Plasti žilne stene so označene s sivo barvo.

V nalogi smo s pomočjo predkliničnih in kliničnih raziskav potrdili ugoden učinek nizkih, subterapevtskih odmerkov statinov in zaviralcev receptorjev za angiotenzin, še posebno pa njune kombinacije na srčno-žilni sistem, predvsem na izboljšanje funkcionalno-morfoloških lastnosti arterijske stene. Tako smo potrdili potencialno učinkovitost novega preventivnega pristopa k preprečevanju nastanka in razvoja srčno-žilnih bolezni: kratkotrajno (enomesečno) jemanje nizkih, subterapevtskih odmerkov statinov in zaviralcev receptorjev za angiotenzin ali njune kombinacije (najbolj učinkovita je kombinacija), kar bi po določenem času brez zdravljenja (6–12 mesecev) lahko ponavljali.

Beneficial Pleiotropic Effects of Low-Dose Statins and Renin-Angiotensin System Inhibitors on Cardiovascular System

MOJCA LUNDER, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: Gorazd Drevenšek, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Mišo Šabovič, University Medical Centre Ljubljana

The prevention and treatment of cardiovascular diseases have improved significantly but nevertheless, they still remain one of the major causes of morbidity and mortality in developed countries. Therefore, new preventive strategies are highly desirable. In the present thesis we have studied a new original preventive approach in cardiovascular medicine. Its main novelty in comparison to the currently established approaches is the direct protection of the arterial wall and arterial function improvement. It does not focus on the prevention and treatment of risk factors, which only have an indirect impact on the arterial wall. We have studied the effectiveness of statins and renin-angiotensin system inhibitors, which are known to possess beneficial pleiotropic effects on the cardiovascular system and of particular interest, on the arterial wall. We used low doses of the mentioned drugs in order to avoid their primary and side effects and to achieve only beneficial pleiotropic effects.

We have confirmed the beneficial effects of low subtherapeutic doses of statins, angiotensin receptor blockers and their combination on the cardiovascular system in preclinical and clinical studies. In preclinical studies, we have confirmed a direct (acute) and long-term (chronic) protective pleiotropic action of low-dose atorvastatin and losartan and their combination on the cardiovascular system of rats through improving the thoracic aorta relaxation and the reduction of ischaemic-reperfusion injury of the isolated rat heart. We have also shown that low-dose atorvastatin and losartan and especially their combination increased the expression of endothelial nitric oxide synthase and reduced the expression of endothelin receptor. In clinical studies in which healthy middle-aged males participated, we have confirmed that a large proportion of them already possessed functional and morphological arterial wall impairments (Figure 1), despite the calculated low cardiovascular disease risk. Low-dose fluvastatin and valsartan improved the functional and morphological arterial wall characteristics: improved brachial artery flow-mediated dilation and reduced local stiffness and pulse wave velocity on the carotid artery after the short-term (one-month) treatment. A combination of both drugs was more effective than separate drugs. Significant beneficial effects of low-dose fluvastatin or valsartan remained present up to 6 months after treatment discontinuation, the beneficial effects of combination was present for a longer period (up to 10 months) after treatment discontinuation.

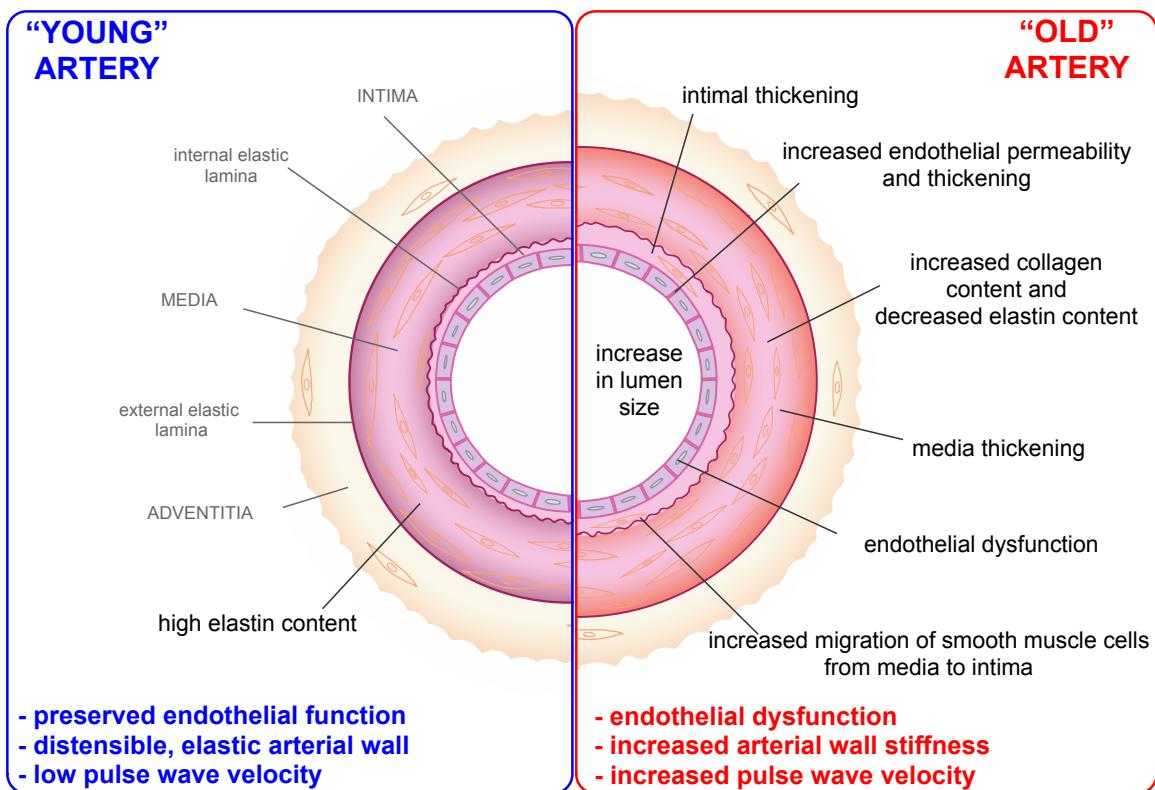


Figure 1: Schematic representation of functional and morphological arterial wall characteristics which are the consequence of the arterial ageing process. An artery in cross-section is shown, the layers of the arterial wall are marked in grey.

In conclusion, we have confirmed the beneficial effects of low subtherapeutic doses of statins, angiotensin receptor blockers and particularly their combination on the cardiovascular system. These were revealed through improvements of functional and morphological arterial wall properties. Thus, we have confirmed the potential efficacy of a new preventive approach against cardiovascular diseases, namely: a short-term (one-month) treatment with low subtherapeutic doses of statins and angiotensin receptor blockers, or their combination (being the most effective), which would be repeated intermittently after some time without treatment (6–12 months).



Dr. ERVIN ŠINKOVEC

Dr. Ervina Šinkovca so bolj kot laboratorijska kemija od nekdaj zanimali kemijski tehnološki procesi, zato se je po končani gimnaziji v Novem mestu odločil za študij kemijskega inženirstva na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Teoretično znanje, ki ga je pridobil na fakulteti, je v praksi nadgradil v Kemijskem razvoju v Krki, kjer je pripravil diplomsko nalogu, za katero je prejel Krkino nagrado. Na podiplomskem študiju se je odločil za proučevanje kemijskih reakcij v mikroreaktorjih, ki predstavljajo eno najnovejših in najhitreje razvijajočih se področij kemijskega inženirstva.

V raziskovalni nalogi se je osredotočil na dvofazne reakcije (tekoče-tekoče), katalizirane s faznim prenašalcem. Proučeval je snovni transport in reakcijsko kinetiko v dveh različnih tipih mikrokanalov pri dveh različnih tokovnih režimih. Z matematičnim modelom mu je uspelo napovedati potek proučevanih reakcij, pri katerih je ključen snovni transport. Hkrati je do potankosti spoznal mikrotehnologijo in možnosti njene uporabe v pilotnem, morda celo industrijskem merilu.

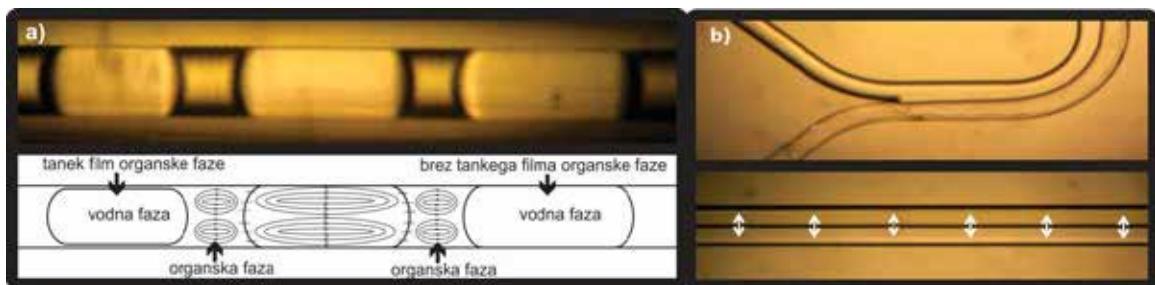
»Za uspešno raziskovalno delo je treba do zastavljenega cilja prispeti ne glede na ovire, ki se pojavijo na poti. Ključni sta vztrajnost in neobčutljivost za neuspehe, ki so sestavni del raziskav. Verjamem, da mi bodo vsa pridobljena znanja od razvoja sinteznih postopkov v laboratoriju in prenosa tehnologij v industrijski proces do poznavanja mikrotehnologije in razumevanja transportnih pojavov v veliko pomoč pri delu v Sektorju za proizvodnjo učinkovin, kjer sem trenutno zaposlen.« Krkaš poudarja, da raziskovalno delo zahteva veliko odrekanja, zato ostane malo prostega časa. Zelo je hvaležen, da ga pri njegovem delu podpirajo in razumejo partnerica in hčerki.

Gospodarstvo mora v današnjih časih ponujati nove izdelke in nenehno izboljševati proizvodnjo. Zelo pomembno je sodelovanje in povezovanje med raziskovalnimi ustanovami in gospodarstvom, pri čemer imajo Krkine nagrade velik pomen. Zelo sem počaščen, da sem s svojim raziskovalnim delom med Krkinimi nagrajenci. Nagrada potrjuje, da sem na pravi poti, hkrati pa predstavlja nov izviv, kako pridobljeno znanje čim bolj učinkovito uporabiti in nadgraditi pri svojem delu, nam je še zaupal dvakratni Krkin nagrjenec.

Snovni transport in reakcijska kinetika z medfaznim prenašalcem kataliziranih reakcij v mikroreaktorju

ERVIN ŠINKOVEC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Matjaž Krajnc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Potrebe kemijske industrije, predvsem farmacevtske in biokemijske, po novih tehnologijah so pripeljale do intenzivnega razvoja mikrotehnologije, ki je trenutno eno od najbolj inovativnih in najhitreje razvijajočih se področij kemijskega inženirstva. V zadnjih letih se je pokazalo, da imajo mikronaprave v primerjavi s tradicionalnimi sistemi veliko prednosti. Gre predvsem za hitrejši prenos topote in snovi, ki je posledica velike specifične površine in superiornih lastnosti mešanja znotraj mikrokanalov. Pomembna lastnost mikroreaktorjev so različni hidrodinamični tokovi, ki jih lahko zagotovimo znotraj mikrokanala. V dvofaznem sistemu tekoče-tekoče poznamo v mikroreaktorju naslednje možne tokovne režime: paralelni tok, kapličasti tok ter t. i. annular flow in slug flow. Kakšen tokovni režim se bo vzpostavil v mikrokanalu, je odvisno od fizikalnih lastnosti obeh tekočih faz, geometrije vstopa v mikrokanal, geometrije mikrokanala ter volumskega pretoka in razmerja med pretokoma obeh faz.



Slika 1. Slug flow tokovni režim v cevnem mikroreaktorju (a) in paralelni tokovni režim v pravokotnem mikroreaktorju (b).

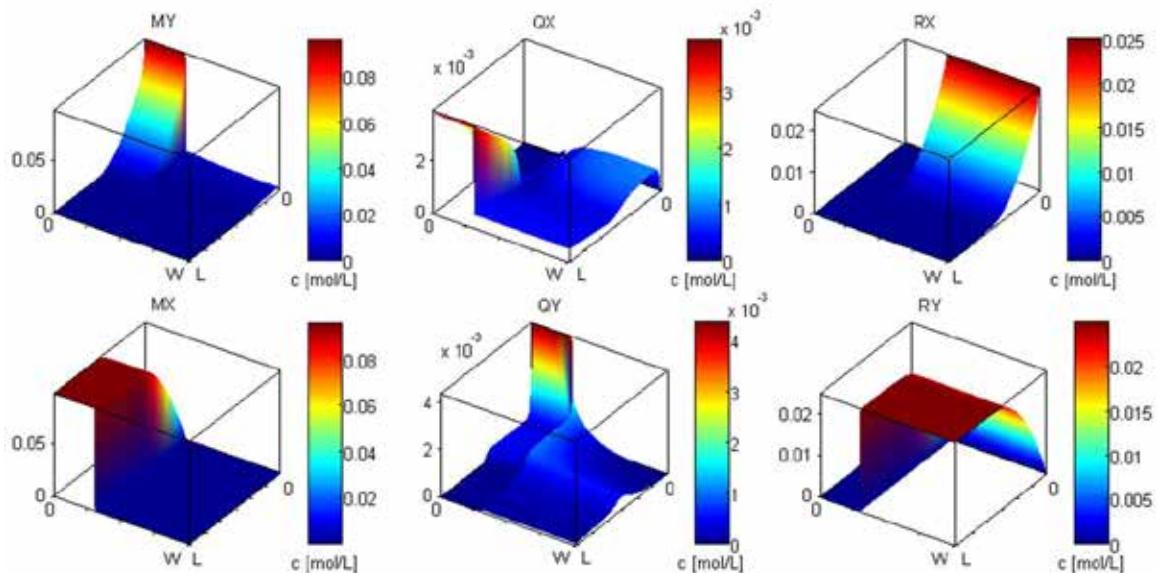
Kataliza s faznim prenašalcem (Phase Transfer Catalysis, PTC) je pri izvajanju dvofaznih kemijskih reakcij zelo pomembna metoda. V primerjavi s konvencionalnimi šaržnimi sistemi kažejo mikroreaktorski sistemi tudi pri PTC-reakcijah številne prednosti, ki jih lahko pri stabilnih tokovnih režimih pripšemo veliki in natančno določljivi medfazni površini. Kljub številnim objavam in zelo široki uporabi PTC-reakcij zasledimo v literaturi le nekaj znanstvenih objav, ki govorijo o vplivu snovnega transporta med dvema fazama v dvofaznih sistemih tekoče-tekoče na skupno hitrost kemijske reakcije. V doktorski disertaciji sem proučeval potek PTC-reakcij tekoče-tekoče v dveh različnih mikroreaktorjih pri dveh različnih tokovnih režimih.

Dvofazno Wittigovo reakcijo med benziltrifenilfosfonijevim bromidom (BTPPBr) in *p*- oziroma o-metoksibenzaldehidom sem izvajal v cevnem mikroreaktorju pri stabilnem *slug flow* tokovnem režimu. Opazil sem velik vpliv procesnih parametrov na stabilnost tokovnega režima, specifično medfazno površino ter posledično na snovni transport med obema fazama in skupno hitrost kemijske reakcije. Ugotovil sem, da je skupna hitrost kemijske reakcije v cevnem mikroreaktorju višja kot v šaržnem reaktorju, kar lahko pripšemo večji medfazni površini in posledično hitrejšemu snovnemu transportu znotraj faz in med fazama. Do podobnih ugotovitev sem v enakem mikroreaktorju pri enakem tokovnem režimu prišel tudi pri spremljanju dvofazne PTC-esterifikacije tekoče-tekoče med reaktantoma 4-metoksibenzoil kloridom in 4-*t*-butilfenolom. Pri slednji reakciji sem uporabil fazni prenašalec tetrabutilamonijev bromid.

V nadaljnjih raziskavah sem isto PTC-esterifikacijo izvajal v pravokotnem mikroreaktorju pri stabilnem paralelnem tokovnem režimu. Ker ima uporabljeni mikrokanal 34 zavojev, sem najprej proučil njihov

vpliv na sekundarno mešanje znotraj mikrokanala. Ugotovil sem, da se pri velikih pretokih (odvisno od uporabljenega topila) na zavojih mikrokanala pojavi sekundarno mešanje, ki ga lahko pripisemo Deanovemu toku. Uvedel sem koeficient sekundarnega mešanja f , ki pove, za kolikokrat se poveča hitrost snovnega transporta znotraj mikrokanala z zavoji pri različnih volumskih pretokih. Da bi proučil in napovedal potek PTC-esterifikacije, sem razvil matematični model, ki upošteva konvekcijo v smeri toka (z), difuzijo v smerih x, y in z ter reakciji v organski in vodni fazi. Kinetične parametre reakcije v organski fazi sem določil na podlagi eksperimentalnih rezultatov in simulacij, dobljenih z matematičnim modelom. Eksperimentalno sem določil tudi porazdelitvene koeficiente sodelujočih komponent med organsko in vodno fazo, medtem ko sem koeficiente difuzivnosti v organski in vodni fazi določil z Wilke-Changovo empirično korelacijo. Ugotovil sem, da je skupna hitrost kemijske reakcije veliko večja, kot jo napoveduje matematični model, v katerem sem jo lahko pospešil le tako, da sem povečeval difuzijski koeficient faznega prenašalca. To pomeni, da je snovni transport limitna stopnja skupne hitrosti kemijske reakcije in da je hitrejši kot napoveduje matematični model. Na fazni meji se namreč zaradi prehajanja faznega prenašalca med fazama pojavi medfazna nihanja in turbulence, ki povzročijo hitrejši prenos snovi prek fazne meje. Z upoštevanjem omenjenega pojava sem uvedel koeficient povečane hitrosti snovnega transporta E . Ta pove, za kolikokrat se poveča hitrost snovnega transporta prek fazne meje pri različnih skupnih pretokih. Ugotovil sem, da je največja nestabilnost na medfazni površini oziroma največji E dosežen pri najmanjšem pretoku, pri katerem je paralelni tok še vedno stabilen. S korelacijo, ki napove, za kolikokrat se poveča hitrost snovnega transporta prek fazne meje pri različnih skupnih pretokih, sem dosegel dobro ujemanje rezultatov simulacij z eksperimentalnimi vrednostmi.

