



45.

Krkine nagrade
ZNANOST POVEZUJE.

45. Krkine nagrade | 45th Krka Prizes

25. simpozij

Zbornik povzetkov



Poslanstvo

Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

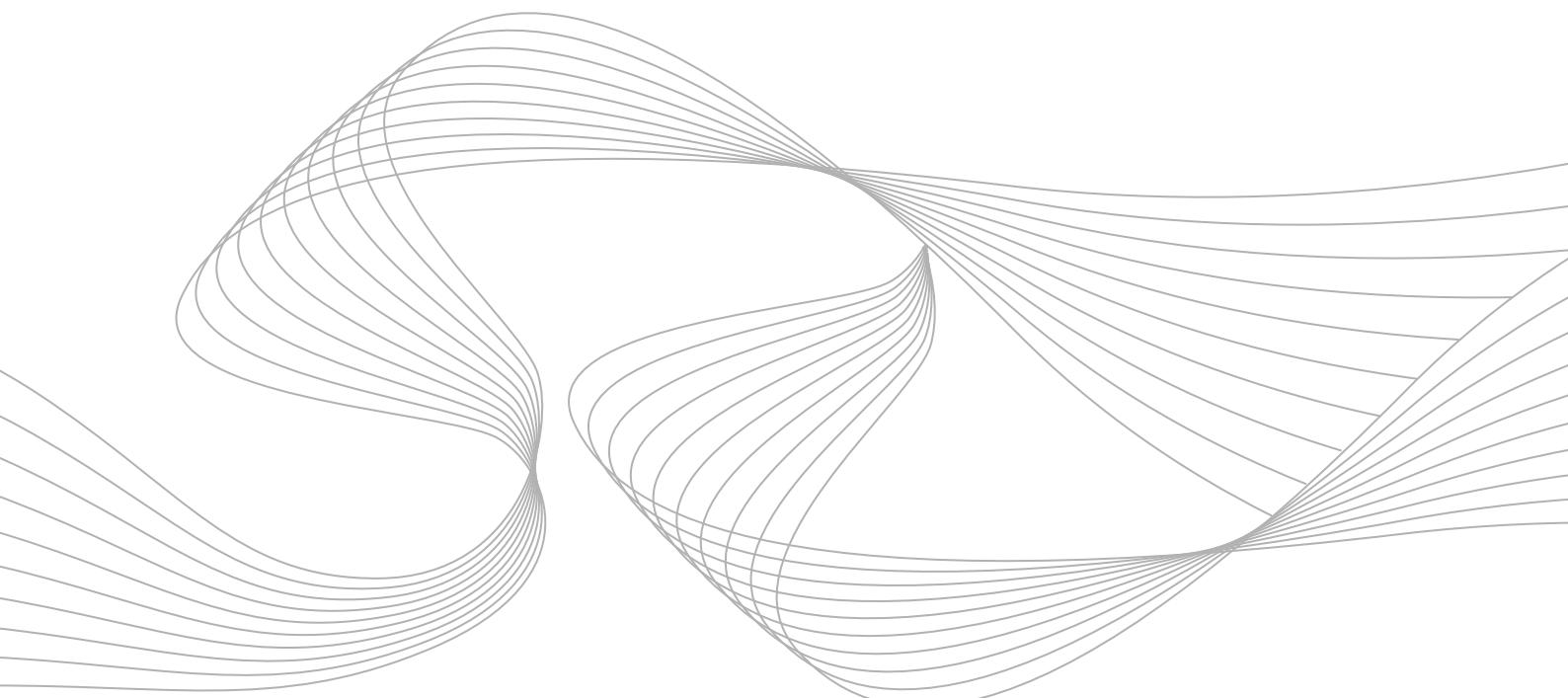
Spodbujamo mladostno zagnanost in stremljenje k odličnosti v raziskovalnem delu. Tlakujemo pot novim spoznanjem, ki bodo prispevala k novim izdelkom prihajajočih generacij.



45. Krkine nagrade
ZNANOST POVEZUJE.

25. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 16. oktober 2015



**Častni odbor
45. 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. **Igor Tičar**, 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, dr. Primož Benkič, dr. Tadeja Bevec, dr. Jure Bezenšek, mag. Irena Bobnar, mag. Marko Boh, dr. Sergeja Bombek, dr. Blaž Brulc, dr. Bojan Burja, mag. Lea Cvitkovič Maričič, dr. Irena Čarman, Aleša Dular Vovko, doc. dr. Aleš Gasparič, dr. Ivan Gobec, mag. Mojca Golob, Peter Hančič, dr. Žiga Hodnik, Grega Hudovornik, Dušan Janežič, dr. Špelca Jenko, dr. Boštjan Jerman, Saša Kajdič, Milena Kastelic, dr. Davor Kiđemet, Ksenija Kikelj, dr. Maja Kincl Skube, Matjaž Kirn, dr. Alen Kljajić, Alenka Kmecl, dr. Saša Kolarič, dr. Borut Kovačič, Irena Krajačič, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, mag. ALENKA KRAMARIČ, dr. Zdenka Kranjc Gregorčič, dr. Vesna Krošelj, mag. Bojana Kržič, Andreja Kuhar, dr. Simon Kukec, dr. Jernej Kužner, dr. Roman Lenaršič, dr. Alenka Leskovar, mag. Denise Leskovar, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateović Rojnik, dr. Špela Miklič, Mirjam Milharčič Simčič, Dušanka Oblak Božič, mag. Irena Orel, mag. Vesna Pahor, Urška Papež Berus, dr. Matej Pavli, Mitja Pelko, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, dr. Miha Plevnik, mag. Ivan Radež, dr. Nataša Rebolj, Vojko Rebolj, Marjeta Redek, Urška Ribič, dr. Aleš Rotar, Vladimira Saje, Robert Sekereš, dr. Zvone Simončič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, Janika Slanc Vovk, dr. Janez Smodiš, dr. Matej Smrkolj, dr. Polona Smrkolj, mag. Nada Šavor, dr. Leon Ščuka, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Marko Štefanič, dr. Anton Štimac, dr. Jaroslav Tihi, dr. Katja Trontelj, mag. Robert Ucman, dr. Ana Vidmar, dr. Tanja Vnučec Popov, dr. Miha Vrbinc, Tomaž Vrbinc, prof. dr. Franc Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Damjana Zupančič Božič, dr. Silvo Zupančič

VSEBINA | CONTENT

45. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Svetega Sklada Krkinih nagrad
- 10 | Krkini nagrajenci 2015

25. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | Franc Vrečer, predsednik Znanstvenega odbora

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

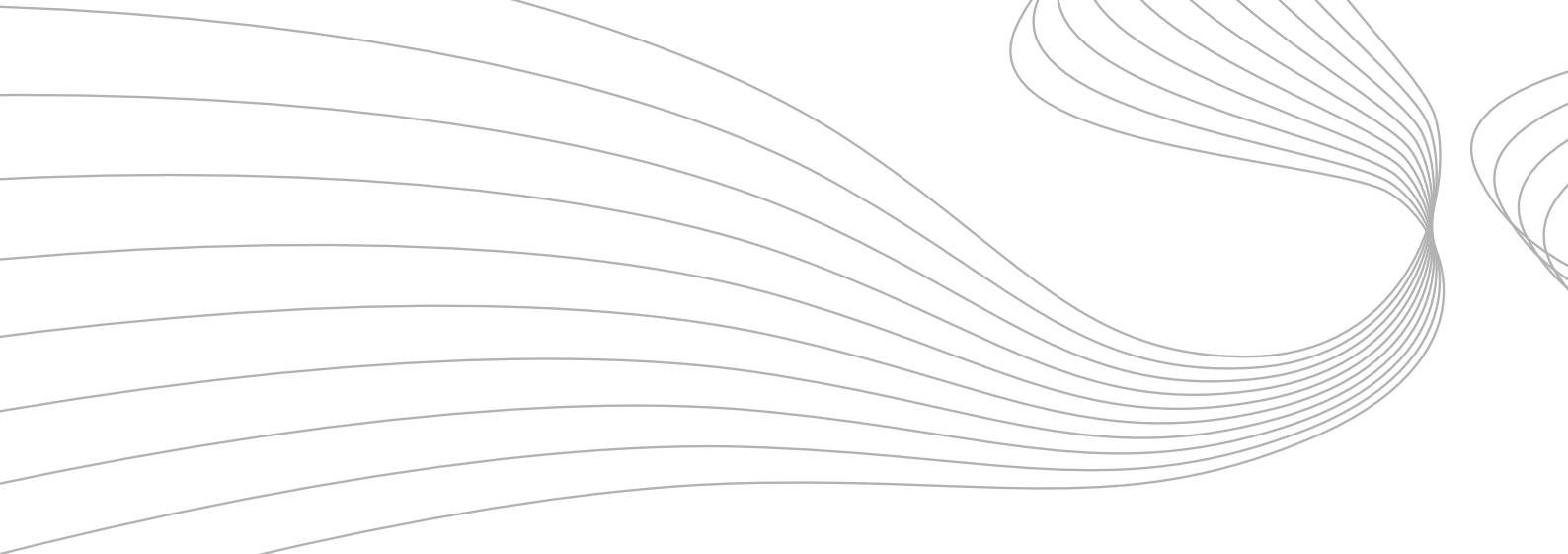
- 18 | Aljoša Bolje, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza in koordinativne lastnosti novih triazolskih ligandov
- 24 | Katja Čerpnjak, Krka, d. d., Novo mesto
Solubilizacija slabo topne učinkovine s samomikroemulgirajočimi sistemi, vgrajenimi v trdne farmacevtske oblike
- 30 | Jana Erjavec, Nacionalni inštitut za biologijo
Vpliv proteinskih ekstraktov in čistih proteinov, izoliranih iz gliv (*Basidiomycota*), ter njihovi učinki na rastlinsko patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum*
- 36 | Maja Radivojša Matanović, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj in vrednotenje temperaturno odzivnih hidrogelov z nanokompleksi za subkutano podaljšano sproščanje heparina
- 42 | Eva Tavčar Benković, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Fitokemijske raziskave fagopirinov iz navadne ajde in fenolov iz navadne jelke

45. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Maša Bošnjak**, *Onkološki inštitut Ljubljana*
Protitumorski in antiangiogeni učinek genske terapije s plazmidom AMEP na mišjem modelu melanoma
- 52 | **Rok Gaber**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Uporaba sintetičnih DNA-vezavnih proteinov za procesiranje informacij in usmerjanje procesov v bioloških sistemih
- 53 | **Jure Gujt**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Računalniške simulacije asociacije enostavnih soli in surfaktantov v vodnih raztopinah
- 54 | **Tanja Koleša Dobravc**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Koordinacijske spojine prve vrste prehodnih elementov s potencialnim hipoglikemičnim delovanjem
- 55 | **Jasna Lojk**, *Fakulteta za elektrotehniko Ljubljana, Univerza v Ljubljani*
Analiza interakcij med celicami in magnetnimi nanodelci
- 56 | **Gregor Lorbek**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Presnova in ravnovesje holesterola pri miših s pogojno izbitim genom *Cyp51* v jetrih
- 57 | **Mitja Pišlar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Razvoj modela prehoda pelet skozi želodec za napovedovanje kinetike absorpcije učinkovin
- 58 | **Barbara Pogorelčnik**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Strukturno podprtlo načrtovanje novih zaviralcev človeške DNA topoizomeraze IIa
- 59 | **Benjamin Prek**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza enaminonov iz metil ketonov in njihova nadaljnja pretvorba v aromatske in heteroaromatske sisteme
- 60 | **Lara Prosen**, *Onkološki inštitut Ljubljana*
Vpliv magnetofekcije s plazmidno DNA, ki kodira shRNA proti genu *Mcam*, na angiogenezo mišjih endotelijskih celic in proliferacijo celic mišjega melanoma *in vitro*
- 61 | **Aleš Ručigaj**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Analiza procesa in matematično modeliranje kinetike encimsko katalizirane sinteze statinskega derivata
- 62 | **Maša Sinreih**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Študije metabolizma progesterona in vloge metabolitov pri raku endometrija in endometriozni

- 63 | **Marko Slana**, Krka, d. d., Novo mesto
Razgradnja enrofloksacina v iztrebkih piščancev pitancev
- 64 | **Rok Šibanc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Numerično modeliranje dvofaznega toka v Wursterjevi komori z računalniško dinamiko tekočin
- 65 | **Jure Vajs**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteze in uporaba novih diazenov in triazenov
- 66 | **Maja Antončič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza alfa-D-manoziliranih glikokonjugatov kot ligandov za lektine, specifične za manozo
- 67 | **Nastja Bašelj**, Krka, d. d., Novo mesto
Raziskave migracije vode med strukturnimi polisaharidi in ostalimi komponentami trdnih farmacevtskih oblik
- 68 | **Andrej Emanuel Cotman**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje in sinteza analogov 4,5-dibromo-1H-pirola s tirozinskim fragmentom kot zaviralcev giraze B s protibakterijskim delovanjem
- 69 | **Jernej Kastelic**, Krka, d. d., Novo mesto
Vpliv sestave disperzije za oblaganje tablet na izbrane lastnosti filmske obloge
- 70 | **Nejc Koračin**, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani
Analiza parametrov razprševanja pri procesu oblaganja tablet
- 71 | **Dejan Lamešić**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Sferična kristalizacija lakoze
- 72 | **Klara Lombar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza novih pirazolovih analogov histamina na osnovi 4,5,6,7-tetrahidropirazolo [1,5-c]pirimidina
- 73 | **Urša Nagode**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja karvedilola z elektrostatskim sukanjem
- 74 | **Saša Rezelj**, Kemijski inštitut Ljubljana
Opredelitev zgradbe in delovanja mutanta listeriolizina O Y406A
- 75 | **Urška Slapšak**, Kemijski inštitut Ljubljana
Določanje struktur apo in holo oblik CaM-domene α-aktinina 1 z jedrsko magnetno resonanco

- 76 | **Jerca Kristan, Tjaša Kitanovski**, Gimnazija Novo mesto
Sovražnik mojega sovražnika je moj priatelj – opis, priprava in učinkovitost bakteriofaga PC14, specifičnega za *Campylobacter jejuni*
- 77 | **Nikola Rakić**, II. gimnazija Maribor
Dva obraza pekoče paprike
- 78 | **Sebastijan Pluščec**, II. gimnazija Maribor
Vpliv koncentracije AgNO₃ in načina sinteze na velikost srebrovih nanodelcev, njihovo protimikrobnoučinkovitost in uspešnost vključitve v hidrogel
- 79 | **Ula Ana Leban, Iris Zajc**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Odpornost bakterije *Salmonella Infantis* proti antibiotikom v slovenski perutninski proizvodnji
- 80 | **Ana Milovanović, Ana Halužan Vasle**, I. gimnazija v Celju
Načrtovanje umetnih genskih omrežij
- 81 | **Žan Zemljič**, II. gimnazija Maribor
Priprava in lastnosti ekstraktov biološko aktivnih učinkovin šentjanževke, *Hypericum perforatum* L.
- 82 | **Andreja Kamenik, Patricija Štainer**, Biotehniška šola Maribor
Prevalenca metljavosti in zatiranje metljavosti pri govedu v severovzhodni Sloveniji
- 83 | **Simon Iskra, Nikolaj Candellari**, Gimnazija Novo mesto
Protikorozjska zaščita in vrednotenje koroziskih procesov s »pametnim« hibridnimi sol-gel prevlekami na železu in jeklu
- 84 | **Romana Vranešič, Vito Šuklje, Peter Matek**, Srednja šola Črnomelj
Razvoj diagnostične metode za določanje Downovega sindroma iz krvi nosečnic
- 85 | **Teja Kosmač, Julija Križaj, Maja Šubic**, Gimnazija Jurija Vege Idrija
Izolacija disintegrinov iz strupa modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*) in ocena njihovega antimetastatskega potenciala
- 86 | **Nadja Škafar, Maja Špilak, Mateja Žnidarič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Metoda za hitro določanje koncentracije nitastih fagov: verižna reakcija s polimerazo v realnem času
- 87 | **Tomaž Žigon**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Biološka razgradnja hormonskih motilcev v pilotnih bioreaktorjih
- 88 | **Petra Kern, Aljaž Mulej, Anja Šivic**, Biotehniški center Naklo
Antibiotični učinki eteričnih olj na rast patogenih kožnih bakterij *Staphylococcus epidermidis*



V Krki, tovarni zdravil, z razvojem, proizvodnjo in trženjem farmacevtskih izdelkov že več kot šestdeset let skrbimo za zdravje in kakovostno življenje. Čeprav nikoli nismo prešteli vseh, ki smo jim pomagali, se njihovo število gotovo meri v milijonih. To nas navdaja z zadovoljstvom, hkrati pa se zavedamo, kako velika je naša odgovornost in kaj vse moramo še doseči, da bomo svoje poslanstvo uspešno nadaljevali.

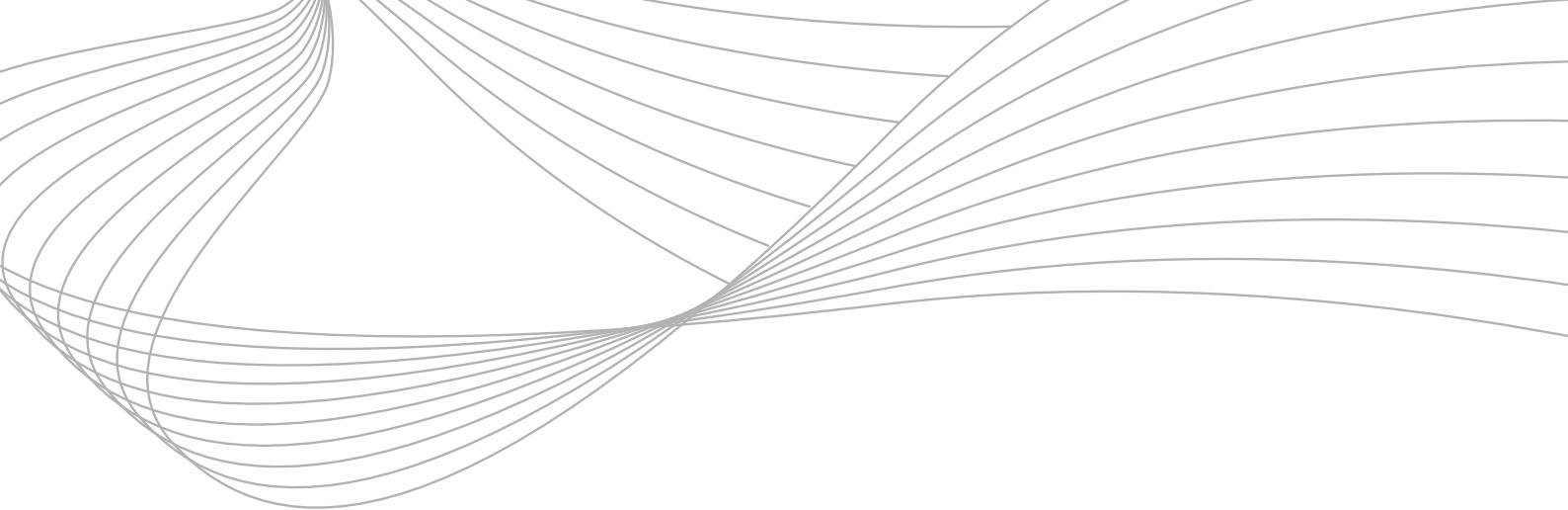
Raziskovanje novega je gotovo najboljši motiv za povezovanje tudi prek meja tovarne ali akademske inštitucije. V Krki se nujnosti sodelovanja v raziskovalnem in tudi vzgojnem procesu zavedamo. Vedno smo gradili na lastnih, domačih kadrih in tudi v prihodnje bo tako. Ko govorimo o svojih kadrih, imamo v mislih sodelavce, ki so zaposleni v Krki, pa tudi druge ljudi, ki z nami tesno sodelujejo. Veselimo se novih moči, ki bodo v Krki ali zunaj nje pripomogle k doseganju naših ciljev.

Pomembni partnerji ste tudi vsi, ki s svojo zavezo k vzgoji novih, mladih znanstvenikov in osvajanju novega znanja skupaj z nami skrbite za stalen napredek. Vaše izkušnje so prav tako odločilne kakor zagnanost mladih generacij, ki prihajajo.

V prihodnjih letih bodo pomembni novi izdelki in nove tehnologije, ki se bodo potrdili na trgu. Z znanjem, ki ga bomo vložili vanje, je krog sklenjen, ljudje, za katere skrbimo, bodo živel zdravo in kakovostno življenje, rezultati raziskav in razvoja bodo potrjeni in naše vezi bodo še močnejše.

Nagrajencem iskreno čestitam, mentorjem in vsem, ki mlade raziskovalce vzpodobujate, pa se zahvaljujem za vztrajnost in požrtvovalnost. Prepričan sem, da se bomo tudi v prihodnje povezovali in srečevali povsod, kjer bo Krka prispevala k zdravju in kakovosti življenja.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Svetu Sklada Krkinih nagrad



For more than 60 years Krka has been developing, producing and marketing its pharmaceutical products so that people could have a better quality of life. Although we have never counted all the people we have helped over the years, it is safe to say that the number is in the millions. This gives us great satisfaction, though at the same time we are aware of how big our responsibility is and what we need to achieve to continue realising our mission.

Researching uncharted territories is certainly one of the best ways for coming together beyond the factory or university level; at Krka we are acutely aware that we need to collaborate with others in both research and educational aspects. We have always built on our own workforce, and will continue to do so in the future; I am referring to anyone who is employed at Krka or has worked with us closely. We are more than happy to welcome new faces that will help us achieve our goals either within the company itself or outside of it.

You are important partners in all of this, you who have committed your work to educating young researchers and who, together with us, help things move forward. Your experiences are as crucial as the drive and motivation that impels the younger generations.

New products and new technologies will come to the market in the future and play an important role. The knowledge we will invest in those novelties will make the process come full circle: our patients will have a better quality of life, trial and research results will be demonstrated and our bonds will be even stronger.

