

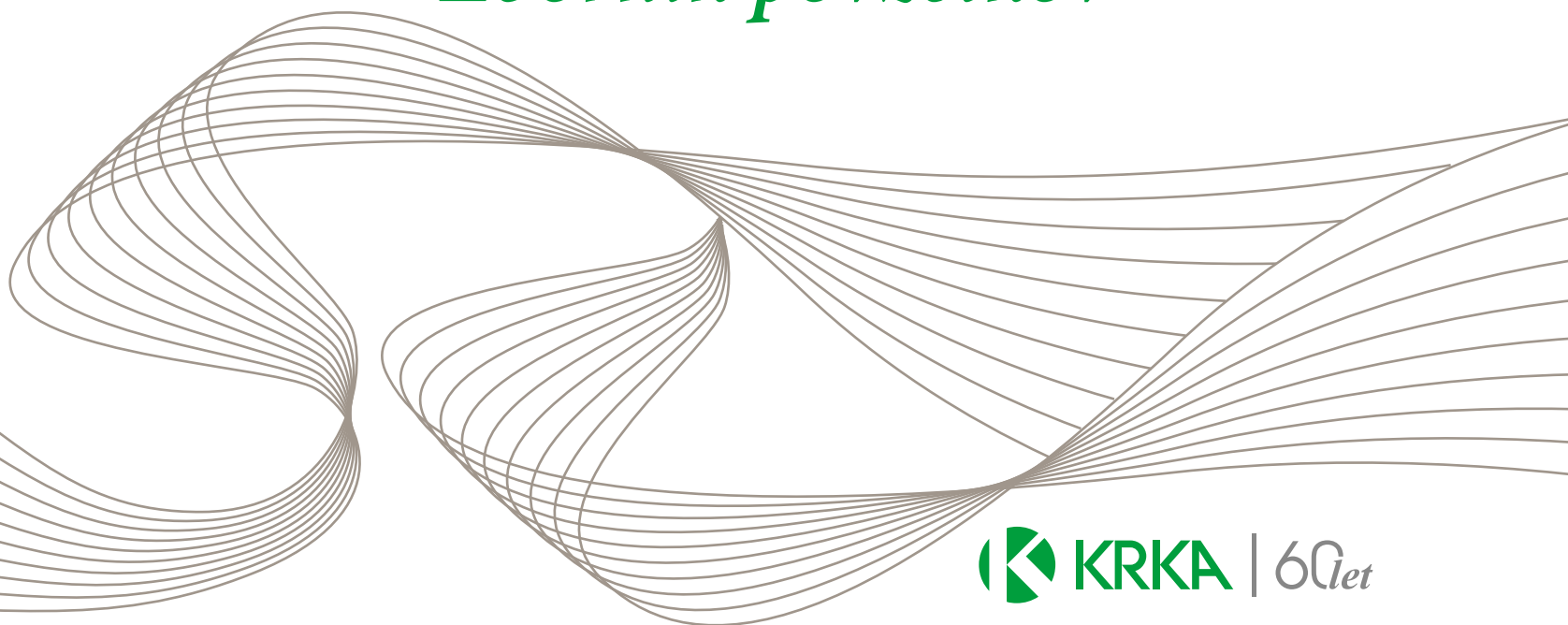
44. Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

44. Krkine nagrade | 44th Krka Prizes

24. simpozij

Zbornik povzetkov



Poslanstvo

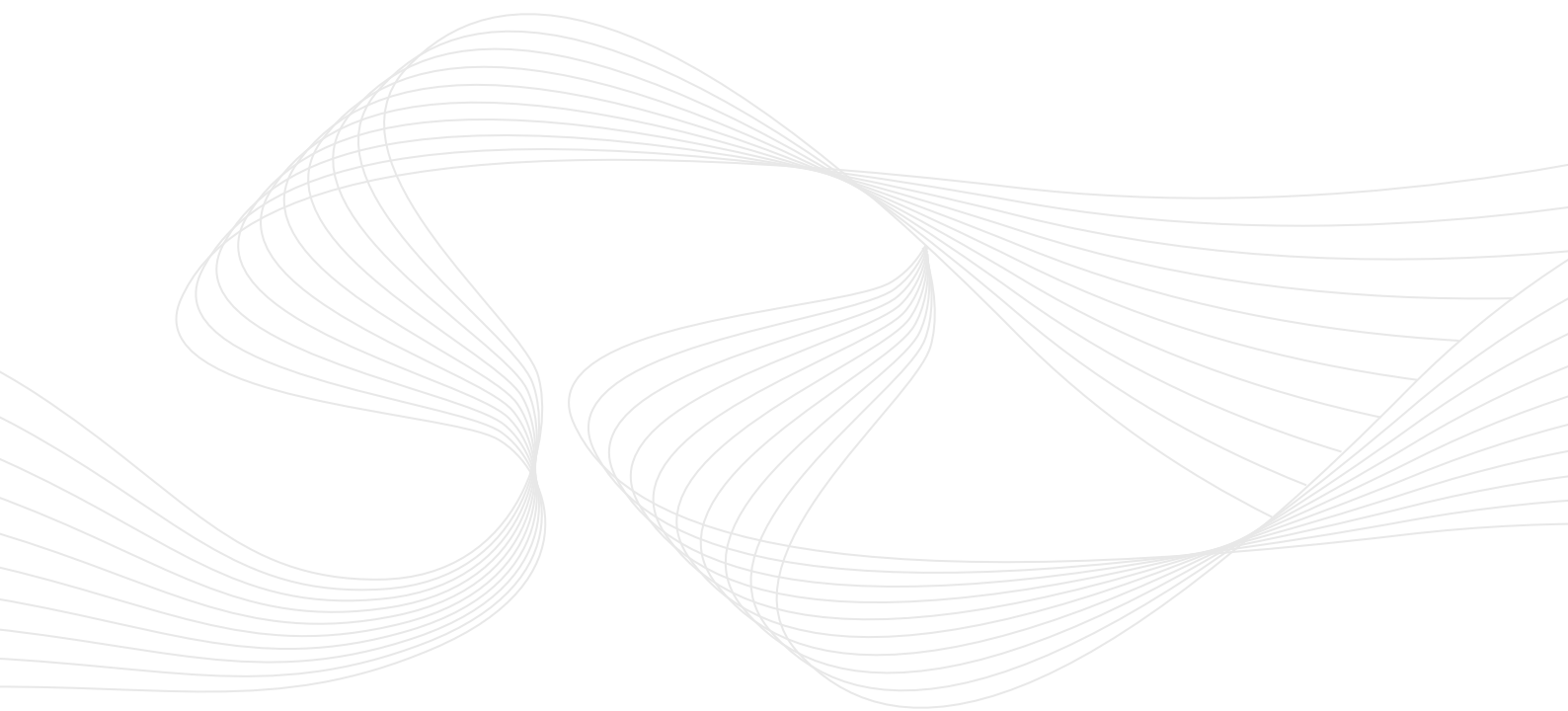
Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

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

24. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 17. oktober 2014

**Častni odbor
44. Krkinih nagrad**

Jože Colarič, *predsednik uprave in generalni direktor Krke*
akad. prof. dr. **Tadej Bajd**, *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

Jože Arh, **Breda Barbič Žagar**, mag. **Matej Bašelj**, dr. **Primož Benkič**,
dr. **Ana Bergant Simončič**, dr. **Jure Bezenšek**, mag. **Irena Bobnar**, mag. **Marko Boh**,
dr. **Žiga Bolta**, dr. **Sergeja Bombek**, dr. **Rok Borštnar**, **Polona Bukovec**, dr. **Bojan Burja**,
dr. **Aleš Curk**, mag. **Lea Cvitkovič Maričič**, dr. **Irena Čarman**, **Matej Černelč**,
Katja Čerpnjak, dr. **Katarina Dobrovoljc**, **Aleša Dular**, **Tina Ekar Likar**,
mag. **Mihael Florjanič**, doc. dr. **Aleš Gasparič**, dr. **Ivan Gobec**, mag. **Mojca Golob**,
mag. **Anica Grandovec**, **Grega Hudovornik**, **Jernej Hvala**, dr. **Špelca Jenko**,
dr. **Boštjan Jerman**, **Saša Kajdič**, mag. **Brane Kastelec**, **Milena Kastelic**,
dr. **Davor Kidemet**, **Ksenija Kikelj**, dr. **Maja Kincl Skube**, **Aleš Knoll**, dr. **Saša Kolarič**,
Jernej Kos, dr. **Borut Kovačič**, **Irena Krajačič**, dr. **David Kralj**, mag. **Andrejka Kramar**,
dr. **Vesna Krošelj**, mag. **Bojana Kržič**, **Andreja Kuhar**, dr. **Simon Kukec**,
dr. **Jernej Kužner**, dr. **Roman Lenaršič**, dr. **Alenka Leskovar**, mag. **Denise Leskovar**,
Irena Lindič, mag. **Bronja Manček**, dr. **Tatjana Mateović Rojnik**, dr. **Marija Meleh**,
mag. **Mateja Merslavič**, **Berta Mešnjak**, dr. **Špela Miklič**, **Mirjam Milharčič Simčič**,
dr. **Anita Mlakar**, **Dušanka Oblak Božič**, **Maja Oblak**, **Uroš Ocepek**, mag. **Irena Orel**,
dr. **Renata Osolnik**, **Špela Osterman**, mag. **Vesna Pahor**, mag. **Tatjana Pečnik**,
dr. **Lidija Pezdirc**, dr. **Andreja Plaper**, mag. **Igor Plaper**, dr. **Miha Plevnik**,
mag. **Marjeta Poznič Planinc**, **Mitja Prah**, **Maja Preskar**, mag. **Ivan Radež**,
Vojko Rebolj, mag. **Gregor Redek**, **Marjeta Redek**, **Danijel Rojc**, dr. **Aleš Rotar**,
Robert Sekereš, dr. **Igor Simonič**, **Gordan Sladič**, dr. **Elena Smirnova**,
dr. **Janez Smodiš**, dr. **Matej Smrkolj**, **Tadej Stropnik**, **Katarina Svetičič Gobec**,
dr. **Leon Ščuka**, doc. dr. **Vida Škrabanja**, dr. **Natalija Škrbina Zajc**, dr. **Anton Štimac**,
dr. **Jaroslav Tihj**, mag. **Simona Torkar Flajnik**, dr. **Katja Trontelj**, mag. **Katja Trop**,
Urška Turk, mag. **Robert Uzman**, mag. **Aleš Urbancič**, mag. **Sandra Urek Blatnik**,
dr. **Darko Uršič**, dr. **Ana Vidmar**, mag. **Petra Vitezič**, dr. **Miha Vrbinc**, **Tomaž Vrbinc**,
prof. dr. **Franc Vrečer**, mag. **Tatjana Vrščaj Žunič**, dr. **Jernej Zadnik**,
dr. **Damjana Zupančič Božič**, dr. **Silvo Zupančič**, dr. **Srečko Zupančič**,
Jana Zupančič Virc, **Nika Žerdoner**

VSEBINA | CONTENT

44. KRKINE NAGRADE

- 8 | **Aleš Rotar**, *predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad*
- 10 | **Krkini nagrajenci 2014**

24. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | **, *predsednik Znanstvenega odbora***

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

- 19 | **Katja Čvan Trobec**, *Univerzitetna klinika Golnik*
Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetiko bisoprolola in ramiprila in na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem
- 25 | **Žiga Hodnik**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje analogov bioaktivnih spojin iz morskih spužev rodov *Agelas* in *Theonella*
- 31 | **Miha Skvarč**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Vloga katepsina X pri patogenezi okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*
- 37 | **Marko Štefanič**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Pomen kinetike prehoda gastrorezistentnih pelet skozi želodec v stanju na tešče za vrednotenje *in vitro* sproščanja ter *in vitro/in vivo* korelacijo
- 43 | **Špela Zupančič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Izdelava in vrednotenje nanodostavnega sistema s kurkuminom za inhaliranje

44. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Andrej Artenjak**, *Univerzitetni klinični center Ljubljana*
Vplivi visoko avidnih protiteles proti β 2-glikoproteinu I in oksidativno spremenjenih naravnih protiteles na človeške endotelijske celice koronarne arterije, gojene *in vitro*
- 52 | **Jana Ferdin**, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Vpliv hipoksije na izražanje zelo ohranjenih regij genoma v tumorskem tkivu
- 53 | **Urška Jamnikar Ciglencečki**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Proučevanje virusnih okužb pri kranjski čebeli (*Apis mellifera carnica*)
- 54 | **Jože Kastelic**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Priprava, karakterizacija in določevanje fizikalno-kemijskih lastnosti kokristalov flukonazola s karboksilnimi kislinami
- 55 | **Eva Kralj**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vpliv aktivnega transporta imatiniba na uspešnost zdravljenja kronične mieloične levkemije
- 56 | **Tina Mesarič**, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Vpliv ogljikovih nanomaterialov na aktivnost acetilholinesteraze
- 57 | **Nejc Rojko**, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Mehanizem tvorbe pore ekvinatoksina II, citolitičnega proteina iz morske vetrnice
- 58 | **Matej Skočaj**, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Označevanje s holesterolom bogatih membranskih mikrodomen s ostreolizinom A
- 59 | **Tanja Vnučec Popov**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Razvoj in uporaba tehnike suhe lise plazme za kvantitativno določevanje topiramata v študijah farmakokinetike in bioekvivalence
- 60 | **Blaž Vidmar**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Stabilnost zmesi ibuprofena in natrijeve soli omeprazola v prisotnosti nekaterih farmacevtsko pomembnih pomožnih snovi
- 61 | **Helena Bogdan**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Vpliv pufrskih sistemov na *in vitro* sproščanje zdravilnih učinkovin iz trdnih farmacevtskih oblik
- 62 | **Irena Gorenc**, *Nacionalni inštitut za biologijo*
Citotoksični in genotoksični učinki UV-A aktiviranih anataznih delcev TiO₂ na celice HepG2
- 63 | **Kaja Gosak**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Elektrofilna uvedba trifluorometilolne skupine v fenole

- 64 | **Jožica Hočevar**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Postopki za določanje delovanja monooksigenaz in ketoreduktaz v procesih kemo-encimske sinteze
- 65 | **Ana Jerše**, *Institut Jožef Stefan*
Pasivno vzorčenje za določevanje ostankov zdravilnih učinkovin v vodnem okolju
- 66 | **Tina Kernulc**, *Pravna fakulteta, Univerza v Mariboru*
Patentno varstvo postopkov zdravljenja
- 67 | **Sabina Kregar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Helsinkih*
Izdelava nanokristalov glibenklamida z mokrim mletjem v krogličnem mlinu
- 68 | **Špela Medic**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Strukturna študija G-kvadrupleksa protiprionskega aptamera
- 69 | **Jože Mužerlin**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza in reaktivnost pirazolo[1,5-*a*]-, imidazo[1,2-*a*]- in triazolo [1,5-*a*] pirimidinov iz substituiranih 3-(dimetilamino)prop-2-en-1-onov
- 70 | **Matjaž Pajk**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Optimizacija študija pojavnih oblik zdravilnih učinkovin z visokozmogljivim rešetanjem
- 71 | **Eva Rožman**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Izdelava in vrednotenje trdnih disperzij karvedilola s polietilenglikolom in mezoporoznim silikatom
- 72 | **Tjaša Saje**, *European Business School London, Regent's University London*
Vpliv antropomorfnih vizualij v oglaševanju zdravil za samozdravljenje na odzive potrošnikov in mediacijska vloga potrebe po spoznanju
- 73 | **Petra Špenko**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Razvoj in validacija metode za določitev glicerola v farmacevtskih pomožnih snoveh
- 74 | **Peter Zajc**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza in vrednotenje pirimidino-gvanidinskih antagonistov Tollu podobnega receptorja 4
- 75 | **Matevž Zupančič**, *Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani*
Izboljšanje učinkovitosti ultrafiltracije rečne vode
- 76 | **Brina Aravs, Patricija Štainer**, *Biotehniška šola Maribor*
Poznavanje in uporaba antiparazitikov pri psih in mačkah
- 77 | **Petra Bajec, Tilen Tori**, *Gimnazija Novo mesto*
Kurkuma – izolacija, identifikacija in preizkušanje njenih zdravilnih učinkovin
- 78 | **Mojca Grižnik, Julija Herman, Nika Kaplja**, *Gimnazija Tolmin*
Primerjava komponent strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije
- 79 | **Špela Gubič, Sara Kreft, Karla Makoter**, *Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*
Vrednotenje interakcij med biološkimi makromolekulami z encimskoimunskimi testi
- 80 | **Jure Hederih, Jernej Zorman**, *II. gimnazija Maribor*
Aktivacija naravne imunosti pri Parkinsonovi bolezni: oligomeri in fibrile α -sinukeina sprožijo aktivacijo inflammasoma NLRP3
- 81 | **Rok Herman, Tjaša Mazej**, *I. gimnazija v Celju*
Določanje vsebnosti L-arginina v treh vzorcih prehranskih dopolnil in proučevanje njegovega učinka na endoteljsko funkcijo
- 82 | **Sara Jensterle, Kristina Jan**, *Gimnazija Jesenice*
Polifenoli v vršičkih borovk
- 83 | **Nejc Kežar, Jan Gojznikar**, *I. gimnazija v Celju*
Vpliv pozitivno nabitih proteinov na internalizacijo eksogene DNK
- 84 | **Klemen Kovač, Aleksandra Mikić, Laura Pust**, *Gimnazija Novo mesto*
Ibuprofen – zgodovina ali prihodnost?
- 85 | **Kristina Kovačič, Pia Štrukelj Pahovič**, *Gimnazija, elektro in pomorska šola Piran*
Interakcije med receptorji naravne imunosti in njihovimi ligandi
- 86 | **Eva Lobnik, Anja Lobnik**, *II. gimnazija Maribor*
Odkrivanje atrijske fibrilacije z žepnim elektrokardiografom z namenom preprečevanja možganske kapi pri starostnikih
- 87 | **Tinkara Vozel, Lara Oberški**, *II. gimnazija Maribor*
Kartiranje epitopov poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu
- 88 | **Ema Butara, Aleš Zupančič**, *Gimnazija Novo mesto*
Zmanjševanje grenkobe izdelkov v farmaciji
- 89 | **Kazalo avtorjev**
- 90 | **Kazalo mentorjev in somentorjev**



Pričujoči zbornik, predstavljene nagrajene naloge in dolga vrsta dosedanjih nagrajencev pričajo, da vztrajno stopamo po poti, ki smo si jo v Krki zastavili pred 44 leti. Na njej se nam vsako leto pridruži vedno več nagrajencev in mentorjev. Ob tem pa je posebej v zadnjem času opaziti, da so prispele naloge vedno bolj kakovostne in njihova globina navdušujoča. To nas utrjuje v prepričanju, da sta kljub atraktivnosti novih orodij in pristopov še vedno ključna ustvarjalnost in trdo delo. Samo v tej smeri lahko napredujemo, zato smo veseli vseh novih sopotnikov! Hvala vsem, ki ste položili nove kamne na naši poti.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

This collection of awarded research papers and a long list of award recipients indicate that we have been walking the path set in Krka 44 years ago with high determination. Every year there are more award recipients and mentors who join us on this path and every year the papers are of a higher quality and their depth more inspirational. This convinces us further that despite new tools and approaches, creativeness and hard work are still crucial. This is the only way forward, so we are pleased that there are new applicants. I would like to say thank you to everyone who have helped pave our path.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2014 | KRKA PRIZE WINNERS 2014

KRKINE NAGRADE ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Katja Čvan Trobec	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Mitja Lainščak Mojca Kerec Kos	2463
Žiga Hodnik	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Danijel Kikelj Lucija Peterlin Mašič	2464
Miha Skvarč	<i>doktor znanosti s področja medicinskih ved</i>	Bojan Tepeš Alojz Ihan	2465
Marko Štefanič	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Marija Bogataj Franc Vrečer	2466
Špela Zupančič	<i>magistra farmacije</i>	Petra Kocbek Satyanarayana Somavarapu	2467

KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Andrej Artenjak	<i>doktor znanosti s področja klinične biokemije in laboratorijske biomedicine</i>	Borut Božič Saša Čučnik	2468
Jana Ferdin	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Tanja Kunej George A. Calin	2469
Urška Jamnikar Ciglencečki	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Ivan Toplak	2470
Jože Kastelic	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Danijel Kikelj Odon Planinšek	2471

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Eva Kralj	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Albin Kristl Simon Žakelj	2472
Tina Mesarič	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Kristina Sepčič Damjana Drobne	2473
Nejc Rojko	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Gregor Anderluh	2474
Matej Skočaj	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Kristina Sepčič Peter Veranič	2475
Tanja Vnučec Popov	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Darinka Brodnjak Vončina Helena Prosen Lea Cvitkovič Maričič	2476
Blaž Vidmar	<i>magister znanosti s področja kemije</i>	Helena Prosen Andrej Gartner	2477
Helena Bogdan	<i>magistra farmacije</i>	Franc Vrečer Darko Uršič	2478
Irena Gorenc	<i>magistrica molekulske biologije</i>	Gregor Serša Jana Nunič	2479
Kaja Gosak	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Marjan Jereb	2480
Jožica Hočevnar	<i>univerzitetna diplomirana inženirka kemijskega inženirstva</i>	Marin Berovič Aleš Gasparič	2481
Ana Jerše	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Helena Prosen Ester Heath	2482
Tina Kernulc	<i>diplomirana pravnica</i>	Martina Repas	2483

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Sabina Kregar	magistra farmacije	Petra Kocbek Leena Peltonen	2484
Špela Medic	univerzitetna diplomirana biokemičarka	Janez Plavec	2485
Jože Mužerlin	univerzitetni diplomirani kemik	Branko Stanovnik	2486
Matjaž Pajk	magister industrijske farmacije	Franc Vrečer Matej Smrkolj	2487
Eva Rožman	magistra farmacije	Odon Planinšek	2488
Tjaša Saje	magistra mednarodnega trženja	Richard Mannix	2489
Petra Špenko	univerzitetna diplomirana kemičarka	Helena Prosen Simona Peterlin	2490
Peter Zajc	magister farmacije	Matej Sova	2491
Matevž Zupančič	magister inženir strojništva	Janez Diaci Iztok Golobič	2492

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Brina Aravs Patricija Štainer	dijakinja dijakinja	Andrej Toplak	2493 2494
Petra Bajec Tilen Tori	dijakinja dijak	Janja Pust Matjaž Retelj Petra Vovko	2495 2496
Mojca Grižnik Julija Herman Nika Kaplja	dijakinja dijakinja dijakinja	Igor Križaj Magdalena Kunc	2497 2498 2499
Špela Gubič Sara Kreft Karla Makoter	dijakinja dijakinja dijakinja	Peter Molek Marija Meznarič	2500 2501 2502
Jure Hederih Jernej Zorman	dijak dijak	Iva Hafner Bratkovič Katja Zorec Holnthaner	2503 2504
Rok Herman Tjaša Mazej	dijak dijakinja	Mojca Alif Bojan Krivec	2505 2506
Sara Jensterle Kristina Jan	dijakinja dijakinja	Katarina Trontelj	2507 2508
Nejc Kejžar Jan Gojznikar	dijak dijak	Mojca Benčina Mojca Alif	2509 2510
Klemen Kovač Aleksandra Mikič Laura Pust	dijak dijakinja dijakinja	Branka Klemenčič Miroslava Abazović	2511 2512 2513
Kristina Kovačič Pia Štrukelj Pahovič	dijakinja dijakinja	Karolina Ivičak Kocjan Vida Forstnerič Breda Novak	2514 2515
Eva Lobnik, Anja Lobnik	dijakinja dijakinja	Katja Zorec Holnthaner Vesna Masten Gubelj	2516 2517
Tinkara Vozel Lara Oberški	dijakinja dijakinja	Tomaž Bratkovič Zdenka Keuc	2518 2519
Ema Butara Aleš Zupančič	dijakinja dijak	Tatjana Durmič	2520 2521



Ničesar v življenju se ni treba bati, treba je samo razumeti. Zdaj je čas, da razumemo več in se bojimo manj.

Marie Curie

Pred vami je zbornik nagrajenih nalog, ki smo jih izbrali med nalogami, prispelimi na razpis za 44. Krkine nagrade. Tudi letos so raziskovalci ob pomoči svojih mentorjev in somentorjev dokazali, da je moč z dobro idejo, raziskovalnim entuziazmom in odprtostjo doseči odlične rezultate.

V Svetu Sklada Krkinih nagrad nas posebej veseli rast kakovosti in števila raziskovalnih nalog najmlajših raziskovalcev – dijakov srednjih šol in tudi njihovih starejših kolegov – diplomantov univerzitetnih programov druge bolonjske stopnje. Mlade raziskovalce bi še posebej rad spodbudil, naj iščejo predvsem odličnost raziskovalnih idej in jih nato s svojim predanim delom in pomočjo mentorjev uresničijo v rezultatih, ki so izjemni tako z vidika znanstvene kot uporabne vrednosti. Odličnost v raziskovalnem delu uporabljenih eksperimentalnih metod je gotovo vabljava pri pripravi posameznega znanstvenega prispevka, za celovito vrednost raziskovalnega dela oziroma za rast raziskovalnih in inovativnih potencialov posameznika pa je manj pomembna. V tem delu vidim pomembno vlogo mentorjev pri usmerjanju mladih raziskovalcev v njihovo raziskovalno odličnost, ki bo temeljila na odličnih idejah in racionalni uporabi eksperimentalnih tehnik in metod, ki naj bodo primarno predvsem orodje za preverjanje raziskovalnih idej in boljše razumevanje eksperimentalnih rezultatov. Ravno želja po razumevanju eksperimentalnih podatkov je ključnega pomena za bodoče uspešno delo mladih raziskovalcev v praksi, posebej v razvoju in proizvodnji zdravil.

V imenu Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in v svojem imenu se vsem avtorjem, ki so se prijavili na razpis za 44. Krkine nagrade, zahvaljujem za prijavo in jim hkrati čestitam za opravljeno raziskovalno delo. Še posebne čestitke pa namenjam vsem nagrajenkam in nagrajencem, ki so nas obogatili s svojimi raziskovalnimi idejami.

Iskrena zahvala tudi vsem mentorjem in somentorjem, ki so mlade raziskovalce usmerjali na neznanih in neshojenih poteh raziskovanja in znanosti. Najlepše se zahvaljujem tudi vsem strokovnjakom iz Krke, ki so sprejeli dodeljene naloge, jih pregledali in ocenili. S svojo strokovno in kakovostno oceno so pripomogli k izboru najboljših nalog.

Vsem prejemnikom Krkinih nagrad in priznanj v imenu članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in seveda v svojem imenu iskreno čestitam ter jim želim, da jih bodo nagrade dodatno spodbudile k razvijanju njihovih potencialov in uporabi pridobljenega znanja v delovnih okoljih.

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

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.

Marie Curie

This collection of research papers includes the awarded papers selected from all the papers that were submitted by applicants for the 44th Krka Prizes. Assisted by their mentors and co-mentors, the researchers have once again proven that good ideas, research enthusiasm and open-mindedness may bring outstanding results.

The Krka Prizes Council is particularly pleased with the growing quality and number of the research papers submitted by young researchers – high school students, and their older colleagues – graduates of the second cycle Bologna study programmes. I would particularly like to encourage young researchers to search for excellent research ideas and implement them in practice with committed work and the help of their mentors. In this way, they might achieve extraordinary results in terms of academic and practical value. Excellency of experimental methods used in research work is particularly welcome when working on a scientific paper, however, for the full value of the research work or for the growth of the individual's research and innovative potentials, it is less important. Here lies the important role of mentors in directing young researchers to achieve research excellency based on outstanding ideas and a rational use of experimental techniques and methods that should primarily serve as a tool for verifying research ideas and for a better understanding of experimental results. The desire to fully understand experimental data is crucial for the success of the future work of young researchers in practice, especially in the development and manufacture of medicines.

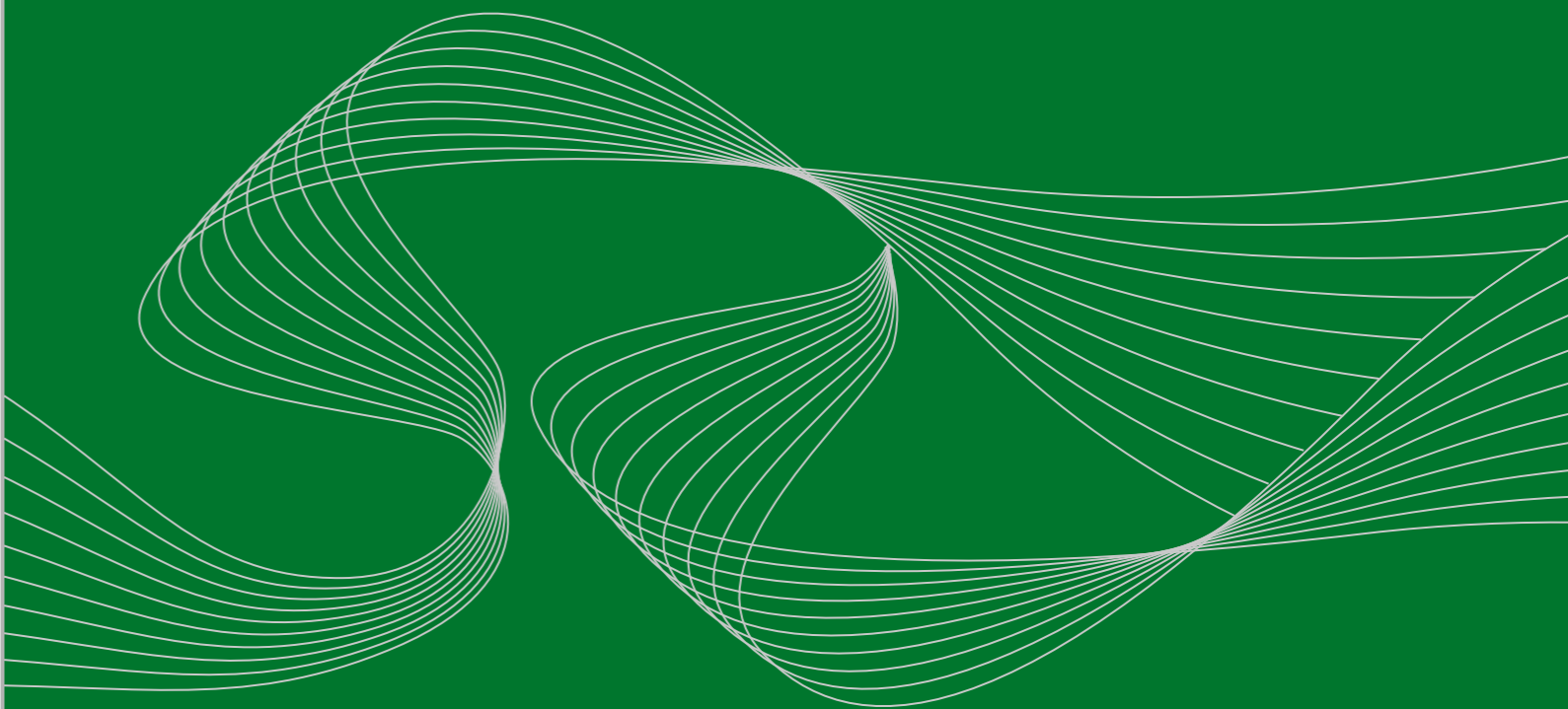
On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf, I would like to thank all the authors for submitting their papers for the 44th Krka Prizes and I congratulate them for their research work. I would also like to extend my warm congratulations to all the recipients of Krka prizes for their excellent research ideas.

Let me express my sincere gratitude to all the mentors and co-mentors who have guided these young researchers through the unknown and less trodden paths of research and science. I would also like to thank all the experts from Krka who agreed to review and assess the submitted papers. With their expert assessment they have contributed to the selection of the best research papers.