V dvofaznih sistemih tekoče-tekoče je medfazna površina ključnega pomena za zagotavljanje interakcij med fazama. Gre za površino, prek katere lahko poteka snovni transport med obema fazama, včasih pa lahko tudi reakcija med dvema reaktantoma, raztopljenima v različnih fazah, poteka samo na tem mestu, torej na medfazni površini. Mikroreaktorji omogočajo zagotavljanje natančno določenih in ponovljivih tokovnih režimov, kar je v primerjavi s standardnimi šaržnimi reaktorji velika prednost. Dvofazni tok je v mikrokanalih možno predvideti, natančno nadzirati in na koncu optimizirati.



Slika 2. Koncentracijski profil reaktantov (RX, MY), faznega prenašalca (QX), aktivnega kompleksa (QY), stranskega produkta (MX) in produkta RY v mikrokanalu pri pretoku vodne faze 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, organske faze 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ in temperaturi 20 °C. Vodna faza v takih pogojih zavzema 30 % mikrokanala (leva stran mikrokanala).

Mass Transport and Reaction Kinetics of Phase Transfer Catalysed Reactions in a Microreactor

ERVIN ŠINKOVEC, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Matjaž Krajnc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The increasing demand of the industry, for example chemical, pharmaceutical, analytical and biochemical, for novel technologies has led to the intensive development of the microreactor technology which is nowadays one of the most innovative and rapidly developing fields in chemical engineering, synthesis and process technology. In the last decade, microstructured devices have impressively demonstrated several decisive advantages, such as a better heat and mass transfer due to a very large surface-to-volume ratio and superior mixing of the fluid phases. An important feature of microstructured reactors is the hydrodynamic flow in the microchannels. In liquid-liquid microchannel flow, different flow patterns such as annular flow, parallel flow, drop flow or slug flow are found. Circulation patterns vary with the physical properties of liquids as well as with operating parameters such as flow ratio of two immiscible liquids, mixing elements geometry, channel geometry and capillary dimensions.

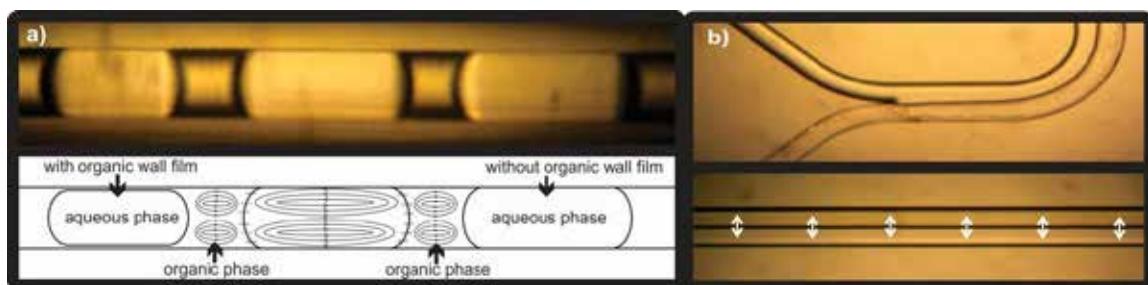


Figure 1: a) Slug flow hydrodynamic flow pattern in a microtube reactor and b) parallel hydrodynamic flow pattern in a glass rectangular microreactor.

Phase transfer catalysis (PTC) is an important method in synthetic two-phase chemistry. Due to a higher and strictly defined interfacial area at stable liquid-liquid hydrodynamic flow, microreactors offer considerable benefits over the conventional batch reactors also in phase transfer catalysis. Despite many publications on the chemistry and applications of PTC, only a few of them involve the role of interfacial mass transfer and mathematical modelling, which include reaction kinetics in both phases and mass transport between and within each phase. In my PhD thesis, two liquid-liquid PTC reactions in two types of microreactors under two different flow patterns were studied.

Two-phase PTC Wittig reaction of benzyltriphenylphosphonium bromide (BTPPBr) and *p*- or *o*-methoxybenzaldehyde was attempted to conduct in a microtube reactor under reproducible slug-flow pattern. A strong impact of process parameters on stable operating conditions, specific interfacial area and consequently on mass transfer between phases and overall rate of reaction was observed. In the case when the mass transfer is the rate limiting step, the overall rate of chemical reaction in the microtube reactor at slug flow regime is much higher in comparison to the batch reactor due to a higher surface-to-volume ratio and consequently more rapid mass transport. Similar results were obtained when liquid-liquid PTC esterification reaction of 4-*t*-butylphenol and 4-methoxybenzoil chloride in the same microreactor under the same flow conditions was studied. Tetrabutylammonium bromide was used as the PT catalyst.

In further investigations, same PTC esterification reaction in a glass rectangular microreactor under the parallel flow conditions was studied. Because the microchannel contained 34 curves, the influence of curves on a secondary mixing was studied first. At higher flow rates (depends on a solvent), the secondary flow within microchannel curves was observed. The secondary flow enhancement coefficient f was introduced to describe the mass transfer in a curved microchannel. To predict the PTC mechanism and to forecast reactor performance, a mathematical model considering convection in the flow direction (z), diffusion in x , y , z directions and reactions in the organic and aqueous phases was developed. To define the order of the reaction and the intrinsic reaction rate constant, the reaction kinetics in the organic phase were investigated first. Based on experimental results at different initial concentrations, the organic reaction parameters were defined and further confirmed with mathematical model simulations. The distribution coefficients of chemical compounds between two immiscible phases were determined experimentally, whereas the Wilke-Chang empirical correlation was used to estimate molecular diffusion coefficients in the aqueous and organic phase. It was observed that the overall reaction rate of experimental data is much higher than the values of the mathematical model calculation. We have found that only the increase of diffusion coefficients results in higher overall reaction rate, which means that the overall reaction rate is limited by the mass transfer.

The higher actual mass transfer rate between both phases than the one predicted by the mathematical model may be explained by the rippling and erratic pulsation at the interface caused by the mass transfer of QX and QY between both phases. As the best fit for all the experimental data, the optimal correlation for the mass transfer enhancement (E) was found. Just before the breaking of stable parallel flow into slug flow, the interfacial turbulence was found to be the strongest and consequently the mass transfer enhancement coefficient the highest. With a proposed correlation for mass transfer enhancement due to interfacial convection, all the experimental data were successfully predicted by the model.

In a two phase system specific interfacial area is crucial for desired interactions between two phases. The mass transfer between phases and sometimes also chemical reaction of reactants presented in different media is limited to this area. Known and precisely tuned specific interfacial area enable the optimization of a selected two phase chemical reaction. The microreactor process with stable flow pattern and consequently known specific interfacial area provides a great advantage over the standard batch method. Two phase system can be more precisely controlled, predicted and finally optimized.

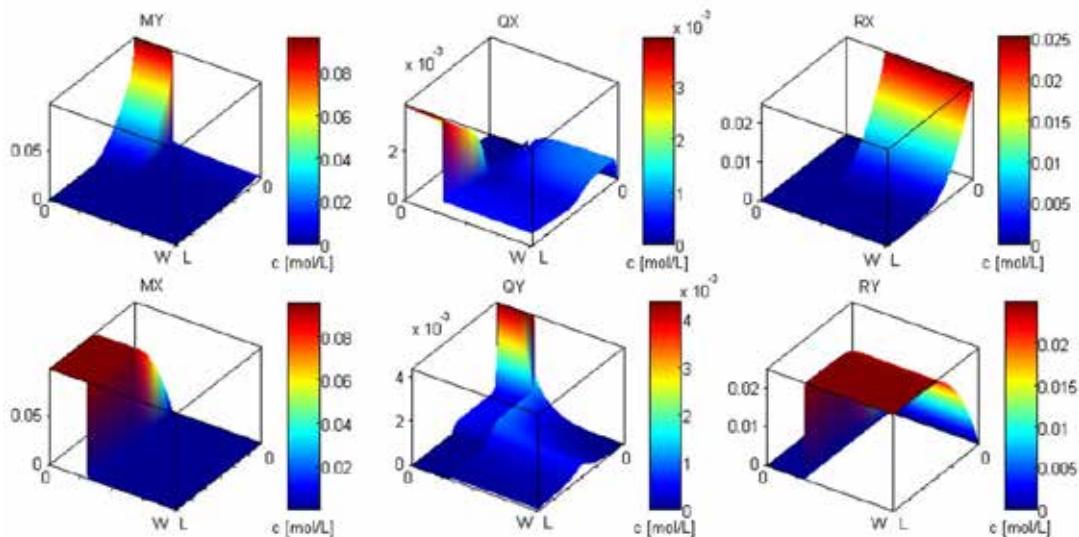
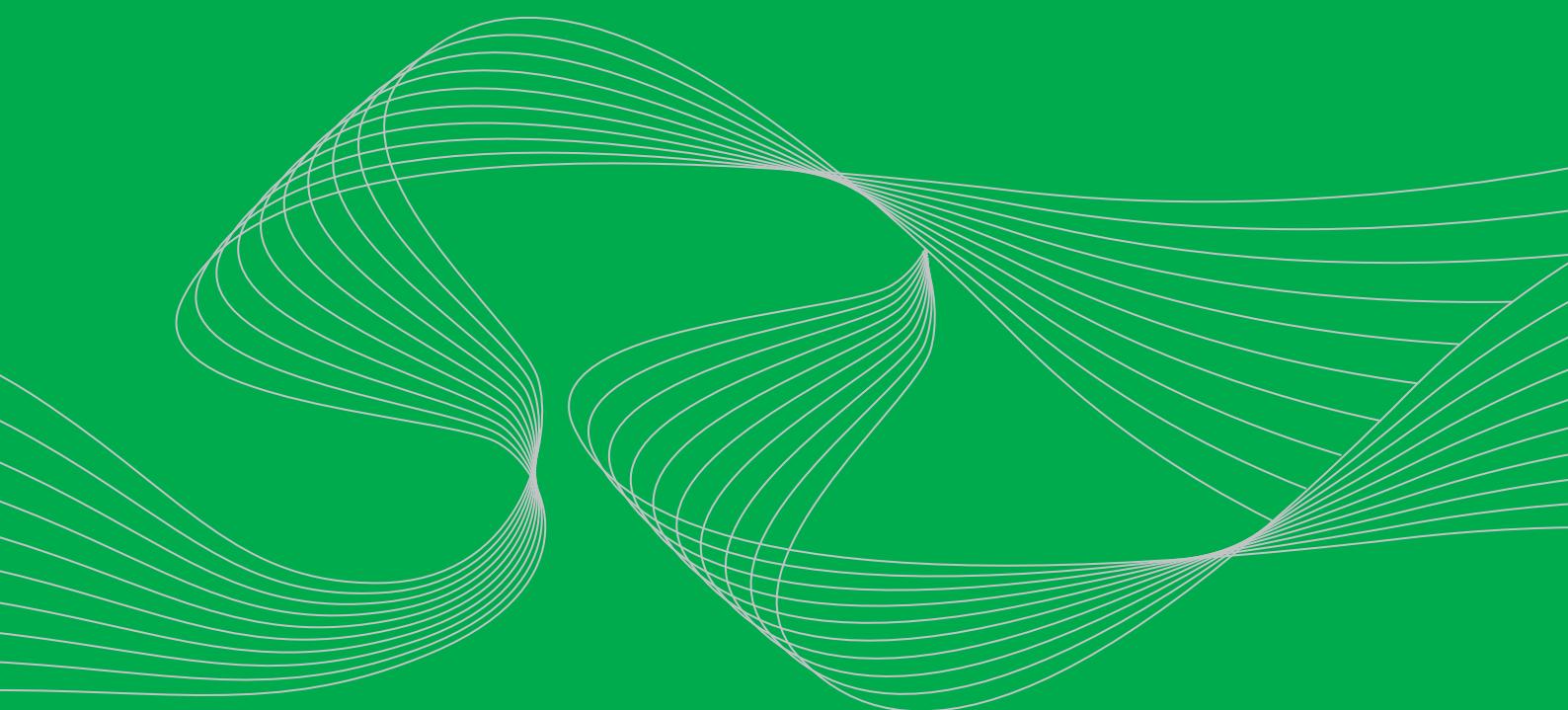


Figure 2. The depth-averaged concentration profiles of the reactants (RX, MY), PT catalyst (QX), active complex (QY), side product (MX) and product (RY) at 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate of the aqueous phase and 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate of the organic phase at 20°C. The aqueous phase occupied 30% of the microchannel (on the left).

43



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

*Povzetki
Abstracts*

Jodove(I) spojine: Katalizatorji za jodiranje organskih molekul

LEON BEDRAČ, Institut Jožef Stefan
Mentor: Jernej Iskra, Institut Jožef Stefan

Jodiranje organskih molekul je ena izmed pomembnejših reakcij v kemijskih laboratorijih, sintezi farmacevtskih učinkovin in kemiji materialov. Zaradi slabe reaktivnosti molekularnega joda za jodiranje se kot aktivatorji uporabljajo nevarne kemikalije (močne kisline, soli težkih kovin, korozivni oksidanti), kot reakcijski mediji pa halogenirana organska topila, kar predstavlja veliko breme tako za okolje kot za človekovo zdravje. Namen doktorske naloge je bil pripraviti reaktivne jodove(I) spojine z oksidacijo joda z vodikovim peroksidom, ki je okolju manj škodljiv. V reakcijskem sistemu jod/vodikov peroksid/klorovodikova kislina so nastali diklorojodati(I), ki sem jih izoliral v obliki kvarternih amonijevih soli in jih uporabil za jodiranje aromatskih spojin. Pri direktni oksidaciji I_2 s H_2O_2 v prisotnosti HCl je nastal hidridodikloridojod $HICl_2$. Pokazalo se je, da je ta jodirni reagent bolj učinkovit od njegovih soli, hkrati je njegova uporaba bolj ekonomična, izvedba reakcij pa enostavnejša. $HICl_2$ sem uporabil za jodiranje benzenovih derivatov in regioselektivno jodochloriranje nenasičenih spojin v milih reakcijskih pogojih. Reaktivnost sistema sem moduliral z izbiro topila, posebej učinkovita je bila aktivacija s fluoriranimi alkoholi. Reakcijski sistem, v katerem se generira $HICl_2$, sem nadgradil z okolju bolj primerno metodo tako, da sem za oksidativno jodiranje aromatskih spojin uporabil HCl v katalitskih količinah. Z uporabo HBr namesto HCl sem sintetiziral kvarterne amonijeve dibromoiodate(I) in jih uporabil za halogeniranje organskih spojin.

Iodonium(I) Compounds: Catalysts for Iodination of Organic Molecules

LEON BEDRAČ, Jožef Stefan Institute
Supervisor: Jernej Iskra, Jožef Stefan Institute

The iodination of organic molecules is an important reaction in chemical laboratories, the synthesis of pharmaceuticals and in materials chemistry. Due to the poor reactivity of molecular iodine for iodination, hazardous chemicals (i.e. strong acids, heavy metal salts, corrosive oxidants) are used for activation while halogenated solvents are used as reaction media, which both present a heavy burden for the environment as well as for human health. The aim of the thesis was to prepare more reactive iodine(I) compounds by the oxidation of molecular iodine using hydrogen peroxide as environmentally benign oxidant. In the reaction system, iodine/ hydrogen peroxide/ hydrochloric acid dichloroiodates(I) were formed and isolated as quaternary ammonium salts. They were used for iodination of aromatic compounds. Direct oxidation of I_2 with H_2O_2 in the presence of HCl led to the formation of hydridodichloridoiodine $HICl_2$, which was proven to be a more effective iodinating agent than its salts and at the same time provided greater atom economy and simpler reaction procedure. $HICl_2$ was used for iodination of various benzene derivatives and regioselective iodochlorination of unsaturated compounds under mild reaction conditions. Reactivity of the reaction system was modulated by the choice of the solvent. Fluorinated alcohols activated the reaction system strongly. Reaction system, where $HICl_2$ is generated, was upgraded toward the environmentally-friendly method using HCl in catalytic amounts for oxidative iodination of aromatics. By replacing HBr for HCl quaternary ammonium dibromoiodates(I) were synthesized and used for halogenation of organic compounds.

Intramolekularne reakcije diazenov in pretvorbe njihovih produktov

MARTIN GAZVODA, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Slovenko Polanc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V okviru disertacije sem se ukvarjal z intramolekularnimi reakcijami 2,3-diarilprop-2-enoidiazenkarboksilatov in pretvorbami nastalih produktov. Izhodne spojine za opisane reakcije so bile različne 2,3-diarilpropenojske kisline (α -arilcimetne kisline). Ustrezno substituirane (*E*)- α -arilcimetne kisline so se pokazale za učinkovite inhibitorje družine encimov AKR1C. Sintetiziral sem serijo (*E*)-3-aryl-2-(4-metilsulfonil)fenilpropenojskih kislin, ki so se v praktično vseh primerih pokazale za učinkovite in selektivne inhibitorje AKR1C3. Nekaj α -arilcimetnih kislin, ki sem jih modificiral s Suzukijevo »coupling« reakcijo, se je pokazalo za zmerne inhibitorje encima FabG in bi kot spojine lahko bile vodnice za razvoj učinkovitih inhibitorjev. V sklopu sintez pirazolonov sem α -arilcimetne kisline pretvoril v hidrazide, ki sem jih oksidiral v ustrezne diazene, ti pa so ciklizirali v N-1 metokskarbonil 4,5-diarilpirazol-3-one. Nekateri pirazoloni in njihovi prekurzorji so pokazali dobre inhibicijske sposobnosti COX-1 in COX-2. Sintetiziral sem derivat kombretastatina A-4 s pripojenim pirazolonskim obročem, ki je bil v nanomolarnem območju visoko citotoksičen za rakave celice HeLa. Razvil sem preprosto in učinkovito metodo za sintezo *N*-sulfonil formamidinov bodisi iz sulfonamidov ali njihovih *N*-acyliranih derivatov. *N*-sulfonil formamidini so obstojne in nereaktivne molekule, vendar sem odkril blage pogoje za njihovo pretvorbo v sulfonamide. Celotna opisana pot lahko predstavlja način zaščite in odščite sulfonamidov.