I would like to sincerely congratulate all the winners of Krka Prizes. I also thank all the mentors and anyone who encourages young researchers for your perseverance and dedication. I am convinced that we will continue to come together in the future as well and see our paths crossed wherever Krka will contribute its share to better health and quality of life.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2014 | KRKA PRIZE WINNERS 2014

KRKINE NAGRADOV ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Aljoša Bolje	doktor znanosti s področja kemije	Janez Košmrlj	2522
Katja Čerpnjak	doktorica znanosti s področja farmacije	Mirjana Gašperlin Franc Vrečer	2523
Jana Erjavec	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Maja Ravnikar	2524
Maja Radivojša Matanović	doktorica znanosti s področja farmacije	Pegi Ahlin Grabnar Iztok Grabnar	2525
Eva Tavčar Benković	doktorica znanosti s področja farmacije	Samo Kreft Damjan Janeš	2526

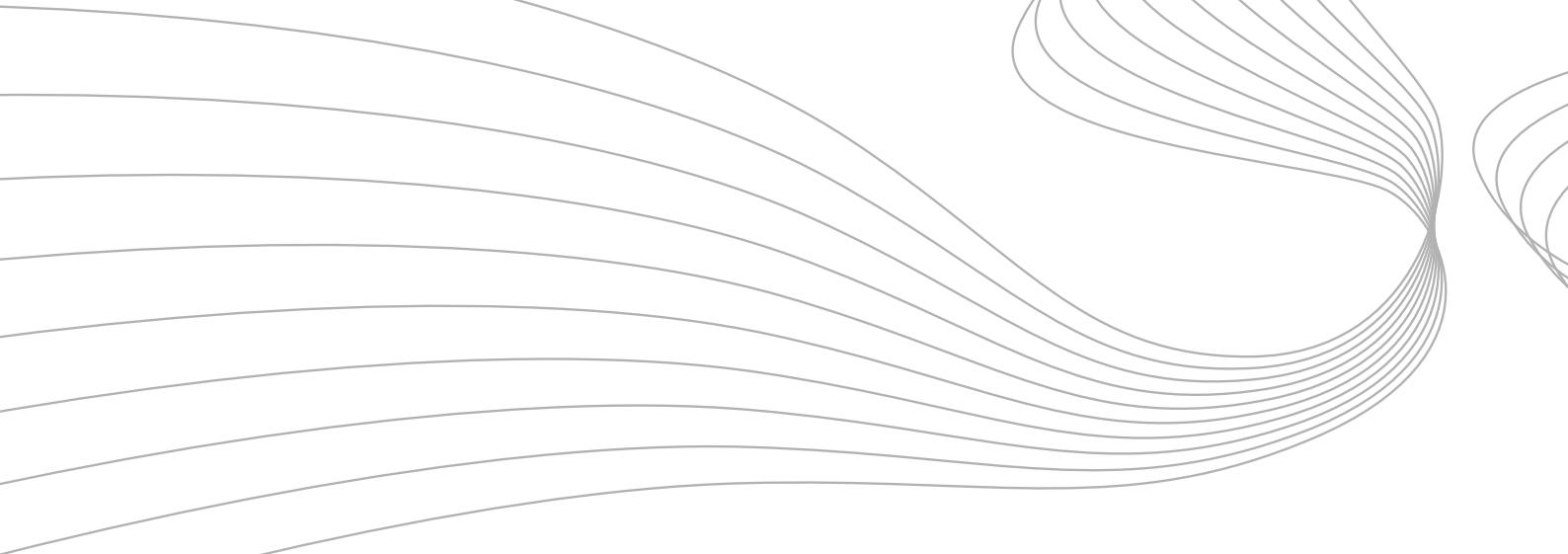
KRKINE NAGRADOV NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Maša Bošnjak	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Gregor Serša	2527
Rok Gaber	doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Roman Jerala	2528
Jure Gujt	doktor znanosti s področja kemije	Marija Bešter Rogač	2529
Tanja Koleša Dobravc	doktorica znanosti s področja kemije	Anton Meden Franc Perdih	2530

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Jasna Lojk	<i>doktorica znanosti s področja bioznanosti</i>	Mojca Pavlin	2531
Gregor Lorbek	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Damjana Rozman	2532
Mitja Pišlar	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Aleš Mrhar Marija Bogataj	2533
Barbara Pogorelčnik	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Tomaž Šolmajer Andrej Perdih	2534
Benjamin Prek	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Branko Stanovnik	2535
Lara Prosen	<i>doktorica znanosti s področja medicinskih ved</i>	Gregor Serša	2536
Aleš Ručigaj	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Matjaž Krajnc Zdenko Časar	2537
Maša Sinreich	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Tea Lanišnik Rizner Jerzy Adamski	2538
Marko Slana	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Marija Sollner Dolenc Vesna Pahor	2539
Rok Šibanc	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Rok Dreu	2540
Jure Vajs	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Janez Košmrlj	2541
Maja Antončič	<i>magistra farmacije</i>	Marko Anderluh Anna Bernardi	2542
Nastja Bašelj	<i>univerzitetna diplomirana inženirka živilstva in prehrane</i>	Tomaž Požrl Boštjan Jerman	2543

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Andrej Emanuel Cotman	<i>magister farmacije</i>	Danijel Kikelj Rok Frlan	2544
Jernej Kastelic	<i>magister farmacije</i>	Franc Vrečer Uroš Ocepek	2545
Nejc Koračin	<i>magister inženir strojništva</i>	Iztok Golobič Franc Vrečer	2546
Dejan Lamešić	<i>magister farmacije</i>	Odon Planinšek	2547
Klara Lombar	<i>magistra kemije</i>	Jurij Svetec	2548
Urša Nagode	<i>magistra farmacije</i>	Petra Kocbek	2549
Saša Rezelj	<i>magistra biotehnologije</i>	Gregor Anderluh Marjetka Podobnik	2550
Urška Slapšak	<i>univerzitetna diplomirana biokemičarka</i>	Janez Plavec Kristina Djinović Carugo	2551

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Jerca Kristan Tjaša Kitanovski	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Matjaž Peterka Eva Zaletel Janja Pust	2552 2553
Nikola Rakić	<i>dijak</i>	Katja Holnhaner Zorec Helena Rihtar	2554
Sebastijan Pluščec	<i>dijak</i>	Zdenka Keuc Helena Rihtar	2555
Ula Ana Leban Iris Zajc	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Majda Golob Irena Štrumbelj Drusany	2556 2557
Ana Milovanović Ana Halužan Vasle	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Tina Lebar Mojca Alif	2558 2559
Žan Zemljic	<i>dijak</i>	Marko Jeran Sanja Cvar	2560
Andreja Kamenik Patricia Štainer	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Andrej Toplak Jože Matavž	2561 2562
Simon Iskra Nikolaj Candellari	<i>dijak</i> <i>dijak</i>	Peter Rodič Ingrid Milošev Janja Pust	2563 2564
Romana Vranešič Vito Šuklje Peter Matek	<i>dijakinja</i> <i>dijak</i> <i>dijak</i>	Borut Štrukelj Jernej Luzar	2565 2566 2567
Teja Kosmač Julija Križaj Maja Šubic	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Adrijana Leonardi Toni Petan Magdalena Kunc	2568 2569 2570
Nadja Škafar Maja Špilak Mateja Žnidarič	<i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i> <i>dijakinja</i>	Miha Vodnik Jasna Šlenc Marija Meznarič	2571 2572 2573
Tomaž Žigon	<i>dijak</i>	Ester Heath Irena Štrumbelj Drusany	2574
Petra Kern Aljaž Mulej Anja Šivic	<i>dijakinja</i> <i>dijak</i> <i>dijakinja</i>	Marjetka Kastelic Švab	2575 2576 2577



Izziv, ki ga je prinesel razpis za 45. Krkine nagrade, so sprejele kar 104 mlade raziskovalke in raziskovalci. 50 dijakinj in dijakov srednjih šol ter 54 študentk in študentov dodiplomskih in poddiplomskih študijskih programov je prijavilo 79 raziskovalnih nalog. Med njimi smo člani Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad tudi letos izbrali najboljše tako z znanstvenega vidika kot z vidika uporabnosti idej in rešitev v farmacevtski industriji, posebej generični. V zborniku so objavljeni povzetki 43 nagrajenih nalog.

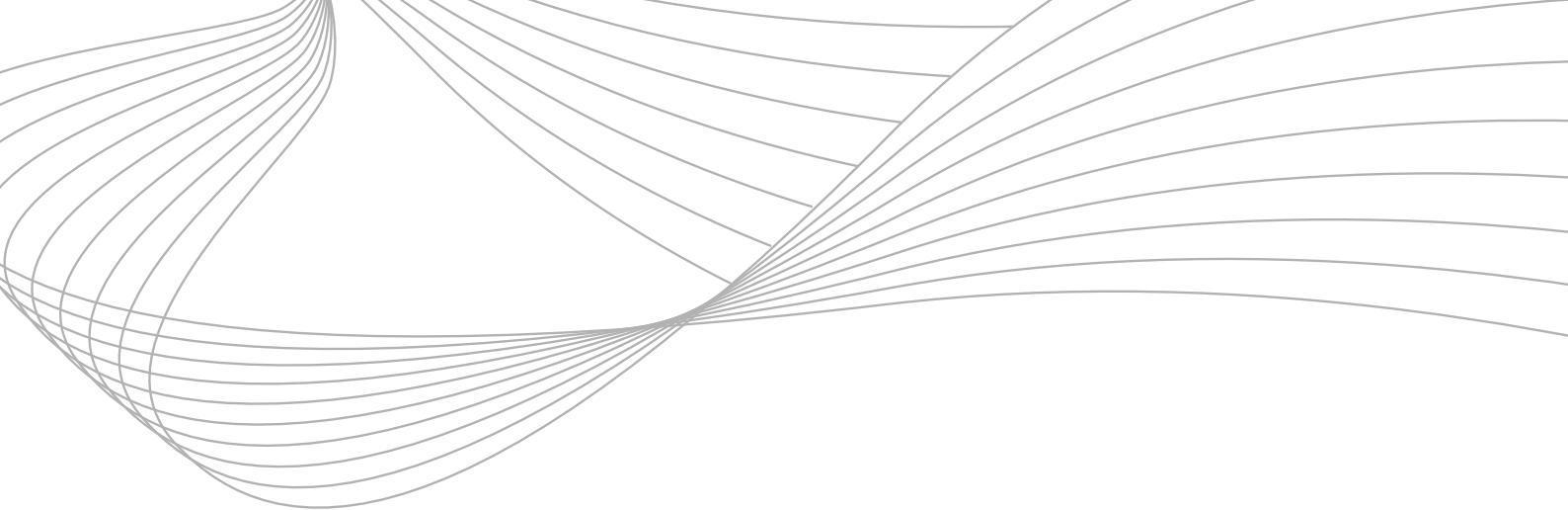
V Znanstvenem odboru smo izredno zadovoljni s kakovostjo nalog mladih raziskovalk in raziskovalcev. Kot predsednika Znanstvenega odbora me posebej veseli, da se krog raziskovalno aktivnih dijakov vsako leto širi na nove srednje šole po Sloveniji, kjer se v raziskovalno delo mladih vključujejo vedno novi šolski mentorji, in da je vedno večja tudi podpora izkušenih raziskovalcev z raziskovalnih inštitutov in univerz.

Razveseljiva je tudi kakovost doktorskih nalog s farmacevtskega področja, in to tako po izvirnosti idej kot po znanstveni vrednosti doseženih rezultatov. Ti se med drugim kažejo v velikem številu znanstvenih objav, ki so jih doktorandi objavili kot prvi avtorji. Pohvala za kakovost gre tudi študentom ostalih študijskih programov. Številni so dokazali, da je ob dobrem raziskovalnem izzivu moč doseči tako raziskovalno odličnost kot industrijsko uporabnost (aplikativnost) eksperimentalnih pristopov in doseženih rezultatov. Takšen pristop je pomemben za uspešno vključitev raziskovalcev v realno delo v gospodarstvu.

Iskrena zahvala vsem mentorjem in somentorjem, ki so mlade raziskovalce usmerjali na neznanih in neshojenih poteh raziskovanja in znanosti in jih vodili do uspešnega zaključka. Velika zahvala tudi vsem strokovnjakom iz Krke, ki so dodeljene naloge ocenili v razmeroma kratkemu času. S svojo strokovno in kakovostno oceno so bistveno pripomogli k izboru najboljših nalog.

Vsem prejemnikom Krkinih nagrad v imenu članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in seveda v svojem imenu iskreno čestitam in jim želim, da bi jih nagrade dodatno spodbudile k nadaljnemu razvoju njihovih raziskovalno-razvojnih potencialov in uporabi pridobljenega znanja v delovnem okolju.

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



One hundred and four young researchers answered the challenge of submitting papers for the 45th Krka Prizes. Seventy-nine research papers were submitted by 50 high school students and 54 undergraduate and graduate university students. The Scientific Committee of the Krka Prizes Council selected the best papers from the scientific standpoint as well as their applicative use in the generic pharmaceutical industry. This collection includes the abstracts of 43 papers that were awarded.

The Scientific Committee would like to point out that the quality of the submitted papers is remarkable. As president of the Scientific Committee I am particularly pleased that the circle of research-oriented high school students is gaining momentum every year, with more and more mentors participating in the research work of young researchers, and that already seasoned researchers from universities and research institutes are gaining support as well.

We are also very happy with the quality of doctoral theses, both in terms of originality and their scientific importance. This is reflected in the many scientific publications that PhD students published as the first authors. We would also like to congratulate students from other study programs for submitting their excellent papers. Many have demonstrated that a good research challenge can lead to research excellence as well as the application of those experimental approaches and results to the industry itself. This type of approach is vital for including researchers into the real world.

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 to the ultimate conclusion. I would also like to thank Krka experts for grading the papers in a relatively short period of time; 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; I wish these prizes would serve as additional encouragement for developing potential in the future as well as using the acquired knowledge in work environments.

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

45.



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

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners



Dr. ALJOŠA BOLJE

*Znanstvenoraziskovalno
delo zahteva celega
človeka*

Aljoša Bolje je po končani osnovni šoli v Kopru obiskoval tamkajšnjo gimnazijo, kjer se je navdušil nad kemijo, popoldne pa preživil med tolkali na srednji glasbeni šoli. Želja po raziskovalnem delu ga je pripeljala na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Ob koncu 4. letnika je dobil ponudbo za mladega raziskovalca in vpisal doktorski študij kemijskih znanosti. Študij in diplomsko delo sta ga navdušila nad raziskovalnim delom, a prava raziskovalna pot se je začela z doktorskim študijem, ko ga je kemija povsem prevzela. Osnovno sporočilo njegove disertacije, ki jo je pod mentorstvom prof. dr. Janeza Košmrlja končal maja 2015, je, da se triazol kot heterocikel s pridom uporablja kot koordinacijsko sredstvo, hkrati je njegova sinteza enostavna in okolju prijazna, saj izpolnjuje vse pogoje zelene kemije. Svojo raziskovalno pot nadaljuje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, kjer bo v prihodnje pripravil nove monomere na osnovi biomase.

»Že od malega me je zanimalo naravoslovje in rad sem ‚mešal‘ ali v kuhinji ali delavnici ali okoli hiše. To imam enostavno v genih, saj smo vsi bližnji v zadnjih treh generacijah, razen mame in tete, čisti naravoslovci,« pripoveduje navdušeni doktor kemijskih znanosti.

Osnovno področje njegovega raziskovanja je sinteza novih triazolov in triazolijevih soli, študija njihovih koordinativnih lastnosti na izbrane kovine prehoda in študija katalitskih procesov z njihovimi koordinacijskimi spojinami. Kot pravi, koordinacijske spojine lahko služijo bodisi kot katalizatorji bodisi kot biološko aktivne spojine. »Ključni dejavniki, ki so me usmerili na to področje, so navdušujoči mentor, raznolikost kemije, relativno nova kemija (triazolijeve soli v povezavi s kovinami prehoda so bile prvič objavljene pred sedmimi leti) in odlične objave, ki so me dodatno spodbudile k raziskovanju.«

V okviru doktorske naloge je razvil metodo za pripravo triazolijevih soli, ki lahko veliko prinese k sintezi na področju heterociklične kemije, kjer se selektivno alkilira določeno mesto v skeletu. »Pokazal sem, da se triazole in njihove soli lahko zelo uspešno uporabi v koordinaciji na veliko kovin prehoda, kar bi prispevalo k še večji uporabi teh spojin v koordinacijski kemiji. Hkrati so ugotovitve na področju katalize pomembne za sintezo novih katalizatorjev, ki bi imeli še boljšo aktivnost. Upam, da bo njihova uporaba iz akademske sfere prešla na industrijsko raven, saj vidim velik potencial za implementacijo v praksi.«

Mentor, prof. dr. Janez Košmrlj, ga je že na začetku doktorske disertacije z ambicioznim pristopom navdušil nad kemijo triazolov in koordinacijsko kemijo. »Vmes me je prepustil samostojnemu delu, a mi hkrati pomagal pri pisanju publikacij,

reševanju sinteznih problemov in nastajanju naloge. Na njegov predlog sem že med doktoratom odšel na dodatno izobraževanje v Berlin.« Vse to je prispevalo, da je Aljoša Bolje dosegel cilje, na katere je ponosen.

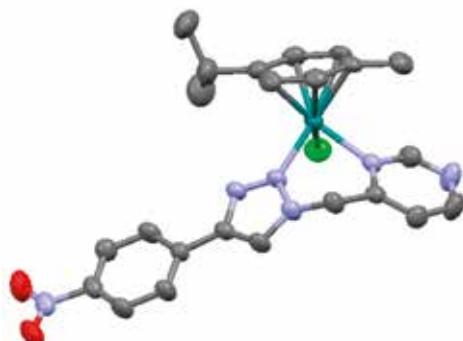
»Znanstvenoraziskovalno delo v kemiji zahteva celega človeka, kajti v nasprotnem primeru ni pravih rezultatov. Vse je mogoče, če le imaš voljo in si nekaj močno želiš,« pravi raziskovalec, ki najde čas tudi za profesionalno ukvarjanje z glasbo, saj kot bobnar sodeluje v nekaj glasbenih skupinah. »Glasba mi predstavlja neponovljiv užitek in oddih, da sem lahko še bolj motiviran za nove izzive. Tu je še družina, trenutno žena in sorodniki, ki jim prav tako namenjam svojo pozornost.«

Krkina nagrada mu pomeni potrditev, da je njegovo raziskovalno delo kakovostno in zanimivo tudi za gospodarstvo. »Spoštujem tudi dejstvo, da Krka nagrade letos podeljuje že 45. leto in s tem povezuje znanost akademskega pola z gospodarskim sektorjem. Te nagrade ne more prejeti kar vsak, zato je dosežek toliko bolj cenjen, hkrati pa mi daje nov zagon za raziskovalno delo v moji nadaljnji karieri.«

Sinteza in koordinativne lastnosti novih triazolskih ligandov

ALJOŠA BOLJE, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Janez Košmrlj, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

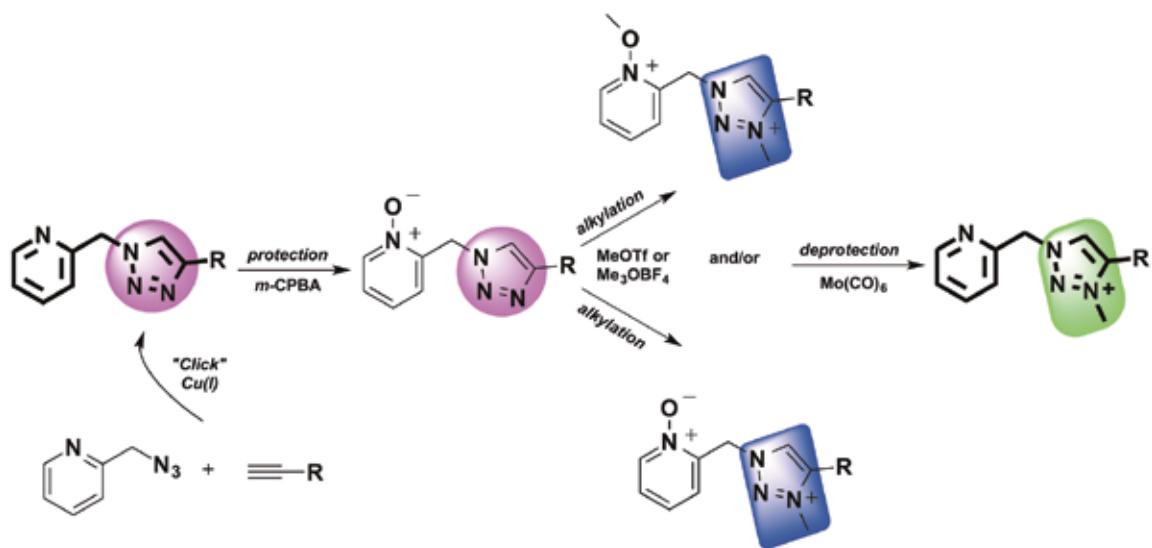
Od odkritja z bakrom(I) katalizirane cikloadicije med organskim azidi in acetileni za pripravo 1,4-disubstituiranih-1,2,3-triazolov, pogosto imenovanih klik triazoli, so te spojine pritegnile veliko zanimanja na različnih področjih kemije, od sintezne do uporabne. Iz skrbno izbranih heterocikličnih azidov in substituiranih fenilacetilenov, ki lahko služijo kot N,N-bidentatni ligandi za številne kovine prehoda, smo sintetizirali štiri različne serije klik triazolov. Izbrano serijo 1,2,3-triazolov, funkcionalizirano s piridinskim, pirazinskim in pirimidinskim obročem, smo koordinirali na rutenij(II) (slika 1).



Slika 1. Ru(II) kompleks s pirimidin substituiranim klik triazolnim ligandom.

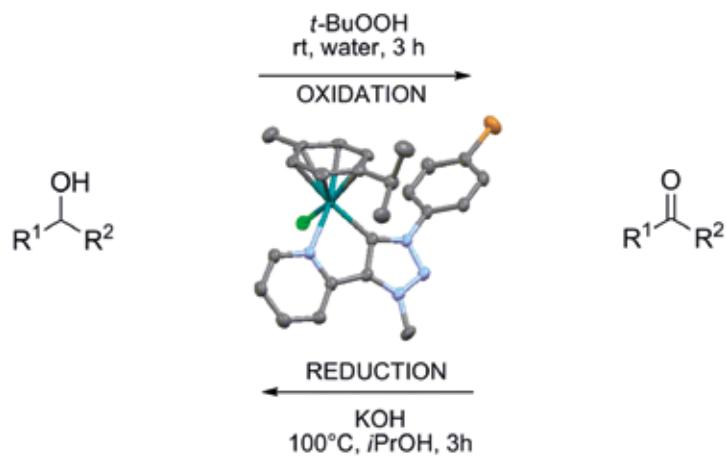
1,3,4-trisubstituirane triazolijke soli so se v zadnjem desetletju uveljavile kot zanimiva podskupina dušikovih heterocikličnih spojin. Triazolijke soli so pokazale aplikativnost na različnih področjih kemijske znanosti in materialov, kot organski katalizatorji, organokovinski prekurzorji katalizatorjev, novi materiali, tarčno specifične ionske tekočine, metalofarmacevtska zdravila, metalomakrocikli in tudi nove spojine za fotodinamično zdravljenje. Najbolj obetavna je njihova uporaba za prekurzorje pri pripravi abnormalnih *N*-heterocikličnih karbenskih ligandov (trzNHC). Za take karbene je značilna mezoionska struktura, ki se odraža v edinstveni sposobnosti kompleksiranja prehodnih kovin. Triazolijke soli se lahko pripravijo z enostavnim alkiliranjem 1,2,3-triazola na dušiku N-3. Tak pristop ni mogoč, ko je klik triazol funkcionaliziran s potencialno reaktivno nukleofilno skupino, ki lahko z alkilirnim sredstvom reagira. Taka skupina je na primer piridinski obroč. V tem primeru se pogosto tvorijo zmesi mono- in polialkiliranih produktov.