On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf, I would like to congratulate all the recipients of Krka prizes and recognitions. I wish all the recipients that these prizes would serve as additional encouragement to develop their potentials and use the acquired knowledge in work environments.

Prof Franc Vrečer, MPharm, PhD
President of the Scientific Committee
Krka Prizes Council

44.



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

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners

Dr. KATJA ČVAN TROBEC

*Znanost kot izpolnitev želja
in izziv prihodnosti*



Dr. Katja Čvan Trobec se je po končani gimnaziji v Novi Gorici kot zlata maturantka vpisala na Fakulteto za farmacijo. Že med študijem je opravljala dodatno raziskovalno delo in se praktično usposabljala na Univerzitetni kliniki Golnik. Tam je delo nadaljevala kot koordinatorica kliničnih študij in se kasneje zaposlila kot mlada raziskovalka. Aprila je uspešno zagovarjala doktorsko nalogo z naslovom Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetiko bisoprolola in ramiprila in na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem, ki jo je pripravila pod mentorstvom izr. prof. dr. Mitje Lainščka in doc. dr. Mojce Kerec Kos.

Da je vse veliko lažje, če svoje delo rad opravljaš, je prepričana dr. Katja Čvan Trobec, ki se je od nekdaj navduševala nad naravoslovjem in raziskovanjem. Njeno primarno področje raziskovanja je farmakokinetika zdravilnih učinkovin pri spremenjeni telesni sestavi in kaheksiji. »Vedno me je zanimal prenos farmakokinetičnega znanja v klinično prakso in na kliniki Golnik se je ponudila priložnost za raziskovanje farmakokinetike v kliničnem okolju.«

Z mentorsko ekipo se je kot ena prvih na znanstvenem področju posvetila proučevanju farmakokinetike učinkovin pri kaheksiji. »Ta tematika je bila do sedaj slabo raziskana, saj je bila uradna definicija kaheksije postavljena šele pred kratkim. Naše ugotovitve bodo uporabne predvsem v klinični obravnavi bolnikov, saj bodo omogočale bolj optimizirano odmerjanje zdravil pri bolnikih, ki razvijejo kaheksijo ali spremembe v telesni sestavi,« razloži jedro svojega raziskovalnega dela. Proučevanje vpliva telesne sestave na farmakokinetiko učinkovin je pripeljalo do pomembnih spoznanj. »Predvsem smo se usmerili v kaheksijo, ki predstavlja poseben proces izgubljanja telesne mase pri bolnikih s kroničnimi boleznimi, kot so rak, kronično srčno popuščanje, kronična obstruktivna pljučna bolezen itd. Izkazalo se je, da ima kaheksija velik vpliv na presnovo in izločanje učinkovin, zato bi morali pri bolnikih, ki kaheksijo razvijejo med kronično boleznijo, ponovno ovrednotiti varnost in učinkovitost odmerkov zdravil.«

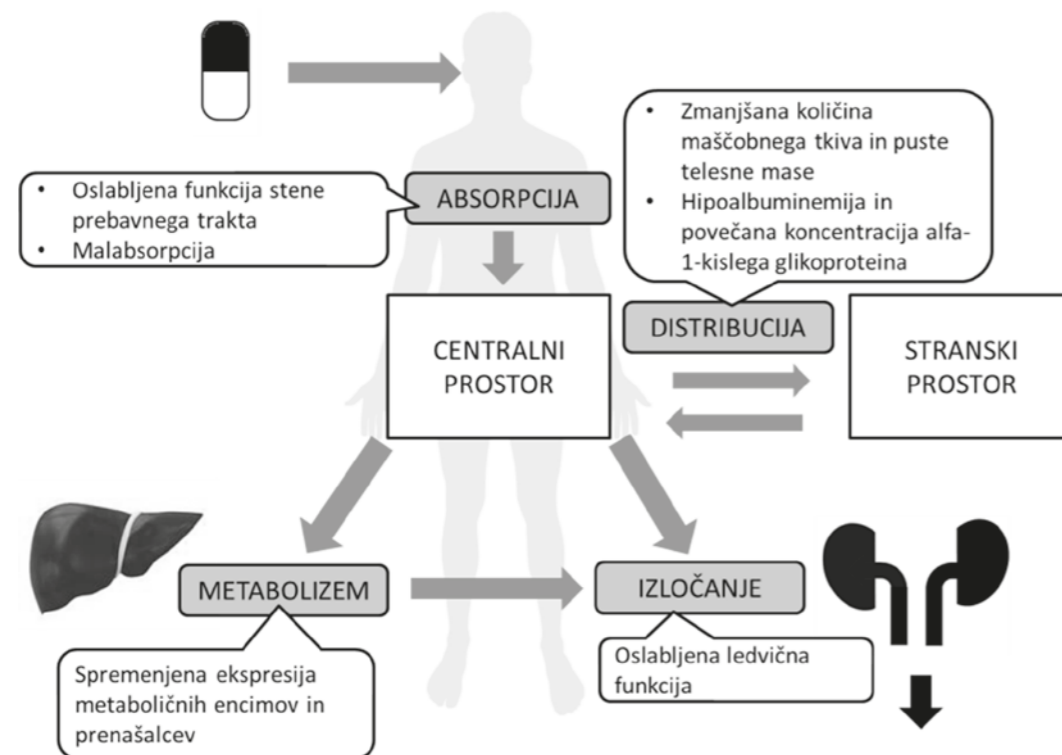
V delu doktorske naloge se je ukvarjala s spreminjanjem ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem in vplivom telesne sestave na oceno ledvične funkcije pri isti skupini bolnikov. »Ugotovili smo hiter upad ledvične funkcije, ki ga sicer z običajnim sledenjem v klinični praksi na podlagi serumskega kreatinina ne zaznamo. To je pomemben kazalec za spremembo načina spremljanja ledvične funkcije pri teh bolnikih,« doda.

V raziskovanju vidi vrsto izzivov tudi v prihodnje, saj želi do sedaj pridobljeno znanje in izkušnje le še nadgraditi. »To delo me veseli, a seveda ne gre brez razumevanja ostalih članov družine. Srečo imam, da je moj mož potrpežljivo prenašal moje delo ob koncih tedna in večerih in da je imel razumevanje za pozne prihode iz službe,« pove mlada mamica, ki jo Krkina nagrada za posebne dosežke navdaja z veseljem. »Pomeni priznanje, da smo skupaj z ekipo delali dobro. Doktorsko nalogo smo začrtali široko in vanjo vložili veliko truda. Veseli me, da so ta trud prepoznali tudi zunanji strokovnjaki,« še doda.

Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetiko bisoprolola in ramiprila in na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem

KATJA ČVAN TROBEC, Univerzitetna klinika Golnik
 Mentor: Mitja Lainščak, Univerzitetna klinika Golnik
 Somentorica: Mojca Kerec Kos, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Kaheksija je poseben proces izgube telesne mase, ki se pojavi kot posledica dolgotrajne aktivacije obrambnih procesov zaradi pridružene kronične bolezni, kot je rak, kronično srčno popuščanje ali kronična obstruktivna pljučna bolezen. Tako srčno popuščanje samo kot spremembe v telesni sestavi, ki se pojavijo zaradi bolezni, lahko vplivajo na farmakokinetiko učinkovin, kot sta bisoprolol in ramipril. Spremembe v telesni sestavi in kaheksija namreč lahko vplivajo na absorpcijo, porazdelitev, metabolizem in izločanje učinkovin. Izguba telesne mase pri kroničnih boleznih je povezana s spremembami v črevesni steni, kar lahko vpliva na absorpcijo učinkovin. Spremembe v telesni sestavi in koncentraciji serumskih proteinov (hipoalbuminemija, povišan alfa-1 kisli glikoprotein) lahko vplivajo na porazdelitev učinkovine po telesu. Vnetni procesi in podhranjenost dokazano vplivajo na ekspresijo citokromov in molekularnih prenašalcev v jetrih in drugih organih. Tako kot na vse ostale organe lahko procesi kaheksije vplivajo tudi na ledvice in s tem na izločanje učinkovin, saj je kronična ledvična bolezen povezana s kaheksijo in inzulinsko rezistenco, čeprav vzročno-posledični mehanizem še ni znan. Poleg tega telesna sestava zaradi povezave med mišično maso in nastajanjem kreatinina v telesu pomembno vpliva tudi na oceno ledvične funkcije na podlagi serumskega kreatinina.



Slika 1. Vpliv kaheksije na farmakokinetične procese

S sistematičnim pregledom literature smo poiskali študije, ki so preiskovale farmakokinetiko učinkovin pri kahektičnih bolnikih. Identificirane študije nakazujejo spremenjeno absorpcijo, zmanjšan volumen porazdelitve in upočasnen metabolizem učinkovin pri kaheksiji. Študij, ki so proučevale farmakokinetiko učinkovin pri kaheksiji, je malo oz. jih za nekatera najpogostejša stanja v klinični medicini (srčno popuščanje, kronična obstruktivna pljučna bolezen) ni, zato ni na voljo dovolj informacij, ki bi omogočale postavitev smernic za odmerjanje učinkovin pri bolnikih s kaheksijo.

Na živalskem modelu smo proučili vpliv kaheksije na farmakokinetiko petih učinkovin: bisoprolola, ramiprila, joheksola, midazolama in propranolola. Bisoprolol in ramipril smo izbrali zaradi nadaljnega raziskovanja njune farmakokinetike pri bolnikih s srčnim popuščanjem, joheksol smo izbrali kot označevalec ledvične funkcije, ki smo ga uporabili tudi pri bolnikih s srčnim popuščanjem, midazolam in propranolol pa kot označevalca jetrne presnove. Izbran živalski model so bile podgane, ki pa imajo majhen volumen krvi, zato je vzorčenje v več časovnih točkah, ki bi omogočalo določanje celotnih farmakokinetičnih profilov, omejeno. Zato smo najprej razvili analizo metodo, ki bi nam omogočila določanje teh učinkovin v posušenem madežu krvi, ki zahteva odvzem samo 20 µl krvi v vsaki časovni točki. Razvili in validirali smo postopek ekstrakcije in sočasne detekcije bisoprolola, ramiprilata, midazolama in propranolola v suhem madežu podganje krvi s tekočinsko kromatografijo, združeno z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). S farmakokinetičnim modeliranjem smo primerjali očistek in volumen porazdelitve izbranih učinkovin pri zdravih podganah, pri raku ter pri kaheksiji. Ugotovili smo, da se jetrni metabolizem pri raku prehodno neznačilno poveča ter značilno zmanjša, ko se razvije kaheksija (za več kot 80 %). Ledvična funkcija se prav tako nekoliko (a neznačilno) poveča pri raku in se nato značilno zmanjša za 30 %, ko pride do razvoja kaheksije. V našem eksperimentalnem modelu smo tako pokazali, da kaheksija značilno poslabša jetrni metabolizem in ledvično funkcijo.

Drugi sklop raziskovalnega projekta je bila prospektivna opazovalna klinična študija pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem, ki so bili na redni terapiji z bisoprololom in/ali ramiprilom. Pri njih smo na dveh zaporednih obiskih v razmiku vsaj šestih mesecev določili farmakokinetiko bisoprolola in ramiprila, ledvično funkcijo z zunanjim označevalcem joheksolom, telesno sestavo in prisotnost kaheksije. Dokazali smo značilen vpliv telesne sestave na različne farmakokinetične parametre bisoprolola in ramiprila. Pri ramiprilu je na njegov očistek značilno vplivala tudi kaheksija, kljub majhnemu številu bolnikov s kaheksijo. Pri bolnikih se je ledvična funkcija med obiskoma klinično pomembno in statistično značilno zmanjšala (v povprečju za 8 ml/min x 1,73 m²). Zmanjšanje je bilo značilno večje pri bolnikih, ki so prejeli antagonist mineralokortikoidnih receptorjev. Enačbe, ki temeljijo na serumski koncentraciji kreatinina, niso zaznale zmanjšanja ledvične funkcije, saj je koncentracija serumskega kreatinina med obiskoma ostala nespremenjena. Podatek o telesni sestavi je izboljšal točnost ocene ledvične funkcije z enačbami, vendar ni preprečil neuspešnega zaznavanja zmanjšanja ledvične funkcije. Longitudinalno spremljanje ledvične funkcije na osnovi serumskega kreatinina pri bolnikih s srčnim popuščanjem torej ni zanesljivo, zato bi bilo pri teh bolnikih priporočljivo merjenje ledvične funkcije z zunanjimi označevalci.

Impact of Body Composition Changes and Cachexia on Bisoprolol and Ramipril Pharmacokinetics and Renal Function Estimation in Patients with Chronic Heart Failure

KATJA ČVAN TROBEC, *University Clinic Golnik*
 Supervisor: Mitja Lainščak, *University Clinic Golnik*
 Co-supervisor: Mojca Kerec Kos, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Cachexia is a unique process of weight loss resulting from the constant activation of inflammatory processes caused by underlying chronic diseases like cancer, chronic heart failure, chronic obstructive pulmonary disease, etc. In patients with chronic heart failure, the disease itself and changes in the body composition may influence the pharmacokinetics of drugs such as ramipril and bisoprolol. Changes in the body composition and cachexia may influence the absorption, distribution, metabolism and elimination of drugs. Weight loss in chronic diseases was previously associated with the changes in the gut wall and could therefore influence the absorption of orally administered drugs. Changes in the body composition and in the concentrations of plasma proteins (hypoalbuminemia, increased alpha-1 acid glycoprotein) may influence the distribution of drugs. Inflammation and malnutrition were shown to influence the expression of cytochromes and transporter proteins in liver and other organs. Kidney function may also be impaired in cachexia; chronic kidney disease was linked to cachexia and insulin resistance, although the cause-and-effect relationship is not yet known. Additionally, the body composition may influence the estimation of renal function if it is based on the serum creatinine concentration due to the correlation between muscle mass and creatinine.

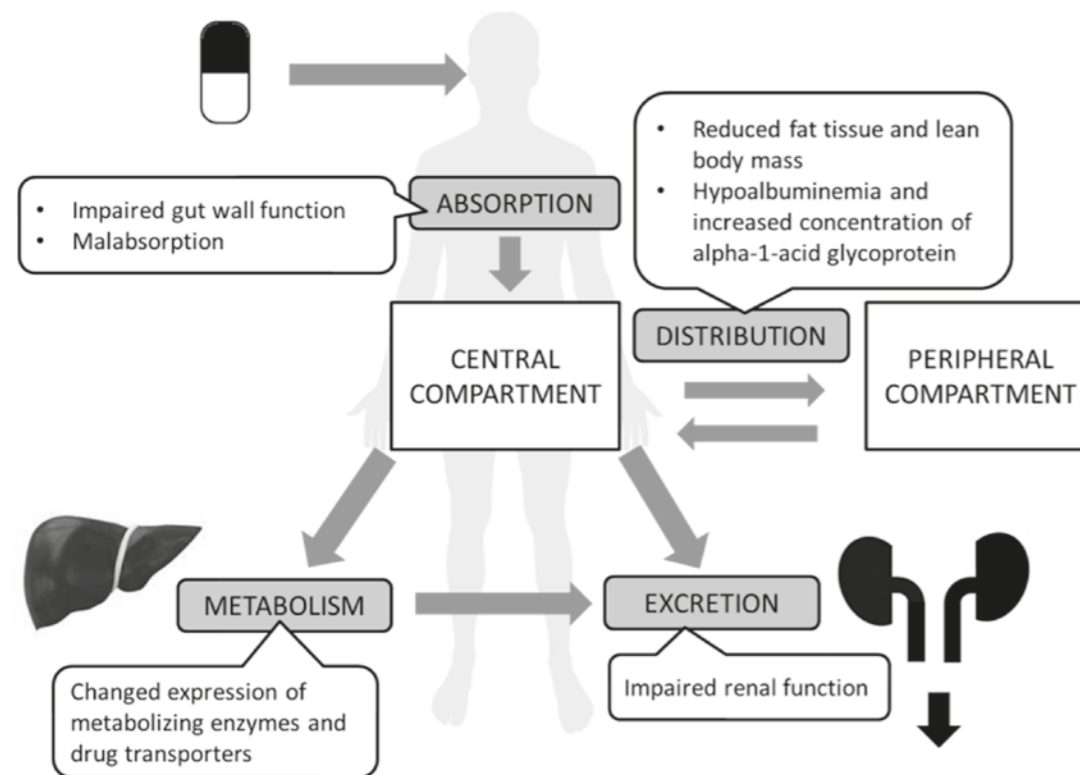


Figure 1. Influence of cachexia on pharmacokinetic parameters.

Firstly, we performed a systematic review to identify articles, which have investigated the influence of cachexia on the drugs' pharmacokinetics. Articles identified with the systematic review of the literature suggest the changed absorption, decreased volume of distribution and the reduced metabolism of drugs in cachexia. Overall, there is a lack of studies investigating the influence of cachexia on drugs pharmacokinetics and we are therefore left with no information on how to appropriately adjust drug dosing in cachexia.

We continued our research in an animal model in which we studied the influence of cachexia on pharmacokinetics of five different drugs: bisoprolol, ramipril, iohexol, midazolam, and propranolol. Bisoprolol and ramipril were chosen due to the planned research of their pharmacokinetics in the chronic heart failure. Iohexol was chosen as a marker of glomerular filtration rate, and midazolam and propranolol as markers of hepatic metabolism. Rats were chosen as an animal model for the pharmacokinetic studies. Rats have small blood volume, which hinders blood sampling in multiple time points to obtain the whole pharmacokinetic profile in an individual rat. We therefore developed a method that would enable us to determine the concentration of the selected drugs in the dried blood sample, which requires only 20 µL of blood in each time point. We developed and validated the extraction procedure and simultaneous detection of bisoprolol, ramiprilat, midazolam and propranolol in a dried blood spot with liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS). The nonlinear mixed effects modelling was used to assess clearance and the volume of distribution of these drugs at three different occasions: in healthy rats, after the development of cancer and after the occurrence of cachexia. We observed a slight but insignificant increase in hepatic clearance of midazolam and propranolol at the stage of cancer and a significant decline of more than 80% of the baseline hepatic clearance after cachexia developed. Renal function was also slightly but insignificantly increased in cancer and then decreased significantly by 30% of the baseline value when cachexia occurred. This study clearly showed that cachexia significantly impaired the hepatic metabolism and renal function in rats.

The last part of this thesis consisted of a clinical trial in chronic heart failure patients, who were on a regular therapy with bisoprolol and/or ramipril. Patients attended two consecutive visits separated by at least six months. At both visits, pharmacokinetics of bisoprolol and ramipril was assessed, the renal function was measured with iohexol clearance, body composition was determined and patients were screened for cachexia. We determined a significant influence of the body composition on different pharmacokinetic parameters of bisoprolol and ramipril. Cachexia significantly influenced ramipril clearance, although the number of cachectic patients was low. The measured renal function significantly declined during the follow-up. An average decline was 8 mL/(min x 1.73 m²), which is a clinically relevant decline. The decrease was significantly higher in patients receiving mineralocorticoid receptor antagonists at baseline. Equations did not detect this decline, since the serum creatinine concentration remained unchanged during the follow-up. The information on body composition improved the performance of the equations, but could not prevent the failure of equations to detect the decline. Longitudinal monitoring of renal function on the basis of serum creatinine is therefore not appropriate in chronic heart failure patients. Instead, external markers of renal function should be used.

Dr. ŽIGA HODNIK

Najboljša učiteljica je narava

Žiga Hodnik se je po končanem izobraževanju na Gimnaziji Vič vpisal na študij farmacije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja s Fakultete za farmacijo in somentorstvom dr. Jožeta Kastelica iz Krke se je v diplomskem delu ukvarjal s pripravo in karakterizacijo farmacevtskih kokristalov. Po diplomi in opravljenem pripravništvu v Lekarni Postojna se je kot raziskovalec na evropskem projektu Marex zaposlil na Fakulteti za farmacijo, kjer je zaposlen še danes. Kasneje je vpisal doktorski program Biomedicina. Junija 2014 je uspešno zagovarjal doktorsko nalogo z naslovom Načrtovanje, sinteza in vrednotenje analogov bioaktivnih spojin iz morskih spužev rodov Agelas in Theonella, ki je nastala pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja in izredne prof. dr. Lucije Peterlin Mašič.



Žiga Hodnik je eden tistih, ki se ga je nemirni raziskovalni duh polastil že v rani mladosti. Z domišljijo, lastno le otrokom, je v domačem okolju ustvaril improviziran laboratorij. Kemija ga je torej od nekdaj zelo privlačila, toda kasneje, ko se je odločil o izobraževanju, je pretehtala farmacija, saj so ga zanimale tudi biološko usmerjene vede. Kot pravi, mu je bila vseč zamisel, da bi nekoč sodeloval v procesu odkrivanja in izdelave novih zdravil.

Svojo raziskovalno pot je posvetil sintezi analogov in mimetikov bioaktivnih spojin morskega izvora, ki bi v človeškem telesu delovali enako ali bolje kot spojine, iz katerih so izhajali. »Totalna sinteza bioaktivnih spojin morskega izvora zaradi kompleksnosti njihovih struktur časovno in ekonomsko običajno ni ugodna. To pa lahko obidemo s sintezo njihovih mimetikov in analogov, kar je bolj ugodna in z vidika industrije bolj zanimiva rešitev,« pojasnjuje in dodaja, da se je pri načrtovanju novih bioaktivnih spojin najbolje učiti od najboljših – od narave. »Opisane biološke aktivnosti sintetiziranih analogov in mimetikov potrjujejo, da so morske spužve rodov Agelas in Theonella bogat vir sekundarnih metabolitov, ki so primerni za razvoj novih spojin vodnic. A to je šele začetek strme poti do odkritja novih spojin vodnic in posledično do klinično uporabnih učinkovin. Potrebne so številne dodatne raziskave, pa tudi finančna sredstva.«

V prihodnje si želi sodelovanja v »močnih« raziskovalnih skupinah, ki bi pomembno vplivale na njegovo znanstveno širino. »Menim, da so za uspešnost raziskovalca ključne vedoželjnost, sposobnost logičnega razmišljanja in sistematičnost. Zavedati se je treba, kako malo v resnici vemo, in se poskušati čim več naučiti od bolj izkušenih,« je prepričan raziskovalec, ki zase pravi, da običajno ni tekmovalen, a je kljub temu občasno dobro preveriti svoje mesto v vse večji konkurenci. Tudi zato je svoje doktorsko delo prijavil na razpis za Krkine nagrade. Nagrade za posebne dosežke se je ljubitelj gorskega kolesarjenja, deskanja na snegu, pohodništva in popotništva razveselil, saj, kot pravi, je lepo, če nekdo prepozna tvoj uspeh, še posebej, če si vanj vložil veliko truda.

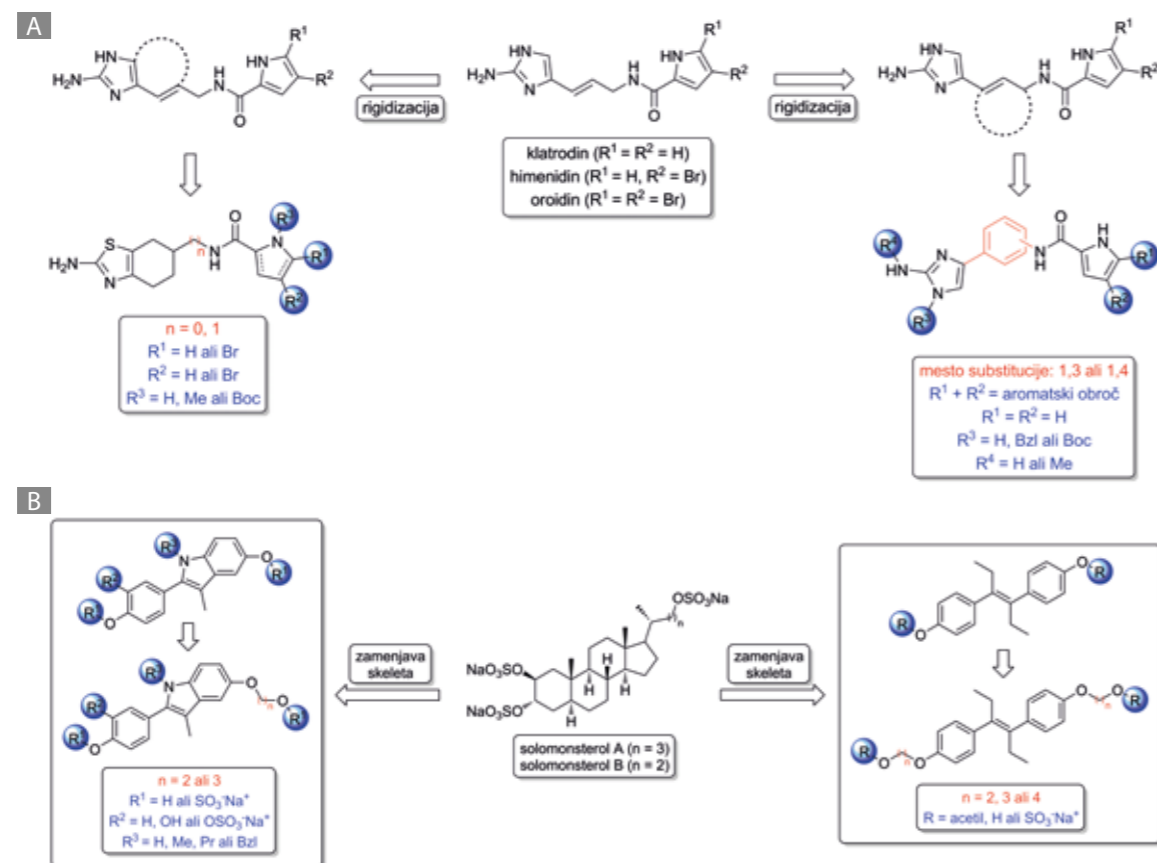
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje analogov bioaktivnih spojin iz morskih spužev rodov *Agelas* in *Theonella*

ŽIGA HODNIK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentorica: Lucija Peterlin Mašič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Za sekundarne metabolite iz morskih spužev rodov *Agelas* in *Theonella* je značilen nabor različnih bioloških aktivnosti in tudi velika strukturna raznolikost. Posledično so omenjene spojine zanimive kot vir novih spojin vodnic, kar pa omejuje njihove izjemno majhne količine v naravnem okolju ter težavna totalna sinteza. V okviru doktorskega dela smo tako načrtovali, sintetizirali in biološko ovrednotili kemijsko dostopnejše analoge alkaloidov klatrodina, himenidina in oroidina iz spužev rodu *Agelas* in mimetike solomonsterolov A in B iz spužev rodu *Theonella*, s čimer smo dodatno raziskali odnos med strukturo in delovanjem ter razširili nabor znanih aktivnosti omenjenih spojin na nove tarče. Zaradi ciljanja različnih bioloških tarč smo analoge bioaktivnih spojin iz spužev rodu *Agelas* načrtovali na osnovi ligandov, načrtovanje mimetikov solomonsterolov A in B pa je potekalo na osnovi ligandov ter na osnovi dostopnih tridimenzionalnih struktur kompleksov humanega jedrnega receptorja PXR z agonisti. Pri tem smo (*E*)-5-(3-aminoprop-1-enil)-1*H*-imidazol-2-aminski fragment alkaloidov klatrodina in oroidina iz spužev rodu *Agelas* nadomestili s sintezno dostopnejšimi rigidiziranimi ogrodji, steroidni skelet solomonsterolov A in B pa s steroidomimetičnima ogrodjema basedoksifena in dietilstilbestrola (slika 1).



Slika 1. Sintetizirani in biološko ovrednoteni analogi bioaktivnih spojin iz morskih spužev rodov *Agelas* (A) in *Theonella* (B).

S 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-aminskim ogrodjem rigidizirani analogi alkaloidov iz spužev rodu *Agelas* so pokazali nizkomikromolarne modulatorne aktivnosti na podtipih $Na_v1.3$, $Na_v1.4$ in $Na_v1.7$ napetostno odvisnih natrijevih kanalov, med katerimi izstopa na Boc-L-prolinu zasnovan analog ($IC_{50} = 8 \mu M$) kot selektivni blokator podtipa $Na_v1.4$. Poleg tega so rezultati študije odnosa med strukturo in delovanjem razkrili, da je sposobnost tvorjenja hidrofobnih interakcij ključna za doseganje nizkomikromolarnih aktivnosti na omenjenih podtipih napetostno odvisnih natrijevih kanalov. Druga serija rigidiziranih analogov oroidina in klatrodina iz morskih spužev rodu *Agelas* je privedla do novih zaviralcev razvoja biofilmov bakterij *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus mutans*. Omenjene aktivnosti z 1,3- in 1,4-fenilenskim distančnikom rigidiziranih analogov v nizkomikromolarnem območju so dokazale, da je indol kot ena izmed molekul, ki sodelujejo v medcelični komunikaciji bakterijskih biofilmov, ustreza bioizosterna zamenjava za dibromopirrol. Poleg tega so rezultati študije odnosa med strukturo in delovanjem dokazali pomembno vlogo substituentov na mestu 5 indolnega fragmenta pri zaviranju razvoja biofilmov bakterij *S. aureus* in *S. mutans*. Nekateri z 1,3-fenilenskim distančnikom rigidizirani analogi alkaloidov iz morskih spužev rodu *Agelas* so pokazali tudi protimikrobne aktivnosti tako na sevu *Candida albicans* kakor tudi na 3 bakterijskih sevih (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*). Najbolj aktivna na 4-fenil-2-aminoimidazolnem ogrodju zasnovana spojina je pokazala vrednosti MIC_{90} $12,5 \mu M$ na po Gramu pozitivnih bakterijah *E. faecalis* in *S. aureus* oz. $50 \mu M$ na *E. coli*. Na osnovi vrednotenja proapoptotičnih aktivnosti celotne knjižnice omenjenih analogov smo določili ključne strukturne elemente in fizikalno-kemijske lastnosti spojin, ki so potrebne za indukcijo apoptoze na celicah humanega hepatoma. Tako so se nekatere na indolnem fragmentu zasnovane spojine izkazale kot induktorji apoptoze na obeh celičnih linijah z vrednostmi EC_{50} v nizkomikromolarnem območju. Nadaljnje analize celičnega ciklusa na akutnih monocitnih levkemičnih celicah pa so potrdile proapoptotične aktivnosti omenjenih spojin pri koncentracijah $25 \mu M$.

Rezultati transaktivacijskih eksperimentov na celični liniji HepG2 so v nasprotju z aktivnostjo solomonsterolov A in B iz spužev *Theonella swinhoei* razkrili antagonistično delovanje nekaterih na basedoksifenskem skeletu zasnovanih steroidomimetičnih analogov na pregnanskem X-receptorju (PXR), nadaljnja študija odnosa med strukturo in delovanjem pa pomembno vlogo hidroksilnih skupin kot donorjev vodikovih vezi pri PXR-antagonističnem delovanju. Najmočnejša PXR-antagonista iz omenjene serije spojin ($IC_{50} = 11$ oz. $14 \mu M$) sta potrdila rezultate transaktivacijskih eksperimentov z zaviranjem ekspresije samega PXR-receptorja, kakor tudi z močnim zaviranjem od PXR odvisne ekspresije encimov CYP3A4. Slednje kaže na potencial omenjenih spojin za zaviranje od PXR odvisnih metaboličnih reakcij 1. faze. Ustreznost steroidomimetičnega pristopa smo dodatno preverili tudi pri načrtovanju modulatorjev PXR-receptorja, zasnovanih na skeletu dietilstilbestrola. Analoge dietilstilbestrola smo tako načrtovali na osnovi solomonsterolov A in B, sulfatiranih steroidov morskega izvora s PXR-agonističnim delovanjem, kakor tudi na osnovi zgoraj omenjenih, na basedoksifenskem skeletu zasnovanih antagonistov PXR-receptorja. O-metilni analog dietilstilbestrola izstopa v seriji sintetiziranih analogov kot močan agonist PXR-receptorja ($EC_{50} = 11 \mu M$), medtem ko so nekateri analogi delovali antagonistično na PXR-receptorju v nizkomikromolarnem območju. Rezultati transaktivacijskih eksperimentov na celični liniji HepG2 so v nasprotju s prejšnjimi študijami razkrili tudi antagonistično delovanje dietilstilbestrola na PXR-receptorju ($IC_{50} = 15 \mu M$), kar dodatno potrjuje tudi z dietilstilbestrolom povzročeno zaviranje od PXR odvisne ekspresije encimov CYP3A4. Rezultati verižne reakcije s polimerazo v realnem času so poleg tega razkrili, da O-hidroksipropilni analog dietilstilbestrola zavira od PXR odvisno ekspresijo encimov CYP3A4 in da O-metilni analog dietilstilbestrola inducira ekspresijo encimov CYP3A4. Poleg tega sta PXR-antagonistični aktivnosti dietilstilbestrola in njegovega O-hidroksipropilnega analoga nakazali pomembno vlogo hidroksilnih skupin kot donorjev vodikovih vezi pri PXR-antagonističnem delovanju, kar se sklada z dognanji zgoraj opisane študije na basedoksifenskem skeletu zasnovanih PXR-antagonistov.