Intramolecular Reactions of Diazenes and Conversions of Their Products

MARTIN GAZVODA, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Slovenko Polanc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In my dissertation I dealt with intramolecular reactions of 2,3-diarylp-2-enoyldiazenecarboxylates and modifications of their products. Starting compounds for the described transformations were 2,3-diarylp-2-enoyldiazenecarboxylates (α -arylcinnamic acids). Properly functionalized (*E*)- α -arylcinnamic acids have proven to be efficient inhibitors of AKR1C enzymes. A comprehensive series of (*E*)-3-aryl-2-(4-methylsulfonil)phenylpropenoic acids were synthesized which were in almost all cases effective and selective inhibitors of AKR1C3 enzyme. Some of α -arylcinnamic acids, which were modified by employing the Suzuki coupling reaction, were moderate inhibitors of FabG enzyme and could serve as lead compounds for development of more effective inhibitors. α -Arylcinnamic acids were further transformed into appropriate hydrazides, the latter were oxidized to the corresponding diazenes which upon cyclization formed 1-methoxycarbonyl 4,5-diarylp-2-enoyldiazenecarboxylates. Properly substituted pyrazolones and their synthetic precursors have shown moderate ability to inhibit COX-1 and COX-2, thus correlations between the structure and activity of the investigated compounds could lead to the discovery of new selective COX-2 inhibitors. I managed to synthesize the pyrazolone-fused derivative of combretastatin A-4 which was highly (on a nanomolar scale) cytotoxic against HeLa cancer cell lines. I developed a simple and efficient method for the preparation of *N*-sulfonil formamidines from either sulfonamides or their *N*-acylated derivatives. I also discovered mild conditions for transformation of *N*-sulfonil formamidines to sulfonamides. The described procedure can be regarded as a protection and deprotection of sulfonamides.

Vpliv atorvastatina in rosuvastatina na transkriptom človeških jeter ter mehanizmi delovanja posredovani z jedrnimi receptorji

MATEJA HAFNER, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorka: Damjana Rozman, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Statini so najučinkovitejša zdravila za zdravljenje motenj v homeostazi holesterola. Čeprav večina bolnikov zdravljenje z njimi dobro prenaša, lahko pride do različnih neželenih učinkov. Statini inducirajo izražanje genov prek aktivacije jedrnih receptorjev, ki so vključeni v uravnavanje različnih citokromov P₄₅₀ pri človeku, prek katerih se lahko spremeni kinetika številnih zdravil. Z uporabo mikromrež DNA smo proučili podobnosti in razlike v izražanju genov pri učinkovanju atorvastatina in rosuvastatina na primarne človeške hepatocite. Ugotovili smo, da oba statina vodita v povečano izražanje genov, povezanih s holesterolom, kar nakazuje povečan privzem LDL in povečano shranjevanje esterificiranega holesterola, povečano izločanje žolčnih kislin in zdravil ter zmanjšano zmožnost tvorbe HDL. Prav tako povzročita spremembe v izražanju genov, povezanih v homeostazo glukoze in maščobnih kislin, kar vpliva na povečano dostopnost acetil-CoA in tem povečano glukoneogenezo in izvoz glukoze. Povečata tudi izražanje ADIPOR2, kar nakazuje občutljivost za adiponektin. Odgovorna sta za spremembe v izražanju genov za sintezo lipoproteinskih delcev, spremenita pa tudi izražanje številnih metabolnih genov, ki so direktni tarče jedrnih receptorjev CAR in PXR. S promotorskimi poročevalskimi študijami smo pokazali, da se CAR ne veže na specifična vezavna mesta DNA v bližnjem promotorju holesterogenega gena CYP51. Z metodo premika na gelu pa smo pokazali, da se veže na vezavna mesta DNA v distalnem promotorju CYP51 in tako vpliva na njegovo izražanje. S površinsko plazmonsko resonanco smo pokazali, da sta atorvastatin in rosuvastatin liganda jedrnega receptorja CAR in neposredno vplivata na izražanje genov, ki so uravnani prek jedrnega receptorja CAR.

The Effect of Atorvastatin and Rosuvastatin on Human Hepatic Transcriptome and the Mechanism of Nuclear Receptor Action

MATEJA HAFNER, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: Damjana Rozman, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Statins are the most effective drugs for the treatment of disorders in cholesterol homeostasis. Although most patients tolerate treatment with statins well, they can cause various side effects. Statins induce gene expression through activation of nuclear receptors that are involved in the regulation of various cytochromes P₄₅₀ in humans through which kinetics of many drugs may be changed. Using DNA microarrays, we investigate the effect of atorvastatin and rosuvastatin on the transcriptome of human primary hepatocytes. Results have shown that both statins lead to upregulation of cholesterol-related genes indicating an increased LDL uptake and storage of esterified cholesterol, elevated bile acid/drug export and lower capacity to form HDL. They are responsible for perturbation of genes in glucose and fatty acid homeostasis, influencing acetyl-CoA pools, promoting gluconeogenesis and glucose export and they elevate the expression of ADIPOR2 suggesting the increased sensitivity to adiponectin. They lead to perturbations in genes of lipoprotein particle formation and metabolic genes that are directly controlled by nuclear receptor CAR. Reporter-promotor studies have shown that CAR does not bind to specific DNA binding sites in the proximal promoter of CYP51. With gel-shift we have shown that CAR binds to specific DNA binding sites in the distal promoter of CYP51 and thus influences the expression of this cholesterologenic gene. With surface plasmon resonance we have shown that both statins are ligands of CAR and directly regulate the expression of genes that are under CAR regulation.

Načrtovanje in sinteza inhibitorjev ligaz Mur in ligaze D-alanil-D-alanin

MARTINA HRAST, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Stanislav Gobec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Protibakterijske učinkovine imajo ključno vlogo v boju proti baterijsko povzročenim infekcijskim boleznim, vendar pa je njihova čezmerna in nepravilna uporaba privredila do razvoja številnih odpornih oblik bakterijskih sevov. V okviru doktorske disertacije smo se osredotočili na načrtovanje, sintezo in biokemijsko vrednotenje spojin, ki zavirajo delovanje esencialnih znotrajceličnih bakterijskih encimov ligaz Mur in ligaze D-alanil-D-alanin (Ddl). Na podlagi objavljene spojine smo našli in sintetizirali dve družini inhibitorjev DdlB s protibakterijskim delovanjem, ellipticine in 9-acridinylamine. Nato smo z različnimi računalniškimi metodami odkrili strukturno nove zaviralce Ddl. V nadaljevanju smo izolirali, očistili in biokemijsko ovrednotili MurF iz bakterijskega seva *Streptococcus pneumoniae*. Načrtovali in sintetizirali smo dve seriji cianotiofenskih spojin s protibakterijskim delovanjem, ki sta zavirala delovanje MurF v nizkem mikromolarnem oziroma nanomolarnem območju. Nazadnje smo razrešili dve kristalni strukturi MurF v kompleksu s spojinami in tako neposredno dokazali način vezave inhibitorjev na aktivno mesto. Naši rezultati so dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo novih protibakterijskih učinkovin.

Design and Synthesis of Inhibitors of Mur Ligases and D-Alanine:D-Alanine Ligase

MARTINA HRAST, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Stanislav Gobec, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The development of antibacterial drugs plays a crucial role in fighting infectious diseases caused by bacteria. However, too extensive and often inappropriate use of antibiotics has resulted in the development of bacterial resistance. In this thesis we focused on design, synthesis and biological evaluation of compounds that inhibit essential intracellular bacterial enzymes: Mur ligases and d-alanine:d-alanine ligase (Ddl). First, ligand-based similarity search was used and two different families of inhibitors of DdlB with antimicrobial activity were found and synthesized, ellipticides and 9-acridinylamines. Then, different computational methods were used to identify several new DdlB inhibitors. Furthermore, MurF from *S. pneumoniae* was successfully expressed, purified and characterised. Moreover, two series of cyanothiophene compounds were designed and synthesized. Both classes were found to inhibit MurF in low micromolar and nanomolar range, respectively. Some of the inhibitors also showed antibacterial activity. Finally, two crystal structures of *S. pneumoniae* MurF with inhibitors were solved to determine the binding mode of the inhibitors in the enzyme. All our findings represent an excellent starting point for further optimization toward effective novel antibacterial drugs.

Vpliv elektroporacije in elektrokemoterapije na normalno in tumorsko žilje pri miših

BOŠTJAN MARKELC, Onkološki inštitut Ljubljana

Mentorka: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

Somentor: Tomaž Jarm, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Elektroporacija (EP) je fizikalna metoda, ki z dovajanjem električnih pulzov celicam ali tkivu omogoča povečanje vnosa različnih molekul (citostatikov, plazmidne DNA itd.) v celice. V onkologiji imenujemo kombinacijo EP s citostatikoma bleomicinom in cisplatinom elektrokemoterapija (ECT). K celotnemu uspehu te terapije naj bi poleg citotoksičnega učinka ECT na tumorske celice prispeval tudi njen žilno razdiralni učinek. Z intravitalno mikroskopijo na modelu dorzalnega okna pri miših smo spremljali učinek EP in ECT na normalno in tumorsko žilje. Pokazali smo, da električni pulzi povzročijo zmanjšanje premera žil, tako arterij kot ven, in posledično začasno zaporo pretoka krvi v normalnih žilah. Električni pulzi tudi povečajo permeabilnost normalnih žil za molekule različnih velikosti. Na nivoju tumorjev smo pokazali, da električni pulzi povzročijo začasno zaporo pretoka krvi v tumorskem žilju, čemur sledi povečanje permeabilnosti tumorskega žilja. ECT ima hkrati tudi žilno razdiralni učinek, ki pa je specifičen za tumorsko žilje. Normalne žile, ki obkrožajo tumor po terapiji, ostanejo funkcionalne. Rezultati raziskave so prispevek k uveljavitvi EP kot varne metode za ECT v dobro prekrvavljenih organih, kot so jetra in možgani, kot varno metodo za dostavo plazmidne DNA v normalna tkiva ter kot učinkovito metodo za lokalno dostavo različnih molekul po njihovem sistemskem injiciranju.

The Effect of Electroporation and Electrochemotherapy on Normal and Tumor Vasculature in Mice

BOŠTJAN MARKELC, Institute of Oncology Ljubljana

Supervisor: Maja Čemažar, Institute of Oncology Ljubljana

Co-supervisor: Tomaž Jarm, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Electroporation (EP) is a physical method that by application of electric pulses to cells or tissues enables the introduction of molecules (cytostatics, plasmid DNA etc.) into the cells. In oncology the use of EP in combination with cytostatic drugs is called electrochemotherapy (ECT). In addition to the direct cytotoxic effect to the tumour cells, ECT also has a vascular disrupting action. We used intravital microscopy in the dorsal window chamber model in mice to determine the effects of EP and ECT on normal and tumour blood vessels. We showed that the electric pulses decrease the diameter of arteries and veins which results in an abrogation of blood flow followed by an increase of permeability of normal blood vessels for different sizes of molecules. In tumours, the application of electric pulses causes an immediate abrogation of blood flow accompanied by an increase in the permeability of tumour blood vessels. ECT also has a vascular disrupting effect which is specific for tumour blood vessels. The normal blood vessels surrounding the tumour remain functional after the therapy. The results of this study further support the use of electroporation as a safe method for ECT in well-perfused organs such as liver and brain, as a safe method for the delivery of plasmid DNA into normal tissues and show that electroporation can be used for the local delivery of molecules of different sizes after their systemic administration.

Sinteza heterocikličnih analogov aminokislin in peptidov na osnovi 3-pirazolidinona

ANA NOVAK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Jurij Svetec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V raziskovalni nalogi je opisana nova sintezna pot za pripravo tetrahidropirazolo[1,2-*a*]pirazolonskih analogov peptidov. Po tej poti lahko na osnovni biciklični pirazolidinonski skelet uvajamo različne substituente in s tem spremojemo aminokislinsko sekvenco, hkrati pa predvidimo konfiguracijo (3D-strukturo) nastalih heterocikličnih dipeptidov. Metoda omogoča nadaljnjo selektivno odstranitev karboksi- in aminoskupine ter selektivno derivatizacijo racemnega 6-amino-7-oksoperhidropirazolo[1,2-*a*]pirazol-1-karboksilatnega dipeptida. V tako pripravljene konformacijsko toge gradnike lahko pripojimo poljubne peptidne verige. Poleg tega lahko z enantiomerno čistimi aminokislinskimi derivati pripravimo diastereomerne pare, ki jih lahko kromatografsko ločimo na neracemne diastereomerno čiste spojine.

Drugi del raziskave opisuje pripravo manjše knjižnice nesubstituiranih, 1-substituiranih in 1,2-disubstituiranih 4-amino-3-pirazolidinonov, med katerimi *terc*-butil 2-((3*R*,4*R*)-4-benziloskarbonilamino-2,3-dizopropil-5-oksopirazolidin-1-il)acetat, podobno kot njegovi biciklični analogi, omogoča selektivno odščito C- in N-terminalov ter nadaljnjo derivatizacijo z aminokislinami.

Knjižnico novih spojin, pridobljenih po tem postopku, smo testirali na morebitno biološko aktivnost. Rezultati so pokazali, da izmed 42 testiranih spojin dve kažeta zmerno inhibicijo encima ligaza MurD.

Synthesis of Heterocyclic Analogues of Amino Acids and Peptides Based on 3-Pyrazolidinone

ANA NOVAK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Jurij Svetec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The research project describes a new route for the synthesis of tetrahydropyrazolo[1,2-*a*]pyrazolone based peptide analogues. This methodology enables introduction of different substituents to bicyclic pyrazolidinones with variable amino acid sequence and variable as well as predictable configuration of the resulting products. Further selective deprotection of the carboxy and the amino protecting groups in 6-amino-7-oxoperhydropyrazolo[1,2-*a*]pyrazolo-1-carboxylates results in conformationally rigid building blocks that can undergo derivatization with various amino acids. Coupling with non-racemic amino acids furnishes diastereomeric pairs, which can be separated by chromatography to give the non-racemic isomerically pure peptides.

The second part of the research describes how small libraries of 1,2-non-substituted-, 1-substituted in 1,2-disubstituted-4-amino-3-pyrazolidinones were prepared. Among those, pyrazolidinone *tert*-butyl 2-((3*R*,4*R*)-4-benzoyloxycarbonylamo-2,3-diisopropyl-5-oxopyrazolidin-1-yl)acetate enables selective deprotection of the C- and the N-derivatives and further derivatization with amino acid derivatives, similarly as its bicyclic analogues.

A library of new pyrazolidinone derivatives was tested for biological activity. Two out of 42 tested compounds showed moderate inhibition of MurD ligase.

Načrtovanje, izdelava in vrednotenje biokompatibilnih nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja

ROMANA ROŠIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

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

Nanovlakna ponujajo najobetavnejšo in najnaprednejšo rešitev za spodbujanje lastne tkivne obnove, tehnologija izbire za njihovo izdelavo pa je metoda elektrostatskega sukanja. Osrednji cilj doktorske disertacije je bil razvoj biomimetičnih in biokompatibilnih polimernih nanovlaken ter postavitev smernic za napovedovanje izida elektrostatskega sukanja. Tako smo kot prvi pripravili hidroksietilcelulozna (HEC) nanovlakna in natančno proučili vpliv posameznih spremenljivk na morfologijo hidroksietilceluloznih in hitosanskih nanovlaken. Nato smo se usmerili v poglobljeno raziskovanje povezav med fizikalnimi lastnostmi polimernih raztopin in njihovo procesibilnostjo z metodo elektrostatskega sukanja. Rezultati dokazujejo izreden pomen reoloških lastnosti polimernih raztopin in razkrivajo, da lahko iz oblike grafov različnih fizikalnih parametrov v odvisnosti od sestave polimernih raztopin univerzalno in jasno definiramo področje, ki rezultira v nastanku gladkih nanovlaken. Še več, med vsemi proučevanimi fizikalnimi spremenljivkami imajo največjo napovedno moč prav tiste, ki smo jih v analizo raztopin za izdelavo nanovlaken vpeljali mi. V zadnjem delu smo svoje bazične študije še nadgradili s proučevanjem nanovlaken kot dostavnih sistemov za vnos antimikrobne zdravilne učinkovine. Spoznanja doktorske disertacije tako nedvomno prinašajo nova temeljna znanja in vodijo v bolje zasnovano delo na področju nanovlaken.

Design, Formulation and Evaluation of Biocompatible Nanofibers by Electrospinning

ROMANA ROŠIĆ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

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

Nanofibers offer the most advanced and promising resolution for enhanced tissue regeneration, whereas the technology of choice for their preparation is electrospinning. The aim of the dissertation was the development of biomimetic and biocompatible nanofibers, together with setting the guidelines for the prediction of electrospinning outcome. We were the first to prepare HEC nanofibers and precisely studied the influence of individual variables on the morphology of HEC and chitosan nanofibers. Work further focused on the in-depth investigation of correlations between the physical properties of polymer solutions and their processability by electrospinning. Results demonstrate the prominence of solutions' rheology and disclose the universal definition of a group, which correlates with the formation of smooth nanofibers, from the shape of the diagrams of different physical properties. Among the investigated parameters those with the highest forecast level are the ones that were introduced by us into the analysis of solutions used for nanofibers. Lastly, our basic studies were promoted by the research of nanofibers as delivery systems for antimicrobial drugs. Therefore findings of the dissertation undoubtedly provide essential knowledge and lead towards improved work in the field of nanofibers.