V ta namen smo razvili enostaven pristop do piridin funkcionaliziranih klik triazolijevih soli, ki temelji na selektivni zaščiti piridinskega obroča prek piridin-*N*-oksidacije (slika 2). Za *N*-oksidacijo smo izbrali *m*-CPBA (metakloroperoksibenzojsko kislino). Zaščitene triazole smo nato metilirali z metil triflatom oz. Merweinovo soljo in na koncu odstranili *N*-oksidno zaščito z molibdenovim heksakarbonilom, da smo dobili triazolijke soli v visokih izkoristkih in čistosti. S to metodo nam je iz prej sintetiziranih klik triazolov uspelo pripraviti štiri analogne serije klik triazolijevih soli. Te soli lahko služijo kot prekurzorji za omenjene trzNHC in s tem potencialno nudijo C,N-bidentatno koordinacijo. Izbrane soli smo v ta namen testirali za koordinacijo na rutenij(II), iridij(III), osmij(II) in baker(I).



Slika 2. Selektiven pristop k piridin substituiranim triazolijevim solem.

Koordinacijo klik triazolov in triazolijevih soli smo spremljali z večjedno NMR-spektroskopijo. Kristalne strukture v trdnem za izbrane komplekse smo dodatno potrdili z monokristalno rentgensko difrakcijsko analizo. Pripravljene komplekse smo testirali kot katalizatorje za direktno ortoariliranje prek aktivacije C–H, oksidacijo primarnih in sekundarnih alkoholov s tercbutil hidroperoksidom (TBHP) v vodi in redukcijo s prenosom vodika (slika 3). Raziskovali smo tudi elektronske vplive ligandov in uporabo različnih substratov. Predstavili smo preliminarne mehanistične študije nekaterih katalitskih procesov. Izbrane triazolijeve soli smo testirali kot prekurzorje za *in situ* tvorbo katalizatorjev za reakcijo Suzuki-Miyaura.



Slika 3. Oksidacija in redukcija s prenosom vodika, katalizirani z rutenijevim trzNHC-kompleksom.

Proučili smo biološke aktivnosti izbranih triazolijevih soli in nekaterih Ru, Ir in Os trzNHC-kompleksov. Za piridil funkcionalizirane triazolijeve soli je bilo ugotovljeno, da so *in vitro* citotoksične za nekatere tumorske celične linije v podmikromolarnem območju. Tudi pri nekaj karbenskih kompleksih se je pokazalo, da imajo perspektivne biološke lastnosti oz. aktivnosti.

Synthesis and Coordination Properties of Novel Triazole-based Ligands

ALJOŠA BOLJE, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Janez Košmrlj, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Since the discovery of copper(I) catalysed cycloaddition between organic azides and alkynes into 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles, these compounds, commonly known as click triazoles, have received remarkable attention in various fields of chemistry, from synthetic to applied. We synthesized four different series of click triazoles, from carefully selected heterocyclic azides and substituted phenyl acetylenes, which can serve as N,N-bidentate ligands for a variety of transition metal ions. A selected series of 1,2,3-triazoles, tethered to pyridine, pyrazine and pyrimidine rings was coordinated to ruthenium(II) (Figure 1).

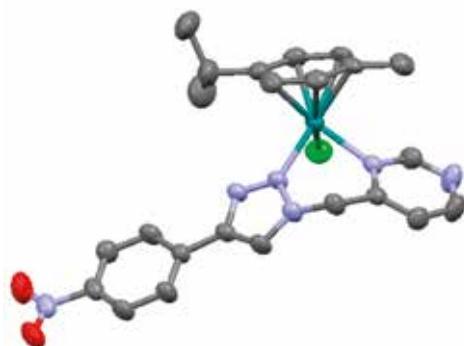


Figure 1. Ru(II) complex with pyrimidine substituted click triazole ligand

In the last decade, 1,3,4-trisubstituted triazolium salts have emerged as an interesting subclass of nitrogen heterocycles. Triazolium salts have found applications in different fields of chemical and material sciences as organic catalysts, organometallic catalyst precursors, novel materials, target-specific ionic liquids, metallo-pharmaceuticals, metallo-macrocycles and novel photosensitizers. The most prominent is their use in coordination chemistry, serving as precursors for abnormal N-heterocyclic carbene (trzNHC) ligands. These are characterized by a mesoionic structure and therefore possess a unique complexation ability towards transition metals. Triazolium salts can be easily accessed by N-3 alkylation of the 1,2,3-triazole. This is no longer the case when the click triazole is functionalized with a potentially competing nucleophilic group, such as the pyridine ring, which can also interfere with the alkylating reagent. Thus, often a mixture of mono- and poly-alkylated non-desired side products is formed.

In this context, we have recently developed a simple approach to pyridine-functionalized click triazolium salts, which is based on selective pyridine ring protection through pyridine-N-oxide (Figure 2). We used m-CPBA (meta-chloroperoxybenzoic acid) for N-oxidation. The protected triazoles were subsequently methylated with methyl triflate or Meerwein's salt and finally de-protected with molybdenum hexacarbonyl to give triazolium salts in high yield and purity. By pursuing this strategy, we transformed the four series of click triazoles into their triazolium salts. These salts can serve as precursors for the already mentioned trzNHCs and thus potentially offer C,N-bidentate coordination. Therefore, we tested the triazolium salts in coordination to ruthenium(II), iridium(III), osmium(II) and copper(I).

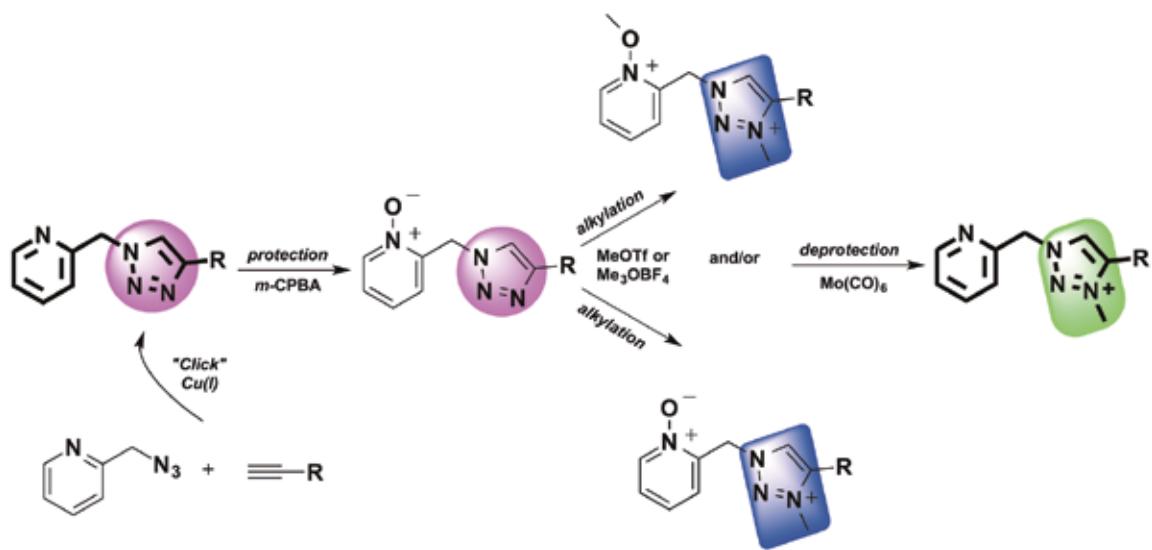


Figure 2. A selective approach to pyridine-appended triazolium salts

The coordination of click triazoles, as well as triazolium salts, was followed by multinuclear NMR spectroscopy. Additionally, the solid-state structures of selected complexes were confirmed by single-crystal X-ray diffraction analyses. Moreover, complexes were tested as catalysts for several transformations, such as direct ortho-arylation via C–H activation, oxidation of primary and secondary alcohols with tert-butyl hydroperoxide (TBHP) in water and transfer hydrogenation catalysis (Figure 3). The electronic effects of the ligands and different substrates were investigated. Furthermore, mechanistic studies of some catalytic transformations performed were done. Selected triazolium salts were also tested as precursors for in situ formation of the catalysts for the Suzuki-Miyaura coupling.

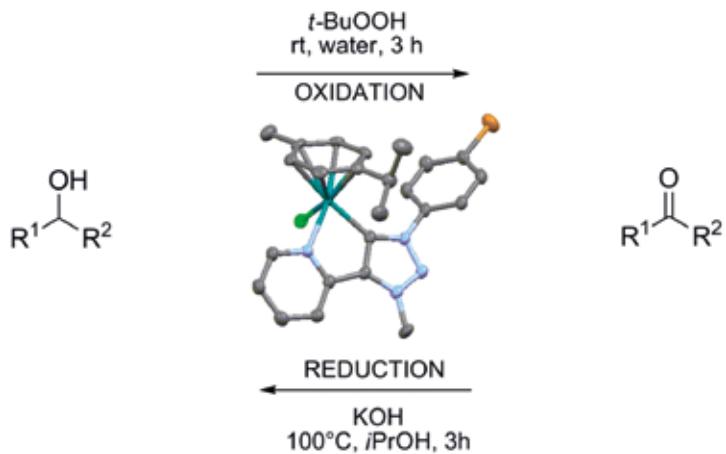


Figure 3. Oxidation and reduction via transfer hydrogenation, catalysed by ruthenium trzNHC-complex

In addition, some triazolium salts and Ru, Ir and Os trzNHC-complexes were examined for their biological activity. The pyridyl-functionalized triazolium salts were found to be cytotoxic *in vitro* for some tumour cells in sub-micromolar range. Also some carbenic complexes were shown to possess promising biological activities.



Dr. KATJA ČERPNJAK

*Tudi veliki izzivi
so povsem premagljivi*

Katja Čerpnjak prihaja iz Murske Sobote, kjer je obiskovala gimnazijo, nato pa je svojo izobraževalno pot nadaljevala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, na kateri je končala univerzitetni študijski program Farmacija. Kot Krkina štipendistka se je takoj po študiju zaposlila v Krki in se hkrati vpisala na interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, smer Farmacija. Julija 2015 je uspešno zagovarjala doktorsko nalogu z naslovom Solubilizacija slabo topnih učinkovin s samomikroemulgirajočimi sistemi, vgrajenimi v trdne farmacevtske oblike, ki jo je pripravila pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja.

»Povezovanje akademskega sveta in gospodarstva je ključ do izmenjave znanja in učinkovitega multidisciplinarnega reševanja izzivov,« poudari Krkina raziskovalka, ki se je v doktorski nalogi ukvarjala s samomikroemulgirajočimi dostavnimi sistemi in njihovo pretvorbo v trdne farmacevtske oblike. Cilj je bil združiti prednosti na lipidih zasnovanih dostavnih sistemov in klasičnih trdnih farmacevtskih oblik. »Cilj je bil solubilizacija slabo topne modelne zdravilne učinkovine (naproksena). Najprej smo razvili tekoči samomikroemulgirajoči sistem (SMES). Z metodo sušenja z razprševanjem smo ga pretvorili v trdno obliko (SMES-prašek) z ohranjenimi samomikroemulgirajočimi lastnostmi, ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in želeno kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine.« Iz trdnih SMES so ob dodatku ustreznih pomožnih snovi izdelali samomikroemulgirajoče tablete in minitablete z znatno izboljšano hitrostjo in obsegom sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine na račun solubilizacijske učinkovitosti SMES.

»Mentorica prof. dr. Mirjana Gašperlin in somentor prof. dr. Franc Vrečer sta imela pri nastajanju mojega raziskovalnega dela neprecenljivo vlogo, saj sta z mano delila bogate izkušnje, me usmerjala in spodbujala,« poudari krkašica in pohvali tudi hitro odzivnost mentorjev pri vseh aktivnostih, ki so se jih lotili.

Rezultati eksperimentalnega dela prispevajo k boljšemu razumevanju vpliva različnih metod solidifikacije, nosilcev in koncentracije vgrajene zdravilne učinkovine na samo(mikro)emulgirajoče in morfološke lastnost trdnih SMES. »Pokazali smo, da načrtovanje eksperimentov (Design of Experiments, DoE) za definiranje procesnih parametrov metode za izdelavo samomikroemulgirajočih praškov in uporaba metode raman-skega mapiranja omogočata poglobljeno razumevanje in načrtovanje trdnih SMES s ciljnimi fizikalno-kemijskimi in biofarmacevtskimi lastnostmi produkta. S tem podpirata tehnološko konkurenčnost sistemov SMES za solubilizacijo slabo

topnih zdravilnih učinkovin, kar je lahko uporabno tudi v generični farmacevtski industriji,« pojasni Katja Čerpnjak.

Da je bilo njeno raziskovalno delo dobro opravljeno in da ga je prepoznala tudi širša strokovna javnost, dokazuje Krkina nagrada. Mlada raziskovalka, ki si je dom ustvarila na Dolenjskem, ob tem ne skriva navdušenja. Nagrada ji pomeni spodbudo za nadaljnje raziskovanje, predvsem pa želi pridobljeno znanje čim bolj implementirati na področju farmacevtske tehnologije in ga nadgrajevati. »Če ti je delo, ki ga opravljaš, v veselje in zadovoljstvo in če imaš podporo in razumevanje najbližjih, so tudi veliki izzivi povsem premagljivi,« še optimistično konča.

Solubilizacija slabo topne učinkovine s samomikroemulgirajočimi sistemi, vgrajenimi v trdne farmacevtske oblike

KATJA ČERPNJAK, Krka, d. d., Novo mesto

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

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

Med sodobnejše pristope k solubilizaciji slabo vodotopnih zdravilnih učinkovin (ZU) sodijo na lipidih zasnovani samo(mikro)emulgirajoči sistemi (S(M)ES), ki po peroralni aplikaciji v stiku s fiziološkim medijem pod vplivom peristaltičnega gibanja gastrointestinalnega trakta hitro in spontano tvorijo optično transparentne in termodinamično stabilne mikroemulzije (ME) tipa O/V, znotraj katerih ostane ZU raztopljena celoten čas prehoda skozi prebavni trakt. Cilj doktorskega dela je bil združiti prednosti tekočih SMES in trdnih farmacevtskih oblik (FO).

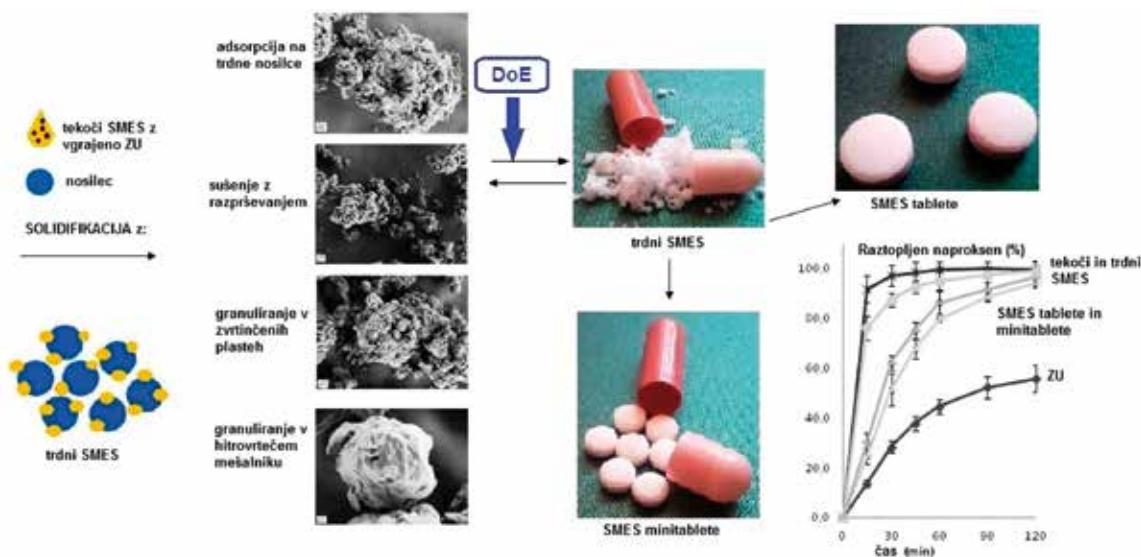
V prvem delu doktorske naloge smo se osredotočili na razvoj in vrednotenje tekočega SMES, izdelanega na osnovi površinsko aktivne snovi (PAS) Gelucire® 44/14. Cilj razvoja je bil izbrati FO, ki bo imela samomikroemulgirajoče lastnosti (velikost kapljic ME < 100 nm) in bo zagotovljala maksimalno količino vgrajene modelne ZU pri minimalni koncentraciji izbranih PAS. Na podlagi rezultatov študije topnosti naproksena v izbranih pomožnih snoveh in izdelanih (psevdo)trikomponentnih diagramov smo definirali sestavo tekočega SMES. Z *in vitro* testom sproščanja pa smo preverili vpliv SMES na solubilizacijo oz. hitrost sproščanja in potrdili hipotezo, da z vgradnjo naproksena v SMES signifikantno izboljšamo tako obseg kot tudi hitrost sproščanja naproksena.

V drugem delu doktorske naloge smo zato, da bi združili prednosti na lipidih zasnovanih sistemov in trdnih FO, razviti tekoči SMES v trdno FO pretvorili z različnimi metodami, tj. s polnjenjem v kapsule, s sušenjem z razprševanjem, z adsorpcijo na trdne nosilce in z granuliranjem s talinami, pri čemer smo uporabili različne nosilce, primerne za posamezno metodo. Metode smo primerjalno vrednotili in na osnovi samo(mikro)emulgirajočih lastnosti nastalih praškov za izdelavo trdnih SMES izbrali metodo sušenja z razprševanjem, kjer smo kot nosilec uporabili maltodekstrin (MD). Na podlagi načrta eksperimentov (DoE) smo s popolnim 2-nivojskim 3-faktorskim (2^3) načrtom vrednotili vpliv procesnih parametrov metode sušenja z razprševanjem na samo(mikro)emulgirajoče lastnosti trdnega SMES (velikost kapljic in njihova porazdelitev) in izkoristek procesa. S statistično analizo smo ocenili, da ima tlak razprševanja največji in signifikanten vpliv na samo(mikro)emulgirajoče lastnosti praškov. Na porazdelitev velikosti kapljic pa poleg tlaka razprševanja signifikantno vpliva tudi pretok oz. hitrost črpanja disperzije za razprševanje (antagonistični učinek). Potrdili smo, da z DoE lahko optimiziramo tvorbo trdnega SMES. Na podlagi DoE smo definirali nastavitev ključnih procesnih parametrov ter izbrali optimalno sestavo disperzije za razprševanje in izdelali trdne SMES z vgrajeno ZU. Potrdili smo, da smo tudi s pretvorbo SMES ohranili samomikroemulgirajoče lastnosti FO ter povečali topnost in hitrost sproščanja naproksena. Trdni SMES izkazuje manjšo hitrost sproščanja v primerjavi s teočim (najprej se mora raztopiti trdni nosilec MD, v katerem so ujete kapljice tekočega SMES), ZU pa se sprosti v enakem obsegu, kar je lahko rezultat spontane tvorbe ME. Nadalje smo preverili vpliv nosilca in koncentracije vgrajene ZU na ključne lastnosti SMES. Ugotovili smo, da koncentracija ZU in izbrani nosilec vplivata tako na samomikroemulgirajoče in morfološke lastnosti trdnih SMES ter na učinkovitost enkapsuliranja kot tudi na profil sproščanja ZU. Dodatno ZU v prenasičeni koncentraciji vpliva tudi na kristaliničnost.

V tretjem delu disertacije smo se osredotočili na izdelavo samo(mikro)emulgirajočih tablet in minitablet, da bi preverili hipotezo, da z DoE lahko optimiziramo tvorbo trdnega SMES ter izdelamo tablete in minitablete z ohranjenimi samo(mikro)emulgirajočimi lastnostmi in izboljšano topnostjo naproksena. Tablete in minitablete smo izdelali iz trdnih SMES, izdelanih z metodo sušenja z razprševanjem z nosilcem MD in naproksenom v dveh koncentracijah (raztopljeni in prenasičeni). Ugotovili smo, da tako tablete kot

minitablete ne izkazujejo samomikroemulgirajočih lastnosti, temveč po redispersiranju tvorijo emulzije (samoemulgirajoči učinek). Še vedno pa izkazujejo izboljšano topnost in hitrost sproščanja v SMES vgrajenega naproksena v primerjavi s samo ZU.

Rezultati našega eksperimentalnega dela prispevajo k boljšemu razumevanju vpliva različnih metod, nosilcev in koncentracije vgrajene ZU na samo(mikro)emulgirajoče in morfološke lastnosti trdnih SMES. Z izbiro ustreznega nosilca lahko dosežemo tako pospešeno kot upočasnjeno sproščanje ZU iz trdnega SMES, in sicer s povečano hitrostjo in povečanim obsegom sproščanja glede na samo ZU. Vključitev DoE za definiranje procesnih parametrov metode za izdelavo samomikroemulgirajočih prahov in uporaba metode Ramanskega mapiranja kot novosti za proučevanje trdnih SMES nam omogočata poglobljeno študijo razumevanja in tudi načrtovanja trdnih SMES nam ciljnimi fizikalno-kemijskimi in biofarmacevtskimi lastnostmi izdelka in s tem podpirata tehnološko konkurenčnost sistemov SMES za solubilizacijo slabo topnih ZU.



Slika 1. Slikovni povzetek eksperimentalnega dela naloge. Morfološke lastnosti trdnih samomikroemulgirajočih sistemov (SMES), izdelanih z različnimi metodami, ter profil sproščanja naproksena iz tekočih in trdnih SMES v primerjavi s samomikroemulgirajočimi tabletami (SMS-tabletami) in minitabletami ter samo zdravilno učinkovino (ZU).

Solubilisation of a Poorly Soluble Drug with Self-microemulsifying Delivery Systems Incorporated into Solid Dosage Forms

KATJA ČERPNIJAK, Krka, d. d. Novo mesto

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

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

One of the current approaches to the solubilization of poorly water-soluble drugs is to use lipid-based self-microemulsifying drug-delivery systems (SMEDDS), which in physiological media spontaneously form optically transparent and thermodynamically stable o/w microemulsions (ME) containing the drug in dissolved form. With a view to combining the advantages of SMEDDS formulations and solid dosage forms, this doctoral dissertation focuses on the solubilization of a poorly water-soluble drug with a SMEDDS formulation incorporated into solid dosage forms.

The first part of the PhD study focussed on the development and evaluation of liquid SMEDDS based on the Gelucire® 44/14 surfactant. The aim was to select a formulation that shows self-microemulsifying properties (mean droplet size of ME after dilution < 100 nm) and is able to solubilize the highest amount of the model drug (i.e., naproxen) using a minimal concentration of selected surfactants. Based on a solubility study of naproxen in selected excipients and construction of (pseudo)ternary diagrams, the most promising liquid SMEDDS formulation was defined. In order to evaluate the effect of SMEDDS on dissolution profiles, an *in vitro* dissolution study was performed. The results obtained confirmed the prediction that incorporating naproxen into the SMEDDS formulation significantly improves its extent and release rate.