Opisane biološke aktivnosti sintetiziranih analogov potrjujejo, da so morske spužve rodov *Agelas* in *Theonella* bogat vir sekundarnih metabolitov, ki so primerni za razvoj novih spojin vodnic.

Design, Synthesis and Evaluation of Analogs of Bioactive Compounds from Marine Sponges of the Genera *Agelas* and *Theonella*

ŽIGA HODNIK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Lucija Peterlin Mašič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Secondary metabolites from marine sponges of the genera *Agelas* and *Theonella* possess a wide range of pharmacological activities, as well as a great structural diversity. Therefore, they represent a promising source of new therapeutic lead compounds, whose application is limited by non-sustainable isolation due to the small amounts in marine organisms as well as by expensive and time-consuming total synthesis due to the relative structural complexity of those molecules. In this paper, we report the design, synthesis and biological evaluation of synthetically more favourable analogues of marine alkaloids clathrocin, hymenidin and oroidin from sponges of the genus *Agelas*, as well as mimetics of solomonsterols A and B from the marine sponge *Theonella swinhoei*. With an attempt of targeting multiple biological targets, we applied a ligand-based approach in the design of analogues of bioactive compounds from *Agelas* sponges, while also using a molecular-docking approach in the design of mimetics of solomonsterols A and B. We have therefore replaced the (*E*)-5-(3-aminoprop-1-enyl)-1*H*-imidazol-2-amine moiety of clathrocin and oroidin from the sponges of the genus *Agelas* with synthetically more favourable and conformationally constrained moieties, as well as replaced the steroid scaffold of solomonsterols A and B with steroidomimetic scaffolds of bazedoxifene and diethylstilbestrol (Figure 1). Synthesised compounds displayed improved biological activities compared to their parent compounds, while structure-activity relationship (SAR) studies also revealed their new biological targets.

4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[*d*]thiazol-2-amine-based analogues of alkaloids from the marine sponges of the genus *Agelas* displayed low micromolar modulatory activities on Na_v1.3, Na_v1.4 and Na_v1.7 subtypes of voltage-gated sodium channels, with Boc-L-proline-based analogue (IC₅₀ = 8 μM) standing out as the most potent compound from the series. Furthermore, preliminary structure-activity relationship studies also revealed the importance of hydrophobic interactions for binding to all three tested isoforms. The second series of conformationally constrained analogues of alkaloids from *Agelas* sponges inhibited the formation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* biofilms. Anti-biofilm activities of these 1,3- and 1,4-phenylene-based analogues in low micromolar range illustrated the applicability of the quorum-sensing indole moiety as a dibromopyrrole surrogate towards design of the inhibitors of *S. aureus* and *S. mutans* biofilm formation. The SAR study also revealed the promising substituents at position 5 of the indole moiety for anti-biofilm activity against the tested bacterial strains. Some of the phenylene-based analogues also displayed antimicrobial activities against fungus *Candida albicans*, as well as against bacterial strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The most active 4-phenyl-2-aminoimidazole-based analogue from the series displayed MIC₉₀ values of 12.5 μM against Gram-positive bacteria *E. faecalis* and *S. aureus*, and 50 μM against *E. coli*. Further screening of our library of clathrocin, hymenidin and oroidin analogues revealed the key structural elements, as well as physical and chemical properties necessary for the induction of apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells. Some of the indole-based compounds were therefore found to be potent inducers of apoptosis in HepG2 and THP-1 cell lines, with EC₅₀ values in the low micromolar range. The cell cycle analysis assays further confirmed that these compounds induce the apoptosis of THP-1 cells at 25 μM.

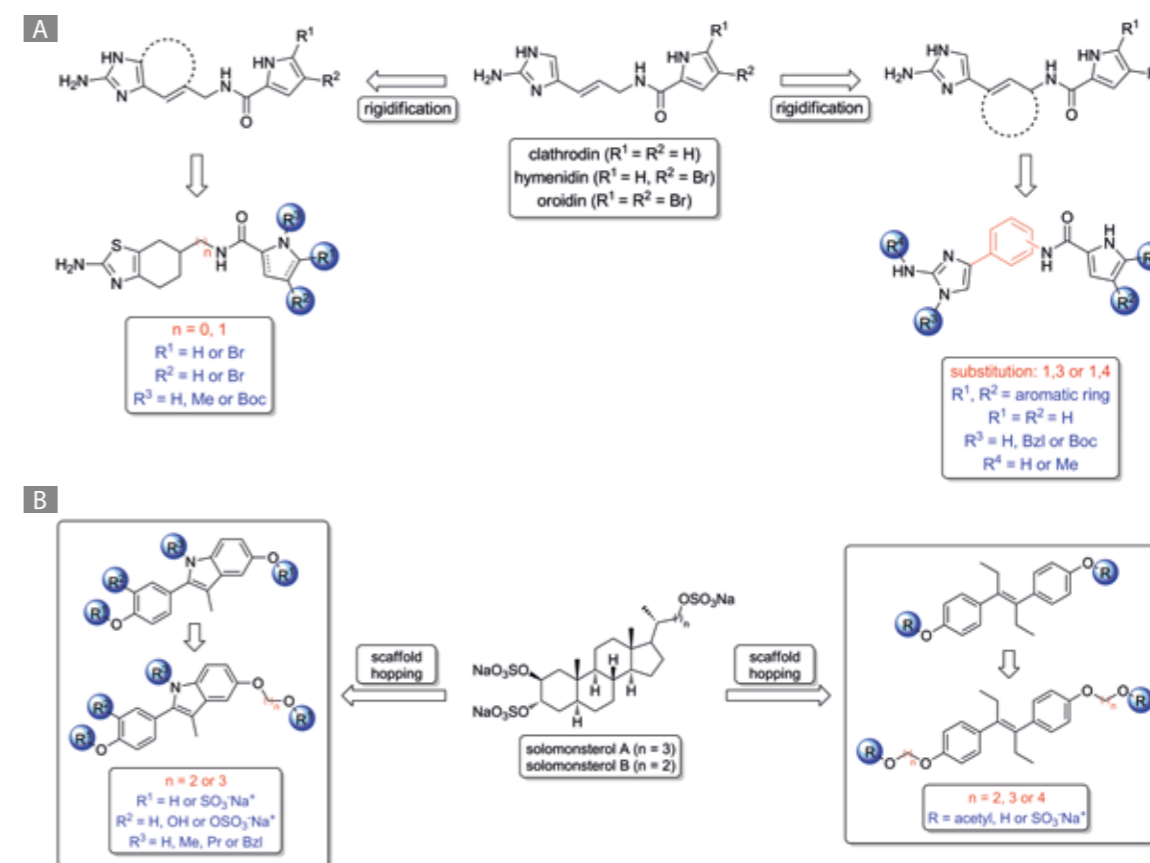


Figure 1. Synthesised and biologically evaluated analogues of bioactive compounds from marine sponges of the genera (A) *Agelas* and (B) *Theonella*.

Transactivation experiments in HepG2 cells revealed that in contrast to pregnane X receptor (PXR) agonists, solomonsterol A and solomonsterol B, which were isolated from the marine sponge *Theonella swinhoei*, their bazedoxifene scaffold-based steroidomimetic analogues act as potent PXR antagonists. The SAR study pointed out an important role of hydroxy groups as hydrogen bond donors for the PXR antagonistic activity of bazedoxifene-based analogues of solomonsterols A and B. In addition to the down-regulation of PXR expression, two most potent PXR antagonists from the series (IC₅₀ = 11 μM and 14 μM) exhibited an inhibition of PXR-regulated CYP3A4 expression, which illustrates their potential to suppress PXR-regulated phase I drug metabolism. With the aim to further evaluate the steroidomimetic approach towards design of novel PXR modulators, we have designed diethylstilbestrol analogues using the solomonsterols A and B, as well as our bazedoxifene scaffold-based PXR antagonists as parent compounds. O-Methyl diethylstilbestrol analogue displayed a potent PXR agonistic activity with EC₅₀ value of 11 μM, while some of the analogues exhibited PXR antagonistic effects in a low micromolar range. In contrast to previous studies, the concentration-response experiment displayed a dose-dependent PXR antagonistic activity for diethylstilbestrol itself (IC₅₀ = 15 μM), which was additionally confirmed by the diethylstilbestrol-promoted inhibition of PXR-regulated CYP3A4 expression. The real-time polymerase chain reaction experiments further revealed that O-hydroxypropyl analogue of diethylstilbestrol inhibits the PXR-regulated CYP3A4 expression, while O-methyl diethylstilbestrol analogue induces the CYP3A4 expression. Additionally, the PXR antagonistic activities of diethylstilbestrol and its O-hydroxypropyl analogue outlined the importance of hydroxy groups as potential hydrogen bond donors for PXR antagonism, which complies with the results of our bazedoxifene scaffold-based PXR antagonists. To summarize, biological activities of synthesised analogues have confirmed that marine sponges from the genera *Agelas* and *Theonella* represent a rich source of biologically active secondary metabolites that can serve as promising parent compounds for the development of new therapeutic lead compounds.

Dr. MIHA SKVARČ

Znanost za dobro bolnikov

*Dr. Miha Skvarč se je leta 1997 vpisal na Medicinsko fakulteto v Ljubljani in leta 2004 diplomiral. Med študijem je bil demonstrator pri predmetu Mikrobiologija na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer se je srečal z bakterijo *Helicobacter pylori*. Po končanem študiju se je kot mladi raziskovalec zaposlil na omenjenem inštitutu in še naprej raziskoval bakterijo *H. pylori*. Konec leta 2013 je pod mentorstvom prof. dr. Bojana Tepeša in prof. dr. Alojza Ihana dokončal in zagovarjal doktorsko nalogo, v kateri je raziskoval vlogo katepsina X pri patogenezi okužbe z bakterijo *H. pylori*. Je vodja Laboratorija za parazitologijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo.*



Dr. Miha Skvarč na vprašanje, katero je njegovo prednostno področje raziskovanja, odgovarja, da jih je več, prav vsa pa so tako ali drugače povezana s strokovnim kliničnim delom, ki ga opravlja kot specialist klinične mikrobiologije. »Med specializacijo sem odkril področja, ki so bila v raziskovalnem smislu zanemarjena, sam pa sem v njih videl izziv. Temeljno vprašanje, ki sem si ga postavil, je bilo, kako jih razviti, da bi pomagali bolnikom.« Kot pojasnjuje, ga v zadnjem času najbolj zanima, kako hitro in čim bolj racionalno diagnosticirati bakterijsko okužbo pri hudo bolnem posamezniku, ki je okužbo pridobil doma ali v bolnišnici. »Med drugim me zanima imunski odziv na bakterijo *H. pylori*, kakšno vlogo ima pri razvoju raka želodca imunski sistem in kakšno *H. pylori*. Tretje področje zanimanja pa so okužbe s paraziti, še posebej pri ljudeh s pomanjkljivim imunskim odzivom.«

Svoje zgodnje raziskovalno delo je posvetil prav bakteriji *H. pylori*, s katero se lahko človek okuži že zelo zgodaj. »Če je iz želodca ne odstranimo pravočasno s pomočjo antibiotikov, lahko vnetje ob kronični okužbi pripelje do razvoja raka na želodcu.« Ugotovitve, zbrane v doktorski nalogi, razkrivajo delček tega procesa. »Naloga ponuja vpogled v delovanje katepsina X in razvoj njegovega inhibitorja, kar bi lahko vplivalo na zdravljenje raka želodca. Proučevanje delovanja katepsina X so začeli na Fakulteti za farmacijo in ga še danes intenzivno raziskujejo.«

Za raziskovalno delo pravi, da je in ni zahtevno. »Izziv, novo spoznanje je močan aktivator in občasno zahteva tudi nočno ali celodnevno delo. Dobre zamisli pa pogosto priletijo od nikoder, lahko na kolesu, med tekom ali pri igri z otroki,« razmišlja nagrajenec za posebne dosežke, ki v Krkinih nagradah vidi redko priložnost, da lahko mlad človek na začetku raziskovalne poti svoje delo predstavi tudi širši javnosti. »Krkin nagrada potrjuje naše dosežke, ki smo jih objavili v več člankih, obenem pa je to priznanje širše strokovne javnosti, da delamo dobro in da imamo dobre zamisli.«

Vloga katepsina X pri patogenezi okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*

MIHA SKVARČ, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Bojan Tepeš, Abakus Medico, d. o. o., Diagnostični center Rogaška, Rogaška Slatina

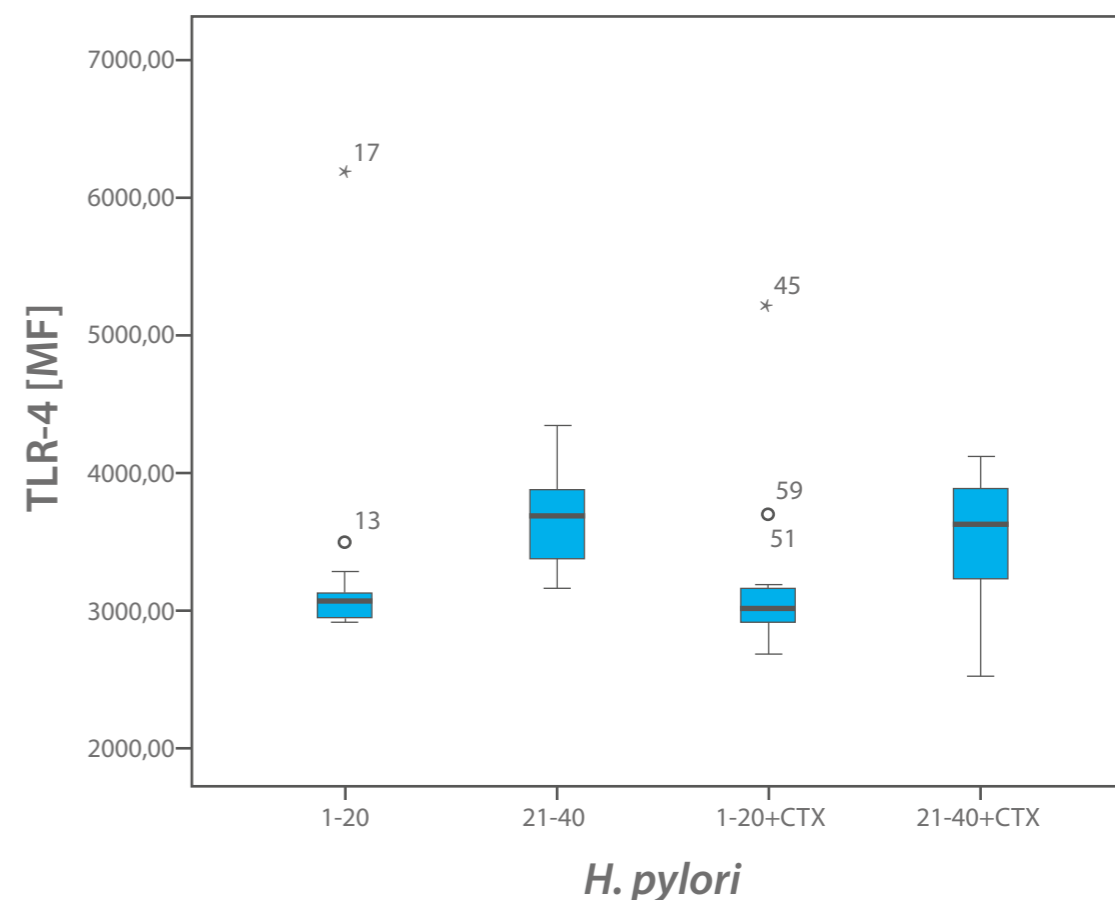
Somentor: Alojz Ihan, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Katepsin X je lizosomska cisteinska proteaza, ki se primarno izraža v monocitih in makrofagih. Povečane nivoje katepsina X so v tkivu želodčne sluznice prvič našli leta 2004 pri posameznikih, ki so bili okuženi z bakterijo *Helicobacter pylori* ali pa so oboleli zaradi želodčnega raka. V želodčni sluznici bolnikov, okuženih s *H. pylori*, so našli več katepsina X kot pri zdravih posameznikih. Katepsin X je vplival na zorenje dendritičnih celic prek povezave z receptorjem Mac-1 (Macrophage 1 antigen). Zorenje dendritičnih celic je ključni dejavnik za razvoj uspešnega imunskega odziva na okužbo.

Uporaba antigenskih pripravkov sevov s *H. pylori* okuženih bolnikov, ki so odporni proti terapiji (antigeni TRS), pri spodbujanju celic THP-1 (makrofagna celična linija) je povzročila manjše izražanje katepsina X na membranah teh celic v primerjavi z njihovim spodbujanjem z antigenskimi pripravki sevov *H. pylori* bolnikov, občutljivih za terapijo (antigeni TSS). Antigenski pripravki TSS so bolj imunogeni. V primerjavi z antigenskimi pripravki TRS smo v supernatantu celic THP-1 zaznali večje koncentracije provnetnih citokinov IL-12 in IL-6.

Ko smo vpliv sevov bakterije *H. pylori*, izoliranih iz vzorcev bolnikov, ki so imeli težave z odstranitvijo te bakterije iz želodčne sluznice, proučevali neodvisno od odpornosti proti klaritromicinu, smo ugotovili, da sevi vplivajo na zorenje celic monocitne vrste (izoliranih iz levkocitne raztopine krvodajalcev) v dendritične celice. Zorenje je bilo upočasnjeno. Molekul HLA-DR, CD86, TLR-2 in IL-8 je bilo manj, kot če bi celice monocitne vrste spodbujali s sevi, izoliranimi iz vzorcev bolnikov, ki niso imeli težav z odstranitvijo bakterije iz želodca. Če smo dodali inhibitor katepsina X 2F12, so se koncentracije IL-6 zmanjšale, ko smo celice monocitne vrste spodbujali s sevi bolnikov, ki so imeli težave z odstranitvijo bakterije.

Če smo celice THP-1 spodbujali s sevi bakterije *H. pylori* bolnikov, ki so imeli zaradi nastanka odpornosti proti klaritromicinu težave z odstranitvijo te bakterije iz želodca, so celice THP-1 na svojih membranah izražale več receptorjev TLR-4. Obenem so sevi *H. pylori*, odporni proti klaritromicinu, povzročili, da so celice THP-1 izražale manj provnetnih citokinov kot sevi, občutljivi za klaritromicin. Če smo dodali inhibitor katepsina X 2F12, se je vpliv na TLR-4 še bolj izrazil, celice THP-1 pa so izražale več TLR-4 in manj je bilo provnetnih citokinov. Dendritične celice, vzgojene iz monocitov bolnikov, smo okužili s *H. pylori*, ki smo jih izolirali iz istih bolnikovih biopsij želodčne sluznice. Ekspresija TLR-2 in TLR-4 na dendritičnih celicah je bila povečana, če smo poleg spodbujanja dendritičnih celic s sevi *H. pylori* uporabili inhibitor katepsina X 2F12.



Slika 1. Izražanje TLR-4 (MFI) na celicah THP-1 ob spodbujanju s sevi bakterije *H. pylori* ali s sevi bakterije *H. pylori* in inhibitorjem katepsina X. Sevi 1–20 so občutljivi za klaritromicin, sevi 21–40 so odporni proti klaritromicinu, CTX je inhibitor katepsina X 2F12.

Katepsin X sodeluje že na začetku imunskega odziva, saj zagotavlja primerno fluidnost membrane in učinkovito fagocitozo. Ko njegovo delovanje zavremo, se aktivacija antigen predstavitevni celic lahko upočasni. Katepsin X vpliva na prirojeno imunost, in sicer na sistem predstavljanja antigenov s pomočjo TLR-receptorjev. Imunski odziv je že na začetku okrnjen, če je njegovo delovanje inhibirano. Antigen predstavitvene celice, kot so dendritične celice, izločajo manj provnetnih citokinov, kar omogoči prilagoditev bakterije *H. pylori* na razmere v želodcu in razvoj kronične okužbe z bakterijo. Ustvarijo se pogoji za zmanjšano fagocitozo imunskih kompleksov in zmanjšano predstavljanje antigenov ostalim celicam imunskega sistema. To je lastnost posameznih sevov bakterije *H. pylori*, ki se na ta način lahko prilagodijo in obstanejo v želodcu. Kakšno vlogo pa imajo pri tem lastnosti gostiteljevega imunskega sistema? Iz eksperimentov domnevamo, da so določeni posamezniki bolj nagnjeni k temu, da imunski odziv pri odstranitvi bakterije ni uspešen.

The Role of Cathepsin X in the Development of Infection with *Helicobacter Pylori*

MIHA SKVARČ, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: Bojan Tepeš, Abakus Medico, d. o. o., Diagnostic Center Rogaška, Rogaška Slatina

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

The immune response to *Helicobacter pylori* importantly determines the pathogenesis of infection as well as the success of antibiotic eradication of the bacteria. In the study we demonstrate the importance of cathepsin X, a cysteine protease, for the *Helicobacter pylori* eradication success. Cathepsin X is restricted to the cells of the immune system, predominantly monocytes, macrophages and dendritic cells. Cathepsin X was first linked to *H. pylori* in 2004. Higher levels of cathepsin X were found in immune cells of gastric carcinomas and in macrophages of gastric mucosa. Patients infected with *H. pylori* expressed more cathepsin X than the healthy control group.

The experiments on the THP-1 cell line with *H. pylori* strains confirmed the potential role of cathepsin X in the immune response to *H. pylori*. *H. pylori* antigens (Hp antigens) of patients that successfully eradicated the bacteria (TSS strains) increased the proportion of cathepsin X positive cells compared to Hp antigens of therapy resistant strains (TRS strains). Hp antigens of TSS induced higher secretion of IL-12 and IL-6 compared to Hp antigens of TRS.

The dendritic cells stimulated with *Helicobacter pylori* isolated from the patients with repeated antibiotic eradication failure expressed less HLA-DR, CD86, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin-8 (IL-8) compared to *H. pylori* strains susceptible to antibiotic therapy; the latter expressed the lower production of IL-10. Polymyxin B inhibition of lipopolysaccharide reduces IL-8 secretion in the group of *H. pylori* strains susceptible to antibiotic therapy. The differences in IL-8 secretion between both groups are lipopolysaccharide dependent, while the differences in secretion of IL-10 remain unchanged after lipopolysaccharide-inhibition. The inhibitor of cathepsin X 2F12 reduced the secretion of IL-6 and the secretion was significantly lower in the group of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with repeated antibiotic eradication failure.

The expression of TLR-4 molecules on the membranes of THP-1 cells or dendritic cells was higher when we stimulated cells with *H. pylori* together with the inhibitor of cathepsin X 2F12 compared to THP-1 cells or dendritic cells stimulated with *H. pylori* resistant/sensitive to clarithromycin, and also in comparison with negative control samples. We also demonstrated that when we inhibited the action of cathepsin X in THP-1 cells, the concentrations of pro-inflammatory cytokines were lower than when THP-1 cells were stimulated with *H. pylori* resistant/sensitive to clarithromycin. The strains of *H. pylori* resistant to clarithromycin stimulated more THP-1 cells to express TLR-4 on the membrane and the concentrations of pro-inflammatory cytokines in supernatant were lower in comparison to the strains that were sensitive to clarithromycin.

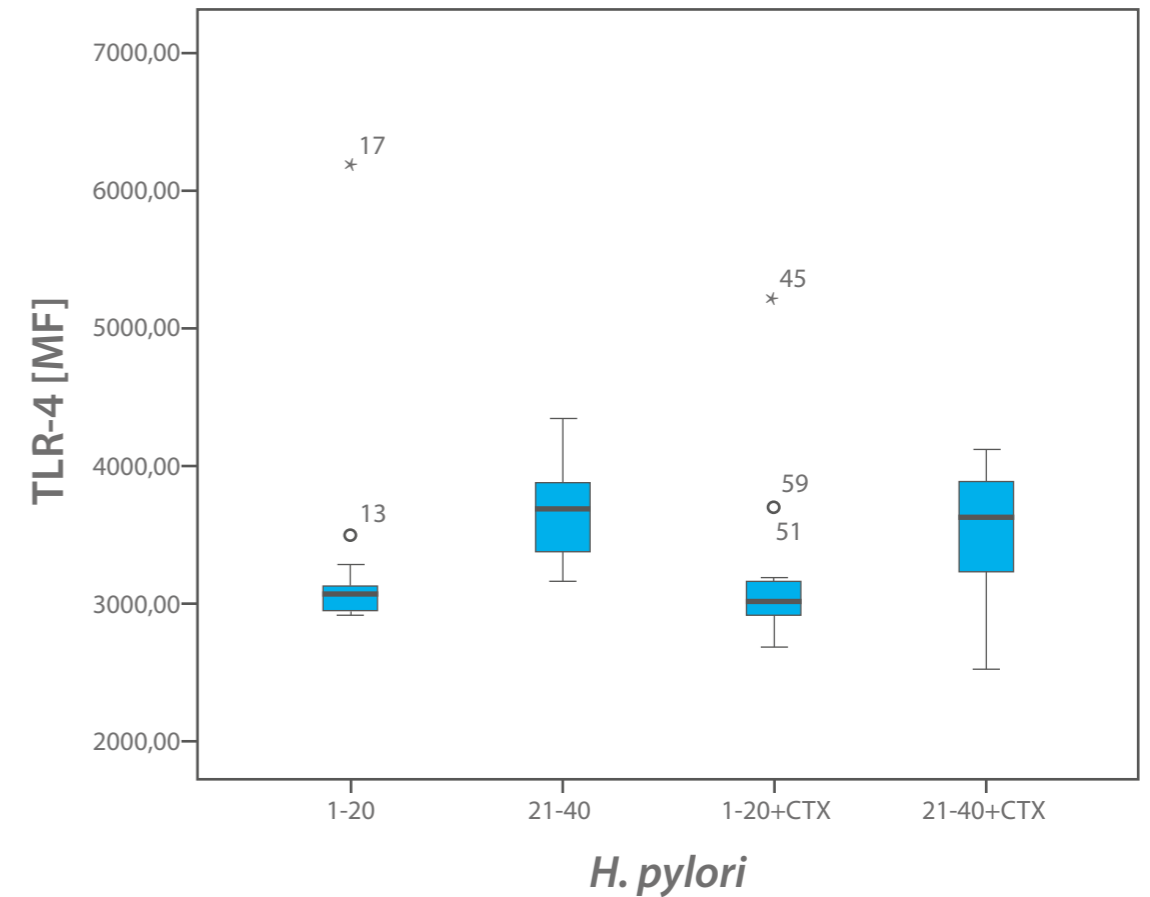


Figure 1. Expression of TLR-4 on THP-1 cells after stimulation with *H. pylori* or with *H. pylori* plus inhibitor of cathepsin X. 1-20 strains of *H. pylori* sensitive to clarithromycin, 21-40 strains of *H. pylori* resistant to clarithromycin, CTX inhibitor of cathepsin X 2F12.

We demonstrated that inhibition of cathepsin X influences the internalization of TLR-2 and TLR-4. The TLR-2 and TLR-4 redistribution to intra-cytoplasmic compartments is hampered if cathepsin X is blocked. The beginning of a successful immune response against *H. pylori* in the case of inhibition of cathepsin X inhibition is delayed. *H. pylori* may persist in the gastric mucosa and influences the development of gastric cancer. The individual's immune response may react inappropriately to *H. pylori*. One of the key players in this reaction may be cathepsin X.

Dr. MARKO ŠTEFANIČ

Z novim eksperimentalnim pristopom do pomembnih spoznanj



Dr. Marko Štefanič je osnovno šolo in gimnazijo obiskoval v Črnomlju, študij pa nadaljeval na ljubljanski Fakulteti za farmacijo. Za diplomsko nalogo z naslovom *Primerjava fizikalno-kemijskih lastnosti hidratov K-0805* pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla je leta 2005 prejel Krkino nagrado. Istega leta se je zaposlil v Krki in hkrati kot podiplomski študij vpisal program Biomedicina na Fakulteti za farmacijo. V doktorskem delu, ki ga je pripravil pod mentorstvom prof. dr. Marije Bogataj in somentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja, je raziskoval pomen kinetike prehoda gastrorezistentnih pelet skozi želodec v stanju na tešče za vrednotenje *in vitro* sproščanja ter *in vitro/in vivo* korelacijo.

Dr. Marka Štefaniča je že kot študenta zanimalo več področij in ne le eno, ozko usmerjeno. Zaposlitev na področju razvoja in raziskav v Krki mu je ponudila priložnost raziskovanja sproščanja zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik. Kot pravi, so mu študije raztapljanja pisane na kožo, saj gre za interdisciplinarno področje, kjer se prepletajo fizikalna in analitna kemija, farmacevtska tehnologija ter anatomija in fiziologija. »Poskusi sproščanja predstavljajo pomemben del tako razvoja izdelkov v raziskovalni fazi kot tudi kontrole kakovosti izdelkov. Gre za področje, ki je zlasti v generični industriji ključnega pomena za razvoj novih izdelkov.«

Kot pojasnjuje, je bil namen njegovega dela dobiti čim boljše *in vitro/in vivo* korelacijo, torej razviti eksperimentalne pogoje, s katerimi je mogoče kar najbolje ponazoriti sproščanje zdravilne učinkovine v gastrointestinalnem traktu *in vivo*. »Raziskovalno delo smo izvajali s peletami lansoprazola, za katere je značilno, da se v telesu obnašajo drugače kot tablete. Razvili smo nov eksperimentalni pristop k študiju sproščanja zdravilne učinkovine iz pelet, ki do sedaj še ni bil opisan v znanstveni literaturi.« Kot razlaga, je sproščanje gastrorezistentnih tablet specifično, saj se učinkovine ne smejo sproščati v želodcu, ampak v tankem črevesu. Ker iz želodca prehajajo v daljšem časovnem intervalu, so lahko izpostavljene različnim pogojem. »Klasičen pristop k študiju sproščanja učinkovin iz gastrorezistentnih pelet obsega izvedbo eksperimenta s samo enim časom zadrževanja v kislem mediju (posnemanje zadrževanja v želodcu), torej predpostavlja, da so vse pelete hkrati v želodcu in gredo vse hkrati iz želodca v tanko črevo. Mi smo ta pristop razširili in nadgradili, saj smo uporabili več različnih časov zadrževanja v kislem mediju.«

Po besedah Krkinega nagrajenca so v raziskovalnem delu opisana dognanja uporabna tudi v praksi, saj takšen pristop veliko bolje posnema resnično stanje. »Pristop je še posebej uporaben v generični farmacevtski industriji pri razvoju gastrorezistentnih pelet, kjer moramo iz nabora številnih formulacijskih poskusov izbrati primerne kandidata za nadaljnje študije na zdravih prostovoljcih. Ker so te študije drage in zamudne, lahko z dobrimi metodami sproščanja prej razvijemo pravo farmacevtsko obliko, s katero poskušamo čim prej prodreti na trg,« še razloži in doda, da mu izzivov na delovnem mestu gotovo ne bo zmanjkalo. Zdaj, ko je podiplomski študij uspešno končan, mu bo ostalo nekaj več časa tudi za družino in športne dejavnosti, ki jih je zaradi številnih obveznosti nekoliko zapostavljal.