Zvijanje in prostorske strukture DNA G-kvadruplexov

MARKO TRAJKOVSKI, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Mentor: Janez Plavec, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Z gvanini bogate DNA lahko tvorijo nenanadne strukture, imenovane G-kvadruplexi, ki so vpletene v temeljne biološke procese in so potencialne tarče terapevtskih učinkovin. G-kvadruplexi so zanimivi tudi za razvoj novih nanomaterialov in nanonapravic. Z uspešnim načrtovanjem G-kvadrupleksa z dodelj še neopaženo topologijo smo dokazali, da je z racionalnim pristopom načeloma mogoče kontrolirati G-kvadruplexno zvitje. V G-kvadruplexu, ki predstavlja model ionskega kanalčka, smo pokazali, da so kationi lokalizirani v predelu centralne osi vzdolž celotne strukture. S pomočjo heteronuklearnih NMR-eksperimentov smo ugotovili, da je hitrost izmenjave amonijevih ionov z vezavnih mest v G-kvadruplesih v raztopino odvisna od konformacije vzdolž glikozidne vezi v gvaninskih preostankih, ki tvorijo jedro strukture. Vpogled v kinetiko in lokalizacijo amonijevih ionov v modelni strukturi je osnova za nadaljnje raziskave o vplivu interakcij kationov na elektronsko strukturo G-kvadrupleksov. Oligonukleotid DNA, ki izvira iz prvega introna onkogena N-myc, v prisotnosti kalijevih ionov tvori enomolekularni in dvomolekularni G-kvadruplex. Njuni prostorski strukturi, določeni na atomskem nivoju, sta razkrili edinstvene lastnosti, ki bi lahko omogočale specifične interakcije z molekulami v celici in vplivale na izražanje onkogena N-myc.

Folding and Structures of DNA G-Quadruplexes

MARKO TRAJKOVSKI, *National Institute of Chemistry Ljubljana*
Supervisor: Janez Plavec, *National Institute of Chemistry Ljubljana*

Guanine rich DNA can adopt non-canonical structures denominated G-quadruplexes, which are involved in vital cell mechanisms and are considered to be potential targets in medical applications. In addition, G-quadruplexes have been identified as promising building blocks for designing novel nanomaterials and nanodevices. We successfully constructed G-quadruplex with an unprecedented topology and thereby demonstrated that with the use of a rational approach it is in principle possible to control G-quadruplex folding. With the use of heteronuclear NMR experiments we demonstrated that ammonium ions localize along the entire cavity of G-quadruplex representing a model of an ion transporter. In addition, we showed that the kinetics of ammonium ion movement from the binding sites within G-quadruplex to the surrounding solution depends on the glycosidic conformation of guanine residues within the core of the structure. The insight into the kinetics and localization of ammonium ions within the studied model is particularly interesting with regard to the roles of cations in G-quadruplex-type specific electronic properties. The DNA oligonucleotide originating from the first intron of the N-myc oncogene in the presence of potassium ions adopts monomeric and dimeric G-quadruplexes. We calculated their NMR-based high-resolution structures and characterized the unique features which could allow selective binding of biomolecules and regulate expression of the N-myc oncogene.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih inhibitorjev faktorja Xa in antagonistov GPIIb/IIIa kot potencialnih dualnih antitrombotičnih učinkovin

UROŠ TRSTENJAK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: Janez Ilaš, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Za doseganje ustreznega antitrombotičnega učinka se pri zdravljenju trombotičnih zapletov pogosto uporabljajo kombinacije antikoagulantnih in antiagregatornih učinkovin, ki imajo sinergistični učinek in kot takšne vodijo v razvoj antitrombotičnih učinkovin z dvojnim mehanizmom delovanja. V okviru doktorskega dela smo pripravili prve nizkomolekularne potencialne antitrombotike z direktnim inhibitornim delovanjem na faktor Xa in antagonističnim delovanjem na fibrinogenski receptor s K_1 oziroma vrednostmi IC_{50} v mikromolarnem območju. Hkrati smo z zamenjavo morfolin-3-ona z 2-etoksikarbonilpiperidinom selektivni direktni inhibitor faktorja Xa rivaroksaban pretvorili v dualni inhibitor faktorja Xa in trombina z razmeroma uravnoteženo nanomolarno aktivnostjo na obeh tarčah, spojine z 1,2,4-oksadiazol-5(4H)-onskim obročem pa so se pokazale za struktурno povsem nove submikromolarne antagoniste fibrinogenskega receptorja. Razvili smo tudi sintezični poti za pripravo metil *N*-(4-nitrofenil)-3-oksomorfolin-2-karboksilata in izomerne etil *N*-(4-nitrofenil)-2-oksomorfolin-3-karboksilata, pri čemer je bila v obeh primerih ključni korak z rodijevim(II) acetatom katalizirana reakcija intermolekularne vstavitve karbenskega intermediata v vez O-H oziroma N-H. Na podlagi izoliranega stranskega produkta pri sintezi prve spojine smo uspešno razvili še sintežno pot za pripravo novih cikličnih aminokislin z *N,O*-acetalnim struktturnim motivom.

Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Inhibitors of Factor Xa and GPIIb/IIIa Antagonists as Potential Dual Antithrombotic Compounds

UROŠ TRSTENJAK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Janez Ilaš, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The observations that the concomitant use of anticoagulants and antiaggregatory drugs displays synergistic antithrombotic effects stimulated research towards antithrombotic drugs with a dual mechanism of action. In the course of the doctoral dissertation, we have prepared the first low molecular weight dual inhibitors of the factor Xa and fibrinogen binding to GPIIb/IIIa with both K_1 and IC_{50} in the micromolar range. In addition, the replacement of the morpholin-3-one moiety in the selective factor Xa inhibitor rivaroxaban by 2-ethoxycarbonylpiperidine resulted in a dual factor Xa/thrombin inhibitor, while compounds bearing 1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one moiety were identified as a structurally novel class of submicromolar fibrinogen GPIIb/IIIa binding inhibitors. We have also developed strategies for the preparation of methyl 4-(4-nitrophenyl)-3-oxomorpholine-2-carboxylate and isomeric ethyl 4-(4-nitrophenyl)-2-oxomorpholine-3-carboxylate via rhodium(II) acetate-catalyzed O-H or N-H carbene insertion. An isolated side product in the synthesis of the first compound has further inspired the development of a concise method for the preparation of novel cyclic amino acids containing *N,O*-acetal structural motif.

Vpliv s funkcionalnostjo povezanih in ostalih lastnosti mikrokristalne celuloze na stabilnostni profil zdravilnih učinkovin

TANJA VEHOVEC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Andrej Gartner, Krka, d. d., Novo mesto

V raziskavi smo proučevali vpliv nekaterih tipov komercialno dostopne mikrokristalne celuloze (MCC) na stabilnost izbranih zdravilnih učinkovin, kadar sta učinkovina in pomožna snov v stiku. Uporabili smo strukturno sorodni učinkovini erbuminijevev perindoprilat in enalapriljev maleat, znana zaviralca angiotenzin konvertaze, ter modelno zdravilno učinkovino KG-7. Izmerili smo najpomembnejše lastnosti MCC, ki bi lahko vplivale na stabilnost posamezne zdravilne učinkovine, in določili povezavo med temi lastnostmi pomožne snovi in stabilnostjo zdravilnih učinkovin v binarnih zmeseh. Stabilnost vseh treh učinkovin se je v posameznih eksperimentih razlikovala in je bila odvisna od tipa uporabljenih MCC. Na stabilnost učinkovin so najbolj vplivale površinske značilnosti, šibko kisle lastnosti oziroma nevezana voda MCC. Raziskava je pokazala, da se površinske lastnosti MCC s časom spreminja, kar je najverjetneje povezano z načinom vezave molekul vode na površino MCC. Dokazali smo, da pri stiku z MCC ni pomembna samo količina vezane vode na MCC, ampak tudi način vezave vode. Ta je pogojen s strukturo površine MCC, tj. z amorfnostjo in poroznostjo, in za njuno določitev sta se kot zelo primerni tehniki pokazali metodi inverzne plinske kromatografije in dinamične sorpcije pare. Z raziskavo smo pokazali, da bi bilo treba razdelke »s funkcionalnostjo povezane lastnosti« pri monografijsah posameznih pomožnih snovi v Evropski farmakopeji razširiti z lastnostmi pomožnih snovi, ki bi lahko vplivale na stabilnostni profil učinkovin.

Influence of Functionality-Related and Other Characteristics of Microcrystalline Cellulose on Stability Profile of Active Substances

TANJA VEHOVEC, Krka d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Andrej Gartner, Krka d. d., Novo mesto

The influence of some commercially available types of microcrystalline cellulose (MCC) on the stability of certain active pharmaceutical ingredients (APIs), when in contact, has been investigated. Two structurally similar APIs, perindopril erbumine and enalapril maleate, both well-known angiotensin-converting enzyme inhibitors and one model API KG-7 were used. The main properties of a MCC that could determine the stability for each API were measured and correlated to the stability of these APIs in binary mixtures. The stability of these APIs differed when in contact with different types of MCC. The dominant properties of MCC were surface features, acidity and unbound water. The experiments showed that the properties of MCC are changing with time which is most probably the consequence of water binding on the surface of MCC. We proved that not only the amount of water but also the strength of binding of water on MCC is important for the stability of active substances. The strength of water binding on MCC depends on the structure of surface of MCC (e.g. amorphicity, porous structure), and the methods such as inverse gas chromatography and dynamic vapour sorption showed to be very suitable techniques for the determination of their characteristics. With this investigation we proved that the FRC (functionality-related characteristics) sections of monographs of excipients in the European Pharmacopoeia should be expanded with the characteristics of excipients that could be critical for the stability profile of active substances.

Sinteza in uporaba organskih biorazgradljivih aerogelov za kontrolirano sproščanje aktivnih substanc

ANJA VERONOVSKI, 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

Farmacevtske oblike za kontrolirano sproščanje aktivnih substanc, pripravljene iz biorazgradljivih in biokompatibilnih polimerov, kot so proteini in polisaharidi, zagotavljajo bolj nadzorovano sproščanje in presnavljanje aktivnih substanc v telesu, kar izboljša njihov terapevtski učinek. Namen raziskave je bil sintetizirati polisaharidne aerogele ter jih uporabiti kot nosilce v vodi dobro topnih aktivnih substanc, nikotinske kislino in teofilino. S sol-gel sintezo po dveh temeljnih metodah ionskega zamreženja z ioni Ca^{2+} in Ba^{2+} smo pripravili alginatne hidrogele in jih s sušenjem s superkritičnim CO_2 pretvorili v aerogele z veliko specifično površino in poroznostjo. Alginatne aerogele smo analizirali z uporabo diferenčne dinamične kalorimetrije, vrstičnega elektronskega mikroskopa in porosimetrije. Izkazalo se je, da s povečevanjem začetne koncentracije in viskoznosti alginatne raztopine dobimo bolj zamrežene nanoporozne aerogele z večjo mehansko močjo. Proučevali smo tudi vpliv spremenjanja procesnih parametrov med sol-gel sintezo in uporabo različnih ionov ter njihove koncentracije za zamreženje na sproščanje obeh modelnih substanc. Uspešno smo pripravili nosilce z želeno vsebnostjo substance in linearno kinetiko sproščanja v odvisnosti od časa. Takšne farmacevtske oblike so idealen model za podaljšano sproščanje aktivnih substanc.

Synthesis and Use of Organic Biodegradable Aerogels in Controlled Drug Release

ANJA VERONOVSKI, 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

Controlled drug delivery products using biodegradable and biocompatible polymers, such as proteins and polysaccharides, provide a better controlled rate of release and assimilation of the drug by the body, improving its therapeutic effect. The aim of the present research was the preparation of polysaccharidic aerogels with a potential application as nicotinic acid and theophylline carriers in oral drug delivery. Alginate hydrogels were synthesized by the sol-gel process using two fundamental methods of ionic cross-linking by Ca^{2+} in Ba^{2+} ions, and were further easily converted to a high surface area and porous aerogels. Alginate aerogels were characterized by DSC, SEM and porosimetry. By increasing the alginate concentration and viscosity more cross-linked and mechanically stable nano-porous aerogels were formed. The influence of drug release from aerogels was also studied dependent on changing the sol-gel process parameters and using different ions and their concentration for cross-linking. We successfully prepared drug carriers possessing desired loadings and linear drug release versus time. Such formulations provide an ideal model of sustained drug release.

Modeliranje odločitvenega znanja za pomoč pri promociji zdravil na recept

MAJA KREJAN, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Vladislav Rajkovič, Fakulteta za organizacijske vede, Univerza v Mariboru

V magistrskem delu obravnavamo proces promocije zdravil na recept s posebnim poudarkom na modeliranju ustreznega znanja. Analizirali smo dejavnike pristopa k promociji zdravil pri zdravnikih. Med njimi smo izvedli anketo in jo analizirali v računalniškem programu DEX-i. Anketna vprašanja smo pripravili na osnovi dosedanjega dela strokovnih sodelavcev. Vprašanja so oblikovana tako, da imajo odgovori nadaljnjo uporabno vrednost. Analiza rezultatov je pokazala, da zdravniki pogosteje predpišejo generično zdravilo slovenskega izvora kot originalno zdravilo. Zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na predpisovalne navade zdravnikov, je tudi omogočanje različnih oblik izobraževanja za zdravnike. Za prepričljiv pristop strokovnega sodelavca sta pomembna dobro razvit občutek za delo z ljudmi in intuicija. Zdravniki se tudi pogosteje odločajo za predpisovanje novega zdravila pri novih bolnikih. Za pomembne dejavnike, ki vplivajo na predpisovalne navade zdravnikov, so se pokazali tudi boljše zdravnikovo poznавanje specifičnega področja medicine, povezovanje strokovnega sodelavca s podjetjem, iz katerega prihaja, kontinuiteta strokovnega sodelavca, varnost zdravil in lastne izkušnje zdravnikov s posameznim zdravilom. Dobavljeni rezultati imajo poleg osnovne vrednosti tudi dodano vrednost, saj so v nalogi izpostavljeni še drugi dejavniki, ki so lahko dobra osnova za delo na področju marketinga ter izvajanje izobraževalnih procesov za strokovne sodelavce.

Decision Model to Support Promotion of Prescription Pharmaceuticals

MAJA KREJAN, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Vladislav Rajkovič, Faculty of Organizational Sciences, University of Maribor

This research deals with knowledge management of prescription pharmaceuticals and focuses on modelling appropriate skills aimed at promoting medicines with doctors. Approach factors in promoting medicines to doctors were analysed. We have conducted a survey among doctors that was analysed with the DEX-i software. Survey questions were developed based on previous experience of medical representatives working in the field and were designed in order to obtain useful answers. The results have shown that doctors prescribe generic medicines of the Slovenian origin more often than the original medicines. A very important factor influencing the doctors' prescribing attitudes is also the organization of different types of educational seminars for the doctors. A well-developed sense of working with people and intuition are significant for the persuasive attitude of medical representatives. We have established that doctors frequently prescribe new medicines to new patients. Other important factors are the doctor's knowledge about a specific field of medicine, the connection of the medical representative with the company the representative works for, the continuity of the medical representative, the safety of medicines and the doctor's own experience with a certain medicine. In addition, the results obtained have an additional value as the research emphasised several other aspects which might provide a good basis for marketing and be part of the training for medical representatives.

Študij stabilnosti učinkovine pramipeksola v prisotnosti pomožne snovi hidroksipropilmethylceluloze

ANA TRKOVNIK KLUN, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Helena Prosen, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Andrej Gartner, Krka, d. d., Novo mesto

Pramipeksol spada v skupino zdravil, ki se uporablja za zdravljenje simptomov Parkinsonove bolezni. Hidroksipropilmethylceluloza (HPMC) je pomožna snov, ki se v različnih farmacevtskih oblikah uporablja kot vezivo in sredstvo za oblaganje, pri farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem pa kot tvorec ogrodja. V okviru magistrskega dela sem izvedla študijo stresnega in pospešenega testiranja stabilnosti binarnih zmesi različnih vrst in serij HPMC in pramipeksola. Po določenih časovnih terminih sem izvedla HPLC-analizo razpadnih produktov pramipeksola. Z LC-MS smo kvalitativno ovrednotili dva razpadna produkta, sorodno substanco 1 (SS1) in sorodno substanco 2 (SS2). Natančneje sem spremljala SS1, katerega vsebnost se je med testiranjem spreminjala. V HPMC smo z GC-MS-analizo določili vsebnost formaldehyda, s termogravimetrično analizo smo določili vsebnost proste vode, načine in vezavo vode pa smo preverili z dinamično sorpcijo pare. Raziskovala sem vplive posameznih fizikalno-kemijskih lastnosti HPMC na nastajanje SS1. Pri testiranju pospešene stabilnosti na 40 °C/75 % RV ni bilo opaziti izrazitih korelacij med posameznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi HPMC in nastajanju SS1. Pri stresnih pogojih (40 °C, 50 °C, 60 °C) pa se je pokazal vpliv posameznih lastnosti HPMC, kot so pH, vsebnost proste vode, vsebnost formaldehyda, navidezne viskoznosti in vsebnost metilnih skupin, na nastajanje SS1 iz pramipeksola v zmesi s HPMC. Ugotovila sem tudi, da obstajajo razlike med različnimi vrstami HPMC, ki različno vplivajo na kemijsko stabilnost pramipeksola. Prav tako obstajajo razlike med različnimi proizvajalci iste vrste HPMC in tudi med serijami istega proizvajalca.

Study of Stability of Active Substance Pramipexole in the Presence of Hydroxypropylmethylcellulose

ANA TRKOVNIK KLUN, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Helena Prosen, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Andrej Gartner, Krka, d. d., Novo mesto

Pramipexole is used to treat the symptoms of Parkinson's disease. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) is a pharmaceutical excipient which is widely used in different pharmaceutical formulations. It is used as a tablet binder, in film-coating and as matrix for use in extended-release formulations. In the thesis, the stress and accelerated stability studies of binary mixtures of different types of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and pramipexole were studied. The related substances of pramipexole were determined by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method after fixed time intervals. The related substances 1 (SS1) and 2 (SS2) were identified by LC-MS. During the study only SS1 concentration was changing, therefore we monitored only that product. The determination of formaldehyde in HPMC by GC-MS, the determination of active water in HPMC by thermogravimetric analysis and moisture sorption and desorption profiles of HPMC by dynamic vapour sorption were performed. We determined the influence of some physico-chemical properties of HPMC on the formation of SS1. No correlations were observed between the physico-chemical properties of HPMC and the formation of SS1 at accelerated testing conditions 40°C/75% RH. The influence of some physico-chemical properties of HPMC-like pH, water content, the content of formaldehyde, apparent viscosity and the content of methyl groups on the formation of SS1 in the mixtures was observed at stress testing conditions (40°C, 50°C, 60°C). It was concluded that there are differences between different types of HPMC which influence the chemical stability of pramipexole. There are differences between different manufacturers of the same type of HPMC, and between the batches from the same manufacturers.