The aim of the second part of the PhD study was to combine the advantages of lipid based drug delivery systems and solid dosage forms. Thus, the developed liquid SMEDDS was transformed into a solid dosage form by different solidification techniques – filling into hard gelatine capsules, spray drying, adsorption onto solid carriers, and melt granulation – and with a suitable solid carrier for each method. The solidification techniques were evaluated comparatively with regard to the self-microemulsifying properties of the powders obtained. Based on these results, the spray-drying technique in combination with maltodextrin (MD) as a solid carrier was selected for further experimental work. Then, a design of experiments (DoE) on the spray-drying process using MD was performed using a three-factor, two-level full factorial design (2³) in order to evaluate the influence of process parameters on self-microemulsifying properties (mean droplet size after reconstitution and PDI) of the powders obtained and the yield of the process. The results demonstrated that the spraying pressure and pump speed had a significant influence on mean droplet size and PDI and that they exhibited an antagonistic effect. The results confirmed the prediction that DoE can optimize the formation of solid SMEDDS. The settings of the key spray-drying process parameters were defined based on DoE. Based on these, the optimal composition of the dispersion for spray drying was selected and naproxen-loaded solid SMEDDS were prepared. The obtained results confirmed that, with the transformation of liquid to solid SMEDDS, self-microemulsifying properties were preserved and an enhanced solubility and release rate of naproxen was achieved. Namely, solid SMEDDS show a lower release rate of naproxen in comparison with liquid SMEDDS (first the solid carrier MD needs to be dissolved, in which droplets of liquid SMEDDS are entrapped), but the incorporated drug is released to the same extent, which is the result of spontaneous ME formation. Furthermore, the influence of a solid carrier and the concentration of the incorporated drug on the key characteristics of SMEDDS formulation were examined. The results obtained showed that drug concentration and the type of carrier used influenced the self-microemulsifying and morphological properties of solid SMEDDS. In addition, an influence on the degree of encapsulation and dissolution profile was observed. Moreover, the supersaturated concentration of the incorporated drug also influenced its physical properties.

The third part of the PhD study focused on preparing self-(micro)emulsifying tablets and mini tablets, with the aim to verify the prediction that with DoE it is possible to optimize a solid SMEDDS formation and prepare tablets and mini tablets with preserved self-microemulsifying properties and enhanced naproxen solubility. Tablets and mini tablets were prepared from spray-dried solid SMEDDS containing naproxen in two different concentrations (dissolved and supersaturated). The results obtained showed that tablets and mini tablets did not exhibit self-microemulsifying properties after reconstitution, but they did form emulsions (self-emulsifying effect). They showed an enhanced solubility and release rate of naproxen incorporated into a SMEDDS formulation if compared to the pure drug.

The results of this experimental work contribute to better understanding of the influence of various solidification methods, solid carriers, and incorporated drug concentration on self-microemulsifying and morphological properties of solid SMEDDS. By selecting an appropriate solid carrier, both immediate and modified drug release from solid SMEDDS with an improved rate and extent of drug release can be achieved in comparison with pure drug. The implementation of DoE for defining the process parameters of the method for self-microemulsifying powder preparation and the Raman mapping method, which is an innovation in the study of solid SMEDDS, make it possible to study the issue in depth and to formulate solid SMEDDS for the target physicochemical and biopharmaceutical properties of the final product. This supports the technological competitiveness of SMEDDS formulations for solubilization of poorly water-soluble drugs.

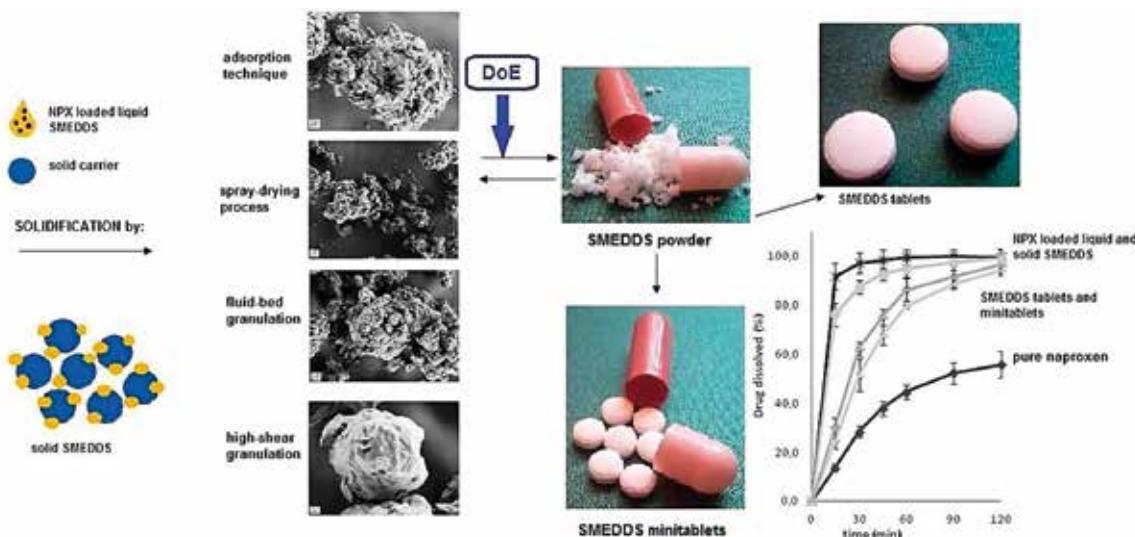


Figure 1. Graphical summary of the experimental work - Morphological properties of solid SMEDDS prepared by using different solidification techniques and dissolution profile of naproxen-loaded liquid and solid SMEDDS in comparison with SMEDDS tablets, mini tablets and pure naproxen



Dr. JANA ERJAVEC

Raziskovanje je strast

*Jana Erjavec je po končani Gimnaziji Bežigrad v Ljubljani vpisala študij mikrobiologije na Biotehniški fakulteti. Že kot študentka je imela priložnost delati v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, zato je z veseljem sprejela ponudbo za opravljanje doktorata. Ob mentorstvu prof. dr. Maje Ravnikar in dr. Tanje Dre o raziskovala vpliv proteinov ekstraktov na rastlinsko patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum*. Tržno zanimive rezultate doktorske naloge, ki jo je uspešno zagovarjala maja 2015, je že predstavila nekaj tujim podjetjem, ki se ukvarjajo s proizvodnjo biopesticidov. Poudarja, da je njena naloga rezultat sodelovanja z Nacionalnim inštitutom za biologijo in Inštitutom Jožef Stefan. Kot raziskovalki, ki karierno pot nadaljuje v podjetju BioSistemika, ji je vedno zelo pomembno, da so rezultati znanstvenih raziskav uporabni tudi v praksi.*

»Raziskovanje je strast, tako kot vsako delo, ki ga opravljaš z veseljem,« poudarja Jana Erjavec, ki je že med študijem biotehnologije vedela, da želi svoje znanje nadgraditi na podiplomskem študiju. V okviru doktorske naloge je raziskovala vpliv proteinov ekstraktov na rastlinsko patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum*, proti kateri ne poznamo učinkovitega sredstva za zatiranje. »Ker bakterija povzroča veliko gospodarsko škodo na pomembnih kmetijskih rastlinah, kot so paradižnik, krompir, jajčevci, banane in druge, je še toliko bolj pomembno, da najdemo učinkovito protibakterijsko sredstvo«, poudari mlada raziskovalka. Rezultati raziskave so zelo obetavni, saj so identificirali več proteinov ekstraktov in čistih proteinov s protibakterijskim delovanjem, za izsledke pa je bil podeljen tudi slovenski patent in prijavljena mednarodna patentna prijava.

»Hvaležna sem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar in delovni mentorici dr. Tanji Dre, saj sem imela ob omenjeni raziskavi priložnost delati na številnih drugih projektih ter se izobraževati na področju patentne zaščite in podjetništva, obiskovati mednarodne in slovenske kongrese ter se udeleževati številnih delavnic.« Kot pravi, je zanjo bistvena naloga mentorja, da doktorskemu študentu omogoči izpopolnjevanje zunaj okvira doktorske naloge, saj le tako lahko pridobi potrebno širino, ki mu pomaga na karierni poti.

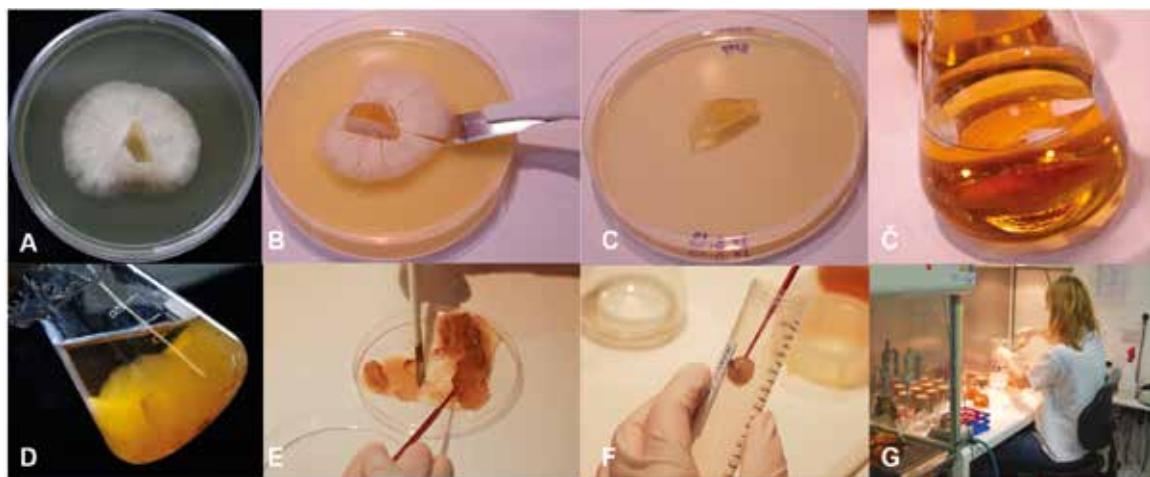
»Krkine nagrade poznam že vrsto let in vedno z občudovanjem spremjam nagrajence, zato si štejem v veliko čast, da sem ob 45. obletnici tudi jaz med njimi. V veliko veselje in ponos mi je, da je Krka nagradila moj doktorat, ki je rezultat dobrega dela in sodelovanja z Nacionalnim inštitutom za biologijo in Inštitutom Jožef Stefan. Nagrada mi daje le še dodaten zagon za dobro delo na moji nadaljnji poklicni poti,« optimistično napove in doda, da ji družina vedno stoji ob strani in jo

podpira. »Sedaj že s svojima otrokoma ponosno raziskujem svet ... in ni lepšega, kot svoje znanje deliti s tistimi, ki jih imaš najraje.«

Vpliv proteinskih ekstraktov in čistih proteinov, izoliranih iz gliv (*Basidiomycota*), ter njihovi učinki na rastlinsko patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum*

JANA ERJAVEC, Nacionalni inštitut za biologijo
Mentorica: Maja Ravnikar, Nacionalni inštitut za biologijo

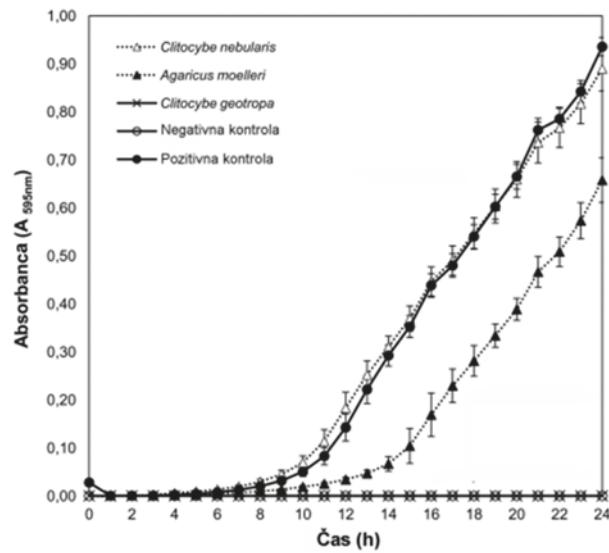
Iskanje novih protibakterijskih učinkovin je še posebej pomembno v primeru rastlinskih patogenih bakterij, proti katerim še niso razvili učinkovitih fitofarmacevtskih sredstev. V naši raziskavi smo 150 proteinskih ekstraktov iz 94 različnih vrst višjih gliv, nabranih v Sloveniji (bazidiomicet in askomicet), testirali proti karantenski rastlinski patogeni bakteriji *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* povzroča bakterijsko venenje več kot 200 rastlinskih vrst, vključno s številnimi agronomsko pomembnimi rastlinami, kot sta npr. krompir in paradižnik. V primeru okužbe so posledice za pridelovalce hude, saj se več let na istem mestu ne sme saditi katerekoli od gostiteljskih rastlin, izguba pridelka pa je lahko tudi do 100-odstotna. V raziskovanju virov protimikrobnih učinkovin so še zlasti slabo zastopane višje glive iz debla prostotrosnic. Na Zemlji je približno 140.000 vrst višjih gliv, poznamo jih največ 20.000. Do sedaj se je v tradicionalni medicini, prehrani in za druge namene uporabljalo le okrog 200 vrst višjih gliv. Večino raziskanih učinkovin iz višjih gliv so pridobili iz trošnjakov (80 %), preostanek pa iz micelija z gojenjem v fermentorjih (20 %). V preglednem članku Erjavec in sodelavci (2012) smo pripravili celovit pregled znanih proteinov iz višjih gliv, saj imajo številni proteini, vključno z lektini, lignocelulitičnimi encimi, inhibitorji proteaz in hidrofobini, posebne lastnosti, npr. protibakterijske, protivirusne, imunosupresivne, protitumorske, protivnetne in druge. Proteini iz višjih gliv so lahko rešitev za nekatere težave, kot sta mikrobna odpornost proti zdravilom in varstvo rastlin pred škodljivci, ter rešitev zahtev po obnovljivih virih energije.



Slika 1. Postopek gojenja micelija *Clitocybe geotropa* v laboratoriju na trdnem (A) in v tekočem gojišču (D). Micelij na trdnem gojišču razrežemo s skalpelom (B) ter posamezne koščke nacepimo na sveže trdno gojišče (C) in v tekoče gojišče (Č). Po nekaj tednih v tekočem gojišču zraste puhat micelij (D), ki ga nežno ločimo od koščkov gojišča (E) in shranimo v sterilnih plastičnih posodicah pri –20 °C. Celoten postopek poteka v sterilni komori (G). Avtorici fotografij: Jana Erjavec (A–D) in Tina Naglič (E–G).

V *in vitro* testu na mikrotitrski ploščici je 11 ekstraktov popolnoma inhibiralo rast bakterij, 4 pa so kazali delno inhibicijo. Večina je imela baktericiden učinek, kar pomeni, da so popolnoma uničili vse bakterije. Ugotovili smo, da ekstrakti *C. geotropa*, *Suillus variegatus* in *Tricholoma saponaceum* zavirajo pojav

bolezenskih znamenj in upočasnijo bakterijsko venenje tako na rastlinah paradižnika kot krompirja. Pokazalo se je, da *in vitro* in *in vivo* aktivnosti nista bili nujno enaki, kar še poudarja pomen zgodnjega vključevanja testov patogenosti na rastlinah. Poleg tega so testiranja na rastlinah nakazala možne mehanizme delovanja ekstraktov iz gob, ki zavirajo pojav bolezenskih znamenj bodisi z neposrednim delovanjem na bakterijske celice bodisi z vzpodbujanjem obrambnega sistema rastlin oziroma s kombinacijo obeh. Pri testiranju specifičnosti inhibicije proti različnim sevom *R. solanacearum* smo ugotovili, da je kar 7 od 11 ekstraktov popolnoma inhibiralo vseh 12 sevov *R. solanacearum*, pri ostalih 4 pa smo opazili, da so posamezni sevi različno občutljivi za proteinske ekstrakte. Prav tako smo ugotovili, da ni povezave med občutljivostjo bakterij in razvrsttvijo sevov v filotipe, biovarje, glede na gostiteljske rastline ali geografski izvor. Prav tako je 6 ekstraktov inhibiralo *R. mannitololytica*, ki je oportunistični patogen in povzroča številne bolnišnične okužbe, 3 pa so inhibirali nepatogen sev *E. coli*. To odpira možnosti različne uporabe proteinov iz gob v praksi, tudi v medicini.



Slika 2. Inhibitorni učinek izbranih ekstraktov na rast bakterije *R. solanacearum* NIB Z30 v *in vitro* testu na mikrotitrski ploščici. Kinetiko rasti smo 24 ur merili spektrofotometrično pri 595 nm (A_{595}). Številni ekstrakti so popolnoma inhibirali rast bakterije (v območju variacije negativne kontrole), drugi so kazali delno inhibicijo (počasnejša rast bakterij kot pri pozitivni kontroli *R. solanacearum* NIB Z30), nekateri pa bakterije niso inhibirali (v območju variacije pozitivne kontrole). Na sliki so prikazani standardni odkloni treh ponovitev.

Po kromatografskem čiščenju ekstraktov *A. phalloides*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa* smo ugotovili, da gre za pribl. 200 kDa velike komplekse proteinov, katerih del so aktivne podenote, velike pribl. 60 kDa. Te smo pri *A. phalloides* identificirali kot toksofalin, pri *C. geotropa* pa je bil najbližji zadetek v bazah podatkov po analizi z masno spektrometrijo identificiran kot dihidrolipoamid dehidrogenaza, ki sodi v družino flavoproteinov. Omenjeni proteini oziroma kompleksi proteinov imajo protibakterijske učinke in so oksidaze L-amino kislin. Z nadaljnjo identifikacijo aktivnih proteinov lahko pridobimo podatke, ki bodo omogočili njihovo biotehnološko uporabo. Naša raziskava je prva tovrstna *in vitro* in *in vivo* študija, ki je pokazala, da so proteini iz ekstraktov višjih gliv lahko obetavni za nadzor bakterijskega venenja, ki ga povzroča *R. solanacearum*.

Protein Extracts and Pure Proteins Isolated from Fungi (*Basidiomycota*) and Their Effects on the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*

JANA ERJAVEC, National Institute of Biology
Supervisor: Maja Ravnikar, National Institute of Biology

Searching for new antibacterial substances is especially important in the case of plant pathogenic bacteria, against which there is no chemical or biological agent available for plant protection. In our research study, we tested 150 wild-mushroom protein extracts from 94 different *Basidiomycetes* and *Ascomycetes* species for antibacterial activity against the quarantine plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* causes bacterial wilt in more than 200 plant species, including economically important plants, such as tomato and potato. In case of field infection, financial consequences for the farmers are devastating – they can have an up to 100% yield loss, while at the same time they are not allowed to plant host plants in the same field for several years after the infection has emerged. There are several known natural sources of antibacterial compounds. However, only few have been isolated from higher fungi, especially *Basidiomycota*. There are approximately 140,000 species of higher fungi but only about 200 have been routinely used as food or for other purposes. Most active substances from fungi have been extracted from basidiocarps (80%) and only 20% from mycelia. In our review article (Erjavec et al., 2012) we have considered all known proteins of higher fungi, including lectins, lignocellulose enzymes, protease inhibitors and hydrophobins, as they have antibacterial, antiviral, immunosuppressive, antitumor and other properties. Proteins of higher fungi can thus represent a solution for the bacterial drug resistance, plant protection against pests or demand for renewable sources of energy.

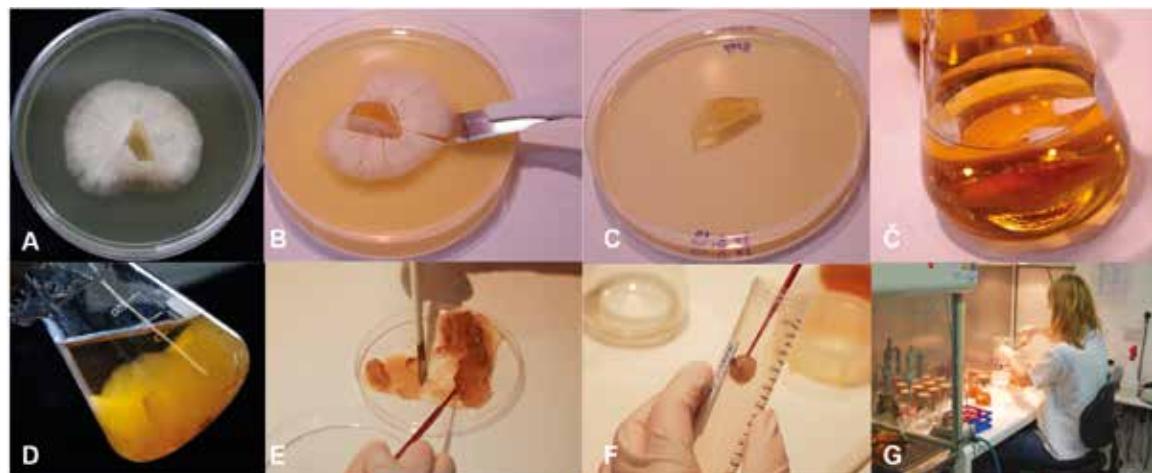


Figure 1: Culturing of *Clitocybe geotropa* mycelium on a solid (A) and in a liquid (D) medium. Scalpel is used to cut the mycelium on solid medium (B), then individual pieces are transferred onto fresh plate (C) or into liquid medium (D). Mycelium grows after several weeks in liquid medium (D) then it is separated from pieces of solid medium (E) and stored at -20 °C in sterile tubes. The entire procedure is done in a sterile hood (G). (Photography: Jana Erjavec (A-D) and Tina Naglič (E-G))

In *in vitro* microtiter plate assays, 11 extracts completely inhibited bacterial growth, while four showed partial inhibition. More commonly they had a bactericidal effect, meaning they completely killed bacterial cells rather than being bacteriostatic. Furthermore, testing of 11 selected active extracts against 12 *R. solanacearum* strains and against *Ralstonia mannitolilytica* identified 7 mushroom protein extracts

that completely inhibited *R. solanacearum*. Other 4 extracts have shown variability in their susceptibility to protein extracts. No correlation could be observed between their susceptibility and their phylotype, biovar, host plant or geographical origin, which stresses the importance of including a large number of strains in such studies. Extracts that completely inhibited *R. solanacearum* strains have potential for broader applicability, including in medicine, since 3 extracts also inhibited *E. coli*. *In vivo* testing of 6 selected extracts on tomato and potato plants led to the conclusion that *C. geotropa*, *Suillus variegatus* and *Tricholoma saponaceum* extracts lower disease occurrence and delay bacterial wilting on both tomato and potato plants. The *in vitro* activities did not always correlate with the *in vivo* activities, which emphasizes the importance of performing early screening tests also *in vivo*. The use of *in vivo* testing indicated different types of phytoprotective mechanisms of the extracts, i.e. direct effects on bacteria or indirect effects on the plant defense system, or a combination of these two.