Pomen kinetike prehoda gastrorezistentnih pelet skozi želodec v stanju na tešče za vrednotenje *in vitro* sproščanja ter *in vitro/in vivo* korelacijo

MARKO ŠTEFANIČ, Krka, d. d., Novo mesto

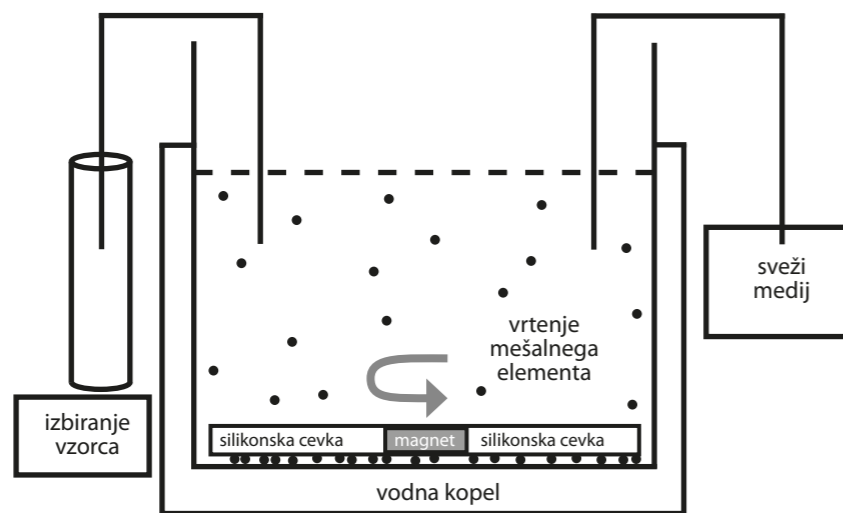
Mentorica: Marija Bogataj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Prehod peroralnih farmacevtskih oblik skozi gastrointestinalni trakt (GIT) lahko znatno vpliva na absorpcijo in biološko uporabnost zdravil. Praznjenje želodca je kritični faktor pri prehodu peroralnih farmacevtskih oblik skozi GIT. Čas prehoda je še posebej pomemben za gastrorezistentne farmacevtske oblike, tako za tablete kot za pelete. Za oboje velja, da začnejo zdravilno učinkovino sproščati, ko preidejo iz kislega okolja želodca v tanko črevo, kjer je pH višji. Za proces praznjenja pelet iz želodca na tešče je značilno, da poteka dalj časa. Kadar je sproščanje v posameznih delih GIT različno, lahko pelete, ki ostanejo v želodcu do naslednje periode praznjenja, sproščajo zdravilno učinkovino z drugačno kinetiko kot pelete, ki so že zapustile želodec.

V okviru raziskovalnega dela smo želeli ob upoštevanju postopnega praznjenja pelet iz želodca na tešče napovedati *in vivo* sproščanje iz gastrorezistentnih pelet in postaviti dobro *in vitro/in vivo* korelacijo (IVVC) s povprečnimi absorpcijskimi profili, ki smo jih izračunali iz plazemskih profilov farmakokinetične študije v stanju na tešče.

Eksperimentalno delo je potekalo z gastrorezistentnimi peletami z lansoprazolom, ki so bile vgrajene v orodisperzibilne tablete oblike A in B. Pri poskusih sproščanja smo se osredotočili na vpliv različnega časa zadrževanja v kislem mediju na sproščanje v fosfatnem pufru s pH 6,8. V prvem sklopu raziskovalnega dela smo poskuse izvajali z aparaturom USP 4 oziroma s pretočno celico ob povprečni hitrosti pretoka 5,5 in 11 ml/min, v nadaljevanju pa z nefarmakopejskim pretočnim sistemom FFA 2, ki nam je omogočal izvedbo poskusov v bolj biorelevantnih pogojih (slika 1).



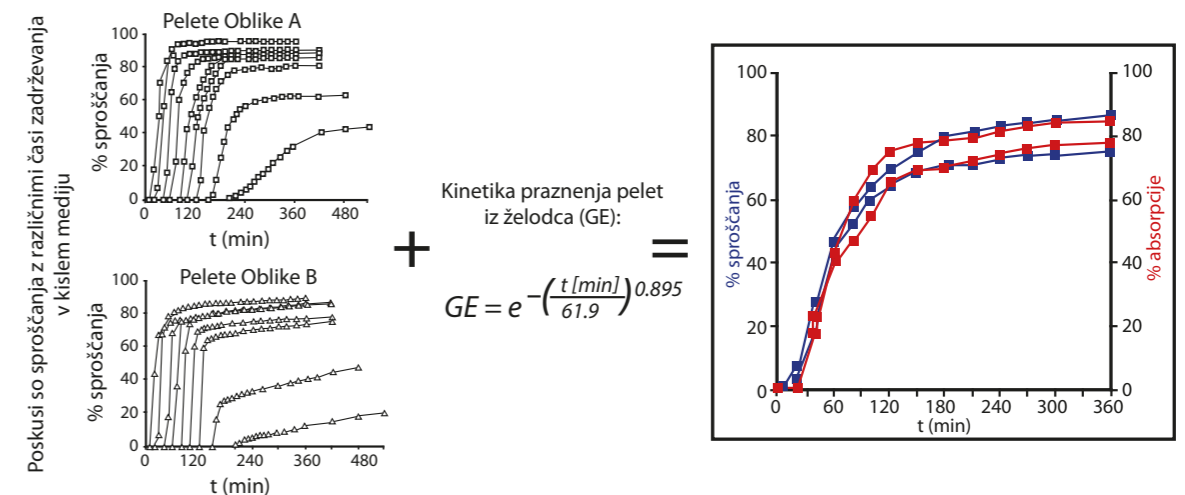
Slika 1. Shema delovanja pretočnega sistema FFA 2. Črni krogi na dnu delovne čaše in v čaši predstavljajo gastrorezistentne pelete.

Pri pretočnem sistemu FFA 2 smo uporabili novo vrsto mešalnega elementa, ki ga je sestavljala silikonska cevka z magnetom na sredini. Z vrtenjem mešalnega elementa, ki je bil v fizičnem stiku s peletami na dnu delovne čaše, smo posnemali gibanje pelet *in vivo* ter njihovo izpostavitv mehanskim obremenitvam.

Z uporabo različnih časov zadrževanja v kislem mediju smo tako pri USP 4 kot pri pretočnem sistemu FFA 2 ponazarjali postopno praznjenje pelet iz želodca in vpliv na sproščanje.

V okviru raziskovalnega dela smo vrednotili tudi gastrorezistenco obeh farmacevtskih oblik v različnih kislih medijih (0,1 M HCl, umetni želodčni sok s pH 2,0 in 0,001 M HCl). Daljši, kot je bil pri poskusih gastrorezistence stik pelet s kislim medijem, manj nerazpadlega lansoprazola je ostalo v peletah, pri čemer je bila ta odvisnost bolj izrazita z naraščajočim pH kislega medija, razpad pa je bil obsežnejši pri obliki B.

Pri vrednotenju sproščanja z USP 4 in v različnih eksperimentalnih pogojih se je odrazil velik vpliv časa zadrževanja v kislem mediju na poznejše sproščanje v fosfatnem pufru s pH 6,8. Tudi pri poskusih sproščanja so bile pelete oblike B bolj občutljive za kislino okolje kot pelete oblike A, razlike med oblikama pa so se povečevale s podaljševanjem časa izpostavljenosti simuliranemu želodčnemu mediju. Z rezultati sproščanja, ki smo jih dobili po samo enem fiksnem času zadrževanja v kislem mediju, kar je običajen pristop v farmakopejah in znanstveni literaturi, nismo mogli dobiti dobre IVVC. Ko pa smo s pomočjo matematičnega modela in z upoštevanjem celotnega sklopa rezultatov sproščanja izračunali napovedana profila *in vivo* sproščanja oblik A in B, sta se oba dobro ujemala s povprečnima *in vivo* absorpcijskima profiloma obeh oblik. Dobro IVVC smo postavili tako z rezultati sproščanja z uporabo USP 4 in pretokom 11 ml/min kot tudi z rezultati sproščanja na pretočnem sistemu FFA 2 v bolj biorelevantnih pogojih in ob pretoku 3 ml/min. S povečano fizično obremenitvijo pelet, ki smo jo povzročili z mešalnim elementom, smo kompenzirali manjši pretok v primerjavi z USP 4. Primerjava rezultatov sproščanja, ki smo jih dobili z dvema zelo različnima aparaturama, je omogočila dodaten vpogled v obnašanje obeh oblik ter izboljšala napovedno moč za njuno obnašanje *in vivo*.



Slika 2. Shematski prikaz izračuna napovedanega profila *in vivo* sproščanja iz rezultatov sproščanja oblik A in B (USP 4, pretok 11 ml/min) ter primerjava z *in vivo* absorpcijskima profiloma obeh oblik.

The Importance of Gastric Emptying Kinetics of Enteric Coated Pellets in Fasted State for *In Vitro* Release and *In Vitro/In Vivo* Correlation

MARKO ŠTEFANIČ, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

The absorption and bioavailability of drugs can be substantially affected by the transit of dosage forms through the gastrointestinal tract (GIT). Gastric emptying is one of the most critical parameters of transit of dosage forms through the GIT. Transit time is especially important for the delayed release dosage forms, tablets and pellets. The release of the drug from both types of delayed release dosage forms begins when the dosage form passes pylorus and comes into contact with the medium with a higher pH in the small intestine. Gastric emptying of pellets from the fasting stomach takes place over a wide time interval, they are not emptied all at once. In case of different release kinetics from pellets along the GIT, pellets that remain in the stomach by the next period of gastric emptying can release the drug with different kinetics than the pellets that have already been emptied from the fasting stomach.

In the scope of our research work we tried to predict the *in vivo* dissolution from enteric coated pellets for the population with the consideration of gastric emptying kinetics of pellets from the fasting stomach, and to establish a good *in vitro/in vivo* correlation (IVIVC) with the mean *in vivo* absorption profiles, obtained in a pharmacokinetic study under fasting conditions.

The experimental work was carried out using enteric coated pellets containing lansoprazole and formulated as orodispersible tablets of the Formulation A and Formulation B. Dissolution experiments were focused on the influence of several residence times in an acidic medium on the dissolution in phosphate buffer pH 6.8. In the first part of the research work, the dissolution experiments were performed using a USP 4 – a flow-through cell with a flow rate of 5.5 and 11 ml/min. In the second part of the research work, the dissolution experiments were performed with a non-compendial flow-through system FFA 2 that enabled more biorelevant dissolution conditions (Figure 1).

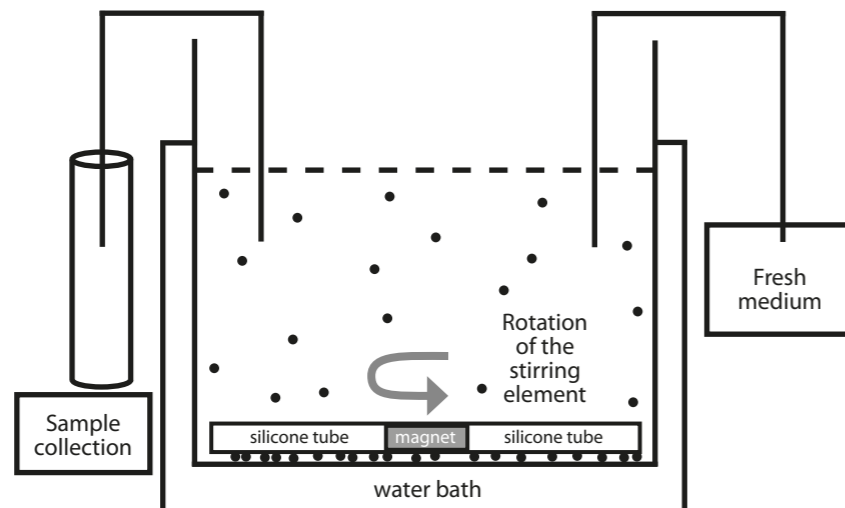


Figure 1: Schematic representation of the non-compendial flow-through system FFA 2. Full circles in the medium and on the bottom of the beaker represent enteric coated pellets.

A novel stirring element, composed from the magnet inserted in a silicone tube was used in case of the flow-through system FFA 2. Rotation of the stirring element, which was in contact with the pellets on the bottom of the working beaker, was used to mimic the movement of the pellets in the gastrointestinal tract and their exposure to physical stress.

Gradual gastric emptying of the pellets from the fasting stomach and an effect on the dissolution properties was simulated with the use of several residence times in an acidic medium in both cases, using USP 4 and with flow-through system FFA 2.

The gastroresistant properties of both formulations in different acidic media (0.1M HCl, simulated gastric fluid pH 2.0 and 0.001M HCl) were also evaluated in the scope of the research work. The amount of the intact lansoprazole remained in the pellets during the gastroresistance test decreased with prolongation of residence time of the pellets in the acidic medium, which was more pronounced at a higher pH of the acidic medium. A larger portion of lansoprazole disintegrated in the case of the Formulation B.

When USP 4 and different experimental conditions were used, there was a substantial effect of time of exposure to acidic medium on dissolution results in phosphate buffer pH 6.8. Pellets of the Formulation B were more susceptible to the acidic conditions than pellets of the Formulation A also during the dissolution experiments and the differences between both formulations increased with prolongation of residence time in the simulated gastric medium. We could not establish a good IVIVC with the dissolution results obtained after only one fixed residence time in the acidic medium which is a common approach according to pharmacopoeias and scientific literature. On the other hand, good agreement was achieved between the mean *in vivo* absorption profiles and the predicted *in vivo* dissolution profiles of both formulations which were calculated on the basis of experimentally determined dissolution profiles and the mathematical model of pellets' gastric emptying. A good IVIVC was obtained using the USP 4 and flow rate 11 ml/min as well as with the use of the non-compendial system with more biorelevant conditions and the flow rate of 3 ml/min. The increased physical load on the pellets induced by the rotating stirring element compensated for the decrease of the flow rate from 11 ml/min using the USP 4 to 3 ml/min using the non-compendial system. A comparison of the dissolution results obtained with two different systems provided an additional insight into the product behaviour and improved the prediction of *in vivo* performance.

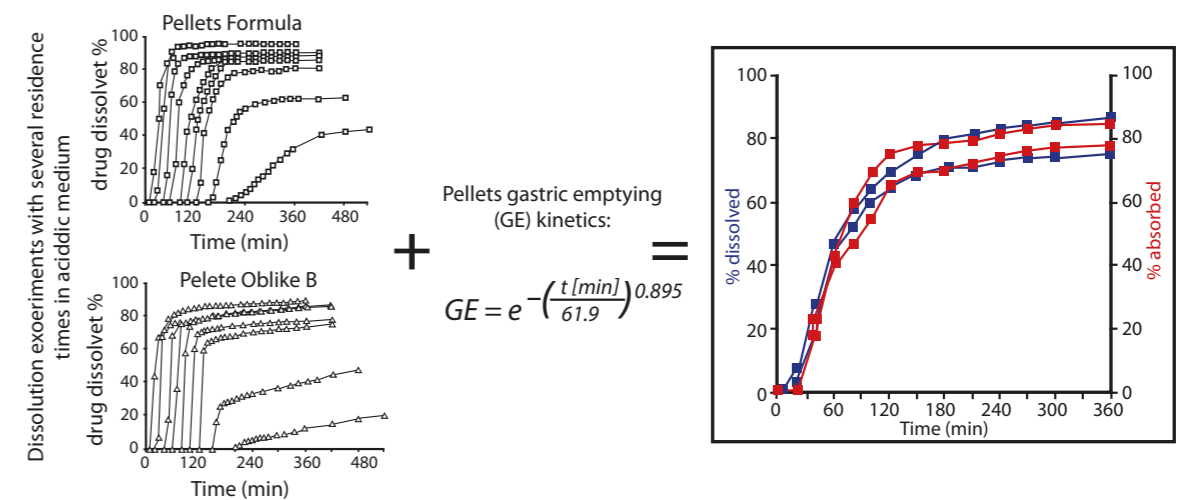


Figure 2: Schematic representation of the calculation of the predicted *in vivo* dissolution profiles from dissolution results of Formulations A and B (USP 4, flow rate 11 ml/min) and comparison with mean *in vivo* absorption profiles of both formulations.

ŠPELA ZUPANČIČ

Delo v laboratoriju je izziv za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja



Špela Zupančič se je po končani Gimnaziji Kočevje vpisala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. V času študentske izmenjave v okviru Erasmusa se je na University College London, School of Pharmacy, resneje posvetila raziskovalnemu delu in ga pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek in dr. Satyanarayane Somavarapuja nadgradila v magistrsko delo z naslovom Izdelava in vrednotenje nanodostavnega sistema s kurkuminom za inhaliranje. V zgodovino Krkinih nagrad se je zapisala kot prva prejemnica Krkine nagrade za posebne dosežke na magistrskem študiju. Sedaj je kot mlada raziskovalka zaposlena na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo, kjer pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl na doktorskem študiju raziskuje multifunkcionalnost nanovlaken.

Zanimanje za naravoslovje in znanost je Špela Zupančič kazala že kot srednješolka, ko je v kočevski kemični tovarni Melamin поближе spoznala raziskovalno delo. Sprva široko polje zanimanja se je med študentsko izmenjavo v Londonu zožilo na področje farmacevtske tehnologije, ki jo je takoj prevzela. »Usmerila sem se v izdelavo in vrednotenje nanodostavnih sistemov. Pri magistrskem delu sem izdelovala liposomom podobne vezikle iz dekalinija, DQAsome, ki predstavljajo novorazvito formulacijo, v katero smo vgradili kurkumin. Na *in vitro* modelih se je pokazal potencial za lokalno dostavo v pljuča in ciljanje mitohondrijev.«

Kot poudarja, gre za inovativen pristop, ki na več različnih ravneh ponuja možnosti za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja s kurkuminom. »Ta je do sedaj v raziskavah sicer pokazal številne pozitivne učinke, a so klinične raziskave potrdile le majhno učinkovitost po peroralnem vnosu.« Kot še razloži mlada raziskovalka, nanodostavni sistemi prinašajo velik potencial za ciljano dostavo učinkovin ne le v določene celice, ampak tudi v celične organele. »Ta pristop lahko izboljša učinkovitost zdravljenja, vendar bo potrebnih še veliko raziskav, preden bi se lahko implementiral v praksi.«

Svoje dosedanje izkušnje in znanje nadgrajuje na doktorskem študiju. Posvetila ga je razvoju novih multifunkcionalnih nanovlaken, ki bi lahko prispevala k učinkovitejšemu zdravljenju periodontalne bolezni. »Svoje delo v laboratoriju jemljem kot izziv za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja in svoj prispevek družbi. Čeprav je raziskovalno delo izredno zanimivo in izpopolnjujoče, je včasih tudi precej težavno, vendar sem vesela, da lahko delam to, kar me veseli.«

V Krkinih nagradah vidi pomemben in predvsem potreben povezovalni element med akademskim svetom in gospodarstvom. Za mlade raziskovalce so po njenem mnenju pomembna priložnost za potrditev inovativnosti raziskav in aplikativnosti znanja, s tem pa trdno izhodišče za uspešno nadaljevanje kariere. »Kot prejemnica Krkine nagrade sem izredno počaščena. Za trud, ki sem ga vložila v svoje delo, sem prejela zelo ugledno priznanje, ki mi bo velika spodbuda za nadaljnje inovativne in poglobljene raziskave.«

Izdelava in vrednotenje nanodostavnega sistema s kurkuminom za inhaliranje

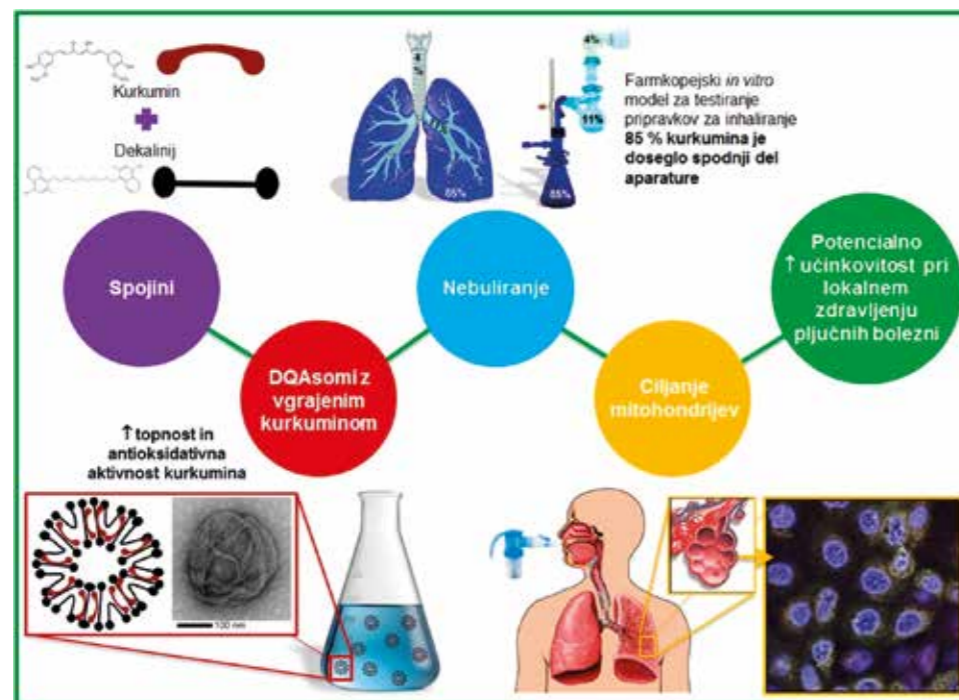
ŠPELA ZUPANČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Petra Kocbek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Satyanarayana Somavarapu, School of Pharmacy, University College London

Številne raziskave so pokazale, da ima kurkumin zaradi antioksidativnega, protitumornega in protivnetnega delovanja velik potencial za zdravljenje pljučnih bolezni, kot so pljučni rak, akutna poškodba pljuč, pljučna fibroza in astma. Njegova uporaba je za ljudi varna, vendar so v kliničnih raziskavah ugotovili majhno učinkovitost po peroralnem vnosu. Ta je odraz majhne biološke uporabnosti kurkumina, ki je posledica slabe vodotopnosti, majhnega obsega absorpcije, hitrega metabolizma in izločanja iz telesa. Tako ostaja velik izziv razvoj novih formulacij in farmacevtskih oblik, ki bodo povečale učinkovitost zdravljenja s kurkuminom.

Namen naše raziskave je bil izboljšati topnost kurkumina z vgrajevanjem v nanodostavni sistem DQAsome. To so liposomom podobne strukture iz dekalinija. Poleg tega smo želeli preveriti stabilnost formulacije ter *in vitro* preveriti njen potencial za lokalni vnos kurkumina v pljuča in sposobnost ciljne dostave v mitohondrije (slika 1).



Slika 1. Shema priprave in vrednotenja formulacije DQAsomov z vgrajenim kurkuminom za lokalno zdravljenje pljučnih bolezni.

DQAsome s kurkuminom smo uspešno izdelali z metodo tankega filma. Vsebnost kurkumina v DQAsomih je bila zelo velika (do 61 %), prav tako učinkovitost vgrajevanja (pribl. 90 %), neodvisno od molarne razmerja med dekalinijem in kurkuminom v formulaciji. Tako smo vodotopnost kurkumina povečali z 22 ng/ml na 9,3 mg/ml. Zeta potencial izdelanih DQAsomov je bil približno +50 mV, velikost DQAsomov pa je naraščala z vsebnostjo kurkumina v nanosistemu od 160 do 200 nm. Oblika DQAsomov

s kurkuminom je bila nepravilno kroglasta z na videz močno nagubano površino, medtem ko je bila oblika praznih DQAsomov pravilno okrogla. Zaradi razlik v morfologiji DQAsomov s kurkuminom in praznih DQAsomov ter velike učinkovitosti vgrajevanja smo predvidevali, da prihaja do specifičnih interakcij med dekalinijem in kurkuminom v nanodostavnem sistemu, kar smo tudi potrdili na podlagi spektrov infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo. Z X-žarkovno difrakcijo in diferenčno dinamično kalorimetrijo smo ugotovili amorfnost obeh sestavin v vzorcu, kar je lahko posledica vgrajevanja kurkumina v strukturo DQAsomov in/ali same liofilizacije.

Velikost in zeta potencial DQAsomov v disperziji se pri sobnih pogojih v časovnem obdobju 40 dni nista signifikantno spremenila, medtem ko sta se vsebnost in učinkovitost vgrajevanja zmanjšali za najmanj 20 %. Manjša, kot je bila vsebnost kurkumina v formulaciji, bolj so bili DQAsomi stabilni. Dokazali smo, da postopek priprave in staranje vzorca ne vplivata na antioksidativno aktivnost kurkumina v DQAsomih. Z vgrajevanjem kurkumina v nanodostavni sistem se je njegova antioksidativna aktivnost v primerjavi s samim kurkuminom v vodi celo izboljšala.

Velikost kapljic aerosola je ključnega pomena za uspešno dostavo učinkovine v pljuča, zato smo s farmakopejsko metodo preverjali lastnosti aerosola nebulirane formulacije DQAsomov. Disperzijo DQAsomov smo nebulirali z nebulatorjem na zračni tok in vrednotili dostavo v različna področja aparature, ki smo jo uporabili kot *in vitro* model dihalnega trakta. Tako smo na modelu proučevali odlaganje nebulirane formulacije v grlu ter zgornjem in spodnjem delu dihalnih poti. Kar 85 % dovedenega odmerka kurkumina je doseglo spodnji del aparature, ki je predstavljal spodnje dihalne poti. Rezultat potrjuje zelo dobre lastnosti formulacije DQAsomov za vnos z inhaliranjem. Z *in vitro* poskusi na celični liniji smo potrdili vstop DQAsomov v celice in dostavo kurkumina v mitohondrije, kar lahko izboljša njegovo farmakološko delovanje, saj so številne raziskave potrdile, da s ciljanim vnosom antioksidantov v mitohondrije povečamo njihovo učinkovitost.

Zaključimo lahko, da predstavlja izdelava DQAsomov s kurkuminom inovativen pristop k povečanju njegove topnosti in antioksidativne aktivnosti in da je vnos formulacije z nebuliranjem glede na rezultate *in vitro* raziskave potencialno učinkovit način za ciljno dostavo kurkumina v mitohondrije in povečanje njegove učinkovitosti pri lokalnem zdravljenju pljučnih bolezni.

Formulation and Characterization of Curcumin Loaded Nanodelivery System for Inhalation

ŠPELA ZUPANČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Petra Kocbek, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Satyanarayana Somavarapu, School of Pharmacy, University College London

Curcumin is a promising natural compound for the treatment of lung diseases, such as lung cancer, acute lung injury, lung fibrosis, and asthma, due to its antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties. Its application is safe for humans however, clinical studies revealed a low efficacy after oral administration because of its low bioavailability, resulting from poor aqueous solubility, low oral absorption, rapid metabolism and elimination from the body. Development of novel formulations and dosage forms, which would enhance efficacy of therapy with curcumin, thus remains a big challenge.

Our study aimed to improve the solubility of curcumin by its incorporation in a nanodelivery system i.e. DQAsomes. These are dequalinium-based liposome-like structure. We also aimed to investigate the stability of formulation, to evaluate *in vitro* its potential for the structures delivery of curcumin and to explore the ability of DQAsomes for the targeted delivery to mitochondria (Figure 1).

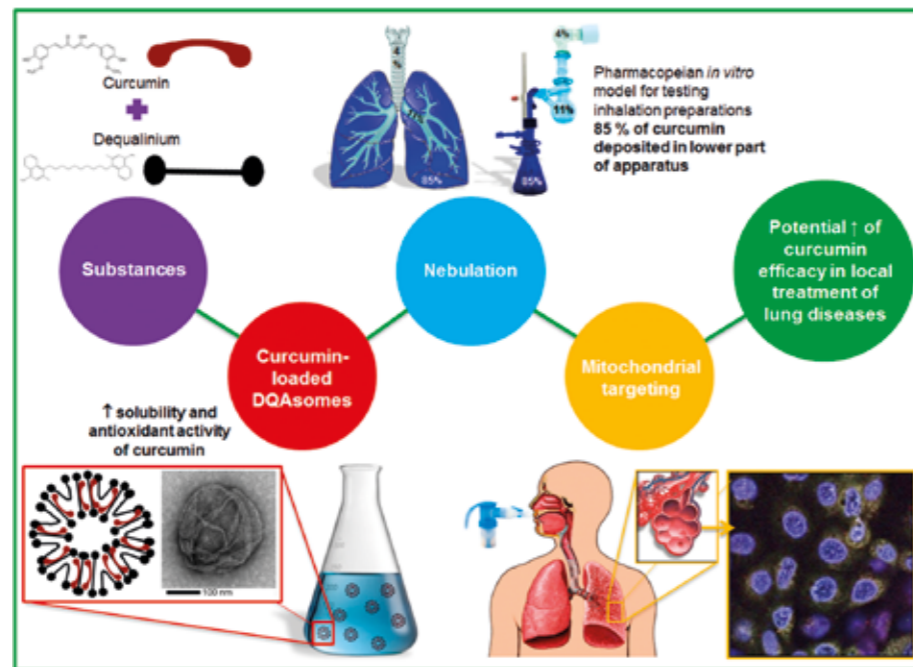


Figure 1: Scheme of preparation and characterization of curcumin-loaded DQAsome formulation for the local treatment of lung diseases.