Medprocesna analitika za spremljanje sinteze 1-hidroksi-3,5-dimetiladamantana s plinsko kromatografijo

KATARINA BRULC, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Jožko Cesar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Anica Pečavar Krka, d. d., Novo mesto

Medprocesna kontrola pri sintezi učinkovin, s katero spremljamo potek stopenj sinteze in čiščenja vmesnih intermediatov, je ključna za zagotavljanje kakovosti končnega produkta (učinkovine). V ta namen največkrat uporabljamo kromatografske metode. Kadar imamo opravka s hlapnimi vzorci, ki ne vsebujejo kromoforjev, je metoda izbora za njihovo vrednotenje plinska kromatografija. V okviru naloge smo razvili medprocesno analizno metodo za spremljanje sinteze intermediata za sintezo memantine splinsko kromatografijo. Proses njegove sinteze zajema štiri stopnje: hidrogeniranje 1,2-dihidroacenaftena, sintezo 1,3-dimetiladamantana, bromiranje 1,3-dimetiladamantana ter hidrolizo 1-bromo-3,5-dimetiladamantana. Kromatografske parametre in postopek priprave reakcijskih vzorcev posameznih sinteznih stopenj smo najprej optimizirali tako, da smo z metodo ločili vse vmesne produkte. Tako smo lahko kvantitativno vrednotili potek kemijskih pretvorb in procesov čiščenja posameznih intermediatov. Ker v naslednjih stopnjah ti nastopijo kot nečistote, smo jih lahko ovrednotili tudi kot take. Metoda se je pokazala za dovolj občutljivo, da lahko z njo vrednotimo tudi nečistote pod mejo navedbe. Analizno metodo smo nato validirali in tako dokazali, da je dovolj specifična, točna, natančna in občutljiva, da jo lahko uporabimo za spremljanje posameznih stopenj sinteze 1-hidroksi-3,5-dimetiladamantana.

In-process Analysis for Monitoring 1-Hydroxy-3,5-Dimethyladamantane Synthesis with Gas Chromatography

KATARINA BRULC, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Jožko Cesar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Anica Pečavar, Krka, d. d., Novo mesto

In-process control in the synthesis of active pharmaceutical ingredients, which is used to monitor and control the synthesis and purification of intermediates is crucial in ensuring the quality of the final product. Chromatographic methods are most often used for this purpose. When dealing with volatile samples that do not contain chromophores, the method of choice for their evaluation is gas chromatography. In the thesis, we have developed an analytical method for in-process monitoring of the synthesis of an intermediate for the synthesis of memantine by gas chromatography. The process of its synthesis consists of four synthetic steps: The hydrogenation of 1,2-dihydroacenaphthene, the synthesis of 1,3-dimethyladamantane, bromination of 1,3-dimethyladamantane, and the hydrolysis of 1-bromo-3,5-dimethyladamantane. The chromatographic parameters and the process of preparing the reaction samples of the individual synthesis steps were optimized first so that the method was able to separate all the intermediates. Thus, we can quantitatively evaluate the progress of the chemical transformation and purification processes of individual intermediates. Since these intermediates in the subsequent stages occur as impurities, we can evaluate them as such. The method has proven to be sufficiently sensitive to be able to evaluate impurities also below the limit of quantitation. The method of analysis was then validated and proven as sufficiently specific, accurate, precise and sensitive to be used to control individual stages of the synthesis of 1-hydroxy-3,5-dimethyladamantane.

Sinteza in pretvorbe derivatov 5-aminometil-3-pirazolidinona

JAKA GLAVAČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jurij Svetec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Pri raziskovalnem delu smo se ukvarjali s sintezo in pretvorbami derivatov 5-aminometil-3-pirazolidinona. Ti derivati so zanimivi, ker je iz njih mogoče pripraviti različne antibiotike in druge uporabne spojine. Iz komercialno dostopnih aminokislin nam je v petih stopnjah uspelo pripraviti ključna intermediata – *tert*-butil in benzil ((5-oksopirazolidin-3-il)methyl)karbamat. Obe spojini smo z dimetoksiacetaldehidom substituirali na mestu N-1 in dobili ustrezna substituirana derivata. V nadaljevanju smo z reakcijami med 3-okso-2-fenilpirazolidin-5-karboksilno kislino in 6 različnimi amini sintetizirali 4 karboksamide in 4 diastereomerne karboksamide, ki bi jih lahko pretvorili v biciklične derivate. S hidrogeniranjem in karbonil diimidazolom (CDI) nam je benzil methyl((2-methyl-3-oksopirazolidin-5-il)methyl)karbamat uspelo pretvoriti v biciklični substituirani imidazo[1,5-*b*]pirazolo-2,6-dion. Z reakcijo med glioksalom in benzil ((5-oksopirazolidin-3-il)methyl)karbamatom smo sintetizirali heksahidropirazolo[1,5-*a*]pirazin-2(1H)-on, vendar nam dobljenega produkta ni uspelo izolirati v čisti obliki, ker je bilo prisotnih preveč podobnih stranskih produktov.

Synthesis and Transformations of 5-Aminomethyl-3-Pyrazolidinone Derivatives

JAKA GLAVAČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Jurij Svetec**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The main objectives of our research were the synthesis and transformations of 5-aminomethyl-3-pyrazolidinone derivatives. These derivatives are interesting because a variety of antibiotics and other useful compounds can be obtained from them. We managed to prepare key intermediates – *tert*-butyl and benzyl ((5-oxopyrazolidin-3-yl)methyl)carbamate from commercially available compounds. These compounds were then transformed into N-1 substituted derivatives with dimethoxyacetaldehyde. Furthermore, we prepared 4 carboxamides and 4 diastereomeric carboxamides by reaction between 3-oxo-2-phenylpyrazolidine-5-carboxylic acid and 6 various amines. All of the obtained products represent a group of compounds which could be transformed into bicyclic derivatives. For example, transformation of benzyl methyl((2-methyl-3-oxopyrazolidin-5-yl)methyl)carbamate using hydrogenation and CDI as C-1 synthon gave bicyclic imidazo[1,5-*b*]pyrazolo-2,6-dione. We also managed to transform benzyl ((5-oxopyrazolidin-3-yl)methyl)carbamate into bicyclic compound hexahidropirazolo[1,5-*a*]pyrazin-2(1*H*)-one with glyoxal, but we were unable to isolate it because too many similar by-products were present.

Separacija in identifikacija flavonoidov v polietilen-glikolnem izvlečku lubja navadne jelke (*Abies alba*)

TINA GROHAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Samo Kreft, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Naš glavni namen pri raziskovanju kemijske sestave lubja jelke je bil ločiti in identificirati spojine, predvsem flavonoide, ki smo jim v predhodnih raziskavah pripisali, da so nosilci antioksidativne aktivnosti. Uporabili smo izvleček lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.) v polietenglikolu. S tiolizno degradacijo smo ugotavljalni prisotnost procianidnih polimerov, po postopku ameriške farmakopeje USP 35 za izvleček iz lubja obmorskega bora pa poleg prisotnosti še vsebnost. Z različnimi vrstami ekstrakcij in kromatografskimi metodami smo iz kompleksnega izvlečka poskušali dobiti čim bolj ločene spojine. Dobljene frakcije smo vrednotili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Za izbrane frakcije smo optimizirali kromatografske metode, ki smo jih nato uporabili za analizo frakcij z masno spektrometrijo. Iz dobrijenih masnih molekulskih vrhov in fragmentov spojin smo pričakovali strukture flavonoidov, vendar smo kot prevladujoče spojine v izvlečku identificirali lignane (taksiresinol, 7-(2-metyl-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)taksiresinol, sekoizolariciresinol, lariciresinol). Od flavonoidov smo identificirali katehin, epikatechin in katechin tetrametil eter, od fenolnih kislin pa p-kumarno, galno, protocatehujsko, vanilinsko, homovanilično in p-hidroksibenzojsko kislino. Identiteto nekaterih spojin smo preverili tudi s primerjavo retencijskih časov standardov. S svojimi rezultati smo uspešno prispevali k poznavanju spojin v izvlečku.

Separation and Identification of Flavonoids in Polyethylene Glycol Extract from the Bark of the Silver Fir (*Abies Alba*)

TINA GROHAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Samo Kreft, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Our primary objective in studying chemical composition of silver fir bark was to separate and identify the compounds, mainly flavonoids which in the previous researches were said to be the bearers of antioxidant activities. We used polyethylene glycol extract from the bark of the silver fir (*Abies alba* Mill.). We examined the presence of procianidin polymers in the extract using thiolytic degradation and the method of the US Pharmacopoeia USP 35 for Maritime Pine Extract with which we also checked the content. By means of extractions as well as various chromatographic methods, we wanted to obtain as much separated compounds as possible from the complex extract. The obtained fractions were evaluated with the analysis of high resolution liquid chromatography. We optimised chromatographic methods for individual fractions. The optimised methods were then used for analysing the fractions with mass spectrometry. Flavonoid structures were expected from the acquired mass molecular ion peaks and the fragments of the compounds; however, it was lignans that we identified as the predominant compounds in the extract (taxiresinol, 7-(2-methyl-3,4-dihydroxytetrahydropyran-5-yloxy)taxiresinol, secoisolariciresinol, lariciresinol). In addition to lignans, we have found flavonoids (catechin, epicatechin, catechin tetramethyl ether) and phenolic acids (p-coumaric, gallic, protocatechuic, vanillic, homovanillic and p-hydroxybenzoic). In addition, we checked the identity of some compounds by comparing their retention time standards. The acquired results have substantially and successfully contributed to the knowledge about the compounds in the extract.

Sinteza in karakterizacija potencialnih nečistot v farmacevtski učinkovini

VERICA HERAK, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Bogdan Štefane, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Davor Kiđemet, Krka, d. d., Novo mesto

Montelukast natrij (natrijev (*R,E*)-2-(1-((1-(3-(2-(7-klorokinolin-2-il)vinil)fenil)-3-(2-(2-hidroksipropan-2-il)fenil)propiltio)methyl)ciklopropil)acetat) je 7-klorokinolinsko substituiran derivat molekule levkotriena D₄. Je oralen, aktiven in selektiven antagonist receptorja levkotriena ter inhibitor receptorja CysLT-1 cisteinskega levkotriena. V delu opisujem različne načine priprave montelukast natrija s poudarkom na postopku, ki ga uporablajo v Krki, d. d., Novo mesto. Prav tako opisujem sintezne stopnje, pri katerih pride do posameznih nečistot, in njihovo pripravo po sinteznem načrtu. Sintetizirali in okarakterizirali smo nekatere najznačilnejše nečistote, ki nastajajo pri sintezi montelukast natrija: dehidro derivat montelukasta, sulfoksidni derivat montelukasta, (*S*)-enantiomer montelukasta, keto derivat montelukasta in *cis* izomer montelukasta. Pri delu smo uporabljali različne analizne tehnike za sledenje poteka reakcij in identifikacijo pripravljenih spojin (HPLC, TLC, NMR, IR, MS). Pri tem smo proučevali vpliv svetlobe na stabilnost montelukast natrija v različnih topilih in njegovo stabilnost v različnih topilih pri različnih temperaturah.

Synthesis and Characterization of Potential Impurities in an Active Pharmaceutical Ingredient

VERICA HERAK, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Bogdan Štefane, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Davor Kiđemet, Krka, d. d., Novo mesto

Montelukast sodium (sodium (*R,E*)-2-(1-((1-(3-(2-(7-chloroquinoline-2-yl)vinyl)phenyl)-3-(2-(2-hydroxypropan-2-yl)phenyl)propylthio)methyl)cyclopropyl)acetate) is a 7-chloroquinoline-substituted derivative of the D₄ leukotriene. It is a selective and orally active leukotriene receptor antagonist that inhibits the cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. In this work several routes of synthesis are described while focusing on the route applied by Krka, d. d., Novo mesto. Herein, every synthetic step along the presented route of synthesis of montelukast sodium is described. In addition, some selected impurities related to montelukast sodium have been synthesized and characterized, the most significant which appear in the synthesis of montelukast sodium; they are: "dehydro" derivative of montelukast, sulfoxide derivative of montelukast, (*S*)-enantiomer of montelukast, "keto" derivative of montelukast, and *cis* isomer of montelukast. Several analytical techniques have been employed to follow the route of synthesis and to identify the prepared products, intermediates and impurities (HPLC, TLC, NMR, IR, MS). Also, the photochemical and thermal stability of montelukast sodium has been checked in various solvents and at different pH values.

Študij nitrilaz in ketoreduktaz za izvedbo biotransformacij izbranih farmacevtskih intermediatov

SAŠA KAJDIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Mentorica: Polona Žnidaršič Plazl, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

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

Uporaba ketoreduktaz in nitrilaz v farmacevtski industriji postaja zaradi vse večje potrebe po optično čistih farmacevtskih učinkovinah vse bolj pomembna in proučevana. Na trgu je na razpolago veliko potencialno ustreznih encimov, zato je za farmacevtsko podjetje ključno izvajanje hitrih in učinkovitih presejalnih testov v miniaturiziranih napravah, s katerimi nabor encimov že v začetku omejimo na nekaj najustreznejših kandidatov, ki so primerni za nadaljnje raziskave. Na ta način lahko bistveno izboljšamo časovno in ekonomsko učinkovitost postopka izbire katalizatorja in s tem razvoja biokatalitskega procesa. S 120 komercialno dostopnimi ketoreduktazami smo v mikrotitrskih ploščah izvedli biotransformacije izbranih prokiralnih ketonov v kiralne alkohole. S presejalnimi testi, ki so temeljni na kvalitativni analizi produktov s tankoplastno tekočinsko kromatografijo, smo za nadaljnje raziskave določili 24 potencialno ustreznih encimov. V drugem delu naloge smo hitro, enostavno in občutljivo fluorimetrično metodo za določanje aktivnosti nitrilaz prilagodili za učinkovito kvalitativno in kvantitativno izvajanje presejalnih testov nitrilaz. Izmed 13 razpoložljivih encimov smo jih za nadaljnje raziskave izbrali 8, z isto fluorimetrično metodo pa smo podrobneje opredelili kinetične parametre in encimsko aktivnost 2 izmed izbranih 8 nitrilaz. S tem smo dokazali, da je metoda primerna za karakterizacijo nitrilaz in da jo lahko uspešno uporabimo pri izbiri biokatalizatorja.

Study of Nitrilases and Ketoreductases for Biotransformations of Selected Pharmaceutical Intermediates

SAŠA KAJDIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Polona Žnidaršič Plazl, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto

The use of ketoreductases and nitrilases in pharmaceutical industry is becoming increasingly important and studied due to the increasing demand for optically pure pharmaceutical agents. The market has to offer a large number of potentially relevant enzymes, therefore the implementation of rapid and effective screening within miniaturized devices is crucial for the pharmaceutical company to narrow a large set of enzymes to a few candidates suitable for further research. In this manner we could substantially improve time and economic efficiency of catalyst selection and thereby of process development. In the present work, biotransformations of selected prochiral ketones to chiral alcohols using 120 commercially available ketoreductases were performed within microtiter plates. Enzyme screening was based on qualitative product analysis by TLC method. 24 potentially relevant enzymes were selected for further research. In the second part of the thesis, fast, simple and sensitive fluorimetric method for determination of nitrilase activity was adapted for the efficient implementation in qualitative and quantitative screening of nitrilases. 8 out of 13 available enzymes were selected for further study, and two out of eight selected nitrilases were further characterized for the kinetic properties and enzyme activity using the same fluorimetric method. Thus we have proven that the method is suitable for characterization of nitrilases and can be used for the selection of the best biocatalyst.

Študija uporabnosti meritev v napravi za spremljanje procesa oblaganja pelet

KLEMEN KORASA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Grega Hudovornik, Krka, d. d., Novo mesto

Uporaba merilnih sond za merjenje v napravi (in-line) postaja pomemben del načrtovanja, spremljanja, analize in optimizacije procesov v farmacevtski industriji. V nalogi smo preizkušali uporabnost dveh in-line sond med procesom oblaganja pelet v vrtinčnoslojnem oblagalniku. Uporabili smo sondi za vrednotenje velikosti delcev s tehniko prostorskega filtriranja (SFT) in sondi za določanje vode z bližnjo infrardečo (NIR) spektroskopijo. NIR-meritve so se pokazale kot uporaben pristop k določanju vlage v peletah. Dobljeni spektri so ob izračunu regresije delnih najmanjših kvadratov (PLS) namreč dobro korelirali z uveljavljenimi metodami določanja vlage v trdnih vzorcih zunaj naprave (izguba pri sušenju, Karl Fischer, aktivnost vode). Z vrednotenjem uporabnosti SFT-sonde smo pokazali, da se ta ustrezno in hitro odzove tudi na manjše velikostne spremembe delcev med procesom. Primerjava rezultatov SFT-ja z meritvami zunaj naprave (sejalna analiza, statično slikanje s svetlobnim mikroskopom, SFT at-line) pa je pokazala primerljivost izmerjenih vrednosti. Največja pomanjkljivost SFT-sonde je njena nezmožnost zaznavanja prisotnosti aglomeratov, kar je posledica rahlih agregatov, ki se tvorijo v komori med razprševanjem disperzije za oblaganje in zakrijejo nastanek pravih trdnih aglomeratov.

The Study of In-line Measurement Applicability in Monitoring of Pellet Coating Process

KLEMEN KORASA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Grega Hudovornik, Krka, d. d., Novo mesto

The use of in-line measuring probes is becoming an important part of planning, monitoring, analysing and optimizing processes in the pharmaceutical industry. In the present study the applicability of two in-line probes during the pellet coating process in fluid-bed chamber was tested. We used a probe for evaluation of particle size with spatial filtering technique (SFT) and a probe for determination of moisture with near infrared (NIR) spectroscopy. The NIR probe has proven to be a useful tool for determination of moisture in the pellets. Thus, the in-line results correlated well with already established methods for off-line moisture determination (loss on drying, Karl Fischer, water activity) when partial least square (PLS) regression was applied. During the evaluation of the SFT probe we have shown that it responds even to small changes in size well and quickly. When we compared the SFT with off-line methods (sieve analysis, static image analysis, SFT "at-line") we saw that the measured values are comparable. Its biggest disadvantage is the inability of the probe to perceive agglomerates due to loose aggregates, which are formed in the chamber during the spraying of coating dispersion.