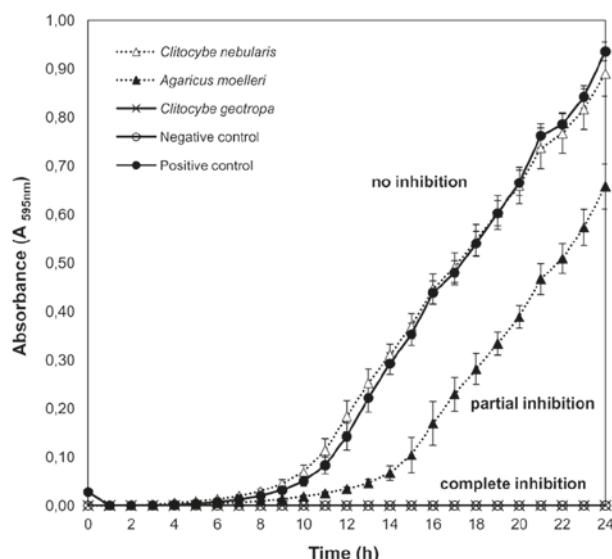


Figure 2: Inhibitory effects of the representative mushroom protein extracts on *Ralstonia solanacearum* NIB Z 30 in *in-vitro* microtitrile plate assays.

Growth of *R. solanacearum* was measured spectrophotometrically at 595 nm (A_{595}) over 24 hours. Examples show no inhibition (A_{595} within the variation of the positive control), partial inhibition (a delayed exponential growth phase or slower growth of bacteria compared to *R. solanacearum* NIB Z 30 positive control) and complete inhibition (A_{595} within the variation of the negative control). Standard deviations of three technical repeats are shown.

Purified fractions of *A. phalloides*, *C. geotropa* and *C. geotropa* mycelium revealed ~200 kDa protein complexes, part of which were ~60 kDa antibacterial proteins. The ~60 kDa protein from *A. phalloides* was identified as a toxophallin, while dihydrolipoamide dehydrogenase had the highest score after mass spectrometry analysis for *C. geotropa* protein. Protein complexes also possessed antibacterial and LAO activity. With further characterization of active proteins we can obtain data that will enable their application in the field of biotechnology. To our knowledge, this is the first *in vitro* and *in vivo* study to show that protein extracts of higher fungi may be promising agents for the treatment of bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.



Dr. MAJA RADIVOJŠA MATANOVIĆ

*Za znanost,
uporabno v praksi*

Maja Radivojša Matanović je osnovno šolo in gimnazijo obiskovala v Kikindi v Srbiji. Izobraževanje je nadaljevala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Beogradu, kjer se je resneje posvetila znanstveno-raziskovalnemu delu na področju analitike zdravil, farmakologije in farmacevtske tehnologije. Poglobljenou raziskovalno delo je botrovalo odločitvi za podiplomski študij na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Bila je štipendistka Javnega sklada Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije. Doktorsko disertacijo v interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicina, smer Farmacija, je uspešno zagovarjala junija 2015.

Krkina nagrjenka je navdušenje za naravoslovne vede kazala že v višjih letnikih osnovne šole, ko se je udeleževala tekmovanj iz matematike, fizike, kemije in biologije. Zanimanje se je v gimnazijskih letih le še stopnjevalo, saj je po desetih uspešnih letih nehala trenirati plavanje in se popolnoma posvetila naravoslovju. Zaradi udejstvovanja na številnih področjih je bila odločitev o izbiri fakultete težka, a je na koncu prevladala farmacija, ker je izrazito interdisciplinarna.

Svoje raziskovalno delo je posvetila razvoju sodobnih farmacevtskih oblik, ki temeljijo na temperaturno odzivnih hidrogelih in lahko omogočijo podaljšano sproščanje zdravilne učinkovine. To vpliva tako na izboljšan terapevtski izid zdravljenja kot tudi na manj pogosto jemanje zdravila, kar je s stališča kroničnih bolnikov zelo pomembno. »Farmacevtska tehnologija in področje načrtovanja farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem sta me zanimala že med dodiplomskim študijem. V mislih sem vedno imela bolnike, ki morajo dalj časa večkrat na dan jemati zdravilo, da bi zagotovili ustrezne koncentracije učinkovine v telesu. Z naprednimi dostavnimi sistemmi, ki bi zagotavljalci daljšo prisotnost ustrezne koncentracije zdravilne učinkovine v telesu, bi lahko zagotovili manj pogosto aplikacijo zdravila.«

Prav to je bil namen doktorskega dela, v sklopu katerega se je posvetila razvoju, ki temelji na *in vitro* ter *in vivo* vrednotenju temperaturno odzivnih hidrogelov z nanokompleksi za subkutano podaljšano sproščanje heparina. »Antikoagulačijskega zdravljenja je deležno veliko število ljudi po vsem svetu. Zaradi kratkega razpolovnega časa eliminacije in specifičnih fizikalno-kemijskih lastnosti je treba heparin dajati večkrat na dan v obliki injekcij. Ravno zaradi tega je bil naš cilj razvoj sodobnih *in situ* gelirajočih dostavnih sistemov heparina. Slednji so pri sobni temperaturi nizkoviskozne raztopine, po subkutani aplikaciji ob zvišanju temperature pa izkažejo prehod sol-gel.«

To bi, kot izpostavlja, omogočilo manj pogosto aplikacijo na eni in podaljšan antikoagulacijski učinek z manj neželenimi učinki na drugi strani. »Rezultati doktorskega dela predstavljajo nova spoznanja na področju izdelave in uporabnosti takoj varnih kot naprednih dostavnih sistemov heparina. S predkliničnimi študijami na podlagah smo nedvoumno pokazali, da so termoodzivni hidrogeli z nanokompleksi ustrezni sistemi za subkutano 5-dnevno dostavo in antikoagulacijski učinek heparina. Potrebnih pa je še nekaj raziskav, preden bi se lahko uporabili v humani medicini,« pove in doda, da je bila vloga mentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar in somentorja izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja zelo pomembna.

Krkina nagrada ji pomeni veliko priznanje in nov zagon za nadaljnje znanstvenoraziskovalno delo. To, kot pravi, terja celega človeka, zato je vesela, da ima razumevajočo družino, ki ji vedno стоji ob strani. Ker jo zanimajo predvsem raziskave, uporabne v praksi, si v prihodnosti želi delati v razvojnih centrih farmacevtske industrije.

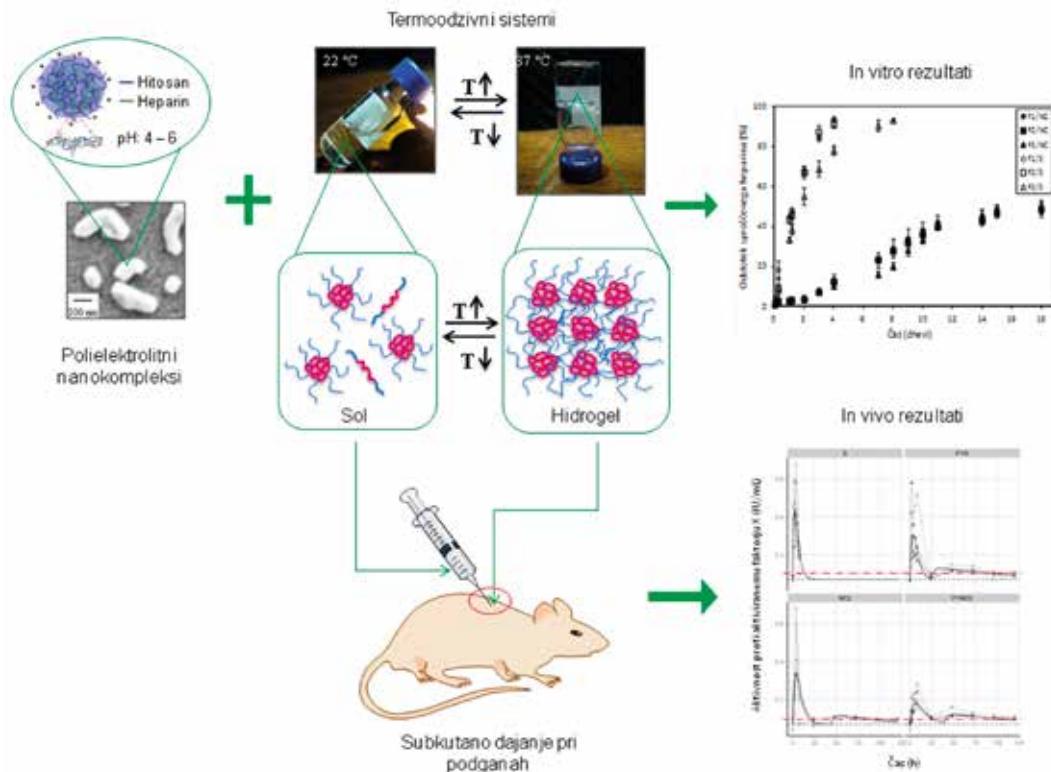
Razvoj in vrednotenje temperaturno odzivnih hidrogelov z nanokompleksi za subkutano podaljšano sproščanje heparina

MAJA RADIVOJŠA MATANOVIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Pegi Ahlin Grabnar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Tromboembolične bolezni so v sodobni družbi zelo razširjene. Znano je, da številni dejavniki povečujejo tveganje za njihov nastanek. Število bolnikov iz leta v leto strmo narašča zaradi staranja prebivalstva, podaljševanja trajanja zdravljenja in povečevanja števila indikacij. Heparin je najstarejše antikoagulacijsko zdravilo, ki je še danes pogosto vključeno v klinično prakso. Zaradi specifičnih fizikalno-kemijskih in farmakokinetičnih lastnosti ga dajemo v obliki injekcij večkrat na dan. V doktorskem delu predstavljamo razvoj ter *in vitro* in *in vivo* vrednotenje naprednih dostavnih sistemov za subkutano podaljšano sproščanje heparina, ki bi lahko omogočili manj pogosto aplikacijo in tudi boljši terapevtski izid zdravljenja (slika 1). Dostavni sistemi temeljijo na temperaturno odzivnih hidrogelih na osnovi poloksamerov 407 in 188 (P407 in P188), katerih lastnosti (temperaturo geliranja, viskoznost, čas raztplavljanja) smo spreminjali z dodatkom hidrosipropilmetylceluloze (HPMC). Pokazali smo, da je z ustrezeno izbiro polimerov mogoče narediti farmacevtsko obliko, ki bo na sobni temperaturi še tekoča in se bo lahko injicirala, po subkutani aplikaciji pa bo pod kožo nastal poltrden hidrogel. Ugotovili smo, da P188 zvišuje točko geliranja in pospešuje raztplavljanje gela, če pa osnovnim P407 dodamo HPMC, farmacevtske oblike gelirajo pri nižjih temperaturah, njihovo raztplavljanje pa traja dalj časa.



Slika 1. Razvoj naprednega *in situ* gelirajočega dostavnega sistema za subkutano podaljšano sproščanje heparina.

Da bi še upočasnili sproščanje heparina, smo v termoodzivne *in situ* gelirajoče sisteme vgradili pH-odzivne polielektrolitne nanokomplekse (PEK) heparina in hitosana. Izdelali smo jih s spontanim združevanjem heparina in hitosana v različnih masnih razmerjih. Natančno smo proučili vpliv pH-vrednosti disperznega medija na tvorbo in razgradnjo kompleksov med nasprotno nabitima polimeroma. Naši rezultati kažejo, da sta tako velikost nastalih kompleksov kot zeta potencial nedvomno odvisna od pH disperznega medija in da nanj lahko vplivamo s sprememb koncentracije in razmerja med polielektrolitoma. Ugotovili smo, da je za tvorbo majhnih, homogenih in stabilnih PEK najbolj primerno masno razmerje 1 : 1 med nefrakcioniranim heparinom in hitosanom pri pH 5,2. Prav tako smo izdelali in ovrednotili PEK med nizkomolekularnim heparinom (NMH) in hitosanom ter pokazali, da je za tvorbo majhnih in stabilnih kompleksov potrebno masno razmerje NMH : hitosan 1 : 2. Z vgradnjo najbolj primernih PEK v termoodzivne gelirajoče sisteme smo bistveno podaljšali čas sproščanja heparina (18 dni), medtem ko so druge lastnosti termoodzivnega sistema ostale nespremenjene.

V nadaljevanju doktorskega dela smo naše ugotovitve *in vitro* raziskav nadgradili s proučevanjem citotksičnosti izbranih formulacij na celični liniji keratinocitov, temu pa je sledil osrednji del naših raziskav, usmerjen v *in vivo* testiranje na živalih. Testi citotksičnosti so pokazali, da disperzije nanokompleksov nefrakcioniranega heparina ali NMH in hitosana ter formulacije termoodzivnih hidrogelov po 24- in 48-urni izpostavitvi ne zavirajo celične proliferacije. *In vivo* študijo smo izvedli na štirih skupinah podgan, ki smo jim določili potek plazemskih koncentracij heparina skozi čas po subkutani aplikaciji testiranih formulacij. Rezultati poskusov na živalih so pokazali 5-dnevno prisotnost preventivnih koncentracij heparina v krvi ($\geq 0,1$ IU/ml) po dajanju termoodzivnega hidrogela s hitosanskimi nanokompleksi. Med testiranimi formulacijami je bila najpočasnejša absorpcija heparina iz termoodzivnega hidrogela z nanokompleksi. Na ta način smo dokazali, da bi dostavni sistem, sestavljen iz poloksamernega termoodzivnega hidrogela in disperzije nanokompleksov heparina in hitosana, lahko omogočil manj pogosto aplikacijo zdravila, kar je izrednega pomena predvsem pri dolgotrajnem profilaktičnem zdravljenju tromboemboličnih bolezni.

V zadnjem delu doktorske disertacije smo predstavili izključitveno kromatografsko metodo za kvantitativno določanje heparina v farmacevtskih izdelkih, ki smo jo prvi uspešno razvili in validirali.

Raziskovalno delo v okviru doktorske disertacije je nedvomno pokazalo, da kombinacija termoodzivnih hidrogelov in pH-odzivnih nanokompleksov predstavlja obetaven subkutani dostavni sistem za heparin in NMH. Dokazali smo, da lahko z ustrezno izbiro sestavin in njihovih deležev pripravimo kombiniran dvojnoodzivni dostavni sistem, ki je varen in primeren za enostavno subkutano aplikacijo. Menimo, da rezultati naših raziskav prispevajo novo znanje na področju *in situ* gelirajočih pametnih dostavnih sistemov in da bi z njihovo uporabo kroničnim bolnikom lahko omogočili prijaznejše zdravljenje.

Development and Evaluation of Thermoresponsive Hydrogels with Nanocomplexes for Prolonged Subcutaneous Delivery of Heparin

MAJA RADIVOJŠA MATANOVIĆ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Pegi Ahlin Grabnar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Thromboembolic diseases are widespread in modern society because a number of factors increase the risk of their development. The number of patients gradually increases due to aging of the population, the prolongation of treatment, and the broadening of indications. Heparin is the oldest anticoagulant medicine that is still widely used in clinical practice. Due to its specific physico-chemical and pharmacokinetic properties, it has to be administered by injection several times a day. This doctoral work was focused on the development and *in vitro* and *in vivo* evaluation of advanced systems for prolonged subcutaneous delivery of heparin, which would enable less frequent administration, as well as improved therapeutic outcomes, prolonged anticoagulant effect and reduced side effects (Figure 1). The systems were based on the temperature-responsive hydrogels prepared from the poloxamers 407 and 188, whose properties (gelation temperature, viscosity, dissolution time) were changed by the addition of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). It was shown that with appropriate combinations of polymers and their amounts we were able to prepare a low viscous liquid at ambient temperature, which transformed into hydrogel after subcutaneous application. We found that P188 increased gelation temperature and improved gel dissolution, and that the addition of HPMC to basic P407 formulations lowered gelation temperature and prolonged gel dissolution.

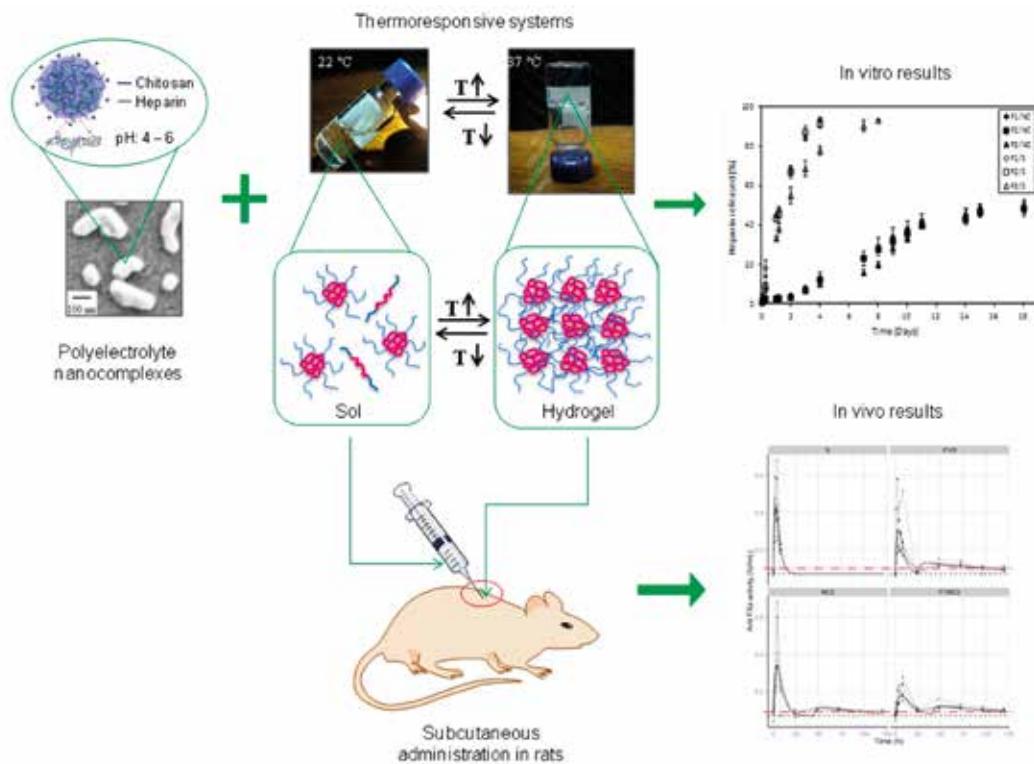


Figure 1. Development of advanced *in situ*-gelling delivery systems for prolonged subcutaneous delivery of heparin

With the incorporation of pH-responsive polyelectrolyte nanocomplexes (PEC) between chitosan and heparin into thermoresponsive *in situ*-gelling systems, the release of heparin was even more prolonged. PECs were prepared by spontaneous complexation of heparin and chitosan in various mass ratios. The influence of the dispersion medium pH on the formation and dissociation of complexes between counter-charged polymers was thoroughly examined. Our results indicate that both complexes' size and zeta potential certainly depend on dispersion pH, and that pH can be controlled by the concentration and the ratio between polyelectrolytes. We found that mass ratio of 1:1 of heparin to chitosan at pH 5.2 is the most appropriate for the formation of small, homogeneous and stable PECs. We also prepared and evaluated PECs between low molecular weight heparin (LMWH) and chitosan, and showed that the 1:2 LMWH:chitosan mass ratio is required for the formation of small and stable complexes. The addition of PECs to thermoresponsive gelling systems prolonged the release of heparin (18 days), while other properties of the thermoresponsive system remained unchanged.

In further studies our *in vitro* results were upgraded with cytotoxicity testing of selected formulations in keratinocyte cell line. This was followed by the central part of the doctoral research focused on *in vivo* evaluation in animals. Cytotoxicity tests demonstrated good cell proliferation after 24 h and 48 h long exposures to heparin/chitosan PEC and thermoresponsive hydrogels. The *in vivo* testing was performed in healthy rats in which heparin plasma concentration-time profiles were determined after subcutaneous administration of the tested formulations. The results demonstrated a 5-day duration of prophylactic heparin concentrations in the blood (≥ 0.1 IU/ml) after thermoresponsive hydrogel with nanocomplexes was administered. We also demonstrated that the heparin absorption rate constant in thermoresponsive hydrogel with nanocomplexes was the lowest. The results of the *in vivo* study proved that a delivery system consisting of thermoresponsive hydrogel with heparin/chitosan nanocomplexes' dispersion can reduce the frequency of drug administration, which is of great importance especially during the long-term prophylactic treatment of thromboembolic diseases.

In the last part of the doctoral study, we successfully developed and validated a novel size-exclusion chromatographic method for the determination of heparin in pharmaceuticals. This research work undoubtedly showed that the combination of thermoresponsive hydrogels and pH-responsive nanocomplexes represents a promising subcutaneous delivery system for heparin and LMWH. We demonstrated that a biocompatible and injectable dually-responsive system can be prepared by proper selection of polymers and their ratios. We believe that the results of our research will contribute new knowledge in the field of *in situ* gelling and smart delivery systems, and that their use will provide more comfortable treatment for chronic patients.



Dr. EVA TAVČAR BENKOVIĆ

*Na široko odprta
mentorjeva vrata*

Eva Tavčar Benković prihaja iz Žalca, kjer je obiskovala osnovno šolo, I. gimnazijo v Celju pa je končala kot zlata maturantka. Zoisova štipendistka si je že med študijem na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani veliko motivacije pridobila z občasnim delom v lekarni in na terenu, a raziskovalno delo jo je najbolj pritegnilo. Najprej na fakulteti pri izr. prof. dr. Tomažu Vovku in nato med študijem v Regensburgu v okviru programa Erasmus, kjer je spoznala dr. Mateja Barbiča, ki je bil njen delovni mentor pri diplomi. Danes je kot asistentka zaposlena na Katedri za farmacevtsko biologijo in se ukvarja s farmakognozijo s poudarkom na fitokemijskih raziskavah rastlinskih drog. Torej s področjem iz doktorske naloge, ki jo je uspešno zagovarjala aprila 2015, nastala pa je pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta. Njena raziskovalna zgodba je dokaz, da je narava bogat vir potencialnih zdravilnih učinkovin, ki jih je vredno raziskovati.

»Prvi namen moje doktorske naloge je bil raziskati fagopirin iz ajde, spojino, ki povzroča preobčutljivost kože za svetlobo, potem ko ajdo zaužijemo. Poleg že prej znane strukture fagopirina smo razvozlali strukturi dveh novih spojin. Razvili smo metodo za ugotavljanje količine fagopirinov v različnih izdelkih iz ajde in metodo za njihovo izolacijo, kar bo omogočilo nadaljnje raziskovanje teh potencialnih zdravilnih učinkovin. Drugi namen pa je bil ugotoviti, katere spojine so v izvlečku navadne jelke, ter preveriti, če bi bil tak izvleček uporaben v farmakoterapiji. Konkretno smo raziskali njegovo sposobnost prestrezanja prostih radikalov, antioksidativno delovanje na človeških celicah in preizkusili njegov vpliv na srčno-žilni sistem laboratorijskih živali,« svoje doktorsko delo strne Eva Tavčar Benković in poudari, da je njen raziskovalni prispevek le del raziskovanja izvlečka iz jelke, ki se intenzivno odvija na številnih področjih.