Curcumin loaded DQAsomes were successfully prepared by the thin-film method. The drug loading (up to 61%) and also entrapment efficiency (~90%) were very high and independent of molar ratio between dequalinium and curcumin in formulation. The solubility of curcumin in water was thus improved from 22 ng/ml to 9.3 mg/ml. Zeta potential of prepared DQAsomes was ~+50 mV. Their average size increased with curcumin loading in the nanodelivery system from 160 to 200 nm. Plain DQAsomes were spherical, whereas curcumin-loaded DQAsomes exhibited different morphology i.e. irregularly spherical

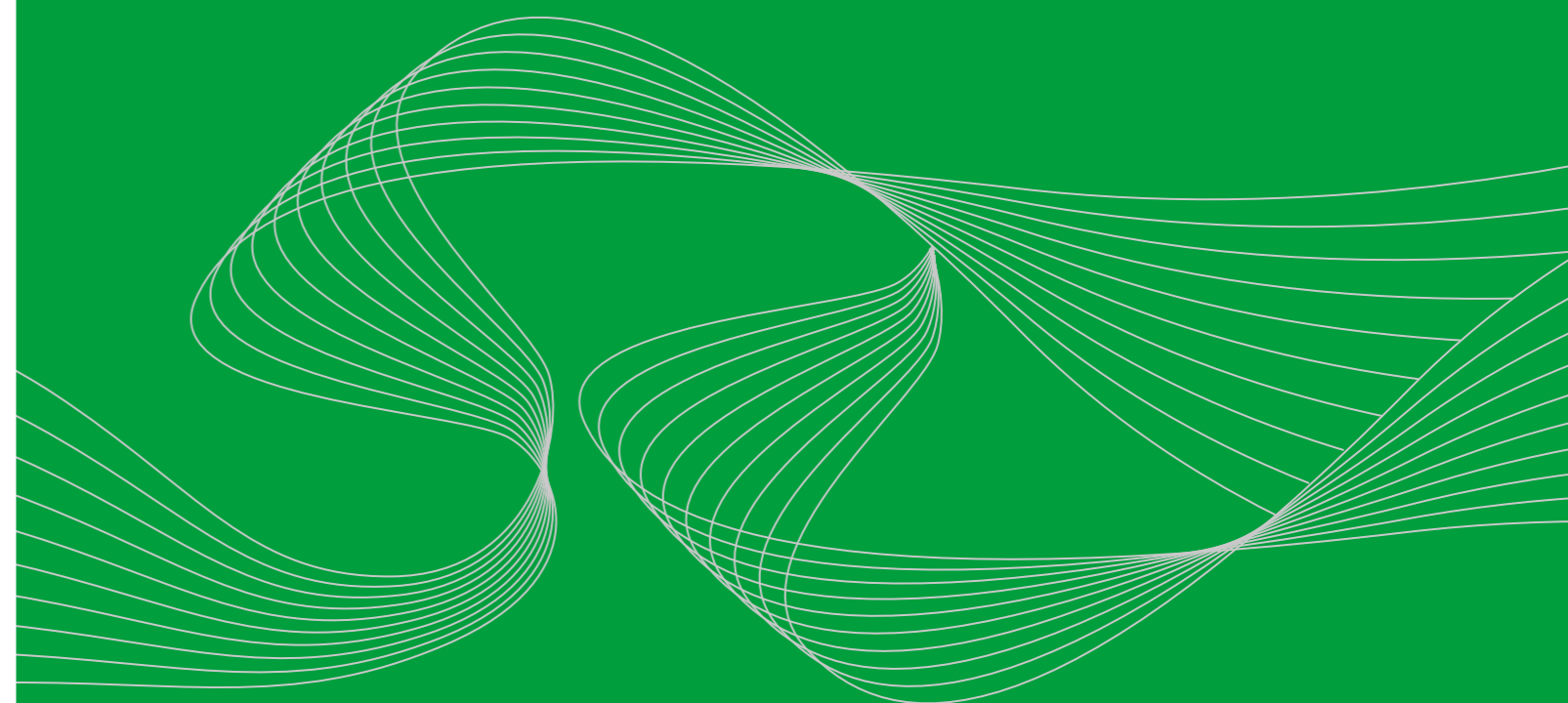
with a wrinkled surface. The differences in curcumin loaded and plain DQAsome morphology and high drug loading suggested the presence of specific interactions between curcumin and dequalinium in the nanodelivery system, being confirmed by spectra of Fourier-transform infrared spectroscopy. The X-ray diffraction and differential scanning calorimetry analysis revealed an amorphous state of both substances, namely curcumin and dequalinium, which could be due to curcumin incorporation in DQAsome structure and/or freeze-drying.

An average size and a zeta potential of DQAsomes in the dispersion remained unchanged at ambient conditions over 40 days, but the drug loading and encapsulation efficacy decreased by at least 20%. The lower drug loading in DQAsomes resulted in better physical stability of the formulation. It was shown that the preparation method and storage of curcumin-loaded DQAsomes did not affect antioxidant activity of curcumin in DQAsomes. Furthermore, the incorporation of curcumin in the nanodelivery system enhanced antioxidant activity of curcumin compared to curcumin in water.

The size of aerosol droplets is crucial for the successful delivery of the drug to the lungs, therefore, we used the pharmacopoeian method to examine aerosol properties of the nebulized DQAsome formulation. The dispersion of DQAsomes was nebulized by a jet nebulizer and the delivery to different parts of apparatus, used as an *in vitro* model of the respiratory tract, has been assessed. In this way, we studied the deposition of the nebulized formulation in the throat, upper and lower respiratory tract. As much as 85% of the delivered dose of curcumin was deposited in the lower stage of the apparatus, which represented lower airways. The results indicate exceptional inhalation properties of DQAsome formulation. The ability of DQAsomes to enter the cells and deliver curcumin in mitochondria was confirmed in an *in vitro* test using cell culture, thus indicating the ability to improve curcumin pharmacological activity, since many studies revealed better efficacy of the curcumin in the case of targeted delivery to mitochondria.

In conclusion, the formulation of DQAsomes with curcumin represents an innovative approach to increase curcumin solubility and antioxidant activity. Furthermore, the delivery of formulation by nebulization was, based on the *in vitro* results, shown to be a potentially effective way for improvement of its efficacy in the local treatment of lung diseases.

44.



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

Povzetki
Abstracts

Vplivi visoko avidnih protiteles proti β 2-glikoproteinu I in oksidativno spremenjenih naravnih protiteles na človeške endotelijske celice koronarne arterije, gojene *in vitro*

ANDREJ ARTENJAK, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Mentor: Borut Božič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: Saša Čučnik, Univerzitetni klinični center Ljubljana

V doktorski nalogi smo raziskali vplive visoko avidnih protiteles IgG proti β 2-glikoproteinu I (HAV anti- β 2GPI) in posttranslacijsko spremenjenih protiteles s pridobljeno imunoreaktivnostjo proti β 2GPI (oxlgG) na človeške endotelijske celice koronarnih arterij (HCAEC) z *in vitro* študijami izražanja vnetnih in koagulacijskih molekul. V ta namen smo optimizirali izolacijo antigena β 2GPI in HAV anti- β 2GPI. Ugotovili smo, da HAV anti- β 2GPI aktivirajo HCAEC *in vitro*, saj povečajo sproščanje kemotaktičnih in vnetnih citokinov (MCP-1, GRO α , IL-8, IL-6), ki je še povečano v okolju s prisotnim dejavnikom akutne faze (SAA). Sproščanje citokinov ima funkcionalen učinek, saj vodi k povečani migraciji mononuklearnih celic, izoliranih iz periferne venske krvi. Elektrooksidacija poveča imunoreaktivnost protiteles proti antigenu β 2GPI in različnim peptidnim fragmentom, ki ustrezajo sekvenčnim ali konformacijskim zaporedjem aminokislin različnih domen β 2GPI. *In vitro* študija je pokazala, da tudi oxlgG vplivajo patološko na HCAEC, saj povečajo sproščanje kemokinov (GRO α , IL-8), ki je še dodatno povečano v okolju s SAA ali TNF α . Rezultati poglobljajo razumevanje delovanja HAV anti- β 2GPI in oxlgG na disfunkcijo endotelija in odkrivajo nov pogled na zdravljenje avtoimunskih bolezni.

Influence of High Avidity Anti- β 2-glycoprotein I Antibodies and Oxidatively Modified Natural Antibodies on Human Coronary Artery Endothelial Cells Grown *In Vitro*

ANDREJ ARTENJAK, University Medical Centre Ljubljana
Supervisor: Borut Božič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: Saša Čučnik, University Medical Centre Ljubljana

The aim of the doctoral thesis was to evaluate the pathogenic effects of high avidity anti- β 2-glycoprotein I antibodies (anti- β 2GPI) and posttranslationally modified natural antibodies with acquired reactivity to β 2GPI (oxlgG) on human coronary artery endothelial cells (HCAEC) with *in vitro* studies of inflammatory and coagulation molecules expression. The first step was the isolation optimization of the antigen β 2GPI and HAV anti- β 2GPI. HAV anti- β 2GPI activated *in vitro* HCAEC and induced the release of chemotactic and inflammatory cytokines (MCP-1, GRO α , IL-8, IL-6). These effects were intensified in conditions with acute phase protein (SAA). The release of chemokines also had a functional impact, thus it increased the migration of peripheral blood mononuclear cells. The study with oxlgG showed that electro-oxidation increased the immunoreactivity of natural antibodies to β 2GPI and six different peptide fragments that correspond to sequence or conformational amino acids on different domains of β 2GPI. *In vitro* experiments on HCAEC demonstrated that oxlgG promote endothelial dysfunction as noted by the increased release of chemokines (GRO α , IL-8), which was further intensified in the presence of SAA or TNF α . Our results deepen the understanding of the effects of HAV anti- β 2GPI and oxlgG on an endothelium dysfunction and open a new insight into the treatment of autoimmune diseases.

Vpliv hipoksije na izražanje zelo ohranjenih regij genoma v tumorskem tkivu

JANA FERDIN, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Tanja Kunej, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentor: George A. Calin, M. D. Anderson Cancer Center, University of Texas

V hipoksičnih celicah so aktivirani ključni odzivi za zagotovitev metabolnih, bioenergetskih in redoks potreb celice. Primarni odziv na hipoksijo je sprožen s hipoksijo induciranimi transkripcijskimi dejavniki (HIF). Alfa podenota heterodimera HIF je občutljiva za O₂, vendar v njegovi odsotnosti postane stabilna in uravnava prepisovanje številnih genov, vpletenih v hipoksične poti. Določitev regulatorjev HIF1A in njegovih tarčnih genov je ključna za razumevanje celičnega in systemskega odziva na hipoksijo, vendar so te informacije zelo razpršene v številnih publikacijah. Kljub temu da je bila hipoksija že povezana s funkcijo miRNA, je zaenkrat malo znanega, kako vpliva na druge skupine nekodirajočih transkriptov. Namen te raziskave je bil na podlagi informacij iz publikacij izdelati Atlas regulatorne mreže gena HIF1A ter eksperimentalno potrditi nove tarče HIF1A. Za pet miRNA je bilo do sedaj že dokazano, da uravnajo izražanje HIF1A, medtem ko je analiza tarč HIF1A pokazala, da so vpletene v 21 različnih bioloških poti. V tej raziskavi je bila prvič dokazana tudi povezava med zmanjšano vsebnostjo O₂ in dolgimi prepisi zelo ohranjenih regij (T-UCR), imenovanih HINCUTs (hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts), ki se izražajo pretežno v jedru celice, HIF1A pa je vsaj deloma odgovoren za indukcijo prepisovanja nekaterih izmed njih. Atlas regulatorne mreže gena HIF1A bo omogočil pospešitev raziskav na tem področju, poleg tega pa naši rezultati predstavljajo prvi vpogled v nove funkcije omrežja hipoksije, ki ga sestavljajo protein kodirajoči in nekodirajoči prepisi RNA.

Influence of Hypoxia on Expression of Ultraconserved Genomic Regions in Tumor Tissue

Jana FERDIN, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: Tanja Kunej, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: George A. Calin, M. D. Anderson Cancer Center, University of Texas

In hypoxic cells important responses are activated for metabolic, bioenergetics, and redox demands and primary transcriptional response to hypoxia is mediated by the hypoxia-inducibile factors (HIFs). Alpha subunit of HIF heterodimer is O₂-sensitive, and once stabilized in hypoxia, it functions as a master regulator of various genes involved in hypoxia pathway. Identification of upstream HIF1A regulators and its downstream targets is essential for understanding the cellular and systemic response to hypoxia, however, information related to this topic is scattered among numerous publications. Even though recent data linked hypoxia to the function of specific miRNAs, very little is known on how hypoxia affects other types of noncoding transcripts. The aim of this study was to construct an Atlas of the HIF1A gene regulatory network integrating known information from publications and to experimentally validate a novel HIF1A target. Five miRNAs were previously identified to regulate HIF1A, while its downstream targets were suggested to be involved in 21 enriched pathways. Here we also demonstrated for the first time a functional link between O₂ deprivation and long transcripts of ultraconserved regions (T-UCRs), termed hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts (HINCUTs), which are predominantly nuclear and HIF1A is partly responsible for the induction of at least some of them. To conclude, the constructed Atlas of HIF1A gene regulatory network presents a central location of information that will accelerate research in this field; in addition, our data give a first glimpse of a novel functional hypoxic network composed of protein-coding transcripts and noncoding RNAs.

Proučevanje virusnih okužb pri kranjski čebeli (*Apis mellifera carnica*)

URŠKA JAMNIKAR CIGLENEČKI, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentor: Ivan Toplak, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Štirje najpogostejše ugotovljeni virusi pri kranjski čebeli so: virus akutne paralize (ABPV), virus črnih matičnikov (BQCV), virus kronične paralize (CBPV) in virus deformiranih kril (DWV). V raziskavi smo v štiriletnem obdobju na vzorcih čebeljih družin, ki niso kazale pravičnega razvoja, ugotavljali pogostost okužbe s temi virusi. V 97 % pregledanih vzorcev smo dokazali vsaj enega izmed preiskovanih virusov, v 75 % pregledanih čebeljih družin pa smo dokazali sočasne okužbe z več različnimi virusi. V enoletni čebelarški sezoni smo enkrat na mesec spremljali prisotnost ABPV, BQCV, CBPV in DWV pri zalegi, pri pašnih in pri panjskih čebelah v 18 zdravih čebeljih družinah. Pri zalegi smo v povprečju ugotovili manj preiskovanih virusov kot pri panjskih čebelah, pri panjskih čebelah pa manj kot pri pašnih čebelah. S filogenetskimi analizami smo potrdili, da sevi ABPV z območja Slovenije spadajo v več genetskih skupin in se razlikujejo od sevov ABPV po svetu. Na podlagi rezultatov smo razvili novo metodo RT-PCR v realnem času in jo optimizirali za hitro, zanesljivo in specifično določanje prisotnosti ABPV v preiskovanih vzorcih. Metoda omogoča dokazovanje sevov ABPV v Sloveniji in v drugih državah po svetu. V poskusu smo v laboratorijskih pogojih čebele delavke okužili s CBPV in spremljali njegovo razmnoževanje v okuženih čebelah, ugotavljali uspešnost različnih načinov okužbe (p/a, p/o) in proučevali vpliv CBPV na preživetje čebel.

Study of Viral Infections in Carniolan Honey Bee (*Apis mellifera carnica*)

URŠKA JAMNIKAR CIGLENEČKI, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: Ivan Toplak, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

The most frequently detected viruses in Carniolan honey bee are: acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV), chronic bee paralysis virus (CBPV) and deformed wing virus (DWV). The research describes the detection of ABPV, BQCV, CBPV and DWV in honey bee colonies that did not show normal development. 97% of the samples were infected with at least one of the investigated viruses and in 75% a simultaneous viral infection was detected. The samples of broods, young workers and forager bees were collected monthly throughout one beekeeping season in 18 healthy bee colonies, and the presence of viruses was compared. Broods were on average infected with the lowest number of the four investigated viruses in comparison to young workers and forager bees. With phylogenetic analysis we confirmed our hypothesis that the detected ABPV strains on the territory of Slovenia belong to several genetic groups and differ from ABPV strains elsewhere in the world. Based on the results of the ABPV phylogenetic analysis, a new real-time RT-PCR method was developed and optimized for fast, reliable and specific detection of ABPV in the investigated samples. The new real-time RT-PCR assay allows the detection of ABPV strains originating in Slovenia as well as in other countries. Experimental laboratory infection of Carniolan winter worker bees was conducted with CBPV in order to evaluate virus replication in infected bees. The replication of the virus was monitored after different methods of infection (p/a, p/o) and the impact of CBPV on the bee survival after infection was examined.

Priprava, karakterizacija in določevanje fizikalno-kemijskih lastnosti kokristalov flukonazola s karboksilnimi kislinami

JOŽE KASTELIC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Odon Planinšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Zdravilne učinkovine lahko obstajajo v različnih trdnih oblikah. Poleg priprave običajnih kristalnih oblik (polimorfov, hidratov oz. solvatov in soli) in amorfnih oblik se vedno bolj uveljavlja priprava kokristalov kot nove kristalne oblike. S poizkusi kokristalizacije zdravilne učinkovine flukonazola s farmacevtsko sprejemljivimi karboksilnimi kislinami, ki so v običajnih pogojih v trdni obliki, smo pripravili šest kokristalov flukonazola z malonsko, maleinsko, fumarno, jabolčno, glutarno in salicilno kislino, pri kokristalizaciji flukonazola z vinsko kislino pa je predvidoma nastala sol. Razen pri kokristalu z jabolčno kislino in soli z vinsko kislino nam je z metodo rentgenske difrakcije na monokristalih pri vseh ostalih kokristalih flukonazola uspelo določiti kristalne strukture. Pri nastanku kokristalov so bile ključne vodikove vezi med karboksilno skupino in heterocikličnim N-atomom triazolske skupine flukonazola. Iz rezultatov raztapljanja prahov, merjenja intrinzične hitrosti raztapljanja in higroskopsnosti je razvidno, da je s kokristalizacijo možno vplivati na fizikalno-kemijske lastnosti flukonazola. Pri kokristalu flukonazola z maleinsko kislino se kaže znatno povečanje hitrosti raztapljanja. Kokristala s fumarno in salicilno kislino sta nehigroskopna, medtem ko je higroskopsnost pri kokristalih z glutarno in maleinsko kislino ter pri soli z vinsko kislino povečana.

Preparation, Characterisation and Evaluation of Physico-Chemical Properties of Fluconazole Cocrystals with Carboxylic Acids

JOŽE KASTELIC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Odon Planinšek, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Active pharmaceutical ingredients exist in different solid forms. In addition to the preparation of common crystal forms (polymorphs, solvates/hydrates, salts) and amorphous forms, the preparation of cocrystals as a new crystal form has been increasingly used. In cocrystallization screening experiments of fluconazole with pharmaceutically acceptable carboxylic acids, which are solids at ordinary conditions, we prepared six fluconazole cocrystals with malonic, maleic, fumaric, malic, glutaric and salicylic acids, while the salt was presumably formed with a tartaric acid. We managed to determine crystal structures of all cocrystals with a single crystal X-ray diffraction method except for cocrystal with a malic acid and the salt with a tartaric acid. Interactions between the carboxylic group and the heterocyclic N atom of the fluconazole triazolic group through hydrogen bonding appeared to be the key element of the fluconazole cocrystals formation. The results of the dissolution rate, intrinsic dissolution rate and hygroscopicity measurements showed that cocrystallization can be used to influence physico-chemical properties of fluconazole. Cocrystal with the maleic acid showed considerable enhancement of the dissolution rate. Cocrystals with fumaric and salicylic acids proved to be non-hygroscopic, while cocrystals with glutaric and maleic acids and the salt with a tartaric acid showed an increased hygroscopicity.

Vpliv aktivnega transporta imatiniba na uspešnost zdravljenja kronične mieloične levkemije

EVA KRALJ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: Simon Žakelj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Neodzivnost bolnikov na zdravljenje s protitumornimi učinkovinami je posledica številnih dejavnikov, predvsem pa razlik med posamezniki in fenotipskimi posebnostmi rakavih celic. Doktorsko delo se osredotoča na proučevanje aktivnih prenašalnih mehanizmov, vpletenih v farmakokinetiko imatiniba, ki bi lahko bili odgovorni za to, da se pri določenih bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML) pojavi odpornost proti zdravljenju s to učinkovino. Na izoliranih segmentih tankega črevesa podgane smo potrdili vpletenost aktivnih prenašalcev v absorpcijo in izločanje imatiniba, s čimer smo razložili visoko biološko uporabnost velike in bazične molekule ter veliko interindividualno variabilnost v farmakokinetičnih parametrih imatiniba. Tudi s klinično raziskavo na 35 bolnikih s KML v remisiji nam je uspelo dokazati veliko variabilnost v aktivnosti privzema imatiniba v nevtrofilne granulocite (tarčne celice) z organskim kationskim prenašalcem (OCT1), hkrati pa tudi povezavo med veliko aktivnostjo OCT1 na teh krvnih celicah in uspehom zdravljenja. Po naših raziskavah plazemska koncentracija dobro odraža znotrajcelično koncentracijo imatiniba in bi lahko bila dober napovedni kriterij uspešnosti zdravljenja KML s to učinkovino. V sklopu doktorskega dela je bilo razvitih in ovrednotenih več metod za določanje plazemske in znotrajcelične koncentracije imatiniba in aktivnosti OCT1 na krvnih celicah bolnikov.

The Influence of Active Transport of Imatinib on the Therapeutic Outcome of Chronic Myeloid Leukaemia

EVA KRALJ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Simon Žakelj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The resistance to treatment with anticancer drugs is a consequence of a variety of factors, including individual variations in patients and phenotypic differences in tumour cells. My doctoral thesis provides some explanation regarding the involvement of pharmacokinetic mechanisms in the resistance of some chronic myeloid leukaemia (CML) patients to imatinib treatment. On the isolated segments of a rat's small intestine, we confirmed the role of an active transport in the absorption and elimination of imatinib, which helped us to explain a very high bioavailability of a large and basic molecule and a large interindividual variability in the pharmacokinetic parameters of imatinib. In a clinical study on 35 CML patients already treated with imatinib, we proved a large variability in the imatinib uptake by organic cation transporter (OCT1) into neutrophil granulocytes among patients and a correlation of the high granulocyte OCT1 activity with imatinib treatment response. The intracellular concentration of imatinib in blood cells on the other hand was found to be highly related to plasma concentration, so the measurement of the latter could be a relevant prognostic criterion for the success of the CML treatment. Several methods were developed and validated for the imatinib intracellular and plasma concentration as well as the blood cell OCT1 activity determination.

Vpliv ogljikovih nanomaterialov na aktivnost acetilholinesteraze

TINA MESARIČ, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Kristina Sepčič, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Damjana Drobne, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ogljikovi nanomateriali (NM) so se v zadnjih letih pokazali kot revolucionarna sredstva za zdravljenje bolezni, kot je rak, pri tarčni dostavi zdravil in v genskih terapijah. Uspeh zdravljenja je v veliki meri odvisen od zgodnjega odkritja bolezni, zato se raziskave usmerjajo v razvoj biosenzorjev za odkrivanje proteinov in drugih molekul, ki naznanjajo zgodnje bolezenske znake. Po drugi strani pa lahko ogljikovi NM iz okolja skozi krvnomožgansko pregrado pridejo v centralni živčni sistem. Tam vplivajo na proteine in povzročijo zgodnje spremembe v možganskem tkivu, ki lahko vodijo v bolezni, kot je npr. Alzheimerjeva bolezen. V okviru naloge smo se osredotočili na proučevanje interakcij med ogljikovimi NM in encimi iz skupine holinesteraz. Dokazali smo, da imajo ogljikovi NM izjemen površinski adsorpcijski potencial za omenjene encime, kar je posledica hidrofobnih in elektrostatičnih interakcij. Nekateri NM, npr. amorfni ogljik, lahko adsorbirajo holinesteraze ter trajno spremenijo njihovo sekundarno strukturo in aktivnost. Po drugi strani se je pokazalo, da je grafenov oksid najbolj učinkovit adsorbent holinesteraz, pri čemer so encimi tudi po adsorpciji na NM ohranili večino svoje aktivnosti. Grafenov oksid bi se zaradi svojih enkratnih površinskih lastnosti lahko uporabljal za imobilizacijo holinesteraz in je trenutno najbolj primeren NM za razvoj biosenzorjev v diagnostične namene.

Effects of Carbon-Based Nanomaterials on the Activity of Acetylcholinesterase

TINA MESARIČ, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Kristina Sepčič, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Damjana Drobne, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Carbon-based nanomaterials (NMs) have recently been shown to be a revolutionary tool in the treatment of diseases such as cancer, and in the targeted drug delivery and gene therapy. The treatment success is largely dependent on an early detection of the disease; therefore, research has been focused on the development of biosensors for the detection of proteins and other molecules that might indicate early signs of the disease. On the other hand, carbon NMs in the environment can pass through the blood-brain barrier into the central nervous system. They can then interact with proteins and cause changes to the brain tissue, which can lead to diseases such as Alzheimer's disease. In the present study, we focused on the interactions between carbon NMs and the cholinesterase enzymes. We have shown that carbon NMs have a remarkable adsorption potential for these enzymes due to their hydrophobic and electrostatic interactions. Some NMs, such as carbon black, adsorb enzymes which results in an irreversible alteration of the enzyme secondary structure and the loss of the enzyme activity. On the other hand, graphene oxide is the strongest adsorbent of cholinesterases. Even when adsorbed to graphene oxide, cholinesterases retain most of their activity. Due to its unique surface characteristics, graphene oxide can be used to immobilise cholinesterases and other proteins, and it is currently the most suitable biosensor to be developed for diagnostic purposes.

Mehanizem tvorbe pore ekvinoxina II, citolitičnega proteina iz morske vetrnice

NEJC ROJKO, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Gregor Anderluh, Kemijski inštitut Ljubljana

Intravenozna aplikacija proteinskega toksina ekvinoxina II (EqtlI) iz morske vetrnice (*Actinia equina*) pri podganah povzroči krčenje žil in srčni zastoj. EqtlI se veže na lipid sfingomielin v celični membrani tarčnega organizma in jo poškoduje s tvorbo pore. Strukturo pore smo proučevali s fluorescenčno označenim EqtlI na podprtih lipidnih membranah in ugotovili, da so pore najpogosteje sestavljene iz 3 do 4 monomerov. Zanimal nas je tudi vpliv sestave tarčne lipidne membrane na proces tvorbe pore. Mikroskopija posameznih por na modelnem lipidnem sistemu kapljic na hidrogelu je razkrila, da EqtlI presenetljivo permeabilizira membrano zunaj lipidnih domen, obogatenih s holesterolom in sfingomielinom, čeprav igra slednji pri vezavi vlogo receptorja. V zadnjem delu naloge smo s tehniko hitrega pomešanja reagentov spremljali kinetiko posameznih korakov pri tvorbi pore. Rezultati kažejo, da je vezava na lipidne vezikle zelo hitra, čemur sledi vgradnja N-terminalne α -vijačnice v lipidno membrano. V zadnjem koraku pride do oligomerizacije in tvorbe pore. Pridobljeno znanje pomembno prispeva k razumevanju delovanja proteinov, ki tvorijo pore, med katere spadajo nekateri bakterijski toksini, komponente imunskega sistema in mediatorji celične apoptoze.

Pore Formation Mechanism of Equinatoxin II, Cytolytic Protein from the Sea Anemone

NEJC ROJKO, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: Gregor Anderluh, National Institute of Chemistry Ljubljana

Intravenous application of protein toxin equinatoxin II (EqtlI) from the sea anemone *Actinia equina* causes cardiac arrest and coronary vasospasm in rats. EqtlI binds sphingomyelin in the target cellular lipid membrane and damages it by forming a pore. We investigated the pore structure with fluorescently labelled EqtlI on supported lipid membranes. We have shown that EqtlI forms pore complexes with predominantly three to four monomers. We also focused on the target lipid membrane composition with respect to its impact on EqtlI pore formation mechanism. The microscopy of single EqtlI pores on the droplet hydrogel bilayers revealed that surprisingly EqtlI does not permeabilise cholesterol and sphingomyelin enriched lipid domains, even though sphingomyelin acts as a binding receptor for EqtlI. Finally, we investigated individual steps in the pore formation mechanism with the use of a stopped flow technique. The association to lipid vesicles is very fast and immediately followed by the insertion of the N-terminal α -helix to the lipid membrane. In the last step, EqtlI monomers oligomerise and form a pore. The results are important not only for EqtlI, but also for other pore-forming proteins like bacterial toxins, components of the immune system and mediators of cell apoptosis.

Označevanje s holesterolom bogatih membranskih mikrodomen z ostreolizinom A

MATEJ SKOČAJ, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Mentorica: Kristina Sepčič, *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Somentor: Peter Veranič, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

V 90. letih prejšnjega stoletja je bila predstavljena teorija o membranskih raftih, ki te s holesterolom in sfingomielinom bogate domene označi kot ključne strukturne in signalizacijske komponente celic. Membranski rafti so v zdravem organizmu udeleženi v številnih ključnih bioloških procesih, saj delujejo kot platforme za ustaljene signalizacijske poti, obenem pa njihova disfunkcionalnost/okvara privede do različnih bolezenskih in patoloških stanj. Za membranske rafte je bilo ugotovljeno, da igrajo pomembno vlogo pri nevroloških boleznih (Alzheimerjevi, Parkinsonovi in prionskih boleznih) in srčno-žilnih boleznih, v karcinogenezi in pri imunskih boleznih, kot je sistemski lupus eritematosus, ter pri okužbi s HIV, kar naredi membranske rafte v luči farmakoloških pristopov za zdravljenje in preprečevanje teh bolezni izjemno zanimive tarče. V našem laboratoriju smo razvili stabilno netoksično rekombinantno fluorescenčno različico proteina ostreolizina A, za katerega smo dokazali, da se veže na s holesterolom in sfingomielinom bogata področja v celičnih membranah. S tem smo dokazali tudi obstoj teh domen v celicah. Razvita molekula bi lahko bila v prihodnosti ključno (in do sedaj edino) orodje v bazičnih in aplikativnih biomedicinskih raziskavah biologije membranskih raftov in z njimi povezanih patoloških stanj.

Labelling of Cholesterol-Enriched Membrane Microdomains Using Ostreolysin A

MATEJ SKOČAJ, *Biotechnical Faculty, University of Ljubljana*
Supervisor: Kristina Sepčič, *Biotechnical Faculty, University of Ljubljana*
Co-supervisor: Peter Veranič, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

In the early 1990s, the concept of membrane rafts was introduced, which defined these cholesterol- and sphingomyelin-enriched plasma membrane domains as crucial structural and signalling components of the cell. Membrane rafts participate in numerous biological processes, where they serve as platforms for biochemical signalling pathways. Their disruption can lead to different pathological states and diseases. Membrane rafts have been shown to be involved in neurological diseases (e.g. Alzheimer's, Parkinson's, and prion diseases), cardiovascular diseases, carcinogenesis, immune diseases (e.g. systemic lupus erythematosus), and various virus infections (e.g. HIV). This thus demonstrates that membrane domains are interesting targets for pharmacological approaches in the treatment of these as well as other diseases. In our laboratory, we have developed a non-toxic recombinant fluorescently labelled protein, ostreolysin A, which we have shown to bind to cholesterol- and sphingomyelin-enriched membrane domains. The use of this fluorescently labelled ostreolysin A has enabled us to reveal these domains in cells, and to study their dynamics in situ. The development of this fluorescently labelled ostreolysin A can now be used as the key and only current tool in basic and applicative biomedical research for the determination of the overall biological roles in cells of membrane rafts, and their involvement in several pathologies.

Razvoj in uporaba tehnike suhe lise plazme za kvantitativno določevanje topiramata v študijah farmakokinetike in bioekvivalence

TANJA VNUČEC POPOV, *Krka, d. d., Novo mesto*
Mentorica: Darinka Brodnjak Vončina, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Somentorica: Helena Prosen, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Somentorica: Lea Cvitkovič Maričič, *Krka, d. d., Novo mesto*

Doktorska naloga temelji na razvoju nove analizne metode za določevanje zdravilne učinkovine topiramata iz samo nekaj kapljic plazme. Metoda je znana kot metoda suhe lise plazme (DPS) in se uporablja skupaj s tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo. Suha biološka matrica ponuja v primerjavi z običajno tekočo plazmo pri farmakokinetičnih raziskavah veliko prednosti. Razvili in preizkusili smo tri bioanalizne metode za določevanje topiramata v bioloških matricah (iz suhe lise plazme, iz tekoče humane plazme in iz suhe lise krvi). Na podlagi raziskav, literature in vzorcev iz raziskave spremljanja terapevtskega učinka smo ocenili, katera suha biološka matrica je najprimernejša za kvantitativno določevanje topiramata v bioloških vzorcih iz farmakokinetičnih in bioekvivalenčnih raziskav. Dokazali smo, da DPS za določevanje topiramata pomeni velike finančne, praktične in etične prednosti, še posebej kadar smo omejeni z volumnom odvzete krvi. Uporabna je, kadar gre za ključne odločitve glede varnosti in učinkovitosti zdravila, predvsem pa pri farmakokinetičnih in bioekvivalenčnih raziskavah. Njena prednost je še večja, kadar gre za raziskave, v katere so vključene živali ter dojenčki in majhni otroci.