Spremljanje interakcij zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi z mikrokalorimetrijo

SIMON KOVAČIČ, Krka, d. d., Novo mesto

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

Detekcija, identifikacija in kvantifikacija interakcij med zdravilnimi učinkovinami in pomožnimi snovmi so za razvoj zdravil zelo pomembne, saj lahko vplivajo na kemijske lastnosti, stabilnost in biološko uporabnost zdravilnih učinkovin ter posledično na njihovo terapevtsko varnost in učinkovitost. S poznanjem mehanizmov interakcij lahko nekompatibilne snovi eliminiramo že v predformulacijski stopnji razvoja farmacevtskih oblik, s čimer dosežemo zmanjšanje stroškov razvoja in oblikovanje izdelka, ki bo kakovosten, varen in učinkovit za bolnika. V diplomskem delu smo analizirali kompatibilnost komponent modelne farmacevtske oblike, ki je vsebovala tri zdravilne učinkovine – amlodipin (AMLO), hidroklorotiazid (HCTZ) in naproxen (NAP) – ter dve pomožni snovi – glukozo in manitol. Študija je temeljila tako na kvalitativnih kot kvantitativnih analizah dogajanja v sistemih, med katerimi smo izbrali štiri analizne tehnike. Glavna je bila izotermna titracijska kalorimetrija (ITC), s katero smo pridobili termodinamično sliko procesov, ki do sedaj še ni bila ovrednotena. Z modelsko analizo eksperimentalnih podatkov smo v sistemih AMLO-NAP in HCTZ-AMLO dokazali nastanek bimolekularnih kompleksov z majhno afiniteto vezave. Obe vezavi sta močno entropijsko vodenici, kar smo pripisali desolvacijskim efektom vezavnih partnerjev.

Application of Microcalorimetry for the Study of Drug-Excipient Interactions

SIMON KOVAČIČ, Krka, d. d., Novo mesto

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

The detection, identification and quantification of interactions between drugs and excipients are of a great importance in the drug development process as they can affect chemical properties, stability and bioavailability of drugs and consecutively their therapeutic safety and efficacy. Understanding the interaction mechanisms is the key to elimination of incompatible components in the preformulation stage of development of a new pharmaceutical dosage form, enabling us to reduce the cost of development and formulation of a product ensuring quality, safety and efficacy. In the thesis we carried out a study on the component compatibility of a model solid dosage form consisting of three active pharmaceutical ingredients – amlodipine (AMLO), hydrochlorothiazide (HCTZ) and naproxen (NAP) – and two excipients – glucose and manitol. Relying on quali- and quantitative analysis of the systems using four analytical techniques – the main one being isothermal titration calorimetry (ITC) – we obtained thermodynamic profiles of processes not characterized before. The analysis of experimental data has shown that in AMLO-NAP and HCTZ-AMLO mixtures bimolecular complexes with low binding affinity are formed. The formation of these complexes seems to be entropy-driven which may be a result of desolvation processes of individual components.

Razvoj samomikroemulgirajočega sistema na osnovi Gelucire® 44/14 in njegova pretvorba v trdno farmacevtsko obliko

ANA LEMOVEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Alenka Zvonar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Peroralna aplikacija slabo vodotopnih zdravilnih učinkovin je mnogokrat težavna, saj ima lahko za posledico slabo biološko uporabnost ter visoko intra-in interindividualno variabilnost. Eden izmed pristopov k izboljšanju raztopljanja zdravilnih učinkovin je njihova vgradnja v samo(mikro)emulgirajoče sisteme (SMEDDS). V okviru diplomske naloge smo razvili samo(mikro)emulgirajoči sistem na osnovi površinsko aktivne komponente Gelucire® 44/14. S kombiniranjem Gelucire® 44/14 z drugo površinsko aktivno snovjo (Solutol® HS-15) in oljno fazo (Miglyol® 812, Peceol™) v specifičnem razmerju smo dobili sistem, ki po dispergiranju v vodnem mediju tvori mikroemulzijo z velikostjo kapljic pod 100 nm. V razviti samo(mikro)emulgirajoči sistem smo vgradili slabo vodotopno modelno učinkovino naproksen. Pri preizkusu sproščanja v mediju s pH 1,2 se je modelna učinkovina iz samo(mikro)emulgirajočega sistema sproščala bistveno hitreje in v večjem obsegu kot sproščanje modelne učinkovine iz fizikalne zmesi modelne učinkovine in maltodekstrina. Razviti tekoči samo(mikro)-emulgirajoči sistem smo nato z metodo sušenja z razprševanjem pretvorili v trdno farmacevtsko obliko, pri čemer smo kot trdni nosilec uporabili maltodekstrin. Samo(mikro)emulgirajoči sistemi so namreč večinoma v tekočem agregatnem stanju, zato se lahko z njihovo pretvorbo v trdno obliko izognemo številnim težavam in združimo prednosti lipidnih dostavnih sistemov s prednostmi trdnih farmacevtskih oblik. Z optimizacijo sestave raztopine za razprševanje in pogojev razprševanja smo izdelali prahove, ki so ohranili samo(mikro)-emulgirajoče lastnosti tekočega sistema, ter izboljšali hitrost in obseg sproščanja modelne učinkovine.

The Development of a Self-micro Emulsifying System Based on Gelucire® 44/14 and its Transformation into a Solid Dosage Form

ANA LEMOVEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Alenka Zvonar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Oral route is a major challenge for multiple drug compounds due to their low aqueous solubility. This can lead to poor oral bioavailability as well as high intra- and inter-individual variability. One of the approaches to improve the dissolution rate of drug substances are self(micro)emulsifying drug delivery systems. We have developed a self(micro)emulsifying drug delivery system (SMEDDS) based on the surfactant Gelucire® 44/14, by combining it with another surfactant (Solutol® HS-15) and an oil phase (Miglyol® 812, Peceol™). Upon contact with aqueous medium our system forms microemulsions with a droplet size below 100 nm. A poorly water-soluble model drug naproxen was incorporated into the SMEDDS. The dissolution test in a pH 1,2 medium revealed that the release of a model drug from the SMEDDS is faster and happens in a larger extent than from the physical mixture of the model drug and maltodextrine. The SMEDDS was then transformed into a solid dosage form by spray-drying, using maltodextrine as solid carrier. Self(micro) emulsifying systems are mostly found in a liquid form; therefore, with their transformation into a solid dosage form, we can combine the advantages of lipid-based delivery systems and the advantages of solid dosage forms. By optimising the composition of the spray-drying dispersion and process parameters we managed to produce solid particles that preserved self(micro)emulsifying properties of the liquid system.

Vpliv vgradnje hidrofilnih snovi na podaljšano sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet, izdelanih iz polivinilacetata in polivinilpirrolidona v razmerju 4 : 1

TINA SNOJ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Cilj naloge je bil izdelati ogrodne tablete s podaljšanim sproščanjem iz Kollidona® SR (fizikalna zmes iz 80 % polivinilacetata in 20 % polivinilpirrolidona), iz katerih bi se v 24 urah sprostila celotna količina vgrajenega pentoksifilina. Pri preizkusu sproščanja smo uporabili napravo z vesli (naprava 2 po Ph. Eur.), količino sproščene učinkovine pa smo določili spektrofotometrično. Sproščanje iz ogrodnih tablet, ki so vsebovale le Kollidon® SR in pentoksifilin, je bilo prepočasno. Vgradnja laktoze je močno pospešila celotno sproščanje in opazno povečala hipno sproščanje pentoksifilina. Po zamenjavi laktoze z enakim deležem HPMC K100LV se je celotno sproščanje upočasnilo, zmanjšala sta se tudi hipno sproščanje in količina sproščene učinkovine. V naslednjih treh poskusih smo v sestavi tablet povečevali delež vodotopnega HPMC K100LV v ogrodju in v vseh primerih dosegli zastavljeni cilj. Ugotovili smo, da povečanje ionske moči medijev z NaCl ali s KCl ne vpliva na hitrost sproščanja pentoksifilina. Statistično podobnost profilov sproščanja smo potrdili z izračunavanjem faktorja podobnosti (f_2) in faktorja različnosti (f_1). Kinetiko sproščanja smo določili s Korsmeyer-Peppasovo enačbo. Sproščanje je potekalo po kinetiki 1. reda, nadzorovala pa sta ga tako difuzija kot erozija. Izbrane tablete smo pregledali s SEM-mikroskopom in analizirali obliko delcev uporabljenih snovi.

Influence of Incorporated Hydrophilic Substances on the Prolonged Release of Pentoxifylline from Matrix Tablets Made of Polyvinyl Acetate and Polyvinylpyrrolidone in a Ratio 4:1

TINA SNOJ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

The aim of our research was to develop prolonged release tablets based on Kollidon® SR (physical mixture of 80% polyvinyl acetate and 20% polyvinylpirrollidone), which would release the whole amount of the incorporated drug pentoxifylline within 24 hours. A paddle apparatus (apparatus 2 in Ph. Eur. and USP) was used in dissolution testing, while the amount of the released drug was measured with UV-VIS spectrophotometer. The release of the drug from matrix tablets, which contained only Kollidon® SR and pentoxifylline, was too slow. The incorporation of lactose strongly accelerated not only the drug release, but also the burst release. After substituting lactose with an equal part of HPMC K100LV, the drug release and the burst release decreased. Three additional formulations were made, in which water soluble HPMC K100LV part in the Kollidon® SR matrix was increased and in all three cases we managed to reach our aim. We have found that the increasing ionic strength of the basic media with NaCl or KCl does not influence the release rate of pentoxifylline. The statistical similarity between dissolution profiles was confirmed with the similarity factor (f_2) and difference factor (f_1). The release kinetics was analysed by using Korsmeyer-Peppas equation. The drug release was controlled by diffusion and by erosion, the release kinetics was first order. The selected tablet formulations were examined with a SEM microscope and morphology of used particles was analysed.

Sinteza nekaterih heterocikličnih sistemov iz 3-(dimetilamino)enaminonov ter določanje njihove strukture in lastnosti

OŽBEJ ZUPANČIČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

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

Delo se osredotoča na pripravo heterocikličnih spojin iz poljubnih enaminonov in heteroarylaminov. Enaminone smo pripravili iz ustreznih metilketonov in amidni acetaloval ter jim določili strukturo z ^1H NMR-spektroskopijo. Vsi nastali 3-(dimetilamino)enaminoni obstajajo kot (*E*)-izomeri. V drugi stopnji smo enaminone ciklizirali s heteroarylaminimi v kislih pogojih z mikrovalovnim obsevanjem. Nastali so heterocikli iz skupin pirazolo[1,5-*a*]pirimidinov in triazolo[1,5-*a*]pirimidinov. Njihov nastanek in strukturo smo potrdili z različnimi analiznimi metodami. V nekaterih primerih so nastale zmesi dveh izomerov, ki se razlikujeta v mestu vezave substituente R v pirimidinskem obroču. Iz ^1H NMR-spektrov smo na osnovi sklopitvenih konstant vodikovih atomov v pirimidinskem obroču določili delež nastanka posameznih izomerov. V zadnji stopnji smo z reakcijami bromiranja določali reaktivnost heterocikličnih sistemov. Pri derivatih pirazolo[1,5-*a*]pirimidinov so reakcije potekle, nastali so monobromirani produkti, v vseh primerih se je molekula broma vezala na mesto 3 pirazolovega obroča. Derivati triazolo[1,5-*a*]pirimidinov z bromom niso reagirali.

Synthesis of Some Heterocyclic Systems from 3-(Dimethylamino) Enaminones, Determination of Their Structure and Reactivity

OŽBEJ ZUPANČIČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

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

The goal of our work was the preparation of heterocyclic systems from various enaminones and heteroarylamines. Enaminones were prepared from the corresponding methyl ketones and amid acetals, their structure was determined by ^1H NMR spectroscopy. All of the prepared 3-(dimethylamino) enaminones exist as (*E*) isomers. In the second stage, enaminones were cyclised with heteroarylamines in acidic media under microwave irradiation. Heterocycles of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine and triazolo[1,5-*a*] pyrimidine class were obtained. Their formation and structure was confirmed with various methods. In some cases the mixtures of two isomers were formed. They differ in R substituent position in a pyrimidine ring. The ratio of isomers was determined with ^1H NMR spectroscopy based on the coupling constants of hydrogen atoms in the pyrimidine ring. The reactivity of heterocyclic systems was studied in the last stage via bromination. The reactions with pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines led to monobromated products, in all cases bromine was bound on the position 3 of the pyrazole ring. Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines did not react with bromine.

Proučevanje vpliva elektrolitov na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov in na sproščanje pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet

NIKA ŽERDONER, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

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

Karagenani spadajo v skupino sulfatiranih polisaharidov. Ker so polielektroliti, kationi bistveno vplivajo na njihove lastnosti in na sposobnost geliranja. V diplomski nalogi smo proučili, kakšen vpliv imajo ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} in Mg^{2+} na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov tipa kapa, iota in lambda. Pripravili smo polimerne disperzije v raztopinah soli različnih ionicnih moči ter z oscilacijsko reometrijo proučevali odvisnost elastičnega in viskoznega modula od frekvence oscilacije. Pri karagenanah kapa in iota smo potrdili obstoj gelov, pri karagenanu lambda pa obstoj viskozne raztopine. Ugotovili smo, da na karagenan kapa najbolj vpliva K^+ , na karagenan iota pa najbolj vplivata Ca^{2+} in Mg^{2+} . Omejujoči faktor pri meritvah je bila heterogenost nekaterih vzorcev, saj so ioni vplivali na nastanek delnih gelov ali gelov s sinerezo. Preverili smo tudi, ali elektroliti vplivajo na sproščanje modelne zdravilne učinkovine pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet. Iz posameznih vrst karagenanov in pentoksifilina smo stisnili tablete in izvedli teste sproščanja na napravi 2 po USP in napravi 3 po USP. Kot medij smo uporabili prečiščeno vodo in raztopine soli z ionsko močjo 0,05. Ugotovili smo, da je sproščanje iz karagenanskih ogrodnih tablet izrazito odvisno od elektrolitov v mediju in da korelira z reološkimi lastnostmi, kadar je disperzija homogena. Kadar izdelane disperzije niso bile homogene, reoloških lastnosti ne moremo neposredno primerjati s hitrostjo sproščanja, lahko pa so nam v pomoč pri interpretaciji rezultatov.

Influence of Electrolytes on Rheological Properties of Carrageenan Hydrogels and Dissolution of Pentoxifylline from Carrageenan Hydrophilic Matrix Tablets

NIKA ŽERDONER, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

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

Carrageenans are a family of sulphated galactanes. Since they are polyelectrolytes, counter ions play a major role in their characteristics and in the gelation process. Therefore, the influence of cations, such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , on the rheological properties of carrageenan hydrogels was studied. Carrageenan dispersions (kappa, iota and lambda) in salt solutions of different ionic strengths were prepared and their viscoelastic behaviour was analysed using a rheometer in the oscillatory mode. The storage and loss modulus were measured as a function of frequency. The existence of true gels for iota and kappa carrageenans and viscous solutions for lambda carrageenan was confirmed. Kappa carrageenan was mostly affected by K^+ and iota carrageenan was affected by Ca^{2+} and Mg^{2+} . Syneresis has been a limiting factor in measuring the dynamic moduli, as the water leads to the slip effect. Further, the influence of electrolytes on dissolution of pentoxifylline from carrageenan hydrophilic tablets was investigated. The dissolution from tablets with apparatus 2 in USP and with apparatus 3 in USP was tested. The results were afterwards interpreted and it was established that the dissolution of a drug is highly dependent on electrolytes in the medium. It is in correlation with rheological properties when samples are homogeneous: a more compact gel means the slower dissolution. When dispersions are not homogeneous, there is no direct correlation between the dissolution of a drug and rheological properties of a gel.

Od priprave zdravila Nalgesin S do njegovega e-oglaševanja v slovenskem znakovnem jeziku

MAJA KUZMA, Krka, d. d., Novo mesto, TIPK, d. o. o.

Mentor: Franc Požgan, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Bojan Mord, TIPK, d. o. o.

Somentorica: Tina Ekar Likar, Krka, d. d., Novo mesto

Somentorica: Melita Jakopič, Krka, d. d., Novo mesto

V okviru diplomskega dela sem raziskovala, kakšen vpliv bi imelo predstavljanje navodil za uporabo zdravila gluhim in naglušnim osebam v slovenskem znakovnem jeziku. Navodilo za uporabo Krkinega zdravila Nalgesin S smo pripravili v obliki videoposnetka z znakovnim jezikom in novost predstavili na demo spletni strani www.tipk.si/krka_nalgesin.html. Anketa med gluhami in naglušnimi je pokazala, da je to zanje odličen način pridobivanja informacij, za farmacevtsko podjetje Krka, d. d., Novo mesto in tudi za druga podjetja, ki delujejo na farmacevtskem in medicinskem področju, pa je to inovativna možnost predstavitev izdelkov. Prikazala sem tudi sintezne poti za pripravo zdravilne učinkovine v Nalgesinu S in predstavila informacijske poti do njegovega e-oglaševanja.

From Preparing medicine Nalgesin S to its e-advertising in the Slovenian Sign Language

MAJA KUZMA, Krka d. d., Novo mesto, TIPK d. o. o.

Supervisor: Franc Požgan, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Bojan Mord, TIPK d. o. o.