Vlogo mentorja prof. dr. Sama Krefta, ki ji je predal teme in izhodišča za doktorat, vidi kot ključno v vsakem trenutku raziskovalnega dela. »Nikoli mi ni narekoval dela z velikimi pričakovanji ali postavljal rokov, a vrata njegovega kabineta so bila vedno na široko odprta, kadarkoli sem potrebovala usmeritev in posvet. To sem tudi izkoristila. Na ta način sva dosegla več, kot sva se na začetku nadejala.«

Krka mladi raziskovalki predstavlja sinonim za uspešno slovensko podjetje, ki je že veliko prispevalo k razvoju farmacije v Sloveniji in sooblikovalo tudi Fakulteto za farmacijo. »Želo me veseli, da Krka te vezi ohranja, zato je bila moja prijava na razpis za Krkine nagrade samoumevna, nagrada pa mi je v veliko čast. Na ta način lahko s svojim raziskovalnim delom seznamim širši krog strokovnjakov in dobim nove priložnosti za sodelovanje. Hkrati se lahko še javno zahvalim

vsem soavtorjem, študentom in sodelavcem, ki so kakorkoli prispevali k doktorski nalogi.«

Raziskovalno življenje Eve Tavčar Benković, ki si je dom ustvarila v Grosuplju, je bilo v zadnjem obdobju z velikimi dogodki prepleteno tudi na osebnem področju. »Rojstvo sina, poroka, potovanja, selitve po Ljubljani ... brez podpore družine bi bilo veliko težje,« poudari energična doktorica znanosti, ki svojo raziskovalno zgodbo nadaljuje z veliko motivacije.

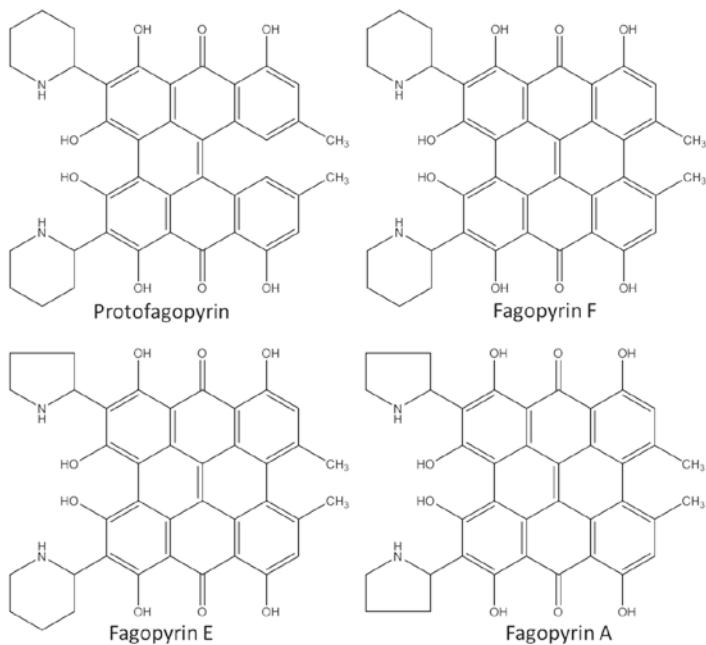
Fitokemijske raziskave fagopirinov iz navadne ajde in fenolov iz navadne jelke

EVA TAVČAR BENKOVIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

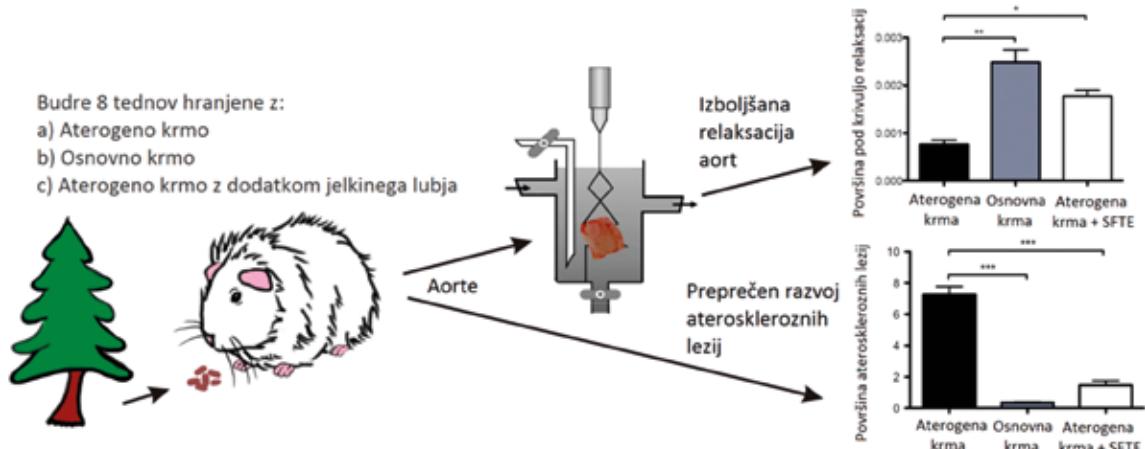
Somentor: Damjan Janeš, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Naravne snovi so spojine ali ekstrakti, ki izvirajo iz živih organizmov ter navadno kažejo biološko delovanje. So osnovna surovina za zdravila naravnega izvora. V farmakognoziji se ukvarjamo z njihovim izborom, karakterizacijo, identifikacijo in uporabo. Pogost pristop k odkrivanju potencialno zdravilnih naravnih snovi je preizkušanje učinkov rastlinskih izvlečkov, ki nas v povezavi s kromatografskimi separacijami vodi do izolacije biološko aktivnih molekul. Njihove kemijske strukture ugotavljamo s sodobnimi spektroskopskimi in spektrometrijskimi metodami in nadaljujemo s preizkušanjem njihovega farmakološkega delovanja. Ajda (*Fagopyrum sp.*) je bogat vir hranil z ugodnim vplivom na zdravje, zato njeni porabi v skladu s popularnostjo zdravega načina življenja narašča. Poleg zdravju koristnih snovi vsebuje tudi manj znane, fototoksične fagopirine, ki pod vplivom svetlobe oksidirajo biološko snov in povzročijo njene poškodbe. Za zagotavljanje varnosti ajde in njenih izdelkov je treba fagopirine vrednotiti tako s prehranskega kot s farmacevtskega vidika. Ne nazadnje gre za spojine s potencialno terapevtsko uporabnostjo, na primer v fotodinamični terapiji. Razvili smo učinkovit postopek ekstrakcije fagopirinov z uporabo raztopine acetona in vode. Ugotovili smo, da so najprimernejši material za pridobivanje fagopirinov ajdovi cvetovi. Razvili smo preprosto in občutljivo metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s fluorescentno detekcijo. Metoda je primerna za analizo vzorcev ajde in kot izhodišče za razvoj preparativne metode za izolacijo fagopirinov. Ugotovili smo, da je poleg osnovne molekule fagopirina F v zeli ajde še vsaj sedem njegovih derivatov. Te derivate smo kromatografsko ločili na posamezne frakcije. Vrednotili smo jih z UV-Vis absorpcijo, masno spektrometrijo in NMR-spektroskopijo. Ugotovili smo strukture dveh novih fagopirinov, ki se razlikujeta po skupinah, pripetih na naftodiantronski obroč. Fagopirin F je spojina z dvema piperidinskima obročema, fagopirin E je spojina s piperidinskим in pirolidinskim obročem, fagopirin A pa je spojina z dvema pirolidinskima obročema.



Slika 1. Strukture fagopirinov

Za kvantitativno vrednotenje vsebnosti fagopirinov je treba pridobiti čiste spojine kot referenčne spojine. Raziskovalci namesto fagopirina kot referenčne spojine uporabljajo hipericin iz šentjanževke, ki pa zaradi nekoliko drugačne strukture in s tem drugačne absorpcije pri spektrofotometrijski detekciji ni ustrezен za točno kvantitativno vrednotenje fagopirinov. Naše ugotovitve in novo razvite metode bodo pripomogle k nadaljnemu raziskovanju fagopirinov ter vrednotenju vsebnosti in varnosti ajdovih izdelkov. V drugem delu doktorskega dela smo se ukvarjali z izvlečki debla navadne jelke. Izvlečki debel različnih vrst borovcev so znani po vsebnosti polifenolnih spojin z zanimivimi farmakološkimi učinki, predvidoma povezanimi z antioksidativnim delovanjem. Najbolj znan, raziskan in uporabljen je izvleček lubja obmorskega bora (*Pinus maritima*) Pycnogenol®. Ugotovili smo, da so izvlečki navadne jelke učinkovitejši antioksidanti od Pycnogenola® tako v *in vitro* antioksidativnih testih kot tudi na humanih celičnih linijah, izoliranih iz periferne krvi. Komponente izvlečka lubja smo kromatografsko ločili z normalnofazno kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku in reverznofazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Vsebovane spojine smo identificirali z metodami masne spektrometrije, UV-Vis absorpcijske spektroskopije in s primerjavo z referenčnimi spojinami. Identificirali smo šest fenolkarboksilnih kislin (galno, homovanilno, protokatehujsko, p-hidroksibenzojsko, vanilno in p-kumarno), tri flavonoide (catehin, epikatehin in katehinetrametileter) in štiri lignane (taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)-taxiresinol, sekolariciresinol in lariciresinol). Nadaljevali smo s farmakološkim testiranjem. Ugotovili smo, da izvleček zmanjša nastajanje ateroskleroze pri budrah na kronični aterogeni dieti. Ovrednotili smo vpliv izvlečka in dveh v njem prisotnih fenolnih kislin, p-kumarne in protokatehujiske, na izolirana podganja srca, podvržena akutnim ishemisko-reperfuzijskim poškodbam. Ugotovili smo, da je izvleček značilno zmanjšal poškodbo srčnega tkiva, merjeno prek sproščanja laktat dehidrogenaze, in zmanjšal pojavnost aritmij. p-kumarna in protokatehujška kislina nista imeli tako izrazitih učinkov, zato verjetno samo delno prispevata k sinergističnemu delovanju v izvlečku prisotnih učinkovin.



Slika 2. Zaščitni učinki izvlečka navadne jelke

Kot ustrezeno surovino za raziskovanje in uporabo smo oblikovali izvleček, raztopljen v polietilenglikolu. Pojavila se je potreba po ugotavljanju vsebnosti vode v tovrstnih vzorcih. Uveljavljena in dostopna Karl-Fischerjeva metoda z opazovanjem spremembe barve pri končni točki titracije ni bila ustrezna, saj je bil izvleček obarvan. Zato smo razvili preprosto in finančno dostopno titracijsko metodo za ugotavljanje vsebnosti vode v obarvanih vzorcih, pri kateri končno točko titracije zaznamo spektrofotometrijsko. Tako ovrednoten izdelek je dobra osnova za nadaljnje raziskovanje in razvijanje novih prehranskih dopolnil, kozmetičnih izdelkov in zdravil.

Phytochemical Investigation of Fagopyrins from Common Buckwheat and Phenols from Silver Fir

EVA TAVČAR BENKOVIĆ, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy

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

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

Natural products are compounds or extracts that originate from natural sources and usually exhibit biological activity. They are raw materials for natural medicines. Pharmacognosy encompasses their selection, characterization, identification and use. Bioassay-guided fractionation of plant extracts linked to chromatographic separation techniques leads to the isolation of biologically active compounds whose chemical structures can readily be determined by modern spectroscopic and spectrometric methods, followed by testing of their pharmacological activity. Buckwheat contains many healthy nutrients, and its consumption is therefore increasing. The plant contains phototoxic compounds called fagopyrins that can act as photosensitizers upon excitation with visible light causing fagopyrim, but these compounds have received little research attention. To assure adequate safety of buckwheat and its products, fagopyrins should be characterized from a nutritional and pharmaceutical point of view. Nevertheless, fagopyrins are not only health-threatening compounds but also potent photodynamic agents that deserve further research. In this work, fagopyrins extraction procedure was improved employing a mixture of acetone and water. Flowers were recognized as the best material for the extraction. A chromatographic analysis of fagopyrins was performed by developing a simple, sensitive HPLC analytical method of high-resolution employing fluorescence detection. This method was a good starting point for a preparative method that would enable the isolation of pure compounds. At least eight fagopyrin derivatives were observed upon isolation and were characterized via UV-Vis absorption, NMR spectroscopy and mass spectrometry. The structures of two new fagopyrins were elucidated. Fagopyrin F is a previously known compound that consists of naphthodianthrone scaffold and two piperidine moieties. Fagopyrin A differentiates by two pyrrolidine moieties instead of piperidine moieties, and fagopyrin E consists of one pyrrolidine and one piperidine moiety.

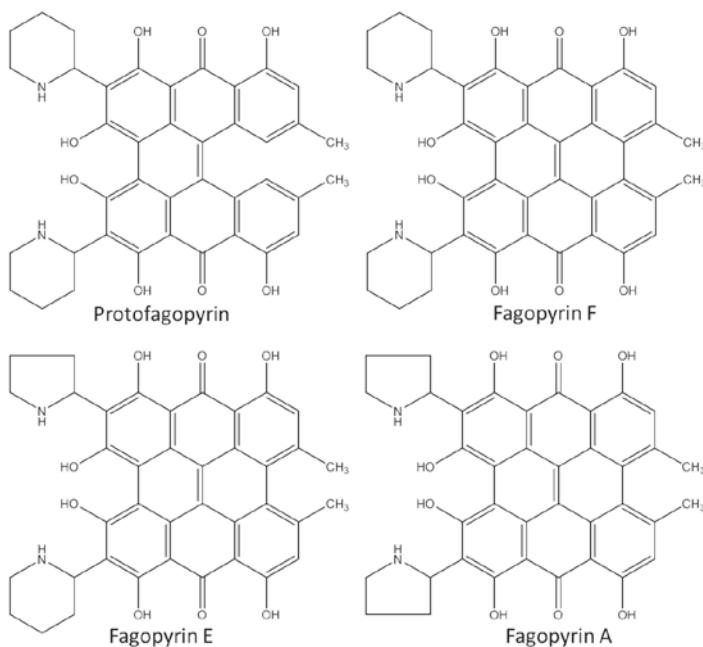


Figure 1. Structures of fagopyrins

The existence of protogagopyrins that originate in buckwheat and can transform into fagopyrins upon light exposure was confirmed. Information on solubility, fluorescence and UV-Vis absorbance in different solvents were obtained. The need for reference compounds of different fagopyrins that would allow proper quantitative evaluation of buckwheat samples still remains. Researchers use hypericin for that purpose, but we recognize its use as inadequate due to the different structure and consequently incomparable absorbance in spectrophotometric detection. Our methods complement the existing knowledge regarding fagopyrins and will facilitate their further isolation and analysis of their biological activity. In the second part of our work, silver fir trunk extracts were investigated. Extracts from the bark of different conifer species are known to contain various polyphenols that possess interesting pharmacological activities. So far the most extensive research was done on the antioxidative extract of the maritime pine (*Pinus maritima*) bark Pycnogenol®, which is widely used in food supplements and cosmetic products. We have shown that antioxidant activity of silver fir (*Abies alba*) extract is higher if compared to the maritime pine bark extract *in vitro* and in cultured cells. Components of the extract were separated with normal phase flash chromatography and reversed phase HPLC. Structures of individual compounds were elucidated by mass spectrometry, UV-Vis absorption spectroscopy and comparison with reference compounds. Six phenolic acids were identified (gallic, homovanillic, protocatechuic, p-hydroxybenzoic, vanillic and p-coumaric), three flavonoids (catechin, epicatechin and catechin tetramethyl ether) and four lignans (taxiresinol, 7-(2-methyl-3,4-dihydroxytetrahydropyran-5-yloxy)-taxiresinol, secoisolariciresinol and laricinresinol). The research was continued with pharmacological testing. It was found that the extract exerts strong antioxidative and protective effects against atherogenic diet-induced arterial wall damage. Protective effects of the silver fir extract and its compounds as well as of two phenolic acids (p-coumaric and protocatechuic acids) were also evaluated against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. The silver fir extract significantly reduced tissue damage (measured as the lactate dehydrogenase release rate) and shortened the duration of arrhythmias, which was not observed in the case of phenolic acids. It was concluded that the two acids are only partially responsible for the observed effects and synergism of more compounds could be present.

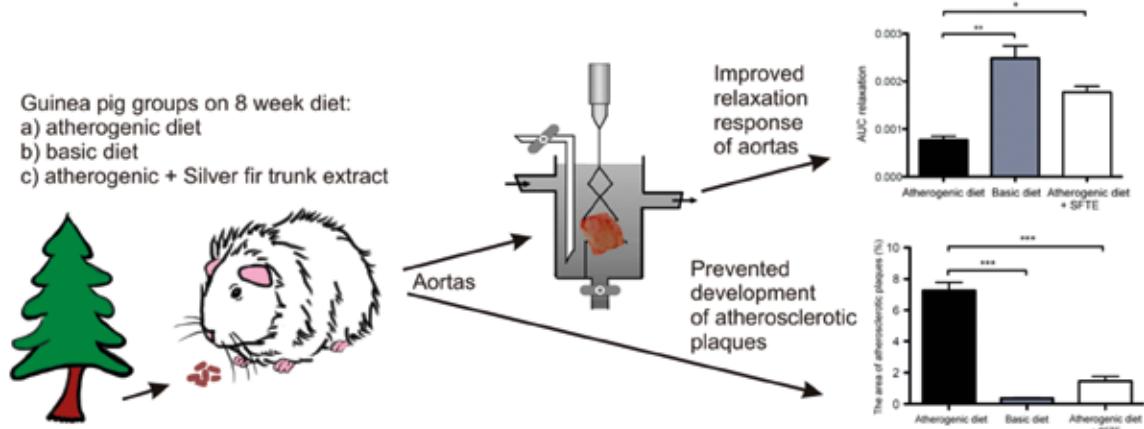
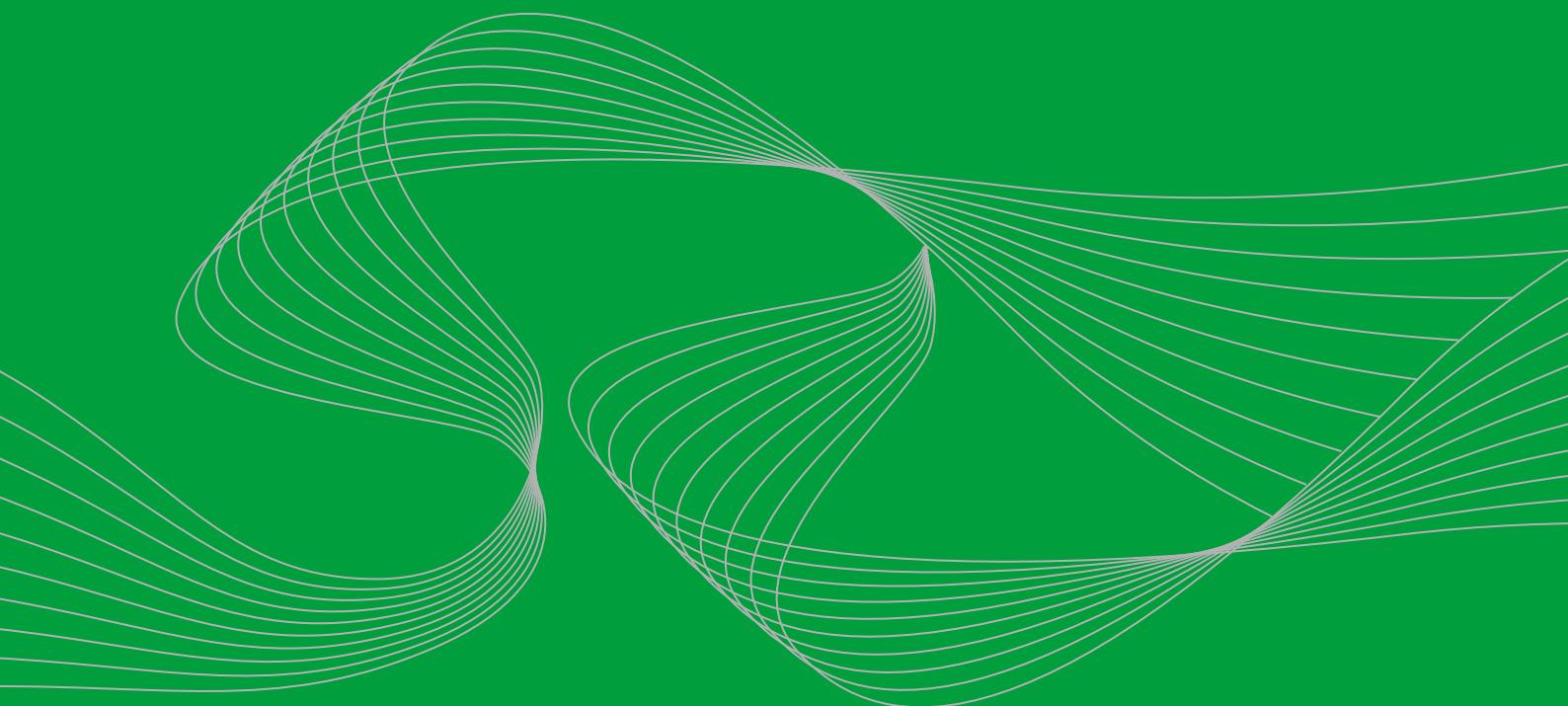


Figure 2. Protective effects of silver fir trunk extract

Silver fir extract, solubilized in polyethylene glycol was developed as an appropriate raw material for research and use. A need for water determination in such samples emerged. The most accessible technique for water content determination is Karl-Fischer titration with visual detection of a titration endpoint, which was unfortunately not suitable for the analysis of the silver fir extract due to its strong color. Therefore an appropriate method for moisture determination in colored samples was developed, employing simple equipment and spectrophotometric detection of a titration endpoint. Silver fir extract, characterized in such manner is a suitable ingredient for food supplements, cosmetic products and medicines.

45.