Development and Use of Dried Plasma Spots Technique for Quantitative Determination of Topiramate in Pharmacokinetic and Bioequivalence Studies

TANJA VNUČEC POPOV, *Krka, d. d., Novo mesto*
Supervisor: Darinka Brodnjak Vončina, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor*
Co-supervisors: Helena Prosen, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*;
Co-supervisors: Lea Cvitkovič Maričič, *Krka, d. d., Novo mesto*

The doctoral dissertation is based on the development of a new analytical method for the determination of the active ingredient topiramate from just a few drops of plasma, known as the dried plasma spot technique (DPS), using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. A dried biological matrix offers a number of advantages over the conventional liquid plasma in pharmacokinetic studies. Three bioanalytical methods for the determination of topiramate were developed and validated (from dried plasma spot, from liquid human plasma and from dried blood spot). Based on various studies, literature data and tests from the therapeutic drug monitoring, the purpose of the research was to determine the most appropriate dried matrix for the quantitative determination of topiramate in biological samples of pharmacokinetic and bioequivalence studies. It has been proven that the dried plasma spot technique for the determination of topiramate offers significant financial, practical and ethical advantages, especially when the volume of biological matrix is limited. The method is very useful when it comes to critical decisions that support the safety and efficacy of the drug for the purposes of pharmacokinetic and bioequivalence studies. This technique has been especially advantageous for animals, babies and young children.

Stabilnost zmesi ibuprofena in natrijeve soli omeprazola v prisotnosti nekaterih farmacevtsko pomembnih pomožnih snovi

BLAŽ VIDMAR, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

Omeprazol je nestabilna farmacevtska substanca, ki pod vplivom zunanjih dejavnikov in povišane temperature razpada, hkrati pa je nestabilna v vodnih raztopinah z nizkim pH in v prisotnosti pomožnih snovi ali učinkovin, ki imajo kisle funkcionalne skupine. Šibko kislina učinkovina ibuprofen pri dolgotrajnem zdravljenju revmatoidnega artritisa povzroča neželene učinke, kot so razjede in krvavitve zgornjih prebavil. Ker je bilo dokazano, da so neželeni učinki pri sočasnem jemanju obeh učinkovin manj pogosti, sem želel, z neizotermičnim in izotermičnim testiranjem preveriti stabilnost binarne zmesi učinkovin in na podlagi HPLC-analize razpadnih produktov časovno različno dolgo obremenjenih vzorcev napovedati reakcijsko kinetiko. Z linearnim neizotermičnim testiranjem stabilnosti sem določil, katere nečistote nastajajo med prvimi in kakšen je njihov trend naraščanja. Zaradi značilnega rdečkastega obarvanja binarne zmesi med testiranjem sem določil, katera nečistota povzroči takšno spremembo videza in nato z LC-MS-analizo kvalitativno ovrednotil razpadne produkte, ki so se v zmesih pojavili prvi in katerih obseg razpada je bil največji. S testiranjem modelne farmacevtske oblike sem ugotovil, da je najbolj stabilna tista, ki vsebuje pelete omeprazola in granulat ibuprofena, obloženega z evdragitno oblogo. Manj stabilna je bila farmacevtska oblika s peletami omeprazola in granulatom ibuprofena, obloženega s PVA. Najmanj stabilni sta bili farmacevtski obliki s peletami omeprazola in neobloženim granulatom ibuprofena z MgO ter peletami omeprazola in neobloženim granulatom ibuprofena in smukcem, kar je bila posledica kemijskih in fizikalnih nekompatibilnosti med učinkovinama in pomožno snovjo.

Stability of Ibuprofen and Omeprazole Sodium Salt in the Presence of Some Pharmaceutically Acceptable Excipients

BLAŽ VIDMAR, 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

Omeprazole is considered as a sensitive pharmaceutical substance, depending on many environmental factors and elevated temperature, and is unstable especially in aqueous solutions with a low pH value and less stable in the presence of excipients or active substances with acidic functional groups. Ibuprofen is a weak acid substance and its long-term use may cause serious side effects in the treatment of rheumatoid arthritis, such as ulceration and bleeding in the gastrointestinal tract. Since scientifically proven facts have shown that concomitant use of both drugs causes fewer side effects, the purpose was to study the stability and predict chemical kinetics of binary mixtures of both active compounds using non-isothermal and isothermal stability tests, using a HPLC as the method of interest. By using the linear non-isothermal stability testing, the impurity profile that was detected first and its increasing trend were determined. Due to obvious red coloration of the binary mixture during stability testing, the impurity which caused the changed appearance was determined and with the LC-MS analysis the degradation products which appeared first and were among the most abundant were identified. The stability testing of model formulations confirmed that the formulation which contains omeprazole pellets with the Eudragit® coated ibuprofen granulate is the most stable, followed by the formulation which contains omeprazole pellets with the PVA coated ibuprofen granulate. Due to chemical and physical incompatibilities between APIs and excipients, the formulation containing omeprazole pellets with ibuprofen granulate and MgO, and the model formulation containing omeprazole pellets, ibuprofen granulate and talcum are presumed to be the least stable.

Vpliv pufrskih sistemov na *in vitro* sproščanje zdravilnih učinkovin iz trdnih farmacevtskih oblik

HELENA BOGDAN, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Darko Uršič, Krka, d. d., Novo mesto

Pri *in vitro* testih raztapljanja želimo posnemati pogoje v prebavnem traktu, zato je treba uporabiti medij, ki se *in vivo* dogajanju čim bolj približa. V skladu s farmakopejskimi priporočili se za vrednotenje raztapljanja kljub nekaterim pomanjkljivostim najpogosteje uporablja fosfatni pufer s pH 6,8. Poiskati smo morali ustrezen nadomestni pufer in ovrednotiti njegovo uporabnost. V ta namen smo proučevali bikarbonatni 2-[bis(2-hidroksietil)amino]-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diolni in maleatni pufer s pH 6,8. Ugotavljali smo korelacijo med hitrostjo raztapljanja modelnih zdravilnih učinkovin in njihovo topnostjo ter časi razpada tablet z izbrano zdravilno učinkovino v fosfatnem in izbranih pufrih. S primerjavo profilov raztapljanja zdravilnih učinkovin iz ustreznih trdnih farmacevtskih oblik smo ocenili, ali so analizirani pufri ustrezna zamenjava za fosfatni pufer. S stališča približevanja pogojem v začetnem delu tankega črevesa je najustreznejša zamenjava za fosfatni pufer bikarbonatni pufer, ker so se v njem odrazile fiziološko relevantne interakcije med komponentami formulacije in pufera. Za uravnavo in vzdrževanje pH-vrednosti bikarbonatnega pufera smo uporabili napravo pHysio-stat.

Influence of Buffer Systems on *In Vitro* Drug Release from Solid Dosage Forms

HELENA BOGDAN, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Franc Vrečer, Krka, d. d., Novo mesto

Co-supervisor: Darko Uršič, Krka, d. d., Novo mesto

In vitro dissolution tests are used to simulate the conditions in the gastrointestinal tract. Therefore, it is important to use a dissolution medium that precisely mimics *in vivo* performance. In order to mimic the conditions in the small intestine in accordance with the pharmacopeial recommendations on dissolution media, phosphate buffer of pH 6.8 is most commonly used despite a few disadvantages. The aim of our work was to find a suitable surrogate for the phosphate buffer and to evaluate its usefulness. We selected bicarbonate, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol and maleate buffer of pH 6.8. We studied the correlation of dissolution rates of model active pharmaceutical ingredients to their solubility and disintegration times of tablets containing the corresponding active ingredient in phosphate and chosen buffers. The suitability of analysed buffers as a replacement for phosphate buffer was evaluated by comparing the dissolution profiles of active ingredients, dissolved from corresponding solid dosage forms. We found bicarbonate buffer to be the most appropriate surrogate for phosphate buffer in terms of approaching the conditions in the initial part of the small intestine as the physiologically relevant interactions between the components of formulation and components of the buffer were displayed in it. In order to adjust and maintain the pH of bicarbonate buffer we used the pHysio-stat device.

Citotoksični in genotoksični učinki UV-A aktiviranih anataznih delcev TiO₂ na celice HepG2

IRENA GORENC, Nacionalni inštitut za biologijo
Mentor: Gregor Serša, Onkološki inštitut Ljubljana
Somentorica: Jana Nunič, Nacionalni inštitut za biologijo

Titanov dioksid (TiO₂) se zaradi posebnih lastnosti vedno pogosteje uporablja v kozmetiki, farmaciji, medicini, živilski industriji itn. Zaradi pogoste izpostavljenosti fotokatalitsko (z UV-svetlobo) aktiviranemu TiO₂ je pomembno poznavanje potencialnih škodljivih učinkov TiO₂ tudi v tej obliki. V magistrskem delu smo zato preverili, ali se po obsevanju anataznih delcev TiO₂ dveh različnih velikosti (nanodelcev in podmikronskih delcev) z UV-A njihovo citotoksično in genotoksično delovanje spremeni in koliko časa se potencialni učinek fotoaktivacije ohrani. Uporabili smo človeške jetrne celice HepG2, ki smo jih izpostavili neobsevanim delcem in obsevanim delcem takoj po obsevanju oziroma po 1 in 7 dneh v temi. Obsevani delci TiO₂ so imeli ne glede na velikost precej večje toksične učinke v primerjavi z neobsevanimi. Največji toksični učinki so bili takoj po obsevanju, nekoliko manjši po 1 dnevu v temi, medtem ko po 7 dneh v temi učinka citotoksičnosti skoraj nismo opazili, genotoksičnost delcev TiO₂ pa se je delno ohranila. Rezultati so skrb vzbujajoči, še posebno pri uporabi TiO₂ v sončnih kremah, saj smo ugotovili, da se škodljivost TiO₂ po obsevanju z UV-A močno poveča ter se ohrani najmanj 1 dan po končanem obsevanju.

Cytotoxic and Genotoxic Effects of UV-A Activated Anatase TiO₂ Particles in HepG2 Cells

IRENA GORENC, National Institute of Biology Ljubljana
Supervisor: Gregor Serša, Institute of Oncology Ljubljana
Co-supervisor: Jana Nunič, National Institute of Biology Ljubljana

Titanium dioxide (TiO₂) is increasingly used in various fields due to its specific properties and can be found in cosmetics, pharmacy, medicine and the food industry. Due to frequent exposure to photocatalytic (with UV light) activated TiO₂ it is important to know the potentially adverse effects of TiO₂ in this form. Therefore, the aim of our master's thesis was to investigate whether the irradiation of two different sizes of anatase TiO₂ particles (nanoparticles and sub-micron particles) with UV-A changes their cytotoxic and genotoxic effects and for how long is the potential impact of photoactivation maintained. We used human liver cells HepG2 that were exposed to non-irradiated particles and irradiated particles immediately after irradiation or after 1 and 7 days in the dark. Irradiated TiO₂ particles regardless of the size of particles had significantly increased toxic effects when compared with the non-irradiated particles. Toxic effects were most prominent immediately after irradiation, slightly smaller after 1 day in the dark, while after 7 days in the dark we observed almost no cytotoxic effects, and genotoxicity of TiO₂ particles was partially maintained. The results are especially alarming due to the use of TiO₂ in sunscreens, since we have found that the toxic effects of TiO₂ particles strongly increase after irradiation with UV-A and that the increased reactivity is maintained at least 1 day after the end of irradiation.

Elektrofilna uvedba trifluorometilne skupine v fenole

KAJA GOSAK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Marjan Jereb, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Fluorirane molekule so vse bolj pomembne pri sintezi novih učinkovin v farmaciji in zaščitnih sredstev v agronomiji. Z uvedbo fluorovega atoma v molekulo dobimo konformacijsko stabilnejše molekule, ki so veliko bolj lipofilne od nefluoriranih analogov in zato tudi potencialno bolj biološko aktivne. Zaradi izredno visokega lipofilnostnega parametra in odpornosti proti kislinski hidrolizi je uvedba trifluorometilne skupine deležna vedno večje pozornosti v organski sintezni kemiji. Predstavili smo elektrofilno uvedbo trifluorometilne skupine v fenole, ki so odlični intermedijati in sintoni za nadaljnje pretvorbe. Do sedaj so elektrofilno trifluorometiliranje na fenole izvedli le s strupenim trifluorometilsulfenil kloridom, zato je bil naš namen poiskati alternativni reagent, ki bi bil primeren tudi za nespecializirane laboratorije. V prvem delu eksperimentalnega dela je predstavljena optimizacija reakcijskih pogojev na fenolu in nato elektrofilno trifluorometiliranje substituiranih fenolov ter nekaterih biološko aktivnih spojin. Reakcija poteka povsem regioselektivno na *para* oziroma, če je to zasedeno, na *orto* mesto fenola. Nazadnje pa smo na produktu proučevali vpliv trifluorometilne skupine na reaktivnost fenolov pri nadaljnjih reakcijah. Ugotovili smo, da skupina, kljub temu da je močno elektronegativna, bistveno ne vpliva na nadaljnje reakcije.

Electrophilic Introduction of Trifluoromethylthio Group into Phenols

KAJA GOSAK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Marjan Jereb, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Fluorinated molecules are nowadays becoming increasingly important in the synthesis of new compounds in pharmacy and agrochemistry. With the introduction of a fluorine atom in the molecule we obtain more conformationally stable molecules, which are much more lipophilic than non-fluorinated analogues and therefore, have a potentially higher biological activity. Due to the extremely high lipophilic parameter and resistance to acid hydrolysis, the introduction of the trifluoromethylthio group has been attracting increasing attention in synthetic organic chemistry. We presented the electrophilic introduction of the trifluoromethylthio group into phenols, which are excellent intermediates, and synthons for further transformations. Until now, the electrophilic trifluoromethylthiolation of phenols was performed with toxic trifluoromethylsulfenyl chloride. The purpose of this work was, therefore, to search for an alternative reagent suitable for non-specialized laboratories. In the first part of the experimental work, the optimization of the reaction conditions on phenol and then electrophilic trifluoromethylthiolation of substituted phenols and some of the biologically active compounds is presented. The reaction was carried out completely regioselectively on the *para* or, when occupied, on the *ortho* position of phenol. Finally, the effect of the trifluoromethylthio group on the further reactivity of phenols was examined. We have found that despite belonging to a highly electronegative group, it does not substantially affect the subsequent reactions.

Postopki za določanje delovanja monooksigenaz in ketoreduktaz v procesih kemo-encimske sinteze

JOŽICA HOČEVAR, *Krka, d. d., Novo mesto*

Mentor: **Marin Berovič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

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

Biokatalizne reakcije, ki jih izvajamo s celicami in njihovimi encimi, so postale nova orodja za asimetrično sintezo spojin. Za izvajanje presejalnih testov ter analizo encimov je treba razvijati ali posodobljati zanesljive in učinkovite analize postopke. V raziskovalni nalogi smo razvili enostavne testne sisteme za določanje aktivnosti monooksigenaze cikloheksanona (CHMO). Princip ugotavljanja delovanja monooksigenaz pri prvi metodi je bila pretvorba cikloheksanona v kaprolakton, ki je reagiral z dinitrobenzojsko kislino v alkalnem mediju. Zaradi izrazite kemospecifičnosti metode z njo ne moremo določati aktivnosti nekaterih gensko modificiranih CHMO. Drugo metodo smo razvili na osnovi obstoječih postopkov ter naših lastnih ugotovitev. Metoda temelji na merjenju porabe – oksidacije NADPH v NADP. Njena prednost je, da je hitra in učinkovita, meritve izvajamo v čitalcu mikrotiterskih plošč, njeno aktivnost pa merimo z uporabo specifičnih substratov. Pri metodi za določanje aktivnosti ketoreduktaze (KRED) smo definirali optimalne pogoje za delovanje encima glede na koncentracijo 2-propanola ter odvajanje acetona, proizvoda oksidacije IPA, iz reakcijske zmesi. Teste smo izvajali z acetofenomom ter ugotovili, da do 60 % V/V IPA v reakcijski mešanici ob odvajanju acetona na aktivnost KRED nima vpliva. Izračunali smo aktivnost KRED ter prikazali kinetiko kemo-encimskih pretvorb v različnih reakcijskih pogojih.

Procedures for Determining the Operation of Monooxygenases and Ketoreductases in the Process of Chemo-Enzymatic Synthesis

JOŽICA HOČEVAR, *Krka, d. d., Novo mesto*

Supervisor: **Marin Berovič**, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

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

Enzymatic transformations and whole cell bioconversions have become generally accepted synthetic tools for asymmetric synthesis. Therefore, reliable screening and analytical tools for enzymatic analysis should be introduced and updated. We developed simple testing systems for determining the cyclohexanone monooxygenase (CHMO) activity. In the first method, the principle determining the CHMO activity was the conversion of cyclohexanone to caprolactone, reacting with dinitrobenzoic acid in an alkaline medium. Due to the high chemospecificity of the method, it cannot be used for determining the activity of certain genetically modified CHMOs. We developed the second method on the basis of the existing methods and our research. It is based on the determination of the NADPH to NADP oxidation rate. An advantage of this method is the speed and efficacy, readings are performed with the microtiter plate reader, and its activity is determined with specific substrates. With the method for the determination of ketoreductase (KRED) activity, we defined optimal activity conditions concerning 2-propanol (IPA) concentrations and the acetone elimination, which is the IPA oxidation product and has to be removed from the reaction mixture. We performed tests with acetophenone and found that up to 60% of V/V IPA in the reaction mixture has no effect on the KRED activity providing that acetone has been eliminated from the reaction mixture. We calculated the KRED activity and demonstrated the kinetics of chemo-enzymatic conversion under different reaction conditions.

Pasivno vzorčenje za določevanje ostankov zdravilnih učinkovin v vodnem okolju

ANA JERŠE, *Institut Jožef Stefan*

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

Somentorica: **Ester Heath**, *Institut Jožef Stefan*

Vzorčenje je pomemben korak analiznega postopka za določevanje onesnažil v okolju. S tradicionalnimi metodami vzorčenja običajno težko določimo povprečne koncentracije analitov v vodi, poleg tega pa so problematične tudi majhne koncentracije. Pasivno vzorčenje, ki združuje vzorčenje, selektivno izolacijo analitov in predkoncentracijo v enem koraku, predstavlja dobro alternativo, s katero dobimo informacijo o časovnem povprečju koncentracij izbranih spojin med vzorčenjem. Namen diplomske naloge je bil oceniti povprečne koncentracije izbranih zdravilnih učinkovin iz skupin nesteroidnih protivnetnih zdravilnih učinkovin (diklofenak, ibuprofen, ketoprofen in naproksen), antiepileptikov (karbamazepin), pomirjeval (diazepam) in hipolipemikov (metabolit klofibrata, klofibrinska kislina) v površinskih in podzemnih vodah. Pred tem je bilo treba izvesti laboratorijsko kalibracijo za določitev faktorja *Rs*, ki je ključen za izračun okoljskih koncentracij, in izbrati primerne pogoje vzorčenja. Pasivne vzorčevalnike smo realnemu okolju izpostavili na več lokacijah: v Postojni (potok Stržen), Ljubljani (Gradaščica, Ljubljana), Mariboru (Drava) in na Dravskem polju (podzemne vode). Na vseh vzorčevalnih mestih smo določili vsaj enega od preiskovanih analitov.

Passive Sampling for Determining Pharmaceutical Residues in Aqueous Environment

ANA JERŠE, *Jožef Stefan Institute*

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

Co-supervisor: **Ester Heath**, *Jožef Stefan Institute*

Sampling is an important step of the analytical process for determining environmental pollutants. Traditional sampling techniques have many shortcomings in obtaining information about the average concentration of an analyte and, in addition, very low concentrations are also problematic. Passive sampling is a good alternative as it combines sampling, selective isolation of analytes and preconcentration in a single step. As a result, passive samplers provide a time-weighted average (TWA) concentration of an analyte. This thesis is aimed at assessing TWA concentrations of some pharmaceutical residues (diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, carbamazepine, diazepam and clofibric acid, a stable metabolite of clofibrate) present in surface and ground water. The use of passive samplers in field experiments requires a prior laboratory calibration of the sampling rates (*Rs* factor) and the selection of appropriate conditions for sampling. Passive samplers were exposed to the environment in Postojna (Stržen stream), Ljubljana (the Gradaščica River, the Ljubljana River), Maribor (the Drava River) and Dravsko polje (groundwater). At least one of the investigated pharmaceuticals was determined at all sampling points.

Patentno varstvo postopkov zdravljenja

TINA KERNULC, *Pravna fakulteta, Univerza v Mariboru*
Mentorica: **Martina Repas**, *Pravna fakulteta, Univerza v Mariboru*

Postopki zdravljenja so predmet posebne obravnave v patentnem pravu. Na podlagi člena 53 (c) Evropske patentne konvencije so kirurški postopki, terapevtsko zdravljenje ter diagnostične metode izključeni iz patentnega varstva, torej jih ni mogoče patentirati. Omenjena določba se ne nanaša na izdelke, zlasti snovi ali sestavke, ki se uporabljajo pri kateri od metod zdravljenja. Med nastajanjem diplomskega dela smo ugotovili, da je izraz metode zdravljenja ozko interpretiran, zaradi česar nekatere zahteve ne spadajo v izključitev po členu 53 (c) EPK 2000 in jih je mogoče patentirati. Patentno varstvo je mogoče zagotoviti tudi za naprave, če med človeškim telesom in metodo zdravljenja ni tesne povezave. V drugem delu smo se posvetili obravnavi kozmetičnih metod, kjer se pokažeta kozmetični učinek, ki ga je mogoče patentirati, ter terapevtski učinek (nepatentabilen). Na koncu so opredeljene tudi metode kontracepcije, ki jih je sicer mogoče patentirati, ker nosečnost ni opredeljena kot bolezen, vendar so zaradi posrednega terapevtskega učinka le redko predmet patentnega prava.

Patent protection of medical methods

TINA KERNULC, *Faculty of Law, University of Maribor*
Supervisor: **Martina Repas**, *Faculty of Law, University of Maribor*

Medical methods are subject of special treatment by patent law. On the basis of Article 53 (c) of the European Patent Convention, surgical procedures, diagnostic and therapeutic treatment methods are excluded from patent protection, so they cannot be patented. This provision does not apply to products, in particular substances or compositions, for use in any of the methods. When preparing this thesis, we have established that the term medical treatment is narrowly interpreted, and because of that some of the requirements do not fall within the exclusion in Article 53 (c) EPC 2000 so they can be patented. If there is no functional link or nexus between the human body and a device, it is possible to provide patent protection for an implantable device. In the second part of the thesis, cosmetic methods are discussed which have two points of view; first the cosmetic effect, which can be patented, and second the therapeutic effect (non-patentable). Methods of contraception are defined at the end, which are patentable because pregnancy is not defined as a disease, but they are rarely the subject of patent protection because there is an indirect therapeutic effect.

Izdelava nanokristalov glibenklamida z mokrim mletjem v krogljčnem mlinu

SABINA KREGAR, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Helsinkih*
Mentorica: **Petra Kocbek**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Somentorica: **Leena Peltonen**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Helsinkih*

Glibenklamid je slabo vodotopna učinkovina, ki se uporablja pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa II. V raziskovalnem delu smo s pripravo nanokristalov želeli povečati hitrost raztapljanja učinkovine, kar bi posledično izboljšalo njeno biološko uporabnost. Nanokristali so nanometrski delci kristalne učinkovine, ki jo obdaja plast stabilizatorja. Preizkusili smo dva stabilizatorja različnih koncentracij, Poloxamer 188 in HPMC. S Poloxamerom 188 smo uspešno izdelali nanokristale glibenklamida, ki so bili manjši od 300 nm, njihova velikost pa je bila homogeno razporejena (PI pribl. 0,2). Pripravljeni nanokristali so v obliki nanosuspenzij, ki smo jih posušili z liofilizacijo. Med sušenjem je prišlo do tvorbe agregatov, ki se ob dodatku medija niso redispergirali nazaj v delce nanometriške velikosti, zato smo kot krioprotektant dodali laktozo. Povečanje hitrosti raztapljanja glibenklamida v obliki nanokristalov smo dokazali z uporabo farmakopejske metode raztapljanja z vesli. S pretočno celico pa smo potrdili povečanje topnosti, na kar vplivata tako nanometriška velikost delcev kot tudi prisotnost Poloxamera 188. V raziskavi smo uspešno razvili formulacijo glibenklamida, ki je ostala stabilna v obdobju dveh mesecev.

Preparation of Glibenclamide Nanocrystals by Pearl Milling

SABINA KREGAR, *Faculty of Pharmacy, University of Helsinki*
Supervisor: **Petra Kocbek**, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*
Co-supervisor: **Leena Peltonen**, *Faculty of Pharmacy, University of Helsinki*

Glibenclamide is a poorly soluble drug used in the treatment of diabetes mellitus type II. In our research work, we intended to increase its dissolution rate by preparing drug nanocrystals, consequently also improving also its oral bioavailability. Nanocrystals are nanoparticles composed of a crystalline drug core surrounded by a stabilizing layer. In our work, two different stabilizers, Poloxamer 188 and HPMC, at different concentrations were tested. When Poloxamer 188 was used as a stabilizer, nanocrystals with the average size below 300 nm and a homogeneous size distribution (PI~0.2) were successfully prepared. Nanocrystals were produced as nanosuspensions and later freeze-dried (lyophilized). Aggregates were formed during the drying process, which did not redisperse to obtain nanosized particles after the addition of the medium. Therefore, lactose was added as a cryoprotectant. The enhancement of glibenclamide dissolution rate, when transformed to nanocrystals, was proved by the pharmacopoeian paddle method. The solubility of glibenclamide also improved as confirmed by flow-through cell measurement, due to the formation of nanosized particles and due to the presence of Poloxamer 188. In this study nanocrystalline formulations of glibenclamide, which remained stable over a period of 2 months, were successfully produced.

Strukturna študija G-kvadrupleksa protiprionskega aptamera

ŠPELA MEDIC, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Mentor: Janez Plavec, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Tripletne ponovitve nukleotidnega zaporedja GGA se pogosto nahaja znotraj biološko pomembnih regij. Oligonukleotidna veriga s ponovitvami GGA lahko zavzame različne strukture, in ker vsebuje veliko gvaninskih ostankov, lahko tvori G-kvadrupleksne strukture. G-kvadrupleksi se lahko uporabljajo kot diagnostična in terapevtska sredstva za različne bolezni. Mednje spadajo prionske bolezni, pri katerih gre za pretvorbo normalne celične oblike prionskega proteina (PrP^{C}) v patogeno obliko (PrP^{Sc}) in za njeno akumulacijo v centralnem živčnem sistemu. Dokazano je bilo, da se RNA-aptamer ($(\text{GGA})_4$) z visoko afiniteto in specifičnostjo veže na PrP^{C} , s čimer ga stabilizira in prepreči pretvorbo v PrP^{Sc} . Na osnovi NMR in CD-spektroskopije smo določili prostorsko strukturo oligonukleotida RNA z zaporedjem $(\text{GGA})_2$. Dve oligonukleotidni verigi $(\text{GGA})_2$ tvorita simetričen G-kvadrupleks, sestavljen iz tetrade in heksade. V slednji sta poleg štirih gvaninskih ostankov vključena še dva adeninska. Dve G-kvadrupleksni strukturi se prek heksadne ravnine povezuje med seboj in tako tvorita dimer. Ugotovili smo, da oligonukleotid z dvakratno ponovitvijo GGA zavzame podobno strukturo kot oligonukleotid s štirimi ponovitvami GGA, vendar se oligonukleotida med seboj razlikujeta v položaju in številu adeninskih ostankov na 3'-koncu verige, zato je vezava $[(\text{GGA})_2]_4$ na PrP^{C} vprašljiva.

Structural Study of G-quadruplex Antiprion Aptamer

ŠPELA MEDIC, *National Institute of Chemistry Ljubljana*
Supervisor: Janez Plavec, *National Institute of Chemistry Ljubljana*

$(\text{GGA})_n$ triplet repeats are frequently located within biologically important regions. The GGA repeats contain guanine rich regions, where G-quadruplexes can be formed. G-quadruplex structures can be used as therapeutic or diagnostic agents in various diseases, including prion diseases. Prion diseases are a group of conditions that affect the nervous system in humans and animals. The conformational change from the normal cellular form of prion protein (PrP^{C}) to the abnormal form (PrP^{Sc}) is crucial in prion pathogenesis. It was reported that RNA oligonucleotide $(\text{GGA})_4$ aptamer binds tightly to PrP^{C} , which stabilizes it and prevents its conversion to the abnormal PrP^{Sc} form. Here, by using the NMR and CD spectroscopy we have determined the structure of a shorter oligonucleotide $(\text{GGA})_2$, which adopts a similar structure as RNA oligonucleotide $(\text{GGA})_4$. It forms a symmetric bimolecular G-quadruplex unit with the tetrad and hexad planes. As observed in $(\text{GGA})_4$ structure, two quadruplexes form a dimer through intermolecular hexad-hexad stacking. Although the structures of $(\text{GGA})_2$ and $(\text{GGA})_4$ are very similar, there are some crucial differences in the part of the structure responsible for prion protein binding, which make the interaction between PrP^{C} and $(\text{GGA})_2$ questionable.

Sinteza in reaktivnost pirazolo[1,5-*a*]-, imidazo[1,2-*a*]- in triazolo[1,5-*a*]pirimidinov iz substituiranih 3-(dimetilamino)prop-2-en-1-onov

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

V reakciji med 3-(dimetilamino)enamioni in heteroarilamini smo v kislih pogojih z mikrovalovnim obsevanjem pripravili heterocikle iz skupin pirazolo[1,5-*a*]pirimidinov, imidazo[1,2-*a*]pirimidinov in triazolo[1,5-*a*]pirimidinov. V vseh primerih smo dobili en izomer azolopirimidinov. Njihove strukture smo potrdili z različnimi analiznimi metodami, v nekaterih primerih tudi z rentgensko difrakcijo monokristala. Na naslednji stopnji smo primeren pirazolo[1,5-*a*]- in triazolo[1,5-*a*]pirimidinski sistem hidrogenirali. V obeh primerih je nastal tetrahidro produkt, adicija je potekla na pirimidinskem obroču. Z reakcijo bromiranja smo določali reaktivnost heterocikličnih sistemov. Brom se je vezal na mesto 3 pirazolovega in imidazolovega obroča. Bromiranje je poteklo tudi na stranski skupini, nastali so mono-, tri- in tetrabromirani produkti. Triazolo[1,5-*a*]pirimidinski sistem z bromom ni reagiral. Na zadnji stopnji smo 3-bromopirazolo[1,5-*a*]pirimidin uspešno pretvorili v 3-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin z reakcijo Suzuki-Miyaura »cross-coupling«.

Synthesis and Reactivity of Pyrazolo[1,5-*a*]-, Imidazo[1,2-*a*]-, and Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines from Substituted 3-(Dimethylamino)prop-2-en-1-ones

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

In the reaction between 3-(dimethylamino)enaminones and heteroarylamines, under acidic conditions by microwave irradiation, heterocycles of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, imidazo[1,2-*a*]pyrimidine and triazolo[1,5-*a*]pyrimidine class were obtained. In all cases only one isomer of azolopyrimidines was obtained. Their structures were confirmed by various methods and in some cases by the X-ray diffraction. In the next step we hydrogenated the appropriate pyrazolo[1,5-*a*]- and triazolo[1,5-*a*]pyrimidine. Both cases resulted in tetrahydro compounds, and hydrogenation took place on a pyrimidine ring. The reactivity of heterocyclic systems was studied via bromination. Bromine was bound on position 3 of the pyrazole and imidazole ring. Bromination also took place on the side-chain, resulting in mono-, tri- and tetrabromated products. The triazolo[1,5-*a*]pyrimidine system did not react with bromine. In the final step, 3-bromopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine was successfully transformed into 3-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine via the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction.