Co-supervisor: Tina Ekar Likar, Krka d. d., Novo mesto

Co-supervisor: Melita Jakopič, Krka d. d., Novo mesto

In my diploma work I deal with effects of a new feature which translates and modifies the instructions for the use of the medicine Nalgesin S produced by the Slovenian pharmaceutical company Krka d. d., Novo mesto into the Slovenian sign language. A short video presenting this feature is meant to be published on the website of www.krka.si and would be available to the deaf and hard of hearing. In a sample survey I have found that this feature could be a useful approach to inform the deaf and hard of hearing about the product in detail. Furthermore, I believe that this innovative approach of advertising Nalgesin S could be a great opportunity for the pharmaceutical company Krka d. d., Novo mesto, to inform its consumers about side effects. This feature could also be used by other companies in the pharmaceutical and medical industry. In addition, the synthetic scheme for the preparation of medicament Nalgesin S is shown, and new and useful information about its e-advertising are presented.

Uporaba encimov v proizvodnji zdravilnih učinkovin

MATIJA ČARMAN, BARBARA VREČER, Gimnazija Novo mesto

Mentorka: Tatjana Durmič, Gimnazija Novo mesto

V raziskovalni nalogi smo preizkušali učinkovitost imobiliziranega in neimobiliziranega encima CALB pri esterifikaciji modelne spojine v organskem topilu, v ionski tekočini in pri katalizi hidrolize rastlinskega olja. CALB je lipaza, ki je eden od najuporabnejših biokatalizatorjev v industrijski proizvodnji, tudi farmacevtski, saj je zelo stabilna, stereoselektivna in aktivna tudi pri povišanih temperaturah. V eksperimentalnem delu smo ugotovili, da je imobilizirani CALB bistveno bolj učinkovit od neimobiliziranega in da je esterifikacija bolj učinkovita pri višji temperaturi (50°C) kot pri sobni. Imobilizirani encimi imajo pred neimobiliziranimi tudi številne druge prednosti, kot so večja obstojnost, enostavna ločitev od reakcijske mešanice, večkratna uporaba, manjši stroški procesa, večja stabilnost in hitrost reakcije. Ugotovili smo, da ionske tekočine v primerjavi z uporabljenim organskim topilom (heksanom) še povečajo encimsko aktivnost in stabilnost reakcije, vendar se je tudi pri ionski tekočini reakcija sčasoma upočasnila. S CALB smo izvedli tudi poskus hidrolize na izbranem triglyceridu. Proces hidrolize olja smo spremljali z merjenjem količine nehidroliziranega olja in z meritvami pH-vrednosti, ki so se zaradi nastanka maščobnih kislin zmanjševale.

The Use of Enzymes in Active Drug Substances' Manufacturing

MATIJA ČARMAN, BARBARA VREČER, Novo mesto Grammar School

Supervisor: Tatjana Durmič, Novo mesto Grammar School

In our research work, we have tested the efficiency of immobilized and non-immobilised CALB enzymes in the esterification of a model substance in an organic solvent, ionic liquid and at catalysis of the vegetable oil hydrolysis. CALB is a lipase being one of the most useful biocatalysts in industrial production, including pharmaceutical, because it has great stability, stereoselectivity and activity – even at raised temperatures. In the experimental part, we have found that immobilized CALB is much more efficient than the non-immobilised one while the esterification is more effective at a higher temperature (50°C) than at room temperature. Immobilized enzymes also have many advantages over non-immobilised ones i.e. better stability, simple separation from reaction mixture, reusability, lower process costs, higher stability and a shorter reaction time. We have found that ionic liquids furthermore improve enzyme activity and reaction stability, compared with the used organic solvent (hexane), but even in ionic liquids, the reaction with time slowed down. With CALB, we have also performed a hydrolysis experiment on a selected liquid triglyceride. The hydrolysis of oil was monitored by measuring the amount of non-hydrolysed oil and by measuring the pH value, which decreased due to the formation of free fatty acids.

Dokazovanje ostankov antibiotika Synulox LC (kombinacija amoksicilina in klavulanske kisline s prednizolonom – AKP) za zdravljenje mastitisa pri izredni uporabi zdravila

TJAŠA ČEH, JAN MEHAK, VERONIKA NOVAK, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Mentorica: **Jana Goršin Fabjan**, *Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Somentor: **Anton Mehak**, *Nacionalni veterinarski inštitut*

Somentorica: **Martina Žagar**, *Nacionalni veterinarski inštitut*

V raziskovalni nalogi smo se odločili preveriti izločanje amoksicilina pri izredni uporabi zdravila pri zdravljenju mastitisa. Amoksicilin je aktivna snov v zdravilu Synulox LC (kombinacija amoksicilina in klavulanske kisline s prednizolonom). Analizirali smo vzorce mleka, ki smo jih vzeli osmim zdravljenim kravam po zadnjem vnosu zdravila. Krave so imele blag mastitis. Vzorce smo jemali vsakih 12 ur (zjutraj in zvečer) do negativnega rezultata hitrega testa. Z Delvotesti SP smo preverjali prisotnost antibiotika v mleku. Teste smo opravljali v laboratoriju Nacionalnega veterinarskega inštituta, v enoti Novo mesto. Karenčna doba antibiotika Synulox LC je 84 ur, vendar je zaradi izredne uporabe zdravila karenčna doba za mleko najmanj 7 dni. Rezultati, dobljeni z Delvotestom SP, so bili pri nekaterih vzorcih pozitivni tudi še 120 ur, zato smo se odločili izmeriti koncentracijo antibiotika v mleku dveh krav. Uredba Sveta (EGS) št. 2377/90 določa, da je največja dovoljena koncentracija amoksicilina v mleku 4 µg/ml. Meritve smo opravljali na Nacionalnem veterinarskem inštitutu Veterinarske fakultete v Ljubljani, na Oddelku za higieno živil in bromatologijo. Točno koncentracijo antibiotika smo ugotovljali s tekočinsko kromatografijo ultraločljivosti (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) z masno detekcijo (MS/MS).

Proving Residues of Antibiotic Synulox LC (a Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid with Prednisolone – ACP) for the Treatment of Mastitis at Extraordinary Use of the Medicine

TJAŠA ČEH, JAN MEHAK, VERONIKA NOVAK, *Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Grammar School*

Supervisor: **Jana Goršin Fabjan**, *Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Grammar School*

Co-supervisor: **Anton Mehak**, *National Veterinary Institute*

Co-supervisor: **Martina Žagar**, *National Veterinary Institute*

The aim of our research was to detect the presence of amoxicillin in the treatment of mastitis at extraordinary use of the medicine. Amoxicillin is an active substance in the antibiotic Synulox LC (a combination of amoxicillin and clavulanic acid with prednisolone). The samples were taken from eight cows with mild mastitis, at 12-hour intervals (in the morning and in the evening) after the last dose of the medicine. Milk was tested for the presence of the antibacterial substance with Delvotest SP at the National Veterinary Institute at the regional unit in Novo mesto. The withdrawal period of the antibiotic Synulox LC amounts to 84 hours. Because of extraordinary use of the medicine, the withdrawal period is at least 7 days. As the results of some samples were positive even after 120 hours after the last dose of antibiotic, we decided to measure antibiotic concentration in the samples of two cows. The Council Regulation (EEC) No. 2377/90 defines that the highest allowed amoxicillin concentration is 4 µg/ml. The measurements were made at the Department of Food Hygiene and Bromatology of the Veterinary Faculty in Ljubljana. The exact concentration of antibiotics was measured with Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC with mass spectrometry (MS/MS).

Lahko na osnovi skupnih fenolov napovemo vpliv ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) na tvorbo TNF- α ?

URŠKA FURAR, TINA GRUBAR, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija
Mentorka: Irena Kurajić, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija
Somentor: Alojz Ihan, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

V raziskovalni nalogi smo želeli preveriti, kako skupni fenoli iz ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) vplivajo na tvorbo citokina TNF- α ob uporabi mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC) v razmerah *in vitro*. Koncentracija skupnih fenolov je bila največja v ekstraktih iz svežih korenin, požetih jeseni, če smo za ekstrakcijo uporabili 70-odstotni etanol. Vsi ekstrakti škrlatnega ameriškega slamnika so PBMC spodbudili k tvorbi TNF- α . Pri najmanjši koncentraciji skupnih fenolov v ekstraktu (0,1106 mg galne kisline/ml) smo izmerili najmanj TNF- α (6,50 pg/ml), pri največji koncentraciji skupnih fenolov (0,2584 mg galne kisline/ml) pa največ TNF- α v kulturi (14,37 pg/ml). Pri vmesnih koncentracijah skupnih fenolov v ekstraktih smiselne povezave med skupnimi fenoli in TNF- α nismo potrdili. Na osnovi skupnih fenolov torej ne moremo napovedati vpliva ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika na tvorbo TNF- α .

Can the Impact of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) Extracts on the Formation of TNF- α be Predicted on the Basis of Total Phenols?

URŠKA FURAR, TINA GRUBAR, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Grammar School

Supervisor: Irena Kurajić, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnology and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Grammar School

Co-supervisor: Alojz Ihan, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

In the research project we wanted to explore how total phenols from differently prepared extracts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench affect the formation of the cytokine TNF- α by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in *in vitro* conditions. If 70% ethanol was used for the extraction, the concentration of total phenols was the highest in extracts from fresh roots harvested in the autumn. All extracts of purple coneflower encouraged PBMC to form a cytokine TNF- α . In the lowest concentration of total phenols in the extract (0.1106 mg gallic acid/mL), we have measured the lowest content of cytokines in the culture (6.50 pg/mL), and in the highest concentration of total phenols in the extract (0.2584 mg of gallic acid/mL) we have measured the highest concentration of TNF- α in the culture (14.37 pg/ml). In intermediate concentrations of total phenols in the extracts, we could not confirm relevant connections between the total phenols and the formation of TNF- α . Therefore, the impact of purple coneflower extracts on the formation of TNF- α cannot be predicted on the basis of total phenols.

Primerjava izražanja MyD88 z mutanto MyD88 L265P v celicah HEK293T

LUKA GOLOB, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorica: Monika Avbelj, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: Nada Udovč Knežević, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Adapterski protein prijene veje imunskega sistema MyD88 sodeluje pri imunskem odzivu na patogene mikroorganizme, pomembno vlogo pa ima tudi pri razvoju avtoimunskih bolezni in pri raku. Pri limfomu ABC DLBCL so ugotovili, da mutacije v domeni TIR MyD88 vodijo v njegovo povečano aktivnost in tako sodelujejo pri razvoju limfoma. Cilj naše naloge je bil ugotoviti, zakaj je rakasta mutanta MyD88 L265P bolj aktivna kot divja oblika MyD88. Ugotovili smo, da prihaja do razlike v intenzivnosti izražanja proteinov MyD88 in MyD88 L265P le pri procesu translacije. Mutanta L265P se na proteinskem nivoju izraža slabše od divje oblike MyD88. Na nivoju transkripcije gena pa se gen za MyD88 izraža enako kot za mutanto MyD88 L265P. Proučevali smo tudi vpliv zaviralca proteasoma laktacistina na količino nastalega proteina. Proteasom je zadolžen za zunajlisosomsko razgradnjo proteinov. Ugotovili smo, da laktacistin ne vpliva na količino MyD88 ali MyD88 L265P. Sestavili smo tudi anketo, s katero smo želeli ugotoviti, kakšno je javno mnenje glede uporabe genskih testov za odkrivanje in preprečevanje razvoja rakavih obolenj. Rezultati so pokazali, da so ljudje večinoma odprtii za genska testiranja, dokler ostanejo pridobljeni podatki zaupni, in da so o genetiki precej dobro poučeni.

Comparison of Expressions MyD88 with Mutant MyD88 L265P in HEK293T Cells

LUKA GOLOB, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

Supervisor: Monika Avbelj, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Nada Udovč Knežević, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

The adapter protein of the innate branch of the immune system MyD88 is involved in immune response to pathogens and also plays an important role in the development of autoimmune diseases and cancer. In ABC DLBCL lymphoma, researchers have found that mutations in the TIR domain of MyD88 lead to its increased activity and thus participate in the development of lymphoma. The aim of our study was to determine why the cancerous mutant MyD88 L265P has greater activity than the wild type MyD88. We came to the conclusion that there are differences in the intensity of expression of proteins MyD88 and MyD88 L265P only in the process of translation. L265P mutant is expressed less on the protein level than the wild form of MyD88 even though its gene is expressed equally at the level of gene transcription as MyD88. We also studied the influence of proteasome inhibitor lactacystin on the amount of the formed protein. Proteasome is responsible for the most non-lysosomal degradation of proteins. We have found that the presence of lactacystin does not affect the amount of formed MyD88 or MyD88 L265P. We conducted a survey the purpose of which was to find out about the public opinion on the use of genetic tests for the detection and prevention of cancer development. The results have shown that people are mostly open to genetic testing as long as the data obtained are kept confidential. We have also found that they are relatively well informed about genetics.

Primerjava vsebnosti laktata v mišičnih vlaknih in v krvi pri športni aktivnosti

DOMEN JAN, GAL ŽVEGELJ, Gimnazija Jesenice

Mentorica: Katarina Trontelj, Gimnazija Jesenice

Somentor: Miha Pirih, Gimnazija Jesenice

Raziskovali smo energijske presnovne procese v mišicah med stopnjujočo se telesno aktivnostjo. Med najpomembnejšimi fiziološkimi kazalci mišične presnove je dinamika naraščanja in upadanja koncentracije laktata. Laktat nastaja v mišicah in se prenaša v krvni obtok, kjer njegova koncentracija izrazito naraste, ko intenzivnost mišičnega dela privede do presežene kapacitete oksidativnega metabolizma (laktatni prag). V raziskovalni nalogi sva naredila še korak dlje in z neinvazivno spektroskopsko metodo nuklearne magnetne resonance izmerila relativne koncentracije laktata neposredno v mišici v mirovanju, takoj po aktivnosti in po počitku. Primerjala sva rezultate meritev laktata v mišicah in krvi. Predpostavila sva, da bo spremenjanje koncentracije laktata v krvi z določenim zamikom sledilo koncentraciji laktata v mišici. Rezultati so najino predpostavko deloma potrdili, pokazala pa se je še drugačna dinamika, ki odpira vpogled v dogajanje v mišicah med aktivnostjo. Z nuklearno magnetno resonanco smo opazovali tudi relativno vsebnost skupnega kreatina v mišicah.

The Comparison of Lactate Content in Muscles and in Blood during Physical Activity

DOMEN JAN, GAL ŽVEGELJ, Jesenice Grammar School

Supervisor: Katarina Trontelj, Jesenice Grammar School

Co-supervisor: Miha Pirih, Jesenice Grammar School

We researched the muscle metabolism during the increasing physical activity. The most important physiological indicator of muscle metabolism is the dynamic of rising and falling of the lactate concentration. Lactate is produced in the muscles and transported to blood circulation, where its concentration significantly rises when the intensity of muscle work leads to an exceeded capacity of oxidative metabolism (lactate threshold). We moved one step forward in the research by using the non-invasive method of NMR spectroscopy and measured the relative lactate concentrations in the muscle *in vivo*. Lactate concentrations were measured before the activity, immediately after it and after a 20 minute rest break. The results of lactate measurements in the blood and muscles were compared. We assumed the lactate change in the blood will follow lactate changes in the muscle with a certain delay. The results have partially confirmed our hypothesis, but we have also noticed different dynamics, which gives an insight into metabolic processes in the muscles during the activity. With the NMR method, we also observed the changes of creatine in the muscles.

Poskus izolacije rekombinantnega proteina iz inkluzijskih telesc s kombinacijo površinsko aktivnih snovi sarkozila, Tritona X-100 in CHAPS

NEŽA LEVIČNIK, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: Tomaž Bratkovič, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Somentorica: Nada Udovč Knežević, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Pri poskusu izražanja evkarionskih rekombinantnih proteinov v prokarionskem ekspresijskem sistemu (bakteriji *E. coli*) se proteini pogosto odlagajo v t. i. inkluzijska telesa. Če želimo protein izolirati, moramo inkluzijska telesca raztopiti z denaturanti in nato vzpostaviti pogoje, v katerih se polipeptidna veriga zvije v nativno konformacijo. Uspešnost takega procesa je praviloma majhna. Pred kratkim so poročali o izredno učinkoviti univerzalni metodi čiščenja netopnih rekombinantnih proteinov s kombinacijo treh detergentov. Inkluzijska telesca so najprej raztopili v 10-odstotnem sarkozilu, redčili in nato dosegli ustrezno zvitje polipeptidne verige z dodatkom Tritona X-100 in CHAPS. S to metodo smo žeeli izolirati in očistiti protein leptin vezavno domeno (LBD), za katero je znano, da se odlaga v inkluzijskih telescih. LBD je pri poskusu izražanja v *E. coli* netopna in se raztopi šele pri pH > 11. Inkluzijskim telescem smo morali kljub raztopljanju v detergentih zvišati pH, da smo sploh dosegli popolno solubilizacijo proteina. Poskusili smo ga izolirati s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (IMAC), vendar smo bili pri tem neuspešni. Verjetno se je že prej narobe zvil in se ni mogel vezati na stacionarno fazo. Potem smo ga poskusili izolirati še z gelsko filtracijo. Pri vzorcu, ki smo mu predhodno nekoliko znižali vrednost pH (na pribl. 8,5), nismo bili uspešni, nam ga je pa vsaj delno uspelo izolirati iz vzorca z višjo vrednostjo pH (pribl. 11,0). Metoda, ki so jo opisali v reviji Biotechniques, se pri izolaciji LBD pokazala za učinkovito.

Experiment on Isolation of Recombinant Protein from Inclusion Bodies with Combination of Three Detergents: Sarkosyl, Triton x-100 and CHAPS

NEŽA LEVIČNIK, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

Supervisor: Tomaž Bratkovič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Nada Udovč Knežević, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

Eukaryotic recombinant proteins commonly form inclusion bodies when expressed in a prokaryotic expression system, such as bacteria *E. coli*. If one wants to isolate the protein, one needs to solubilise inclusion bodies with denaturants and then re-establish proper conditions, at which the polypeptide chain can refold in its native conformation. However, this approach usually yields low amount of a recombinant product. A recently published article describes a universal isolation method of properly folded recombinant proteins from inclusion bodies with the combination of three detergents: the recombinant protein is first solubilised with 10% sarkosyl solution, diluted, and then refolded with addition of Triton X-100 and CHAPS. We applied the method to isolation of the protein leptin-binding domain (LBD). This protein is known to form inclusion bodies in *E. coli*. LBD was solubilized from inclusion bodies only when pH was raised above 11, regardless of addition of detergent sarkosyl, which further complicated chromatographic steps. Initially, we tried to use immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) to recover natively folded protein from detergent-containing high pH solution, but were unsuccessful. We also tried to use gel filtration. We were able to partially isolate the protein from a sample with high pH value. In summary, we could only isolate the protein with a modified method, as the inclusion body solubilisation required extreme pH conditions.