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

*Povzetki
Abstracts*

Protitumorski in antiangiogeni učinek genske terapije s plazmidom AMEP na mišjem modelu melanoma

MAŠA BOŠNJAK, Onkološki inštitut Ljubljana
Mentor: Gregor Serša, Onkološki inštitut Ljubljana

Genska terapija spada med novejše pristope k zdravljenju raka. Poleg ciljanja tumorja je pri terapiji raka pomembno ciljati tudi tumorsko žilje. Tako smo v doktorski nalogi za gensko terapijo melanoma uporabili plazmid AMEP, ki nosi zapis za antiangiogeni peptid metargidina (AMEP) in prek vezave na integrina $\alpha 5\beta 1$ in $\alpha v\beta 3$, katerih izražanje je v tumorjih melanoma močno povečano, cilja obe komponenti tumorja. Za vnos plazmida smo v raziskavi uporabili nevirusni dostavni sistem, elektroporacijo, ter nato proučevali neposredni protitumorski in antiangiogeni učinek genske terapije na nizko- in visokometastatskem modelu mišjega melanoma B16. Dokazali smo, da plazmid AMEP v *in vitro* pogojih deluje protitumorsko in protimetastatsko, saj zmanjša proliferacijo, migracijo in invazijo, ter tudi antiangiogeno, saj zmanjša zmožnost nastajanja kapilarjam podobnih struktur endotelijskih celic. Učinke genske terapije s plazmidom AMEP smo potrdili tudi *in vivo*. Protitumorski učinek se je izražal v zaostanku v rasti ali popolni ozdravitvi tumorjev, temu pa se je pridružil še zmanjšan metastatski potencial melanomskeh celic po terapiji. Antiangiogeni učinek smo spremljali na histoloških rezinah tumorjev in v modelu dorzalnega okna ter v obeh primerih ugotovili, da genska terapija s plazmidom AMEP zmanjša ali popolnoma prepreči nastajanje novih tumorskih žil. Ugotovili smo tudi, da je neposredni protitumorski učinek odvisen le od izražanja integrinov (receptorjev) na tumorskih celicah, medtem ko je antiangiogeni učinek odvisen tako od količine integrinov na endotelijskih celicah kot od stopnje izražanja mRNA proteina AMEP.

Antitumor and Antiangiogenic Effect of Gene Therapy with Plasmid AMEP in Murine Melanoma Model

MAŠA BOŠNJAK, Institute of Oncology Ljubljana
Supervisor: Gregor Serša, Institute of Oncology Ljubljana

Gene therapy is one of the current approaches to cancer treatment. In cancer treatment, not only direct antitumor but also antiangiogenic strategies are needed. Therefore in our study, gene therapy with plasmid AMEP, a coding for antiangiogenic metargidin peptide, was used for treating melanoma. AMEP binds $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins, which are overexpressed on melanoma and activated endothelial cells in tumors, and thus has a dual: antitumor and antiangiogenic effect. Non-viral delivery systems electroporation was used for introducing the plasmid into the cells and tissue. Direct antitumor and antiangiogenic effects of gene therapy were observed in low- and highly- metastatic murine melanoma model B16. Antitumor and antimetastatic effects of plasmid AMEP were observed as reduced proliferation, migration and invasion of melanoma cells *in vitro*. In addition, the antiangiogenic effect, which resulted in a reduced ability of capillary-like structure formation, was also observed in endothelial cells *in vitro*. Gene therapy with plasmid AMEP was proven to be effective also *in vivo*. The antitumor effect resulted in tumor growth delay and some complete tumor eradication after therapy. The therapy also reduced metastatic potential of melanoma cells. Antiangiogenic effects were determined on immunohistologically stained tumor sections and in dorsal window chamber model. In both cases gene therapy with plasmid AMEP reduced or completely prevented the formation of new tumor blood vessels. Moreover, we observed that direct antitumor effect depended only on the quantity of integrins (receptors) on tumor cells, whereas the antiangiogenic effect depended on both, on the quantity of integrins on endothelial cells, as well as on protein AMEP mRNA expression level.

Uporaba sintetičnih DNA-vezavnih proteinov za procesiranje informacij in usmerjanje procesov v bioloških sistemih

ROK GABER, Kemijski inštitut Ljubljana
Mentor: Roman Jerala, Kemijski inštitut Ljubljana

Sintetični DNA-vezavni proteini so proteini, ki se vežejo na poljubno, vendar vnaprej določeno nukleotidno zaporedje. Najbolj poznani proteini iz te skupine so DNA-vezavni proteini na osnovi cinkovih prstov (ZFP) in transkripcijskim aktivatorjem podobni efektorji (TALE). Omenjeni proteini so zgrajeni iz več modulov, ki specifično vežejo nukleotide v DNA-molekuli. S kombiniranjem posameznih modulov lahko zgradimo protein, ki veže poljubno nukleotidno zaporedje. V tem delu smo z uporabo opisanih proteinov povečali produkcijo rastlinskega stilbenoida (resveratrol) v heterolognem gostitelju – bakteriji *Escherichia coli* – in pripravili človeške celične linije, ki so izvajale logične operacije. Encima 4-kumarat-CoA ligazo (4CL) in stilben sintazo (STS), ki katalizirata sintezo resveratrola, smo kovalentno povezali z dvema proteinoma iz skupine ZFP ter ju na tak način vezali na plazmidno DNA. Znotrajcelično združevanje encimov biosinteze poti na DNA-ogrodju je za 5-krat povečalo produkcijo resveratrola v primerjavi z bakterijo, ki ni vsebovala plazmida z vezavnimi mesti za uporabljenega DNA-vezavna proteina. Nato smo pripravili sesalske transkripcijske represorje na osnovi TALE-proteinov in sesalske promotorje, odzivne na omenjene TALE-represorje. S kombiniranjem TALE-odzivnih promotorjev in genov za TALE-represorje smo pripravili različna genska vezja. Ta vezja so po vnosu v človeške celične linije slednjim omogočila izvajanje vseh 16 binarnih dvovhodnih in 2 binarnih trovhodnih logičnih operacij.

Use of Synthetic DNA Binding Proteins for Information Processing and Process Directing in Biological Systems

ROK GABER, National Institute of Chemistry Ljubljana
Supervisor: Roman Jerala, National Institute of Chemistry Ljubljana

Synthetic DNA binding proteins bind specific and predefined DNA sequences. Zinc finger proteins (ZFP) and transcription activator-like effectors (TALE) are most known proteins of this type. Both types of proteins are modular. Each module binds specific nucleotide or set of nucleotides in DNA molecule. Proteins that bind almost any desired DNA sequence can be prepared by combining such modules. We used ZFPs and TALEs to increase the production of plant stilbenoid (resveratrol) in the heterologous host – *Escherichia coli* and to prepare human cell lines that performed basic logic operations. Enzymes 4-coumarate-CoA ligase (4CL) and stilbene synthase (STS), which catalyze the synthesis of resveratrol, were covalently joined with ZFPs. Binding of specific DNA sequence and ZFPs consequently enabled the intracellular aggregation of both enzymes. Bacteria that contained a plasmid with such scaffold DNA produced 5-fold more resveratrol compared to bacteria with control plasmid. In the second part of the project we prepared TALE based mammalian transcriptional repressors and mammalian promoters that were responsive to TALE repressors. Next, we combined genes for TALE repressors and TALE responsive promoters into various genetic networks. When genetic networks were introduced into human cell lines, they were able to perform all 16 binary two-input and also 2 binary three-input logic operations.

Računalniške simulacije asociacije enostavnih soli in surfaktantov v vodnih raztopinah

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

Mentorica: Marija Bešter Rogač, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

S pomočjo simulacije Monte Carlo in uporabo modela vode Mercedes-Benz + dipol smo izračunali asociacijske konstante nekaterih alkalijskih halogenidov. Dobljeni trend vrednosti asociacijskih konstant se večinoma kvalitativno ujema z rezultati študij z bolj realističnimi modeli in tudi z meritvami. Izvedli smo tudi atomistične simulacije molekulske dinamike vodnih raztopin vseh treh geometrijskih izomerov natrijevega hidroksibenzoata (HB) v prisotnosti in brez prisotnosti kationskega surfaktanta dodecyltrimethylammonijevega klorida (DTAC). V simulacijah smo uporabili polje sile GROMOS96 53a5 in model vode SPC ali SPC/E. Izkazalo se je, da lahko simulacije pravilno razvrstijo izomere HB glede na njihov difuzijski koeficient in razložijo vzrok za opažene razlike. Pri nižjih koncentracijah soli orto izomer z vodo tvori najmanj vodikovih vezi in je tako najbolj mobilen, medtem ko je para izomer najbolj hidratiran in ima zato najnižji difuzijski koeficient. Pri višjih koncentracijah pa na mobilnost vpliva tudi tvorba agregatov, v katerih so molekule HB povezane prek vodikovih vezi. V sistemih, kjer je bil prisoten tudi DTAC, ki tvori micelle, smo opazili, da orto izomer prodre globlje v micel in s pozitivno nabitimi glavami surfaktantov interagira močneje kot druga dva izomera. Poleg tega ima orto izomer najbolj izrazito preferenčno orientacijo glede na molekule surfaktanta in vzpostavi najbolj urejeno strukturo glav DTAC-unimerov. To lahko razložimo s tem, da je orto izomer med vsemi najbolj amfifilen. Pri spontani micelizaciji smo opazili tudi zlivanje micelov, pri katerem sodelujejo na vpletenu micela adsorbirani HB-anioni, ki med seboj tvorijo vodikove vezi.

Computer Simulations of Association of Simple Salts and Surfactants in Aqueous Solutions

JURE GUJT, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Marija Bešter Rogač, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Monte Carlo simulations using Mercedes-Benz + dipole water model were employed to calculate association constants of some alkali halides. Obtained values mostly gave the trend of association constants that is qualitatively in accord with computational studies that used more refined models and experimental data. Atomistic molecular dynamics simulations of aqueous solutions of all three geometric isomers of sodium hydroxybenzoates (HB) with and without the presence of a cationic surfactant dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC) were conducted. GROMOS96 53a5 force field and SPC or SPC/E were used. It turned out that simulations could correctly discriminate between the isomers with respect to their self-diffusion coefficient and explain the observed differences. At lower concentrations of the salt, the ortho isomer forms the least hydrogen bonds with water and is thus the most mobile, while the para isomer is the most hydrated and thus the least mobile. At higher concentrations also the clustering of HB via intermolecular hydrogen bonds influences isomer's mobility. When DTAC, which forms micelles, was present, the ortho isomer was found to penetrate more deeply into the micellar core and to interact strongly with surfactant headgroups than the other two isomers. This most amphiphilic isomer also has the most prominent preferential orientation with respect to surfactant molecules and induces the highest order in the arrangement of surfactant headgroups. When studying the spontaneous self-assembly of DTAC in the presence of HB, fusion of micelles facilitated by the formation of hydrogen bonds between HB anions incorporated into the participating micelles was observed.

Koordinacijske spojine prve vrste prehodnih elementov s potencialnim hipoglikemičnim delovanjem

TANJA KOLEŠA DOBRAVC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Anton Meden, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Franc Perdih, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Vanadijevi in cinkovi ioni imajo dokazane hipoglikemične lastnosti, podobne inzulinu. Da bi določili povezave med strukturo, stabilnostjo in biološkimi lastnostmi vanadijevih in cinkovih kompleksov, s poudarkom na inzulinu podobnem delovanju, smo pripravili vrsto koordinacijskih spojin VO^{2+} , VO^{2+} in Zn^{2+} . Uporabili smo komercialno dostopne in novosintetizirane ligande pikolinatnega in β -diketonatnega tipa ter dodatne biološko ali strukturno zanimive nevtralne ligande. Z rentgensko difrakcijo na monokristalih smo določevali njihove strukture v trdnem stanju, spojine VO^{2+} pa smo proučevali tudi v raztopinah in določevali njihove interakcije s serumskima proteinoma apo-hTf in HSA. Izbranim vanadijevim in cinkovim spojinam je bila določena tudi stopnja inzulinu podobnega delovanja – zaviranja sproščanja prostih maščobnih kislin iz podganjih adipocitov. Spojine z najboljšo aktivnostjo so bile spojine VO^{2+} , VO^{2+} in Zn^{2+} z močno vezanimi ligandi Hhypic ter spojina Zn^{2+} z novopripravljenim amidnim ligandom H4mpcpic. Pokazali smo, da so za pripravo potencialnih antidiabetikov primernejši ligandi, ki se močno ali srednje močno vežejo na kovinske ione. Hkrati pa je pomembna tudi dovolj velika topnost spojin v vodi in stabilnost v širšem pH-območju, kar smo dosegli z vpeljavo aminskih skupin na stranske verige ligandov.

Coordination Compounds of First Row Transition Metals with Potential Hypoglycaemic Activity

TANJA KOLEŠA DOBRAVC, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Anton Meden, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Franc Perdih, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Vanadium and zinc ions have proven insulin-like hypoglycaemic properties. With the aim of finding connections between structure, stability and biological properties of vanadium and zinc compounds, focusing on their insulin-like action, several VO^{2+} , VO^{2+} and Zn^{2+} complexes were prepared as part of this work. Commercially available and newly synthesized picolinate and β -diketonato type of ligands as well as additional biologically or structurally interesting neutral ligands were used. Crystal structures of the complexes were determined by single crystal X-ray diffraction, while VO^{2+} compounds were also studied in solution and their interactions with serum proteins apo-hTf and HSA were explored. To evaluate insulin-like activity of vanadium and zinc compounds the inhibition of free fatty acids release from rat adipocytes was measured. The most promising insulin-like activity was found in the case of VO^{2+} , VO^{2+} and Zn^{2+} complexes with strong ligating Hhypic ligands and Zn^{2+} complex with newly prepared amide ligand H4mpcpic. We have shown that strong and medium-to-strong ligands are more suitable for the synthesis of potential antidiabetic complexes. However, sufficient solubility of the complexes in water and their stability at broad pH range is also very important. This was achieved by introduction of amino groups on the side-chains of the ligands.

Analiza interakcij med celicami in magnetnimi nanodelci

JASNA LOJK, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Mojca Pavlin, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Nanodelci (ND) so v zadnjih letih zaradi svojih prednosti postali pomembno orodje na področju biotehnologije in medicine. Omogočili so nove pristope v diagnostiki in zdravljenju, v kliničnem okolju pa se že uporabljo za označevanje celic, kot kontrastna sredstva in za dostavo zdravilnih učinkovin za različne bolezni. V naši skupini smo razvili novo formulacijo biokompatibilnih ND z magnetnim, kobalt feritnim jedrom in plaščem iz poliakrilne kisline, ki omogoča tudi vezavo dodatnih molekul, npr. učinkovin, fluorescenčnih označevalcev ali ligandov za tarčno dostavo. S kombinacijo elektronske in fluorescenčne mikroskopije smo proučevali interakcije med našimi ND in različnimi celičnimi tipi *in vitro* ter pokazali, da ND vstopajo v celice s procesoma makropinocitoze in s klatrinom posredovane endocitoze. Dinamika privzema je bila odvisna od celičnega tipa, ND pa so se vedno nahajali v veziklih endolizosomalne poti ter se v velikih količinah kopčili v perinuklearni regiji celic. Pokazalo se je, da so ND relativno netoksični; niso sprožili direktne celične smrti prek nekroze ali apoptoze, nastanka reaktivnih kisikovih intermediatov ali aktivirali imunskega sistema na celični ravni prek NF- κ B. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da bi bili tovrstni magnetni ND primerni za biotehnološke aplikacije, ki zahtevajo velike količine privzetih ND, kot so npr. aplikacije označevanja in sledenja celicam, saj omogočajo vizualizacijo z elektronsko in fluorescenčno mikroskopijo ter z MRI.

Analysis of Interactions between Cells and Magnetic Nanoparticles

JASNA LOJK, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana
Supervisor: Mojca Pavlin, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

In recent years, nanoparticles (NPs) have emerged as an important tool in biotechnology and medicine. With their advantages they enabled new approaches to diagnostics and therapy and NPs are already used in clinics for cell labelling, as contrast agents and for drug delivery for different diseases. Our group developed a new formulation of biocompatible magnetic NPs with cobalt ferrite core, coated with polyacrylic acid, which also enables additional functionalisation with drugs, fluorescent labels or targeting ligands. With a combination of fluorescence and electron microscopy we analysed the interactions between our NPs and different cell types *in vitro* and showed that the NPs enter cells through the processes of micropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis, are found in the vesicles of the endolysosomal intracellular trafficking route and accumulate in the perinuclear region in high quantities. NPs were relatively non-toxic; they did not trigger cell death through apoptosis or necrosis, induce formation of reactive oxygen species or activate the immune system on the cellular level through activation of NF- κ B transcription factor. Based on these results, our NPs would be suitable for biotechnological applications that require high quantities of internalized NPs, such as cell labelling and tracking applications since our NPs enable visualization with electron and fluorescent microscopy as well as detection with MRI.

Presnova in ravnovesje holesterola pri miših s pogojno izbitim genom *Cyp51* v jetrih

GREGOR LORBEK, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Damjana Rozman, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Holesterol je molekula, ki je pomembna za rast in razvoj sesalcev, saj je eden od ključnih gradnikov celičnih membran, nastopa pa tudi kot izhodiščna molekula v sintezi žolčnih kislin in steroidnih hormonov. Jetrno neravnovesje holesterola se pojavlja kot nov, slabo raziskan dejavnik v nealkoholni maščobni bolezni jeter (NAFLD) in pri bolnikih z dednimi okvarami genov za tvorbo holesterola. Razvili smo mišji model z jetrno specifičnim izničenjem (LKO) gena za lanosterol 14 α -demetilazo (CYP51) iz poznga dela tvorbe holesterola. Pri miših z LKO se je pojavila hepatomegalija s proliferacijo ovalnih celic, fibrozo in vnetjem, kar predstavlja nekatere značilnosti napredovale NAFLD. Glavni vzrok za to je bila znižana koncentracija estrov holesterola, ki je izzvala zaustavitev celičnega cikla, s senescenco povezan izločevalni fenotip in končno proliferacijo ovalnih celic, medtem ko so povisani substrati za encim CYP51 pospeševali integriran odziv na stres. Kljub temu da je bila razsežnost s proliferacijo ovalnih celic povzročene fibroze pri obeh spolih histološko podobna, naši podatki kažejo zmanjšano izražanje genov s poti primarne presnove pri samicah in močnejši imunski odziv pri samcih. Z maščobami bogata krma je izboljšala poškodbo jeter predvsem pri samicah, prehranski holesterol pa je popravil vnetje in fibrozo pri obeh spolih. Pokazali smo, da bi okrnjena tvorba holesterola v jetrih lahko igrala pomembno vlogo pri napredovali NAFLD, hkrati pa spolno specifične prilagoditve v različnih prehranskih pogojih poudarjajo tehtnost dejavnikov spola in prehrane pri s holesterolem povezanih jetrnih obolenjih.

Metabolism and Cholesterol Homeostasis in Liver-specific *Cyp51* Knockout Mice

GREGOR LORBEK, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: Damjana Rozman, University of Ljubljana

Cholesterol represents an important molecule for growth and development of mammals, since it is a major constituent of cell membranes, and a precursor of bile acids and steroid hormones. Deregulated hepatic cholesterol homeostasis is an emerging yet poorly investigated factor in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and in patients with inborn errors of cholesterol biosynthesis. We prepared mouse liver-specific knockout (LKO) of lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) from the late part of cholesterol synthesis. LKO mice developed hepatomegaly with oval cell proliferation, fibrosis and inflammation, which are some of the advanced NAFLD features. The key trigger was reduced cholesterol esters that provoked cell cycle arrest, senescence-associated secretory phenotype, and ultimately, the oval cell response, while elevated CYP51 substrates promoted the integrated stress response. In spite of the oval cell-driven fibrosis being histologically similar in both sexes, our data indicates a female-biased down-regulation of primary metabolism pathways and a stronger immune response in males. Liver injury was ameliorated by dietary fats predominantly in females, whereas dietary cholesterol rectified fibrosis and inflammation in both sexes. We showed that defective cholesterol synthesis could play a detrimental role in advanced stages of NAFLD, while the sex-specific metabolic adaptations in different dietary regimes emphasize the importance of gender and nutrition in cholesterol-associated liver diseases.

Razvoj modela prehoda pelet skozi želodec za napovedovanje kinetike absorpcije učinkovin

MITJA PIŠLAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

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

Kinetika sproščanja natrijevega diklofenakata (DIK-Na) je odvisna od pH medija, zato se sproščanje DIK-Na iz pelet, ki so prisotne v želodcu, bistveno razlikuje od sproščanja DIK-Na iz pelet, ki so prisotne v tankem črevesu. Posledično je sproščanje DIK-Na odvisno od praznjenja pelet iz želodca. V sklopu naloge smo razvili model, ki opisuje sproščanje DIK-Na po zaužitju pelet s podaljšanim sproščanjem in napoveduje absorpcijo diklofenaka v sistemski krvni obtok za individualno osebo. Dokazali smo, da v primerjavi s konvencionalnimi *in vitro* testi sproščanja, ki jih predpisujejo regulatorni organi, z upoštevanjem individualnih profilov praznjenja pelet iz želodca bolje napovemo individualne *in vivo* profile sproščanja oziroma absorpcijske profile. Dodatno smo proučevali hrakan vpliv časa zadrževanja farmacevtske oblike (FO) v simuliranem želodčnem mediju (SGF) ter vpliv pH-vrednosti SGF na sproščanje DIK-Na iz FO in na plazemske koncentracijske profile diklofenaka. Poleg tega smo analizirani tudi čase prehodov tablet skozi tanko črevo, ki je glavno mesto absorpcije.

Modelling of Pellets Gastric Emptying for Prediction of Drug Absorption Kinetics

MITJA PIŠLAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Marija Bogataj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Dissolution of sodium diclofenac (DIK-Na) depends on the pH of the medium, therefore the DIK-Na release from the pellets that are present in the stomach is significantly different in comparison to the DIC-Na release from the pellets that are present in the small intestine. Hence, the dissolution of DIK-Na depends on pellets' gastric emptying. We developed a model describing *in vivo* dissolution of DIK-Na and *in vivo* diclofenac absorption for an individual person after an ingestion of extended-release pellets. We have shown that predicted individual *in vivo* dissolution profiles, which take into account pellet GE in an individual person, better predict the *in vivo* absorption profiles of diclofenac compared to conventional *in vitro* dissolution tests that are prescribed by regulatory agencies. Additionally, we evaluated the simultaneous effect of retention time of the dosage form in the simulated gastric fluid (SGF) and the pH of the SGF on the dissolution of DIK-Na and on plasma concentration profiles of diclofenac. Furthermore, small intestinal transit times of non-disintegrating tablets were analysed since the intestines are a major absorption area.