Optimizacija študija pojavnih oblik zdravilnih učinkovin z visokozmogljivim rešetanjem

MATJAŽ PAJK, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

V okviru naloge smo princip visokozmogljivega polimorfnege rešetanja (HTS) vpeljali v raziskovalni proces. Mikrotitrne plošče, na katerih smo izvajali kristalizacije, smo analizirali z rentgenskim praškovnim difraktometrom. Pri analizi rezultatov smo odkrili novo obliko modelne zdravilne učinkovine (ZU) K-2014, ki smo jo poimenovali oblika MP1. V nadaljevanju smo uspešno pripravili večjo količino nove oblike in jo fizikalno okarakterizirali še z ostalimi analiznimi tehnikami. S termično obdelavo oblike MP1 z visokotemperaturno rentgensko difrakcijo smo odkrili še dodatno obliko ZU K-2014 – MP2. Za obe novi oblike smo ugotovili, da gre za psevdopolimorfni obliki modelne ZU, ki sta metastabilni in s časom prehajata v termodinamično stabilno obliko II ZU K-2014. Za obliko MP1 nam je s pomočjo monokristalne rentgenske difrakcije uspelo določiti tudi strukturo, iz katere je razvidno, da predstavlja 1-heksanol solvat monohidrat ZU K-2014.

The Optimisation Studies of Polymorphic Forms of APIs with High-Throughput Screening

MATJAŽ PAJK, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

In this work we have introduced the principle of high-throughput polymorph screening (HTS) in the research process. The microplates on which the crystallization was carried out were analysed by X-ray powder diffractometry. The analysis of the results of the HTS has discovered a new, so far unknown crystal form of the API K-2014 that we have called the MP1 form. In the following experiments we successfully prepared a large amount of a new crystal form which was then physically characterized also with other analytical techniques. By the thermal treatment of the MP1 form using the high-temperature X-ray diffraction technique, we have discovered an additional, new crystal form of the API K-2014 that we have called the MP2 form. We established for both new crystal forms that they are pseudopolymorphic forms of API K-2014, which are metastable and convert into a thermodynamically stable form II of API K-2014. By using a single-crystal X-ray diffraction we were able to determine the crystal structure of the MP1 crystal form, from which we can see that the MP1 form is 1-hexanol solvate monohydrate API K-2014.

Izdelava in vrednotenje trdnih disperzij karvedilola s polietilenglikolom in mezoporoznim silikatom

EVA ROŽMAN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Vse več novih učinkovin je slabo topnih v vodi, njihova terapevtska učinkovitost pa je zaradi slabe biološke uporabnosti pogosto omejena. Obetaven način za povečanje biološke uporabnosti je izboljšanje raztapljanja učinkovin z vgrajevanjem v trdne disperzije z mezoporoznimi nosilci. V diplomskem delu smo trdne disperzije slabo topnega karvedilola z mezoporoznim silikatom Neusilinom US2 izdelali z metodama somletja in odparevanja topila pri znižanem tlaku, z inovativno metodo, ki je kombinacija tehnik izdelave trdnih disperzij in sorpcije talin pri povišani temperaturi, pa smo izdelali trdne disperzije karvedilola s polietilenglikolom (PEG) in Neusilinom US2. Z vsemi tremi metodami smo bistveno izboljšali hitrost raztapljanja karvedilola v primerjavi s hitrostjo raztapljanja izhodnega karvedilola ali fizikalne zmesi z Neusilinom US2. K izboljšanju hitrosti raztapljanja pripomoreta učinkovina v amorfni obliki ali v obliki molekularne disperzije in izboljšano močenje. Karvedilol se je občutno najhitreje sproščal iz trdnih disperzij karvedilola s PEG in Neusilinom US2, najpočasneje pa iz trdnih disperzij, izdelanih s somletjem. Ugotovili smo, da so trdne disperzije karvedilola in Neusilina US2 fizikalno stabilne le, kadar je vsa učinkovina v ozkih porah nosilca, kar lahko dosežemo z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Trdne disperzije karvedilola s PEG in Neusilinom US2 pa so fizikalno stabilne tudi, kadar je učinkovina zunaj por. Prednost teh trdnih disperzij je, da pri njihovi izdelavi ne uporabljamo hlapnih organskih topil.

Formulation and Evaluation of Solid Dispersions of Carvedilol with Polyethylene Glycol and Mesoporous Silicate

EVA ROŽMAN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Today, many new drugs exhibit poor aqueous solubility. Their therapeutic use can be limited due to their low bioavailability after oral intake. A promising approach to enhance solubility and hence bioavailability is the incorporation of these drugs into solid dispersions with mesoporous carriers. In this study, the methods of co-milling and solvent evaporation were used to formulate solid dispersions of poorly water-soluble carvedilol with mesoporous silicate Neusilin US2. Furthermore, solid dispersions of carvedilol with polyethylene glycol (PEG) and Neusilin US2 were made employing a new method similar to the melt agglomeration. All three methods resulted in a significant improvement of drug release compared to the dissolution of pure carvedilol or its physical mixture with Neusilin US2. The factors contributing to the improved dissolution of the drug are an amorphous or molecularly dispersed form of carvedilol and improved wettability. Drug dissolution was the least improved in solid dispersions made with co-milling, whereas by far the greatest drug dissolution improvement was exhibited by solid dispersions of carvedilol with PEG and Neusilin US2. Moreover, the results suggested that solid dispersions of carvedilol with Neusilin US2 are physically stable when the drug is present solely deep in the pores of Neusilin US2, which can be achieved by the solvent evaporation method. On the contrary, solid dispersions of carvedilol with PEG and Neusilin US2 are physically stable also when the drug is present on the surface of Neusilin US2. An important advantage of these solid dispersions is that they are made without volatile organic solvents.

Vpliv antropomorfnih vizualij v oglaševanju zdravil za samozdravljenje na odzive potrošnikov in mediacijska vloga potrebe po spoznanju

TJAŠA SAJE, *European Business School London, Regent's University London*
Mentor: **Richard Mannix**, *European Business School London, Regent's University London*

Namen naloge je bil raziskati neposredne vplive antropomorfnih podob v oglaševanju na različne odzive potrošnikov. Raziskava poskuša razčleniti koncept antropomorfizma, tj. prenašanja človeških lastnosti na žive ali nežive entitete, ga ločiti od drugih sorodnih konstruktov in konceptualno razjasniti različne stopnje antropomorfnih predstavitev. Poleg tega gre za vpogled v vpliv individualnih razlik potrošnikov na njihove odzive, pri čemer izpostavi posredno vlogo potrebe po spoznanju. V okviru teh opredelitev si raziskava z uporabo eksperimentalne metode, ki vključuje različne testne oglase za fiktivno zdravilo za samozdravljenje, prizadeva ugotoviti, katere antropomorfnе predstavitve zmanjšajo in katere izboljšajo učinkovitost takšnega oglaševanja. Ključna ugotovitev te raziskave je, da so učinki različnih antropomorfnih manipulacij lahko odvisni od stopnje humanizacije. Raziskava tako empirično podpre različen vpliv stopenj antropomorfizma na vedenje potrošnikov in s tem postavi smernice za uspešno trženje. Z vidika izvirnosti in vrednosti je ta raziskava prva, ki raziše antropomorfizem na področju zdravil za samozdravljenje, prva, ki prouči različne ravni antropomorfnе eksplícitnosti v promocijskih oglasih in njihov vpliv na obnašanje potrošnikov, in prva, ki analizira potrebo po spoznanju kot psihološki, posredniški dejavnik, ki vpliva na antropomorfnо dojetje in na odnos potrošnikov.

The Effects of Anthropomorphic Visuals on Consumer Responses to Direct-to-Consumer Advertising for Non-Prescription Medication and the Mediating Role of Need for Cognition

TJAŠA SAJE, *European Business School London, Regent's University London*
Supervisor: **Richard Mannix**, *European Business School London, Regent's University London*

The present research seeks to provide empirical support for the direct influence of anthropomorphic imagery in advertising on a variety of consumer-driven outcomes. An attempt was made to distinguish anthropomorphism from other related constructs and to conceptually clarify different degrees of anthropomorphic explicitness. In addition, an investigation into the moderating effect of consumer's individual differences, focusing on need for cognition, was conducted. With the use of experimental research involving mock print advertisements and by testing a series of hypotheses, the study endeavours to identify which anthropomorphic presentations limit and which enhance advertising effectiveness. The key finding emerging from this study is that the effects of different anthropomorphic manipulations are incongruent and may depend on the level of humanization. The paper empirically demonstrates the effect of anthropomorphism degrees on consumer behaviour, providing a guideline for marketing practitioners. Simultaneously, the findings establish a substantial ground for future research. In terms of originality and value, this research is the first to explore anthropomorphism in the area of OTC medication, the first to test the levels of anthropomorphic explicitness in promotional images and how they drive consumer behaviour, and the first to examine the psychological determinant need for cognition as a mediating factor for anthropomorphic perception and consumer attitudes.

Razvoj in validacija metode za določitev glicerola v farmacevtskih pomožnih snoveh

PETRA ŠPENKO, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Mentorica: **Helena Prosen**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Somentorica: **Simona Peterlin**, *Lek, d. d., Ljubljana*

V proizvodnji tablet in kapsul so poleg aktivnih učinkovin pomembne pomožne snovi (ekscipienti), ki farmacevtski izdelek ščitijo pred zunanjimi vplivi. Ekscipienti imajo v farmacevtskih izdelkih več vlog, ena glavnih značilnosti ekscipienta pa je, da je inerten za aktivno učinkovino in z njo ne reagira. Ekscipienti se razlikujejo tudi po kemijski sestavi. V diplomski nalogi smo poleg mono-, di- in trigliceridov obravnavali etilcelulozne disperzije Surelease, premake, ki postopoma sproščajo učinkovino iz tablet oz. kapsul. Med drugim disperzije vsebujejo srednjeveržne trigliceride, za katere je znano, da v daljšem časovnem obdobju razpadejo na glicerol in maščobne kisline. Omenjeni proces razpadanja pri farmacevtskih oblikah ni zaželen, saj lahko poslabša kakovost končnega izdelka. Za preverjanje kakovosti disperzij Surelease je treba določiti vsebnost prostega glicerola. V diplomski nalogi smo se osredotočili na določanje vsebnosti prostega glicerola v vzorcih. Glicerol je kemikalija, ki se pogosto uporablja tako v prehranski kot v farmacevtski industriji. Ker je hidrofilna molekula, smo za ločitev na HPLC-sistemu uporabili hidrofilno interaktivno tekočinsko kromatografijo (HILIC). Razvili smo novo metodo določanja glicerola. Izbrali smo primerno kolono, topila in mobilne faze. Ločitev od ostalih komponent smo izvedli gradientno ter glicerol določili s primerjavo z eksternim standardom. Metodo smo validirali in jo okarakterizirali s parametri ponovljivosti, natančnosti, točnosti, linearnosti in robustnosti.

Development and Validation of the Method Determining Glycerol in Pharmaceutical Excipients

PETRA ŠPENKO, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*
Supervisor: **Helena Prosen**, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*
Co-supervisor: **Simona Peterlin**, *Lek, d. d., Ljubljana*

In addition to active ingredients, excipients are very important in tablet and capsule production as they protect pharmaceuticals from external influences. Excipients have several roles in pharmaceuticals, but one of their main characteristics is that they are inert to the active ingredient and do not react with them. Excipients have different chemical structures. This thesis discusses mono-, di- and triglycerides and Surelease ethylcellulose dispersions, which are aqueous coating preparations for the extended drug release. Dispersions inter alia include medium chain triglycerides, known for its decomposition into glycerol and fatty acids in a longer period of time. The decomposition is not desired in pharmaceutical formulations as it can cause a lower quality of the finished product. The content of free glycerol in dispersions has to be determined in order to verify the quality of Surelease dispersions. This thesis deals with determination of free glycerol content in samples. Glycerol is a widely used chemical in food and pharmaceutical industry. Because of its hydrophilicity, HILIC chromatography (Hydrophilic interaction liquid chromatography) is used for separations on an HPLC instrument. A new method for free glycerol determination was developed. The appropriate column, solvents and mobile phases were selected. Separations were achieved by gradient elution; free glycerol was determined with the external standard method. Finally, the method was validated and characterised by different parameters such as repeatability, accuracy, precision, linearity and robustness.

Sinteza in vrednotenje pirimidino-gvanidinskih antagonistov Tollu podobnega receptorja 4

PETER ZAJC, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Mentor: **Matej Sova**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Pri delu smo načrtovali delno sintezo spojine zadetka z dokazano antagonistično aktivnostjo na TLR4, ki je bila s pomočjo virtualnega rešetanja najdena na Fakulteti za farmacijo. S trislopnjsko sintezo smo sintetizirali tudi derivate spojine zadetka in optimizirali nekatere stopnje sinteze, kar nam je omogočilo varnejše reakcije, krajše reakcijske čase in boljše izkoristke. Pri nekaterih spojinah se nam je uspelo izogniti čiščenju s kolonsko kromatografijo, saj smo čist produkt reakcije izolirali z metodo kristalizacije. Preverjeni sta bili tudi topnost sintetiziranih spojin v celičnem mediju (RPMI 1640) in citotoksičnost na celicah HEK 293 ter ovrednoteno antagonistično delovanje na TLR4. Sintetizirane spojine so bile v veliki meri citotoksične nad koncentracijo 100 μM , kar je posledica nekaterih funkcionalnih skupin v molekuli. Ugotovljeno je bilo tudi, da sprememba položaja metoksi skupine na fenilnem obroču z mesta 5 na mesto 6 zmanjša antagonistično delovanje spojine, zamenjava 4-fluorofenilnega substituenta na gvanidinskem delu z 1-(piridin-3-ilmetil)piperazinom pa vodi v izgubo delovanja.

Synthesis and Evaluation of Pyrimidino-Guanidine Antagonists of Toll-like Receptor 4

PETER ZAJC, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*
Supervisor: **Matej Sova**, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Our work is aimed at setting up the partial synthesis of the hit compound, found by the virtual screening at the Faculty of Pharmacy and with the proven TLR4 antagonist activity. In the three-step synthesis we synthesized the hit compound derivatives and optimized some synthetic procedures, which enabled safer reactions, shorter reaction times and better yields. We managed to avoid purification by column chromatography for some compounds, obtaining the pure product through the crystallization process. The synthesized compounds were tested for solubility in the cell medium (RPMI 1640), cytotoxicity on the HEK 293 cells and TLR4 antagonist properties. To a large extent, the synthesized compounds showed cytotoxicity at concentrations greater than 100 μM , probably due to certain functional groups present in the molecule. It was also established that the change in the position of the methoxy group on the phenyl ring from the position 5 to the position 6 reduces the antagonistic activity of the compounds and the replacement of 4-fluorophenyl substituent on guanidine to 1-(pyridin-3-ylmethyl)piperazine even leads to loss of activity.

Izboljšanje učinkovitosti ultrafiltracije rečne vode

MATEVŽ ZUPANČIČ, *Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani*
Mentor: **Janez Diaci**, *Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani*
Somentor: **Iztok Golobič**, *Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani*

V nalogi obravnavamo izboljšanje procesa ultrafiltracije rečne vode, ki se uporablja v postopku priprave tehnološke vode v farmacevtskem podjetju. Pri tem se osredotočamo na analizo časovnih vrst zajetih obratovalnih parametrov delovanja sistema v preteklih petih letih. Vpliv motnosti in temperature vode povezujemo z učinkovitostjo sistema in s stopnjo povečevanja celotnega in nepovračljivega mašenja. Zasnovali smo nov koncept krmiljenja časov trajanja filtracijskih ciklov in časov izvajanja kemičnega čiščenja z možnostjo uporabe na obstoječi industrijski aplikaciji. Na podlagi opravljenih analiz predlagamo spremembe načina spiranja in rešitve za zmanjšanje tlačnih nihanj, ki povzročajo izpade sistema. Vse izboljšave ovrednotimo na podlagi prihrankov vode in kemikalij, ki jih določamo s pomočjo simulacij na razvitem modelu. Na rekonstruirani napravi smo spremenili način spiranja z dodajanjem zraka in dodajanjem koagulanta pred filtracijo in izvedli prve meritve delovanja. Na teh osnovah ocenjujemo, da bi na leto prihranili 52.000 m^3 očiščene vode in 3200 kg kemikalij. S tem bi prispevali k večji družbeni odgovornosti in trajnostnem razvoju podjetja.

Efficiency Enhancement in Ultrafiltration of River Water

MATEVŽ ZUPANČIČ, *Faculty of Mechanical Engineering, University of Ljubljana*
Supervisor: **Janez Diaci**, *Faculty of Mechanical Engineering, University of Ljubljana*
Co-supervisor: **Iztok Golobič**, *Faculty of Mechanical Engineering, University of Ljubljana*

This paper deals with efficiency enhancement in the ultrafiltration system that is used in the preparation of process water in the pharmaceutical industry, where feed water comes from a river. The main focus is on the time series analysis of the UF process parameters in the last five years. System efficiency and the rate of total and irreversible fouling versus water temperature and turbidity are analysed. As a result, we proposed a new concept of the control algorithm that decides when to start hydraulic and chemical cleaning procedures and can be used on the existing industrial application. The solutions to improve membrane rinsing and to minimize pressure fluctuations in the system are also proposed. All improvements are evaluated on the basis of lower water and chemicals consumption with the help of the developed program model. The first tests were made on the reconstructed system, where an in-line coagulation and changed rinsing regime with an air scouring were implemented. The results show that 52,000 m^3 of filtered water and 3,200 kg of chemicals could be saved in one year. This makes for greater social responsibility and sustainable development of the company.

Poznavanje in uporaba antiparazitikov pri psih in mačkah

BRINA ARAVS, PATRICIJA ŠTAINER, *Biotehniška šola Maribor*
Mentor: Andrej Toplak, *Biotehniška šola Maribor*

Namen raziskovalne naloge Poznavanje in uporaba antiparazitikov pri psih in mačkah je bil proučiti dostopnost in uporabo antiparazitikov za pse in mačke ter prevalenco in incidenco nekaterih pogostih zajedavskih bolezni pri psih in mačkah. Eden izmed ciljev naloge je bil proučiti lastnikovo poznavanje antiparazitikov in zajedavskih bolezni. Raziskovalno delo je temeljilo na pregledu literature, klinični diagnostiki, laboratorijskem delu, pogovorih z veterinarji ter anketiranju veterinarjev in lastnikov psov in mačk. Z anketo za lastnike smo želeli spoznati njihove izkušnje s preventivo in zdravljenjem zajedavskih bolezni. Z anketiranjem veterinarjev smo želeli ugotoviti njihovo mnenje in izvedeti, kakšne izkušnje imajo z zdravljenjem zajedavskih bolezni pri psih in mačkah v vsakdanji praksi. Pregledali smo tudi 250 kartotek obolelih živali. Zunanje zajedavce smo ugotavljali s kliničnim pregledom živali (kože), invandiranost psov in mačk z notranjimi zajedavci pa predvsem s koprološkimi preiskavami. Ugotovitve so ponazorjene grafično in tabelarično.

Knowledge and Use of Antiparasitic Drugs in Dogs and Cats

BRINA ARAVS, PATRICIJA ŠTAINER, *Biotechnical School Maribor*
Supervisor: Andrej Toplak, *Biotechnical School Maribor*

The study 'Knowledge and use of antiparasitic drugs in dogs and cats' was carried out to provide information on the current accessibility and use of antiparasitic drugs in dogs and cats, and also to determine the prevalence and incidence of some of the most common parasitic diseases in dogs and cats. One of the research goals of this study was also to estimate the owners' knowledge on prevention and therapy of these diseases. The research work was based on reviewing the literature, clinical diagnostics, laboratory work, discussions with veterinarians and interviewing veterinarians and owners of dogs and cats. A survey for the owners was carried out to determine the knowledge of the average owner regarding parasitic diseases and the use and experience on antiparasitics. A special survey was also carried out for veterinarians with the purpose to find out their opinions and experiences with parasitic diseases in everyday practice. We have also examined 250 patient charts. To determine the external parasites a clinical examination of the skin was conducted. The internal parasites were identified with a coprological analysis. The results are presented in graphs and tables.

Kurkuma – izolacija, identifikacija in preizkušanje njenih zdravilnih učinkovin

PETRA BAJEC, TILEN TORI, *Gimnazija Novo mesto*
Mentorica: Janja Pust, *Gimnazija Novo mesto*
Somentor: Matjaž Retelj, *Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Mikrobiološki laboratorij Novo mesto*
Somentorica: Petra Vovko, *Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Mikrobiološki laboratorij Novo mesto*

V zadnjih nekaj letih se vse več ljudi zateka k naravnim zdravilnim učinkovinam. Prav zato se je kurkuma začela pogosteje pojavljati v raziskovalnih nalogah, člankih in pa seveda v kulinariki in zdravstvu. Nas pa je zanimalo, kaj v kurkumi je tisto, kar ima zdravilne učinke. Z ekstrakcijo s Soxhletovim aparatom smo iz izbranih preparatov kurkume izolirali ekstrakt, ki smo ga z rotacijskim uparjevalnikom ločili od topila. Ekstrakt smo hranili v hladnem, temnem prostoru, vzorce pa uporabili pri tankoplastni in kolonski kromatografiji, s katerima smo ločili posamezne kurkuminoide. Rezultate smo primerjali s standardoma za kurkumin in bisdemetoksikurkumin. Pri raziskavi smo določili tudi nekatere fizikalne lastnosti dobljenih ekstraktov, nato pa smo z določanjem minimalne koncentracije, ki zavre rast kvasovke *Candida albicans*, ugotavljali protiglavno delovanje kurkuminoidov.

Curcuma – Isolation, Identification and Testing Its Active Ingredients

PETRA BAJEC, TILEN TORI, *Novo mesto Grammar School*
Supervisor: Janja Pust, *Novo mesto Grammar School*
Co-supervisors: Matjaž Retelj, *National Laboratory for Health, Environment and Food, Microbiological Laboratory Novo mesto*
Co-supervisors: Petra Vovko, *National Laboratory for Health, Environment and Food, Microbiological Laboratory Novo mesto*

Recently, it has become popular to search for medicine with natural healing properties. Consequently, curcuma has become the subject of many research papers and articles as well as an ingredient in cooking and in medicine. The purpose of this research was to identify the part of curcuma with medical properties. Using extraction with Soxhlet's apparatus, we isolated the extract from a selected specimen, which we later separated from the solvent, using the rotavaporator. We kept the extract in a cold, dark room and later used the samples in thin layer chromatography and column chromatography in order to separate certain curcuminoids. We compared the results with the curcumin and BDM-curcumin standard. We also determined some physical properties of the extracts and assessed antifungal properties of the extracts by determining the minimal inhibitory concentration that inhibits the yeast *Candida albicans*.

Primerjava komponent strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije

MOJCA GRIŽNIK, JULIJA HERMAN, NIKA KAPLJA, *Gimnazija Tolmin*
Mentor: Igor Križaj, *Institut Jožef Stefan*
Somentorica: Magdalena Kunc, *Gimnazija Jurija Vege Idrija*

Navadni gad (*Vipera berus berus*) in modras (*Vipera ammodytes ammodytes*) sta glavni strupeni vrsti kač v Sloveniji. Njuna strupa navadno nista smrtno nevarna, lahko pa zastropitev povzroči hemoragije, edeme, anafilaktični šok, mišično paralizo ali drugih zapletov, ki zahtevajo zdravljenje z ustreznim protiserumom. V Sloveniji zaradi večje dostopnosti za obe zastropitvi uporabljamo protiserum, ki je usmerjen proti surovemu modrasovemu strupu. V raziskovalni nalogi smo želeli raziskati, ali je omenjeni protiserum pri imunoterapiji zastropitve z gadovim strupom smiselno in v kolikšni meri sploh učinkuje. Strupa smo z eno- in dvodimezionalno NADS PAGE ter mišično stimulacijo mišje hemidifragme testirali za fibrinogenolizno aktivnost, imunološko navzkrižno reaktivnost ter nevro- in miotoksičnost. Dokazali smo visoko stopnjo navzkrižne reaktivnosti, ki se kaže predvsem pri vsebnosti metaloproteaz, komponent s hemoragičnim delovanjem. Testi so pokazali, da so prav metaloproteaze glavna toksična komponenta obeh strupov, pri modrasovem strupu nam je uspelo potrditi še nevrotoksično delovanje, medtem ko smo pri strupu navadnega gada odkrili tudi močno miotoksično učinkovanje. Zbrani rezultati kažejo, da bi protistrup, usmerjen proti celotnemu modrasovemu strupu, preprečil poglobitve toksične učinke strupa navadnega gada. Zaradi manjše možnosti stranskih reakcij (nesorodne komponente in alergijske reakcije) bi bil za zdravljenje zastropitve s strupom navadnega gada še bolj primeren protistrup, usmerjen zgolj proti hemoragičnim komponentam modrasovega strupa.

The Comparison of Poison Components of the European Horned Viper and the Common European Viper to choose the Right Immunotherapy

MOJCA GRIŽNIK, JULIJA HERMAN, NIKA KAPLJA, *Tolmin Grammar School*
Supervisor: Igor Križaj, *Jožef Stefan Institute*
Co-supervisor: Magdalena Kunc, *Jurij Vega Grammar School Idrija*

Common European viper and European horned viper are two main venomous snakes in Slovenia. Their venom usually does not pose a threat to humans. However, poisoning may lead to various conditions, such as haemorrhage, edema, anaphylactic shock and paralysis of skeletal muscles, which all require medical treatment with an adequate antiserum. In Slovenia, poisoning with either of the two types of venom is treated with the antiserum, designed specifically for the horned viper's venom, due to its greater accessibility. In our research work we wanted to establish to which extent the antiserum mentioned above works and if its use is reasonable. With one- and two-dimensional NADS PAGE and muscle stimulation murine hemidifragme we tested both types of venom for fibrinogenolytic activity, immunological cross reactivity, neuro- and miotoxicity. We managed to prove a high degree of cross-reactivity, which is mainly reflected in the levels of metalloproteases, components with a hemorrhagic activity. Tests have shown that metalloproteases are the main toxic components of both toxins. We have also confirmed the neurotoxic functioning of the horned viper's venom and discovered a strong myotoxic activity in the venom of the common European viper. The collected results indicate that the antidote designed against the venom of the horned viper prevents major toxic effects of the common European viper's venom. On the other hand, there is still a risk of further complications (unrelated components and allergic reactions), which could be reduced with a more suitable antidote, directed solely against haemorrhagic components of the venom of the horned viper.

Vrednotenje interakcij med biološkimi makromolekulami z encimskimi imunskimi testi

ŠPELA GUBIČ, SARA KREFT, KARLA MAKOTER, *Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*
Mentor: Peter Molek, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Somentorica: Marija Meznarič, *Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*

Leptin je proteinski hormon, ki ga izločajo maščobne celice in pomembno sodeluje pri uravnavanju energijskega ravnovesja organizma ter vpliva na nastop in potek nekaterih resnih bolezni. Nedavno so izolirali in pripravili več rekombinantnih enoverižnih fragmentov variabilne regije protiteles (scFv), ki se vežejo na leptinski receptor in zato predstavljajo potencialne antagoniste leptina. V okviru naloge smo se lotili podrobnejšega vrednotenja interakcij med izbranimi rekombinantnima fragmentoma scFv 3L5 in 3L18 ter njuno tarčo, leptinskim receptorjem. V ta namen smo opravili več prirejenih različic encimskih imunskih testov (ELISA). Ugotovili smo, da se preiskovana fragmenta scFv specifično vežeta na zunajcelično regijo človeškega leptinskega receptorja, in sicer na vezavno mesto receptorja ali na del v njegovi neposredni bližini, saj pri vezavi fragmenta tekmuje z leptinom v odvisnosti od njune koncentracije. Obenem nam je s posebej prirejenima različicama kompetitivnega testa ELISA uspelo določiti vrednosti srednje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) in ravnotežne disociacijske konstante (K_d), ustreznost uporabljenih metod pa smo potrdili z ustreznimi kontrolnimi testi. Določeni vrednosti IC_{50} znašata 722 nM (scFv 3L5) in 1,24 μ M (scFv 3L18), vrednosti K_d pa 53,7 nM (scFv 3L5) in 98,3 nM (scFv 3L18), iz česar se vidi, da je fragment 3L5 skoraj dvakrat močnejši vezalec in hkrati bolj učinkovit inhibitor vezave leptina na receptor. Glede na poznane lastnosti terapevtskih protiteles na tržišču menimo, da je jakost vezave testiranih fragmentov scFv nekoliko premajhna za zadovoljivo učinkovitost pri preizkušanju na živalskih modelih. Vseeno pa imata oba fragmenta raziskovalno in diagnostično uporabnost.

Evaluation of Interactions between Biological Macromolecules with Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ŠPELA GUBIČ, SARA KREFT, KARLA MAKOTER, *Franca Miklošič Grammar School Ljutomer*
Supervisor: Peter Molek, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*
Co-supervisor: Marija Meznarič, *Franca Miklošič Grammar School Ljutomer*

Leptin is a protein hormone secreted by fat cells, which significantly contributes to the regulation of energy balance of the organism and affects the onset and progression of some serious diseases. Recently, several recombinant single-chain variable fragments (scFvs) were isolated, which bind to the leptin receptor and may, therefore, represent potential leptin antagonists. The aim of our research project was to quantitatively evaluate the interactions between the chosen recombinant scFvs 3L5 and 3L18, and leptin receptor. We conducted several modified versions of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We have shown that both scFvs compete with leptin for binding to the leptin receptor in a dose-dependent manner. Therefore, we assume that the investigated fragments specifically recognise and bind to the extracellular region of the human leptin receptor, probably to the receptor binding site or a region in its close proximity. Furthermore, we performed other versions of quantitative and competitive ELISA to determine the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and the dissociation constant (K_d). The method was validated by including appropriate control experiments. The IC_{50} values determined for scFvs 3L5 and 3L18 were 722 nM and 1.24 μ M, respectively, and the K_d values were 53.7 nM and 98.3 nM for scFvs 3L5 and 3L18, respectively. These results indicate that the 3L5 fragment has almost twice higher affinity for the leptin receptor, and is at the same time a more effective inhibitor of the leptin-leptin receptor interaction. Based on the known properties of therapeutic antibodies on the market, we believe that the binding strength of our scFv fragments is slightly too low to continue with the tests involving laboratory animals. However, both scFvs have promising research and diagnostic use as antibody alternatives targeting the human leptin receptor.

Aktivacija naravne imunosti pri Parkinsonovi bolezni: oligomeri in fibrile α -sinukeina sprožijo aktivacijo inflammasoma NLRP3

JURE HEDERIH, JERNEJ ZORMAN, *Il. gimnazija Maribor*
Mentorica: Iva Hafner Bratkovič, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Somentorica: Katja Zorec Holnthaner, *Il. gimnazija Maribor*

Novejše raziskave odkrivajo pomembno vlogo naravne imunosti, predvsem inflammasomov, pri razvoju nevrodegenerativnih obolenj. Inflammasom NLRP3 je znotrajcelični proteinski kompleks, ki ga sestavljajo receptor NLRP3, adaptor ASC in prokaspaza 1. Aktivatorji povzročijo sestavljanje inflammasoma in samoaktivacijo kaspaze 1. Aktivirana kaspaza 1 nato cepi provnetni citokin pro-IL-1 β v aktivni IL-1 β . Za Parkinsonovo bolezen je značilna izguba dopaminergičnih nevronov v kompaktnem delu črne substance. Ob znani nevrotoksičnosti agregatov α -sinukeina ostajajo spremljajoči vnetni procesi slabo raziskani. V raziskovalni nalogi smo pokazali, da fibrile in oligomerizacijska zmes humanega α -sinukeina, ne pa tudi monomeri, povzročijo izločanje vnetnega citokina IL-1 β , pri čemer deluje oligomerizacijska zmes močneje kot fibrile. Celice z izbitimi geni za receptor NLRP3, ASC in kaspazo 1 se na skupke α -sinukeina ne odzivajo, kar nakazuje, da je inflammasom NLRP3 ključen za opaženo izločanje IL-1 β . Z inhibitorji efluksa K⁺, reaktivnih kisikovih zvrsti in fagocitoze smo potrdili ključno vlogo omenjenih procesov, ki so pomembni za aktivacijo inflammasoma NLRP3. Naši rezultati razkrivajo potencialno vlogo vnetja in inflammasoma NLRP3 pri Parkinsonovi bolezni, kar odpira nove možnosti v razvoju zdravil za to pogubno bolezen.