Pasivno kajenje

ANJA LOBNIK, EVA LOBNIK, *II. gimnazija Maribor*

Mentorica: Katja Holnhaner Zorec, *II. gimnazija Maribor*

Somentorica: Vesna Masten Gubeljak, *Osnovna šola Bojana Ilich Maribor*

Tobak je najpomembnejši preprečljivi vzrok obolevanja in prezgodnje smrti v razvitem svetu. Pri pasivnih kadilcih je več pljučnega raka in koronarnih bolezni, otroci kadilcev imajo pogosteje okužbe in kronične bolezni dihal. Namen raziskave je ugotoviti zgodnje znake kronične pljučne bolezni in koronarne ogroženosti pri otrocih kadilcev in vpliv socialnega okolja na kadilski status ter povečati ozaveščenost družbe o škodljivosti aktivnega in pasivnega kajenja. Vključili sva 202 preiskovanca. Uporabili sva več metod dela: anketo, spirometrijo, ultrazvočno meritev debeline karotidne intime-medije, meritev krvnega tlaka, pulza, telesne teže, višine, obsega pasu. Podatke sva statistično obdelali in ugotovili, da so pri otrocih – pasivnih kadilcih – vrednosti pljučnih funkcijskih testov manjše, da je nakazan trend večje debeline karotidne intime-medije kot zgodnjega napovedovalca ateroskleroze, da je izobrazbena struktura kadilskih družin nižja in da je redno ukvarjanje s športom povezano z boljšo pljučno funkcijo.

Second-Hand Smoking

ANJA LOBNIK, EVA LOBNIK, *Maribor Second Grammar School*

Supervisor: Katja Holnhaner Zorec, *Maribor Second Grammar School*

Co-supervisor: Vesna Masten Gubeljak, *Maribor Bojan Ilich Primary School*

The consumption of tobacco is one of the most important preventable causes of morbidity and mortality in developed countries. Second-hand smoke exposure results in lung cancer, coronary artery disease, children of smokers more often suffer from respiratory infections and chronic lung diseases. The aim of our research was to identify the early signs of chronic lung disease and risk factors for cardiovascular disease in children exposed to second-hand smoke, and also to determine the impact of the social environment on the smoking status of parents. Also, the aim was to make the society more aware of the harms that active and passive smoking bring. Our research included 202 children. Our research methods included conducting an interview, spirometry, carotid intima-media thickness ultrasound measurement, blood pressure measurements, pulse, body height, weight and waist circumference. Then we used statistical analysis. We have established that children – passive smokers – achieved lower values in functional lung tests; they showed a trend in thicker carotid intima-media layer as an early marker of atherosclerosis; also, their parents' level of education was lower. Finally, in sportsmen/sportswomen we observed a trend of better lung function.

Razvoj in optimizacija postopka redukcije aromatske nitrospobine z uporabo katalitskega hidrogeniranja

MAJA MIKEC, DAVID SIMONIČ, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

Somentor: David Kralj, Krka, d. d., Novo mesto

Priprava farmacevtskih učinkovin je zelo pomembna veja organske kemije, ki se hitro razvija in sloni na novih doganjih v znanosti. Potrebe po novih, še učinkovitejših zdravilih so vedno večje, kar proizvajalce oziroma farmacevtska podjetja sili v obširne raziskave, katerih namen je iznajti nove, boljše učinkovine za zdravljenje bolezenskih stanj.

Razvoj novih sinteznih pristopov je pomembna dejavnost farmacevtske družbe Krka, d. d., Novo mesto, saj ji omogoča neodvisen in konkurenčen dostop do farmacevtskih učinkovin. V sklopu raziskovalne naloge sva želeta pomagati pri razvoju nove, učinkovite sinteze ključnega intermediata za pripravo učinkovine iz skupine antikoagulantov. S tem namenom sva proučevala in študirala pogoje katalitskega hidrogeniranja nitroskupine. Natin študij je obsegal izbiro primernega topila, ustreznega katalizatorja, določitev optimalnega temperaturnega območja in tlaka vodika, koncentracije reaktanta v reakcijski zmesi in seveda časa, potrebnega za izvedbo kemijske reakcije. Po končanem razvoju optimalnih reakcijskih pogojev sva želeta razviti ustrezni postopek izolacije dobljenega produkta, da bi zagotovila kakovost produkta po zahtevanih analitskih parametrih.

Development and Optimization of the Reduction of Aromatic Nitro Compounds by Means of Catalytic Hydrogenation

MAJA MIKEC, DAVID SIMONIČ, Novo mesto Grammar School

Supervisor: Branka Klemenčič, Novo mesto Grammar School

Co-supervisor: David Kralj, Krka, d. d., Novo mesto

The synthesis of active pharmaceutical ingredients is an important branch of organic chemistry which is evolving rapidly and is based on new scientific findings. There is an ever growing need for more effective medicines, forcing manufacturers and pharmaceutical companies into extensive research and inventions of new agents and substances to cure various diseases and illnesses. The development of new approaches to chemical synthesis is an important activity of the Novo mesto based pharmaceutical company Krka, d. d., which allows independent and competitive access to active pharmaceutical ingredients. In our study we attempted to develop an effective synthesis of the key intermediate of an active pharmaceutical ingredient which belongs to a group of pharmaceuticals called anticoagulants. Initially, we wanted to examine the conditions of catalytic hydrogenation of the nitro group under the conditions which require the right choice of a suitable solvent, catalyst, temperature range, applied pressure of the hydrogen, concentration of the reactant in the reaction mixture and last but not least the time needed for the chemical conversion to take place. After the development of optimal reaction conditions our goal was to develop a process of isolating the end product to assure that the product quality meets required analytical parameters.

Samozdravljenje bolečine z zdravili brez recepta v osrednji in jugovzhodni Sloveniji

ALEN PAVLIČ, Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

Mentorica: **Dragica Budić Banović**, Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

Podatki o prodaji zdravil brez recepta v zadnjih letih (IMS market viewer, 2013) uvrščajo analgetike med najbolje prodajana zdravila brez recepta v Sloveniji. Naša raziskava je pokazala, kako pogosto prebivalci osrednje in jugovzhodne Slovenije uporabljajo zdravila brez recepta za samozdravljenje bolečine, katera zdravila se najpogosteje uporabljajo v ta namen, za odpravo katerih bolečin največkrat posegamo po tovrstnih zdravilih ter kateri dejavniki vplivajo na posameznikovo izbiro zdravila. Anketa, podprtta s statistično verodostojnimi podatki, je pokazala, da je glavobol najpogostejša oblika bolečine, ki se pojavlja pri prebivalcih osrednje in jugovzhodne Slovenije. Podatki opravljenih raziskav (FarmAsist, d. o. o.) so pokazali, da farmacevti v lekarnah, kjer največkrat kupujemo analgetike brez recepta, za zdravljenje glavobola najpogosteje svetujejo zdravilo Nalgesin S, ki ga proizvaja Krka, tovarna zdravil, d. d., Novo mesto. Anketa je pokazala tudi visoko stopnjo prepoznavnosti omenjenega zdravila, kar lahko povezujemo s tem, da je bil večji del anketiranja izveden predvsem na območju Dolenjske, kjer je sedež podjetja.

Self-Treatment of Pain with Over-the-Counter Medication in Central and South-Eastern Slovenia

ALEN PAVLIČ, School Centre Novo mesto, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Grammar School

Supervisor: **Dragica Budić Banović**, School Centre Novo mesto, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Grammar School

The records of recent years concerning the sales of over-the-counter (OTC) medication (IMS market viewer, may 2013) reveal the analgetic (painkiller) drugs to be the most sold item in the category of OTC medication in Slovenia. The survey has shown how often the inhabitants of central and south-eastern Slovenia use the OTC medication for self-care treatment of pain, which type of medication is most commonly used in Slovenia for this purpose, which ailments the Slovenians are most likely to self-treat with the help of these drugs and finally, which factors influence the individual's decision on the label of medication. The survey supported by statistically valid data has revealed that the most common type of pain among the inhabitants of central and south-eastern Slovenia is a headache. The collected data from previous research (FarmAsist Ltd.) have shown that the pharmacists in various pharmacies, where the painkillers without prescription are most commonly bought, usually recommend the drug Nalgesin S, the product of the pharmaceutical company Krka, d. d., Novo mesto. In addition, the survey has proved a high degree of recognition of the above mentioned drug, most likely due to the fact that the major part of the survey has been conducted in the region of Dolenjska, where the headquarters of the company is also located (Novo mesto).

Uporaba in učinkovitost antiparazitikov pri psih

LUKA POZNE, MATIC RAMŠAK, DIANA SLAČEK, Biotehniška šola Maribor

Mentorka: Kristina Dolinar Paulič, Biotehniška šola Maribor

V raziskovalni nalogi smo proučevali pomen, uporabo in učinkovitost antiparazitikov pri psih. Zanimala sta nas predvsem Dehinel in Fypryst. V raziskavo smo vključili pse iz mariborskega azila in nekaj lastniških psov. Anketo o pomenu in uporabi antiparazitikov smo izvedli na veterinarskih klinikah v Mariboru in okolici. Učinkovitost antiparazitikov smo preverjali s koprološkimi preiskavami in kliničnim pregledom psov. Ugotovili smo, da večina lastnikov psov, ki obiskujejo veterinarske klinike, uporablja ektoparazitike. Pri izbiri zaupajo veterinarju. Večinoma uporabljajo kožne kapljice, najbolj prodajano sredstvo pa je Frontline. Uporabljajo tudi endoparazitike, in sicer v obliki tablet, najpogosteje Dehinel in Pratel. 43 % lastnikov psov te preparate uporablja 1-krat na leto, kar 46 % pa 3-krat na mesec, kar je razveseljivo. Večina jih uporablja preventivno. Kljub informiranosti in vestnosti lastnikov smo ugotovili, da je večina psov kljub dehelminzaciji še invadirana s paraziti. Največjo težavo predstavljajo nematodi iz rodu *Strongyloides*. Okužba z njimi je po navadi asimptomatska. Ti paraziti so zelo majhni, zato jih v blatu ne opazimo. Dokažemo jih lahko le s koprološkimi preiskavami. Težavo predstavlja tudi dejstvo, da se z njimi lahko okuži tudi lastnik živali. Najbolj učinkovit za zdravljenje strongiloidoze pri psih je ivermektin, vendar se v praksi zelo redko uporablja za zatiranje endoparazitov. Po našem mnenju pogosta uporaba antiparazitikov povzroča odpornost določenih parazitov, zato živali ostajajo subklinično invadirane. Priporočili bi tudi uporabo ivermektinskih preparatov vsaj enkrat na leto. Pazljivi pa moramo biti pri določenih pasmah psov, pri katerih je bolje uporabiti febendazol.

Use and Efficacy of Antiparasitic Medicines in Dogs

LUKA POZNE, MATIC RAMŠAK, DIANA SLAČEK, Biotechnical School Maribor

Supervisor: Kristina Dolinar Paulič, Biotechnical School Maribor

In our report we studied the meaning, use and efficacy of antiparasitic medicines. We were most interested in Dehinel and Fypryst. The research includes dogs from the local shelter and some dogs that have owners. The survey about the use and meaning was conducted on some veterinary clinics in Maribor. We tested the efficacy of these antiparasitic medicines by investigating the feces and by the clinical examination of the test subjects. We have found that most owners who come to these veterinary clinics use ectoparasitic medicines on their pet dogs and that they let the veterinarian to decide on the brand of the product. Mostly they use spot-on preparations, the most popular being Frontline. Endoparasitic medicines are also used by most dog owners, they usually use this medicine in pill form and the most popular ones are Dehinel and Pratel. 43% of owners use endoparasitic medicines once a year. We were surprised that 46% of owners use the medicine three times a month. Most owners use these preparations as preventative care for their pets. We have found that most dogs still had parasites after the use of Dehinel. Nematodes from the genus *Strongyloides* are a major issue (the infection with *strongyloides* is asymptomatic). These parasites are very small and cannot be detected easily, they are only visible under a microscope. The problem with strongyloidosis is that the owners can get infected as well. Ivermectin is the most effective against strongyloidosis in dogs but it is rarely used. In our opinion, frequent use of antiparasitic medicines can cause some parasites to adapt to it and live on, which is why some animals stay subclinically infected. The use of ivermectin is recommended at least once a year, but we have to be cautious because it cannot be used on every breed of dogs. On those breeds it is better to use febendazol.

Določanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti izbranih hrani s pomočjo Briggs-Rauscherjeve reakcije in CAA analize

JERNEJ ZORMAN, II. gimnazija Maribor

Mentor: Lovro Žiberna, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Sanja Cvar, II. gimnazija Maribor

V raziskovalni nalogi smo z Briggs-Rauscherjevo reakcijo proučili antioksidativno delovanje 20 vzorcev hrani. Z največjo kapaciteto sta izstopala vzorca kave in zelenega čaja. Za iste vzorce smo nato s Folin-Ciocalteaujevim reagentom določili skupno vsebnost fenolov. Z 91-odstotno korelacijo med metodama smo potrdili, da je večina antioksidantov v hrani polifenolov. V tretjem delu smo s CAA-analizo proučili znotrajcelično antioksidativno delovanje polifenola EGCG na celičnih kulturah žilnega endotelija, nevroblastoma in jetrnega karcinoma. S poskusi na modelih normalne celične fiziologije in ishemično-reperfuzijske poškodbe smo potrdili znotrajcelično antioksidativno aktivnost polifenola EGCG.

Determination of *In Vitro* Antioxidant Activity of Selected Nutraceuticals by Briggs-Rauscher Reaction and CAA Analysis

JERNEJ ZORMAN, Maribor Second Grammar School

Supervisor: Lovro Žiberna, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Sanja Cvar, Maribor Second Grammar School

The research examined the antioxidant activity of 20 nutraceuticals analysed with the Briggs-Rauscher reaction. The samples of coffee and green tea differed markedly in their antioxidant capacity from other samples. The total content of phenols was determined for the same samples with the Folin-Ciocalteu reagent. We confirmed with a 91% correlation between both methods that the majority of antioxidants in food are polyphenols. In the third part, we researched, with the CAA analysis, the intracellular antioxidant activity of EGCG on cell cultures of vascular endothelial, neuroblastoma and hepatic carcinoma. The intracellular antioxidant activity of EGCG was confirmed on models of the normal cell physiology as well as of ischaemia-reperfusion injury.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

51	Leon Bedrač	37	Mojca Lunder
19	Jure Bezenšek	55	Boštjan Markelc
64	Katarina Brulc	77	Jan Mehak
76	Matija Čarman	83	Maja Mikec
77	Tjaša Čeh	56	Ana Novak
78	Urška Furar	77	Veronika Novak
52	Martin Gazvoda	84	Alen Pavlič
65	Jaka Glavač	85	Luka Pozne
79	Luka Golob	85	Matic Ramšak
66	Tina Grohar	57	Romana Rošic
78	Tina Grubar	83	David Simonič
53	Mateja Hafner	85	Diana Slaček
67	Verica Herak	72	Tina Snoj
54	Martina Hrast	43	Ervin Šinkovec
80	Domen Jan	58	Marko Trajkovski
68	Saša Kajdič	63	Ana Trkovnik Klun
69	Klemen Korasa	59	Uroš Trstenjak
70	Simon Kovačič	60	Tanja Vehovec
25	Ana Kralj	61	Anja Veronovski
62	Maja Krejan	76	Barbara Vrečer
31	Simon Kukec	86	Jernej Zorman
75	Maja Kuzma	73	Ožbej Zupančič
71	Ana Lemovec	74	Nika Žerdoner
81	Neža Levičnik	80	Gal Žvegelj
82	Anja Lobnik		
82	Eva Lobnik		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

79	Monika Avbelj	83	Branka Klemenčič
57, 72, 74	Saša Baumgartner	61	Željko Knez
81	Tomaž Bratkovič	44	Matjaž Krajnc
84	Dragica Budić Banović	83	David Kralj
64	Jožko Cesar	66	Samo Kreft
86	Sanja Cvar	57	Julijana Kristl
55	Maja Čemažar	78	Irena Kurajić
85	Kristina Dolinar Paulič	70	Jurij Lah
32	Rok Dreu	82	Vesna Masten Gubeljak
38	Gorazd Drevenshek	77	Anton Mehak
76	Tatjana Durmič	75	Bojan Mord
75	Tina Ekar Likar	61	Zoran Novak
60, 63	Andrej Gartner	60	Aleš Obreza
68	Aleš Gasparič	64	Anica Pečavar
54	Stanislav Gobec	26	Otto Phanstiel
77	Jana Goršin Fabijan	80	Miha Pirih
26	Markus Heinrich	58	Janez Plavec
82	Katja Holnhaner Zorec	52	Slovenko Polanc
69	Grega Hudovornik	75	Franc Požgan
78	Alojz Ihan	63	Helena Prosen
59	Janez Ilaš	62	Vladislav Rajkovič
51	Jernej Iskra	53	Damjana Rozman
75	Melita Jakopič	20, 73	Branko Stanovnik
55	Tomaž Jarm	56, 65	Jurij Svetec
67	Davor Kiđemet	38	Mišo Šabovič
59	Danijel Kikelj	67	Bogdan Štefane

- 80| **Katarina Trontelj**
26| **Nuška Tschammer**
79, 81| **Nada Udovč Knežević**
32, 69, 74| **Franc Vrečer**
71| **Alenka Zvonar**
77| **Martina Žagar**
86| **Lovro Žiberna**
68| **Polona Žnidaršič Plazl**

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Služba za odnose z javnostmi

Lektoriranje Ksenija Kosem

Prevajanje Mojca Ceferin, Nina Bostič Bishop

Produkcija Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk Gorenjski tisk

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

www.krkinenagrade.si



www.krkinenagrade.si