Innate Immunity in Parkinson's Disease: Oligomers and Fibrils of α -Synuclein Trigger NLRP3 Inflammasome Activation

JURE HEDERIH, JERNEJ ZORMAN, *Maribor Second Grammar School*
Supervisor: Iva Hafner Bratkovič, *National Institute of Chemistry Ljubljana*
Co-supervisor: Katja Zorec Holnthaner, *Maribor Second Grammar School*

The role of innate immunity, especially inflammasomes, was recently implicated in pathogenesis of various neurodegenerative diseases. NLRP3 inflammasome is a protein complex consisting of NLRP3 receptor, adaptor ASC and pro-caspase-1. Upon activation, NLRP3 inflammasome components oligomerize and cause autoactivation of caspase-1. Active caspase-1 then cleaves the proinflammatory cytokine pro-IL-1 β into active IL-1 β . Parkinson's disease is characterised by the loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta. While the neurotoxic role of α -synuclein is well established in disease progression, the underlying mechanisms of inflammation remain poorly understood. Here, we demonstrate the competence of α -synuclein fibrils and oligomerization mixture, but not monomers, to induce secretion of IL-1 β , in which oligomerization mixture was a more potent trigger than fibrils. Cells obtained from knockout mice for NLRP3, ASC and caspase-1 showed no response to α -synuclein assemblies. Thus, NLRP3-inflammasome is essential for the secretion of IL-1 β . We also show that NLRP3 inflammasome activation relies on phagocytosis of protein aggregates, efflux of K⁺ and increased ROS production. In summary, our results indicate the potential role of inflammation and NLRP3 inflammasome in Parkinson's disease, thereby indicating new targets to hinder the progression of this disease.

Določanje vsebnosti L-arginina v treh vzorcih prehranskih dopolnil in proučevanje njegovega učinka na endotelijsko funkcijo

ROK HERMAN, TJAŠA MAZEJ, *I. gimnazija v Celju*
Mentorica: Mojca Alif, *I. gimnazija v Celju*
Somentor: Bojan Krivec, *Internistična srčno-žilna ambulanta Bojan Krivec*

L-arginin je v zadnjih letih postal priljubljeno prehransko dopolnilo, ki mu pripisujejo številne fiziološke in terapevtske učinke. Z raziskovalno nalogo smo želeli preveriti, ali se vsebnost L-arginina v izbranih prehranskih dopolnilih ujema z deklarirano, in proučiti njegov učinek na endotelijsko funkcijo. Za kvantitativno vrednotenje vsebnosti L-arginina smo uporabili spektrofotometrično metodo, ki temelji na merjenju absorbance rumeno obarvanih raztopin, pripravljenih iz bazične raztopine timola, natrijevega hipobromita in L-arginina. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili njegovo vsebnost v treh vzorcih prehranskih dopolnil. Ugotovili smo, da vzorec A vsebuje 55 % količine L-arginina, ki je zapisana na deklaraciji, vzorec B 92 % in vzorec C 83 %. Na podlagi teh rezultatov smo izdelek B uporabili v drugem delu raziskave, v katerem smo s pomočjo testa zažema leve brahialne arterije proučili njegov fiziološki učinek. V raziskavi je sodelovalo deset zdravih prostovoljcev. Pri vsakem smo najprej opravili začetno meritve endotelijske funkcije, potem so zaužili 6 g L-arginina in čez 60 do 70 minut smo meritve ponovili. Vsak prostovoljec je L-arginin jemal še naslednjih osem dni. Deveti dan smo opravili tretjo meritve. Naši rezultati potrjujejo izboljšanje endotelijske funkcije 60 do 70 minut po zaužitju pri sedmih osebah, po devetih dneh pa smo izboljšanje zaznali pri polovici testnih oseb.

Determining L-arginine Content in Three Food Supplement Samples and Studying Their Effect on Endothelial Function

ROK HERMAN, TJAŠA MAZEJ, *Celje First Grammar School*
Supervisor: Mojca Alif, *Celje First Grammar School*
Co-supervisor: Bojan Krivec, *Internal Cardiovascular Dispensary Bojan Krivec*

Recently, L-arginine has become a popular dietary supplement which is said to have numerous physiological and therapeutic effects. The purpose of this research assignment was to check if the content of L-arginine in selected dietary supplements matched the declared content, and to examine its effects on the endothelial function. Quantitative evaluation of the L-arginine content was made using the spectrophotometric method, which is based on measuring the absorbance of yellow-coloured solutions prepared from the alkaline solution of thymol, sodium hypobromite and L-arginine. With the help of a calibration curve, we determined its content in three different dietary supplement samples. We found that sample A contained 55% of the quantity of L-arginine indicated on the declaration, while samples B and C contained 92% and 83% of the declared content, respectively. Based on these results, we used product B in the second part of the research, where we examined its physiological effect using a flow-mediated dilatation test. The research included 10 healthy volunteers. First, we measured their endothelial function. Next, they were given 6 g of L-arginine, repeating the measurement 60–70 minutes later. Each volunteer continued to receive L-arginine for the following eight days. On the ninth day, we performed the third measurement. Our results have confirmed the improvement in endothelial function 60 to 70 minutes after L-arginine consumption in seven persons, while half of all persons tested, showed this improvement after nine days.

Polifenoli v vršičkih borovk

SARA JENSTERLE, KRISTINA JAN, *Gimnazija Jesenice*
Mentorica: Katarina Trontelj, *Gimnazija Jesenice*

Rastline vsebujejo številne različne sekundarne metabolite, med katere spadajo tudi polifenoli. V rastlinah imajo številne pomembne vloge kot antioksidanti, antibiotiki, naravni pesticidi, signalne molekule, zaščitna sredstva proti UV-žarkom in kot strukturne molekule, imajo pa tudi zdravilne učinke za človeka. Vsebnost polifenolov je odvisna od rastlinske vrste in tudi od stresnih dejavnikov okolja. V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na primerjavo prisotnosti polifenolov v treh različnih vrstah borovk (navadna smreka *Picea abies*, rdeči bor *Pinus sylvestris* in rušje *Pinus mugo*) ter primerjavo glede na dve različni rastišči – na nižji in višji nadmorski višini. Spomladi smo na rastiščih z različno nadmorsko višino nabrali vršičke vseh treh vrst borovk. Raziskava polifenolov je potekala predvsem na vodnih ekstraktih vršičkov (prevretkih), saj smo s serijo predhodnih poskusov ugotovili, da je voda za namen naše raziskave najprimernejše topilo. Koncentracije polifenolov smo določali z metodo spektrofotometrije. Ugotovili smo, da ekstrakti iz vršičkov borovk, rastočih na višji nadmorski višini, vsebujejo opazno večje koncentracije polifenolov kot z nižinskih rastišč. Največje koncentracije smo ugotovili v vršičkih navadne smreke, rastoče na gozdni meji, nekoliko manjše pa v vršičkih rušja.

Polyphenols in Pine Tips

SARA JENSTERLE, KRISTINA JAN, *Jesenice Grammar School*
Supervisor: Katarina Trontelj, *Jesenice Grammar School*

Plants synthesize many different secondary metabolites, in particular polyphenols. The crucial roles polyphenols play in plant organisms are those of antibiotics, antioxidants, natural pesticides, signal molecules, protection against UV radiation, structure molecules and they may also have healing effects on human organisms. The amount of polyphenols depends on plant species and stress environmental factors. In our research total polyphenol content in three different species of Pinaceae family (*Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *P. mugo*) was estimated taking into account two different habitats: lowlands and the tree-line in the mountains. Young needles were collected in spring. Total polyphenol content was determined by spectrophotometry in different hot water extracts. It was found that altitude affects the concentration of polyphenols in Pinaceae family's needles as needles of trees growing in higher altitudes contain higher concentration of polyphenols.

Vpliv pozitivno nabitih proteinov na internalizacijo eksogene DNK

NEJC KEJŽAR, JAN GOJZNIKAR, *I. gimnazija v Celju*
Mentorica: Mojca Benčina, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Somentorica: Mojca Alif, *I. gimnazija v Celju*

DNK je ena najpomembnejših molekul življenja, saj shranjuje in prenaša informacije v molekularnem svetu. Vendar mora za svoje učinkovito delovanje vstopiti v celico, kjer lahko skupaj z vrsto encimov svojo informacijo prevede v proteine, ki vodijo večino biokemijskih procesov, pomembnih za življenje. Vstopanje tako velike molekule pa ni enostavno, zato smo se v tej raziskavi posvetili izboljšanju mehanizma prehajanja DNK prek celične membrane, pri čemer se funkcionalnost DNK ne spremeni. DNK je negativno nabita molekula, zato smo v tej nalogi predpostavili, da bomo s pozitivno nabitimi proteini dosegli vezavo z DNK ter tako omogočili varen in hiter prehod v notranjost celice. V ta namen smo uporabili polilizine, poskuse pa izvajali na HEK celičnih kulturah v laboratorijih Kemijskega inštituta v Ljubljani. Eksperimentalni del je bil sestavljen iz označevanja polilizinov z barvili za lažje sledenje njihove lokacije v celici, opazovanja pozicije polilizinov, DNK in receptorjev TLR9, ki smo jih uporabili za zaznavanje prisotnosti DNK, in merjenja hitrosti vstopanja kompleksov polilizina in DNK. Ugotovili smo, da dodatek teh proteinov izboljša učinkovitost in hitrost vstopanja enoverižne DNK v celico, v njeni notranjosti pa polilizini DNK prav tako zaščitijo pred razgradnjo.

The Effects of Positively Charged Proteins on Internalization of Exogenic DNA

NEJC KEJŽAR, JAN GOJZNIKAR, *Celje First Grammar School*
Supervisor: Mojca Benčina, *National Institute of Chemistry Ljubljana*
Co-Supervisor: Mojca Alif, *Celje First Grammar School*

The DNA molecule is one of the most important molecules of life, as it can store and transport information in the world of molecules. However, for its effective functionality, it has to enter the cell, where it can translate the information into proteins needed for most of the important, life-sustaining biochemical processes. But the entry of such a big molecule proves to be difficult, thereafter we focused on empowering the internalization process without altering the functionality of DNA. DNA is a negatively charged molecule; subsequently we assumed that positively charged proteins will bind to the DNA, ensuring its fast and safe passage through the cell membrane. For this purpose, we used polylysine, whereas all the experiments were executed on HEK cell cultures in the laboratories of the National Institute of Chemistry in Ljubljana. The experimental part of our research consisted of the marking of polylysine with fluorescent dyes for easier intracellular tracking, monitoring of polylysine, DNA and TLR9 position, where TLR9 receptors were used for detection of DNA presence, and measuring the rate at which polylysine-DNA complexes were entering the cell. We discovered that the addition of these proteins drastically improves the efficiency and speed at which single-strand DNA can enter the cell. In addition, polylysine also dramatically inhibited the degradation process of DNA inside the cell.

Ibuprofen – zgodovina ali prihodnost?

KLEMEN KOVAČ, ALEKSANDRA MIKIČ, LAURA PUST, *Gimnazija Novo mesto*
Mentorica: Branka Klemenčič, *Gimnazija Novo mesto*
Somentorica: Miroslava Abazović, *Dolenjske lekarne Novo mesto*

Veliko ljudi se vsak dan spopada z bolečino. Trpimo lahko zaradi telesne ali duševne bolečine, v obeh primerih pa se navadno zatekamo k uporabi zdravil. Zdravila, imenovana analgetiki, nam pomagajo lajšati bolečino. Da bi ugotovili, ob katerih bolezenskih stanjih bolniki posegajo po analgetikih, smo izvedli intervju s pediatrom in zdravnikom splošne medicine. Odločili smo se, da bomo raziskali in poskušali sintetizirati eno izmed široko uporabljenih učinkovin, ki se nahaja v analgetikih različnih proizvajalcev. V zadnjem času pogosto opažamo reklamno oglaševanje izdelkov z učinkovino ibuprofen, ki je poleg acetilsalicilne kisline in paracetamola največkrat uporabljena zdravilna učinkovina za lajšanje bolečin. Ker sta nam acetilsalicilna kislina in paracetamol dobro znana, smo izbrali ibuprofen. V šolskem laboratoriju smo izvedli sintezo ibuprofena. Pred tem smo proučili možne sintezne poti in izbrali primerno sintezo. Za spremljanje uspešnosti sinteze smo uporabili metodo tankoplastne kromatografije (TLC) in NMR-spektroskopije. S pomočjo podatkov iz Centralne baze zdravil smo raziskali, kateri izdelki na slovenskem trgu vsebujejo ibuprofen, in s pomočjo tankoplastne kromatografije kvalitativno določili vsebnost ibuprofena v izdelkih različnih proizvajalcev. Z anketo smo preverili poznavanje tržnih imen izdelkov, ki vsebujejo ibuprofen, in raziskali, kako pogosto in za katere namene v Sloveniji uporabljamo zdravila za lajšanje bolečine.

Ibuprofen – History or Future?

KLEMEN KOVAČ, ALEKSANDRA MIKIČ, LAURA PUST, *Novo mesto Grammar School*
Supervisor: Branka Klemenčič, *Novo mesto Grammar School*
Co-supervisor: Miroslava Abazović, *Dolenjske lekarne pharmacy Novo mesto*

A lot of people cope with pain on a daily basis. They suffer either physical or psychological pain, which they usually try to relieve with medications. A type of drugs called analgesics helps us relieve the pain. In order to establish what kind of symptoms patients relieve with analgesics, we conducted an interview with a paediatrician and a general practitioner. We decided to synthesize and research a widespread compound that is found in analgesics. In the last few years, there has been an increase in advertising for ibuprofen, which is alongside acetylsalicylic acid and paracetamol, the most commonly used ingredient in analgesics. And since we are familiar with acetylsalicylic acid and paracetamol we chose ibuprofen. We synthesized it in the school laboratory. First, we examined possible syntheses and chose the adequate one. In order to monitor the performance of the synthesis we used thin layer chromatography (TLC) and NMR spectroscopy. With the help of the Slovenian Central Drug Database we researched which of the products on the Slovenian market contain ibuprofen and by using TLC we qualitatively determined the content of ibuprofen in the products by different manufacturers. With this survey we checked to what extent people are familiar with brand names of analgesics containing ibuprofen, and how often and for what purpose analgesics are used in Slovenia.

Interakcije med receptorji naravne imunosti in njihovimi ligandi

KRISTINA KOVAČIČ, PIA ŠTRUKELJ PAHOVIČ, *GEPŠ Piran*
Mentorici: Karolina Ivičak Kocjan, Vida Forstnerič, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Somentorica: Breda Novak, *GEPŠ Piran*

Tollu podoben receptor 5 (TLR5) spada med receptorje naravne imunosti. Sestavljen je iz treh domen, zunanje ektodomene, bogate z levcini (LRR), enojne transmembranske vijačnice in citoplazemske domene TIR (angl. Toll/interleukin-1 receptor). Ob vezavi liganda na TLR5 pride do dimerizacije dveh TLR5 in aktivacije signalne poti. Na TLR5 se selektivno veže flagelin, ki je glavni strukturni protein flagele oziroma bakterijskega bička. Sestavljen je iz 4 domen: domeni D2 in D3 predstavljata hipervariabilno regijo, ki je za aktivacijo signalne poti nepomembna; domena D1 je pomembna pri vezavi flagelina na TLR5; domena D0 ima ključno vlogo pri aktivaciji TLR5. Kljub že znani kristalni strukturi flagelina pa še ni popolnoma razjasnjen celoten pomen N- in C-končnih delov domene D0 pri aktivaciji TLR5. Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kateri končni del domene D0 (C ali N) ima večjo vlogo pri aktivaciji TLR5 oziroma ali sta si med seboj enakovredna. Pri tem smo uporabile predhodno pripravljene genske konstrukte brez hipervariabilne regije, pri katerih je bil flagelin prek peptidnega linkerja vezan na TLR5: SF-TLR5 (pozitivna kontrola), SFΔD0-TLR5, SFΔCD0-TLR5 in SFΔND0-TLR5. Uporabile smo tudi prazna vektorja pFLAG-CMV3 in pcDNA3, ki sta služila kot negativni kontroli metod, ki smo jih uporabile. Z dvojnimi luciferaznim testom smo merile biološko aktivnost konstruktov. Prišle smo do zaključka, da je domena CD0 ključna za aktivacijo TLR5. S prenosom western smo preverjale, ali se proteini v celici izražajo v primerljivih količinah in ali so pričakovane velikosti. Rezultati so pokazali, da se proteini v celicah izražajo v primerljivih količinah in so pričakovane velikosti. S pretočnim citometrom smo opazovale, ali se proteini izražajo na površini celic. Izražanje konstruktov je bilo primerljivo z negativno kontrolo. Iz tega lahko sklepamo, da so se proteini na membrani izražali v zanemarljivih količinah.

The Interface between Innate Immune Receptors and Their Ligands

KRISTINA KOVAČIČ, PIA ŠTRUKELJ PAHOVIČ, *GEPŠ Piran*
Supervisors: Karolina Ivičak Kocjan, Vida Forstnerič, *National Institute of Chemistry Ljubljana*
Co-supervisor: Breda Novak, *GEPŠ Piran*

Toll-like 5 receptors (TLR5) are classified as innate immune receptors. They consist of 3 domains: an external ectodomain which contains leucine-rich repeat (LRR) motifs, a single transmembrane helix and a cytoplasmic Toll/interleukin-1receptor (TIR) domain. After the ligands are bound on TLR5, the dimerization of two TLR5s and activation of the signalling pathway occurs. TLR5 recognises flagellin, the protein found in most flagella. Flagellin consists of four domains. The D2 and D3 domains are called hypervariable regions and do not play an essential role in the activation of the signalling pathway. The D1 domain is necessary for the binding of flagellin to the receptor, whereas the D0 domain is crucial for triggering the signalling pathway. Although the crystal structure of flagellin is already defined, there are still some unknown functions of N- and C- terminal ends of the D0 domain. The aim of this research paper is to discover which final part (N or C) of the D0 domain is more important in the activation of the TLR5. In this study, previously prepared chimeric proteins without a hypervariable region have been used, where flagellin has been linked to the TLR5 through peptide linker. These chimeric proteins include: SF-TLR5, used as positive control, SFΔD0-TLR5, SFΔCD0-TLR5 and SFΔND0-TLR5. In addition, control vectors pFLAG-CMV3 and pcDNA3 have also been used, serving as negative controls of the used methods. The biological activity of chimeric proteins has been measured with dual luciferase reporter assay. Based on the results obtained, it was established that CD0 domain is crucial for the TLR5's activation. We checked if our expressed proteins met the expected size and pureness using the Western Blot method. The results showed that our predictions were correct. We also tested if the proteins were expressed on the cell's membrane, using flow cytometry. The results were comparable with the negative control. Consequently, we concluded that the proteins were expressed in negligible amounts.

Odkrivanje atrijske fibrilacije z žepnim elektrokardiografom z namenom preprečevanja možganske kapi pri starostnikih

EVA LOBNIK, ANJA LOBNIK, *II. gimnazija Maribor*
Mentorica: **Katja Zorec Holnthaner**, *II. gimnazija Maribor*
Somentorica: **Vesna Masten Gubelj**, *OŠ Bojana Ilča Maribor*

Atrijska fibrilacija (AF) je najpogostejša motnja srčnega ritma. Njena pogostost narašča s staranjem populacije in s pridruženimi obolenji. Velikokrat je neprepoznana, dokler ne pride do katastrofalne posledice – možganske kapi, saj se ob tej aritmiji poveča nastajanje strdkov v levem srčnem preddvoru. Namen raziskave je bil ugotoviti pomen presejalnega odkrivanja AF med starostniki, da bi lahko preprečili možgansko kap. 203 orientiranim oskrbovancem doma upokojencev, starim povprečno 82 let, sva posneli enokanalni elektrokardiogram, izmerili krvni tlak ter opravili anketo o srčno-žilnih boleznih, dejavnikih tveganja za AF, možgansko kap in krvavitev, o zmogljivosti ob AF in jemanju protitrombotičnih zdravil. Ugotovili sva, da ima tretjina preiskovancev AF. Ženske so v povprečju 8 let starejše, med spoloma ni statistične razlike v pojavnosti AF. Kljub velikemu tveganju za možgansko kap jemlje antikoagulacijska zdravila le petina preiskovancev, čeprav je tveganje za krvavitev pri polovici majhno.

Atrial Fibrillation Screening with a Pocket Electrocardiograph for Stroke Prevention in the Elderly

EVA LOBNIK, ANJA LOBNIK, *Maribor Second Grammar School*
Supervisor: **Katja Zorec Holnthaner**, *Maribor Second Grammar School*
Co-supervisor: **Vesna Masten Gubelj**, *Maribor Bojan Ilč Primary School*

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia; the frequency increases with aging and the comorbidity of population. It is often unrecognisable unless there is a catastrophic outcome – stroke, because it is associated with blood clot formation in the left atrial appendage. The aim of our study was to establish the importance of AF screening in the elderly for stroke prevention. We included 203 conscious nursing home occupants; the average age was 82. We recorded a single channel electrocardiogram, took blood pressure and conducted a questionnaire on cardiovascular diseases, risk factors for AF, stroke and bleeding as well as on exercise capacity of the participants with AF. Women were about 8 years older; there were no statistically significant differences in AF occurrence between both genders. Half of the participants were at a low bleeding risk, but only one fifth had received anticoagulation therapy despite a high risk for stroke.

Kartiranje epitopov poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu

TINKARA VOZEL, LARA OBERŠKI, *II. gimnazija Maribor*
Mentor: **Tomaž Bratkovič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Somentorica: **Zdenka Keuc**, *II. gimnazija Maribor*

Bakteriofagne predstavitevne knjižnice so zbir velikega števila bakteriofagov, pri čemer vsak bakteriofag na svoji površini izraža naključen peptid. Iz takšnih knjižnic lahko izoliramo peptide z afiniteto do različnih organskih molekul. V raziskovalni nalogi smo uporabili dva tipa knjižnic – Ph.D.-12 (izraženi linearni dodekapeptidi) in Ph.D.-C7C (ciklični nonapeptidi). Izolacija ligandov iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic naključnih peptidov predstavlja načeloma preprosto, a vendar učinkovito tehniko odkrivanja strukturno preprostih peptidov, ki so usmerjeni na biološko pomembna vezišča na površini tarčnega proteina. Posledično lahko takšni peptidi vplivajo na delovanje tarčnih proteinov in *in vitro/in vivo*. Uporabni so tudi v raziskavah s področja razvoja in odkrivanja zdravil ter diagnostiki različnih obolenj. V okviru raziskovalne naloge smo z afinitetno selekcijo ligandov iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic naključnih peptidov kartirali epitope modelnih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu. Kot modelni antigen smo izbrali grelin, ker gre za relativno kratek peptid brez višjih nivojev proteinske strukture. Pričakovali smo, da bodo poliklonska protitelesa prepoznala različne linearne epitope grelina, a nam je uspelo določiti le enega, tj. fragment sedmih aminokislinskih ostankov, ki se razteza med argininom na mestu 15 in lizinom na položaju 24 zrelega grelina. Sposobnost vezave peptidov smo preverili z encimskim imunskim testom, specifičnost vezave pa smo skušali dokazati s kompeticijo bakteriofagov s predstavljenimi peptidi in sinteznim grelinom za vezavo na tarčna protitelesa.

An Investigation on Epitope Mapping of Polyclonal Antibodies, Directed against Ghrelin

TINKARA VOZEL, LARA OBERŠKI, *Maribor Second Grammar School*
Supervisor: **Tomaž Bratkovič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Co-supervisor: **Zdenka Keuc**, *Maribor Second Grammar School*

Epitope mapping is a process of determining amino-acid sequences of binding sites (epitopes). In the present work, we mapped epitopes of model polyclonal antibodies directed against the 28-amino acid peptide hormone ghrelin, involved in mechanisms of appetite regulation. The research question was: What kind of epitopes will be identified through screening phage-display libraries Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C against model polyclonal antibodies as targets? We isolated polyclonal antibodies directed against ghrelin from the goat serum and performed two affinity selections using two phage-displayed random peptide libraries (Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C). Peptides were expressed on filamentous phage vectors M13KE. The ability of phage-born peptides to bind the target antibodies was tested with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In addition, binding specificity was tested with competitive ELISA, where synthetic ghrelin competed with individual phage clones for binding sites on the target antibodies. We aligned selected peptides to ghrelin's amino acid sequence and determined relevant antigenic determinants. We chose ghrelin as the model antigen for its short peptide chain that likely possesses no higher levels of protein structure. We expected polyclonal antibodies to recognise different ghrelin's linear epitopes. However, we succeeded in identifying a single, presumably dominant linear epitope represented by a fragment of 10 amino acid residues, located between arginine at position 15 and lysine at position 24 of ghrelin.

Zmanjševanje grenkobe izdelkov v farmaciji

EMA BUTARA, ALEŠ ZUPANČIČ, *Gimnazija Novo mesto*
Mentorica: Tatjana Durmič, *Gimnazija Novo mesto*

Cilj najinega raziskovalnega dela je bil ugotoviti primernost uporabe treh snovi (cimetove kisline, ferulične kisline in kavne kisline) za zmanjševanje grenkobe kininovega sulfata ter ugotoviti vpliv koncentracije maskerjev grenkega okusa na učinkovitost zmanjševanja grenkobe kininovega sulfata. Želela sva določiti maskerja grenkega okusa in njegovo koncentracijo za kar najbolj optimalno zmanjševanje grenkobe. Z raziskovalnim delom sva želela predstaviti alternativo saharozi, kot sredstva za zmanjševanje grenkobe, ter način za zmanjševanje grenkobe izdelkov v farmaciji, ki bi bili primerni tudi za diabetike. Z uporabo najine alternative bi se lahko izognili zastrupitvam z zdravili pri majhnih otrocih, ki zdravilo zaradi sladkosti nenadzorovano zaužijejo v velikih odmerkih. Kot najbolj primeren masker grenkega okusa se je pokazala kavna kislina s koncentracijo 0,1 %. V omenjenem primeru nama je grenkobo kininovega sulfata uspelo zmanjšati na 59,5 % začetne vrednosti grenkobe. Ugotovila sva tudi, da prihaja do pomembnih razlik pri ocenjevanju grenkobe med spoloma, pri čemer je povprečna ocena grenkobe pri posameznih vzorcih pri ženskah v povprečju višja, pa tudi pri vrednotenju grenkobe so manj zanesljive od moških. Kavna kislina se je pokazala za bolj primerno od saharoze, saj bi za doseganje enakega učinka potrebovali bistveno manjšo koncentracijo kavne kisline.

Reducing Bitterness of Pharmaceutical Products

EMA BUTARA, ALEŠ ZUPANČIČ, *Novo mesto Grammar School*
Supervisor: Tatjana Durmič, *Novo mesto Grammar School*

The aim of our research was to determine the suitability of the use of three substances (Cinnamic acid, Ferulic acid and Caffeic acid) to reduce the bitterness of quinine sulfate and to determine the optimal concentrations of the taste-modifying agents for reducing the bitterness of Quinine sulfate. The purpose was to determine the optimal bitterness inhibitor and its concentration for the most efficient reduction of bitterness. The aim of our research work was to present an alternative to sucrose as an agent for bitterness reduction and propose a way to reduce the bitterness of pharmaceutical products that would be suitable for diabetics. By using our alternatives poisoning in young children as a result of consuming too much medicine because of its sweetness, could be avoided. We have determined that the caffeic acid is the most suitable bitterness inhibitor in a concentration of 0.1%. In that case, we succeeded in reducing the bitterness of quinine sulfate to 59.5% of primary value of bitterness. We have also found that there are significant differences in the evaluation of bitterness between the sexes, where women have a higher average rating of bitterness in individual samples. They are less reliable in the evaluation of a bitter taste than men. Caffeic acid has proven to be more appropriate than sucrose since, in order to achieve the same effect it requires significantly lower concentrations compared to the concentrations of sucrose.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

76	Brina Aravs	86	Anja Lobnik
51	Andrej Artenjak	86	Eva Lobnik
77	Petra Bajec	79	Karla Makoter
61	Helena Bogdan	81	Tjaša Mazej
89	Ema Butara	68	Špela Medic
19	Katja Čvan Trobec	56	Tina Mesarič
52	Jana Ferdin	84	Aleksandra Mikić
83	Jan Gojznikar	69	Jože Mužerlin
62	Irena Gorenc	87	Lara Oberški
63	Kaja Gosak	70	Matjaž Pajk
78	Mojca Grižnik	84	Laura Pust
79	Špela Gubič	57	Nejc Rojko
80	Jure Hederih	71	Eva Rožman
78	Julija Herman	72	Tjaša Saje
81	Rok Herman	58	Matej Skočaj
64	Jožica Hočevar	31	Miha Skvarč
25	Žiga Hodnik	73	Petra Špenko
53	Urška Jamnikar Ciglencečki	76	Patricija Štainer
82	Kristina Jan	37	Marko Štefanič
82	Sara Jensterle	85	Pia Štrukelj Pahovič
65	Ana Jerše	77	Tilen Tori
78	Nika Kaplja	60	Blaž Vidmar
54	Jože Kastelic	59	Tanja Vnučec Popov
83	Nejc Kežar	87	Tinkara Vozel
66	Tina Kernulc	74	Peter Zajc
84	Klemen Kovač	80	Jernej Zorman
85	Kristina Kovačič	88	Aleš Zupančič
55	Eva Kralj	75	Matevž Zupančič
79	Sara Kreft	43	Špela Zupančič
67	Sabina Kregar		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

84	Miroslava Abazović	26, 54	Danijel Kikelj	70	Matej Smrkolj
81, 83	Mojca Alif	84	Branka Klemenčič	44	Satyanarayana Somavarapu
57	Gregor Anderluh	44, 67	Petra Kocbek	74	Matej Sova
83	Mojca Benčina	55	Albin Kristl	69	Branko Stanovnik
64	Marin Berovič	81	Bojan Krivec	32	Bojan Tepeš
38	Marija Bogataj	78	Igor Križaj	53	Ivan Toplak
51	Borut Božič	78	Magdalena Kunc	76	Andrej Toplak
87	Tomaž Bratkovič	52	Tanja Kunej	82	Katarina Trontelj
59	Darinka Brodnjak Vončina	20	Mitja Lainščak	61	Darko Uršič
52	George A. Calin	72	Richard Mannix	58	Peter Veranič
59	Lea Cvitkovič Maričič	86	Vesna Masten Gubeljak	77	Petra Vovko
51	Saša Čučnik	79	Marija Meznarič	38, 61, 70	Franc Vrečer
75	Janez Diaci	79	Peter Molek	80	Katja Zorec Holnthaner
56	Damjana Drobne	85	Breda Novak	55	Simon Žakelj
88	Tatjana Durmič	62	Jana Nunić		
85	Vida Forstnerič	67	Leena Peltonen		
60	Andrej Gartner	73	Simona Peterlin		
64	Aleš Gasparič	26	Lucija Peterlin Mašič		
75	Iztok Golobič	54, 71	Odon Planinšek		
80	Iva Hafner Bratkovič	68	Janez Plavec		
65	Ester Heath	59, 60, 65, 73	Helena Prosen		
32	Alojz Ihan	77	Janja Pust		
85	Karolina Ivičak Kocjan	66	Martina Repas		
63	Marjan Jereb	77	Matjaž Retelj		
20	Mojca Kerec Kos	56, 58	Kristina Sepčič		
87	Zdenka Keuc	62	Gregor Serša		

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, lekt. mag. Nina Bostič Bishop

Produkcija Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk Tiskarna Vek

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

www.krkinenagrade.si

44

www.krkinenagrade.si