Strukturno podprto načrtovanje novih zaviralcev človeške DNA topoizomeraze IIa

BARBARA POGORELČNIK, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Tomaž Šolmajer, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: Andrej Perdih, Kemijski inštitut Ljubljana

Zaradi povečanega pojava nezaželenih stranskih učinkov protirakavih zdravil se je v zadnjih letih povečala potreba po razvoju novih učinkovin, ki bi pomagale pri vsakodnevniem zdravljenju raka. V doktorski disertaciji smo se ukvarjali z načrtovanjem in začetno eksperimentalno karakterizacijo več razredov novih katalitičnih zaviralcev človeške DNA topoizomeraze IIa, ki se vežejo na vezavno mesto za ATP. Odkrili smo tri nove strukturne razrede spojin, ki zavirajo aktivnost človeške topoizomeraze IIa v mikromolarnem območju. Z biofizikalnimi metodami smo potrdili vezavo novih spojin na vezavno mesto za ATP, torej smo dokazali katalitično delovanje teh spojin. Dokazali smo, da aktivne spojine kažejo obetavno citotoksično delovanje na celicah človeškega hepatoma (HepG2) in raka dojke MCF-7 ter selektivno citotoksičnost na normalnih celicah (HUVEC). S to raziskavo smo prispevali k odkritju novih zaviralcev človeške topoizomeraze IIa iz novih strukturnih razredov ter s tem postavili odlično izhodišče za njihovo optimizacijo do novih protirakavih učinkovin, ki jih vsak dan potrebujemo za zdravljenje naraščajočega števila rakavih obolenj.

Structure-based Design of Novel Human DNA Topoisomerase IIa Inhibitors

BARBARA POGORELČNIK, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Tomaž Šolmajer, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Andrej Perdih, National Institute of Chemistry Ljubljana

Due to frequently experienced occurrence of serious side effects of these molecules during therapy, further drug design efforts were initiated already yielding novel promising compounds. In the doctoral thesis we designed and experimentally evaluated novel catalytic inhibitors from various chemical classes that could bind to the ATP binding site of human DNA topoisomerase IIa. We discovered three new structural class inhibitors that inhibited htopIIa in a low micromolar range. We confirmed binding of the selected active compounds from both classes to the ATP binding site, which indicated catalytic activity of these compounds. Active compounds from this class also showed promising cytotoxic properties in hepatocellular carcinoma HepG2 cell lines and breast cancer MCF-7 and selectivity cytotoxicity against human umbilical vein endothelial HUVEC cells. Our research contributed to the discovery of three novel classes of human topoisomerase IIa inhibitors making them a great starting point for a further development of new anticancer agents, which are much needed for the treatment of an increasing number of cancer illnesses.

Sinteza enaminonov iz metil ketonov in njihova nadaljnja pretvorba v aromatske in heteroaromatske sisteme

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

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

3-(dimetilamino)-1-substituirane prop-2-en-1-one smo prek [2+2] cikloadicije in ciklokondenzacije pretvorili v ustrezne piridine in piridin N-okside in dalje v biciklične produkte. Pripravili smo 3-(dimetilamino)-1-substituirane but-2-en-1-one in preverili njihove reakcije z elektronsko revnimi acetileni. Pri pripravi 3-(dimetilamino)-1-substituiranih but-2-en-1-onov smo opazili, da kot stranski produkti nastajajo benzenovi derivati. Ugotovili smo, da izkoristek te reakcije povečamo, če dodamo 2,5 ekvivalenta DMADMA, reakcije vodimo v mikrovalovnem reaktorju, pri povišani temperaturi in brez topil. Predlagali smo potek reakcije kot dvojno kondenzacijo med N,N-dimetilacetamid dimethyl acetalom in izhodnimi spojinami, to so metil ketoni in spojine z aktivno metilensko skupino. Reakcija predstavlja novo »one-pot« sintezo benzenovih derivatov. Metodo smo razširili na karboksamide in pripravili derivate piridina. Piridine nam je z omenjeno metodo uspelo pripraviti tudi iz metil ketonov v treh stopnjah, ko smo najprej pripravili ustrezne 3-(dimetilamino)-1-substituirane but-2-en-1-one, jim dimetilaminsko skupino zamenjali z aminsko in jih nato reagirali z N,N-dimetilacetamid dimethyl acetalom do ustreznih piridinov. Iz karboksamidov smo pripravili tudi acetamidine in jim z *in situ* generiranim 2-fenil-oksazolonom izmenjali dimetilaminsko skupino. Nastalim produktom smo uvedli dimetilaminometilidenski fragment in dobili produkte, ki reagirajo z maleinanhidridom, pri čemer so nastali N,N-dimetil-7-(substituirani)-1,3-diokso-1,3-dihidroizobenzofuran-4-karboksamidi. Proučili smo tudi [2+2] cikloadicije elektronsko revnih acetilenov na »push-pull« butadiene, pregledali vplive na reaktivnost teh sistemov in pripravili nove produkte. V raziskovalnem delu nam je z novo sintezno metodo uspelo izlahko dostopnih izhodnih spojin in reagentov pripraviti raznovrstne karbociklične in heterociklične produkte.

Synthesis of Enaminones from Methyl Ketones and Their Conversion to Aromatic and Heteroaromatic Systems

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

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

3-(Dimethylamino)-1-substituted prop-2-en-1-ones were transformed via [2+2] cycloaddition and cyclocondensation to pyridines and pyridine-N-oxides and further to bicyclic systems. We prepared 3-(dimethylamino)-1-substituted but-2-en-1-ones and tested their reactivity towards electron deficient systems. While preparing 3-(dimethylamino)-1-substituted but-2-en-1-ones, we also observed small amounts of benzene side products. We learned that using microwave heating, elevated temperatures, solvent-free conditions and 2.5 equivalents of N,N-dimethylacetamide dimethyl lead to better yields of these products. The reaction seems to progress as a double condensation between the starting compounds and the amide acetal, followed by cyclocondensation to the corresponding benzene derivatives. We realised that we found a new one-pot synthesis of benzene derivatives. The method was extended to carboxamides, leading to pyridine derivatives, which were also synthesised from methyl ketones in a three step reaction. First, 3-(dimethylamino)-1-substituted but-2-en-1-ones were prepared followed by substitution of the dimethylamino group with an amine group and reaction with N,N-dimethylacetamide dimethyl acetal to form the final pyridine products. We also prepared acetamidines from carboxamides, substituted the dimethylamino group with *in situ* prepared 2-phenyl-oxazolone leading to products, which we then elongated with a dimethylamino methyldiene fragment to new products, which reacted with maleic anhydride to form N,N-dimethyl-7-(substituted)-1,3-dioxo-1,3-dihydroisobenzofuran-4-carboxamides. We also studied the [2+2] cycloaddition of electron-poor acetylenes and 'push-pull' butadienes, assessed factors that govern their reactivity, and prepared new products. By using cheap and commercially available starting materials and reagents, we were able to prepare various carbocyclic and heterocyclic final products using relatively simple synthetic steps.

Vpliv magnetofekcije s plazmidno DNA, ki kodira shRNA proti genu *Mcam*, na angiogenezo mišjih endotelijskih celic in proliferacijo celic mišjega melanoma *in vitro*

LARA PROSEN, Onkološki inštitut Ljubljana
Mentor: Gregor Serša, Onkološki inštitut Ljubljana

Genska terapija je sodoben in obetaven pristop k zdravljenju raka, s katerim genski material vnesemo v tarčne celice, da bi tako spremenili njihove biološke lastnosti. Ključ do njene učinkovitosti sta uporaba varnega in učinkovitega dostavnega sistema ter izbira primerne tarčne molekule. V doktorski nalogi smo se osredotočili na tri izzive s tega področja, in sicer na raziskovanje novih, varnih in učinkovitih nevirusnih dostavnih sistemov za genski material, na iskanje novih potencialnih tarč za učinkovanje terapije ter na razvoj novih tehnologij, predvsem za utišanje genov. Tako smo proučevali magnetofekcijo, pri kateri celice izpostavimo magnetnim nanodelcem, na katere predhodno vežemo terapevtski gen, ter jih nato s pomočjo zunanjega magnetnega polja koncentriramo in zadržimo na površini celic oz. na ciljanem mestu. Kot potencialno tarčo za zdravljenje melanoma smo uporabili celično adhezijsko molekulo melanoma (MCAM), ki sodeluje pri rasti melanoma in nastajanju njegovih metastaz, in jo ciljali s tehnologijo utišanja genov na posttranskripcijskem nivoju mRNA, tehnologijo RNA-interference. Z dobljenimi rezultati smo prispevali k razvoju magnetofekcije. Optimizirali smo nov postopek sinteze magnetnih nanodelcev in nato z magnetofekcijo v celice *in vitro* uspešno vnesli genski material. Tudi s poskusi na *in vivo* modelih smo pokazali, da je magnetofekcija učinkovita, neinvazivna in neboleča metoda, kar se je v raziskavah po svetu do sedaj zelo redko pokazalo. Poleg tega smo uspešno pripravili tudi novo terapevtsko plazmidno DNA za ciljanje molekule MCAM s tehnologijo RNA-interference ter tako prispevali k njeni izboljšavi in morebitni prihodnji dopolnitvi standardnih pristopov genske terapije. Na podlagi dobljenih rezultatov in rezultatov drugih študij, v katerih so prav tako ciljali molekulo MCAM, je mogoče trditi, da je ta molekula potencialna tarča, proti kateri je smiselno razvijati ciljane terapije.

The Effect of Magnetofection with Plasmid DNA Encoding shRNA against *Mcam* on Angiogenesis of Endothelial and Proliferation of Melanoma Murine Cells *in vitro*

LARA PROSEN, Institute of Oncology Ljubljana, Department of Experimental Oncology
Supervisor: Gregor Serša, Institute of Oncology Ljubljana, Department of Experimental Oncology

Gene therapy is a contemporary and promising approach in cancer treatment. Introduction of genetic material into target cells with a safe and effective delivery system and selection of a suitable target molecule still remain a challenge in the development of new gene therapy approaches. This PhD thesis study was centered around three main challenges in this field, namely to explore new, safe and effective non-viral gene delivery systems, to discover new potential targets for efficient therapy, and to develop new technologies, especially in terms of gene silencing. Therefore, we studied magnetofection, i.e. utilization of magnetic nanoparticles coupled with nucleic acids, guided and accumulated by an external magnetic field to the target cells. A melanoma cell adhesion molecule (MCAM) was used as a potential target in the therapy of melanoma, since it is involved in melanoma development and progression. Its expression was reduced by post-transcriptional specific gene silencing on the mRNA level, the RNA interference technology. The obtained results have contributed to the development of magnetofection. We first optimized the synthesis of magnetic nanoparticles. After that we introduced genetic material into the cells *in vitro* by magnetofection. Magnetofection was demonstrated to be an effective, non-invasive and painless gene delivery system also in *in vivo* models, which has been so far very rarely shown. In addition, we prepared a new therapeutic plasmid DNA targeting MCAM by RNA interference technology, thus contributing to its improvement and future amendments of standard gene therapy approaches. From all the results obtained after targeting MCAM, we can also claim that it represents a potential target against which it is worth developing targeted therapies.

Analiza procesa in matematično modeliranje kinetike encimsko katalizirane sinteze statinskega derivata

ALEŠ RUČIGAJ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Matjaž Krajnc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: Zdenko Časar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Vse večje zahteve po konkurenčnosti v farmacevtski industriji težijo k nenehni optimizaciji postopkov pri pripravi produktov, saj lahko to pomeni velik prihranek pri pripravi zdravilnih učinkovin. Proučevali smo encimsko katalizirano reakcijo statinskega derivata in z opisom reakcije v obliki kinetičnega modela napravili pomemben korak k optimizaciji celotnega procesa. Sinteza statinskega intermedijata je potekala z uporabo encima 2-deoksiriboz-5-fosfat aldolaza (DERA) v obliki surovega lisata. V vlogi reaktantov sta bila v prvem primeru acetiloksiacetaldehid in acetaldehid, v drugem pa kloroacetaldehid in acetaldehid. Pri tem so nastajali vmesni produkt, glavni produkt in stranski produkt ter tudi neželeni stranski produkti kot posledica alternativnih stranski reakcij. Da bi oblikovali kinetični model za proučevano reakcijo, smo izvedli vrsto eksperimentov ter spremajali količino in način dodajanja reaktantov v reakcijsko mešanico. S tem smo pridobili bazo eksperimentalnih podatkov, ki smo jih v nadaljevanju uporabili kot orodje pri določanju kinetičnih parametrov oblikovanega kinetičnega modela. Dosegli smo zadovoljivo ujemanje eksperimentalnih podatkov z izračunanimi vrednostmi in oblikovani kinetični model uporabili pri simulaciji reakcije v različnih reaktorskih sistemih.

Process Analysis and Mathematical Modelling of Kinetics of Enzyme-catalyzed Synthesis of Statin Derivative

ALEŠ RUČIGAJ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Matjaž Krajnc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Co-supervisor: Zdenko Časar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Growing competitiveness in the pharmaceutical industry results in a strive towards continuous optimisation of production procedures, as this could mean huge savings in the preparation of pharmaceutical ingredients. Enzyme-catalyzed reaction of a statin derivative supported with the description of the reaction in the form of a kinetic model was investigated, marking an important step towards the optimisation of the whole process. The synthesis of the statin intermediate was performed by using 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) in a form of a crude lysate. As reactants acetylxyacetalddehyde and acetaldehyde were used in one case, and in the other chloroacetalddehyde and acetaldehyde. In the reaction, the intermediate, the main product, the side product and undesired side products were formed as a consequence of alternative side reactions. In order to obtain a kinetic model for the studied reaction, a number of experiments was performed by varying the amount and manner of reactants addition in the reaction mixture. In such a way, the experimental data base was obtained, which then served as an important tool in determining the appropriate value of kinetic parameters. We managed to achieve satisfactory agreement between experimental and calculated data. The developed kinetic model was thereafter used in a simulation of reaction in different reactor systems.

Študije metabolizma progesterona in vloge metabolitov pri raku endometrija in endometriozи

MAŠA SINREIH, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Tea Lanišnik Rižner, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Jerzy Adamski, Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Centre, Helmholtz Zentrum München

Rak endometrija in endometriosa sta od estrogenov odvisni bolezni, pri katerih je zaščitno delovanje progesterona zmanjšano. V endometriju estrogeni delujejo kot mitogeni, saj spodbujajo celično proliferacijo in zavirajo apoptozo. Progesteron tem učinkom nasprotuje z zaviranjem proliferacije in spodbujanjem diferenciacije celic. Namen naše raziskave je bil proučiti lokalno sintezo in metabolizem progesterona ter pojasniti vlogo progesterona in njegovih metabolitov pri raku endometrija in endometriozи. Naši rezultati kažejo, da se pri raku endometrija zaradi zmanjšanega izražanja genov lokalne sinteze progesterona in zmanjšanega izražanja jedrnih receptorjev za progesteron zaščitni učinki progesterona lahko zmanjšajo. Pri ovarijski endometriozи pa kljub večjemu izražanju genov lokalne sinteze progesterona zaradi znižanih ravnih jedrnih receptorjev za progesteron ta verjetno ne more nasprotovati delovanju estrogenov. V modelnih celičnih linijah raka endometrija in endometrioze je metabolizem progesterona spremenjen v primerjavi z modelno celično linijo normalnega proliferativnega endometrija, saj se tvori več 5a-pregnanoval. Rezultati kažejo, da sta SRD5A1 in AKR1C2 potencialni tarči za zdravljenje raka endometrija, SRD5A1 pa predstavlja možno tarčo za zdravljenje endometrioze.

Studies of Progesterone Metabolism and the Roles of Metabolites in Endometrial Cancer and Endometriosis

MAŠA SINREIH, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: Tea Lanišnik Rižner, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Jerzy Adamski, Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Centre, Helmholtz Zentrum München

Endometrial cancer and endometriosis are estrogen dependent diseases, where protective actions of progesterone are lowered. In the endometrium, estrogens act as mitogens by stimulating cell proliferation and inhibiting apoptosis. Progesterone opposes the actions of estrogens, inhibits cell proliferation, and promotes cell differentiation. The aims of our study were to explore local synthesis and metabolism of progesterone and to clarify the roles of progesterone and its metabolites in endometrial cancer and endometriosis. Our results show that due to the decreased expression of genes of local progesterone biosynthesis and decreased levels of nuclear progesterone receptors in endometrial cancer protective actions of progesterone might be reduced. In ovarian endometriosis tissue, despite the higher expression of genes of local progesterone biosynthesis and decreased levels of nuclear progesterone receptors, the results suggest that the protective actions of progesterone are diminished. In both endometrial cancer and endometriosis model cell lines, more 5a-pregnanes are formed and thus the metabolism of progesterone is altered compared to the model cell line of normal proliferative endometrium. Our results suggest that SRD5A1 and AKR1C2 are potential drug targets for endometrial cancer, and SRD5A1 a potential drug target for endometriosis.

Razgradnja enrofloksacina v iztrebkih piščancev pitancev

MARKO SLANA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentorica: Vesna Pahor, Krka, d. d., Novo mesto

Enrofloksacin je stabilna učinkovina, ki se delno metabolizira v tarčnih živalih in se izloča predvsem v nespremenjeni obliki ali v obliki glavnega metabolita ciprofloksacina, ki prav tako deluje protimikrobnno. Po končani terapiji se izločki tretiranih živali raztresejo po poljih, zato je koncentracija veterinarskih zdravil, ki prehajajo v okolje, odvisna od dolžine terapije, načina aplikacije in količine apliciranega zdravila. Kako dolgo bo posamezna učinkovina prisotna v okolju in kakšni bodo njeni ekotoksikološki vplivi, je odvisno od fizikalno-kemijskih, razgradnih in toksikoloških lastnosti učinkovine in od dejavnikov, prisotnih v okolju. V študiji smo proučili metabolno-ekskrecijski mehanizem enrofloksacina ter njegovo razgradnjo v hlevu v fazi rejnega cikla zdravljenih piščancev in na prostem, kjer se iztrebki skladiščijo, preden se kot gnojilo raztresijo pozemlji. Rezultate usode/razgradnje enrofloksacina iz terenske raziskave smo primerjali s študijo razgradnje v laboratorijskih pogojih, izvedene po navodilu OECD 307. Raziskava je pokazala, da v piščančjih izločkih prevladujeta enrofloksacin (72,3 %) in ciprofloksacin (25,5 %). Spremljanje razgradnje metabolitov v hlevu, v fazi rejnega cikla piščancev, je pokazalo, da se enrofloksacin in ciprofloksacin deloma razgrajujeta v iztrebkih že v hlevu pred prenosom v naravo. Prav tako se je v hlevski fazi povečala koncentracija dezetilen-enrofloksacina, ki je metabolni in razgradni produkt enrofloksacina. Spremljanje koncentracije analitov v kompostiranih iztrebkih v naravi je pokazalo, da se razgradnja enrofloksacina in ciprofloksacina ter tvorba dezetilen-enrofloksacina v naravi nadaljujeta. Primerjava razgradnje v različnih pogojih je pokazala, da je razgradnja enrofloksacina v laboratoriju počasnejša (razpolovni čas 59,1–190,8 dneva) in manj raznolika kot v naravi (razpolovni čas 12,7–18,1 dneva).

Degradation of Enrofloxacin in Chicken Broiler Excreta

MARKO SLANA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Vesna Pahor, Krka, d. d., Novo mesto

Enrofloxacin is a stable substance that is partially metabolised in target animals and is excreted primarily unchanged or in the form of a major metabolite ciprofloxacin, which also has antimicrobial properties. After the therapy is completed, the secretions of treated animals are left behind on fields, so the concentration of veterinary medicinal products which are released into the environment depends largely on the therapy duration and quantity of the administered drug. How long each active ingredient will be present in the environment and what will be its ecological effects, depends mainly on the physico-chemical, toxicological and degradation properties of the substances as well as on the factors present in the environment. In this investigation we examined the metabolic-excretory mechanism of enrofloxacin and its degradation pathway during the rearing cycle inside the rearing facility and after the transfer of the excreta into the environment before it was used as a fertilizer. The degradation of enrofloxacin from the field study was compared with the enrofloxacin degradation study carried out under laboratory conditions according to the OECD 307 guideline. The survey showed that enrofloxacin (72.3%) and ciprofloxacin (25.5%) were the main compounds found in the excreta. Monitoring of the metabolite degradation during the rearing cycle phase inside the rearing facility showed that enrofloxacin and ciprofloxacin were partly degraded in the excreta before the transfer of the excreta into nature. Additionally, concentration of desethylene-enrofloxacin, which is a metabolic and degradation product of enrofloxacin, increased. The concentration of the analytes in the environment composted excreta showed that degradation of enrofloxacin and ciprofloxacin and the formation of desethylene-enrofloxacin continued. The comparison of enrofloxacin degradation under various conditions has shown that the degradation process in the laboratory (half-life 59.1–190.8 days) is slower and less diverse compared to degradation in nature (half-life 12.7–18.1 days).

Numerično modeliranje dvofaznega toka v Wursterjevi komori z računalniško dinamiko tekočin

ROK ŠIBANC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Rok Dreu, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Pelete oblagamo v vrtinčnoslojnih oblagalnikih, med katere uvrščamo tudi komoro z razprševanjem od spodaj z razmejitvenim valjem – Wursterjevo komoro. Na enakomernost debeline oblage in izkoristek oblaganja vpliva veliko materialnih in procesnih spremenljivk. Njihov vpliv smo proučevali z eksperimentalno podprtimi simulacijami s področja računalniške dinamike tekočin (RDT). Pred začetkom smo ovrednotili njihove robne pogoje, med njimi tudi nabor fizičkih lastnosti pelet, na primer kvaliteto trka. Za razvoj simulacij smo uporabili dvodimensionalni model oblagalnika in pri tem proučevali vpliv reže med distribucijsko ploščo in razmejitvenim valjem ter pretoka zraka za potek očinjenje na volumski delež pelet v valju in njihovo hitrost na izhodu valja. V nadaljevanju smo validirane simulacije uporabili za proučevanje vpliva velikosti pelet in količine pelet v oblagalniku in rezultate povezali z eksperimentalnimi rezultati oblaganj. Za merjenje volumskega deleža pelet v razmejitvenem valju smo razvili in-line optično metodo, ki deluje na principu merjenja transmitance. V nadaljevanju smo za primerjavo delovanja klasične Wursterjeve komore in komore z generatorjem vrtinčenja uporabili tridimensionalne RDT-simulacije. Rezultate smo primerjali s hitrostnimi profili pelet, ki smo jih dobili z razvito metodo slikanja z dvojnim osvetljevanjem. Za natančno določanje enakomernosti debeline oblage pelet smo razvili optično barvno metodo, s katero lahko v kratkem času ovrednotimo veliko število pelet in s tem natančno popišemo delovanje oblagalnika.

Numerical Modelling of Two-phase Flow in Wurster Chamber Using Computational Fluid Dynamics

ROK ŠIBANC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Rok Dreu, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Pellets are coated in fluidized bed coaters, which includes bottom spray coaters with draft tube insert – Wurster coater. Coating uniformity and process yield is the result of a large number of material and process variables. Their influence was studied using experimentally validated computational fluid dynamics (CFD) simulations. Prior to performing simulations, simulation boundary conditions were evaluated including pellet physical properties such as coefficient of restitution. For simulation development, a two-dimensional coater model was used, where the effect of the gap between the distribution plate and the draft tube and fluidizing air flow rate on volume fraction of pellets in the draft tube and their velocity at the draft tube exit was studied. Validated simulations were afterwards used in the study of the effect of particle size and the bed load and connected these results with the results of coating. For measurement of pellet volume fraction in the draft tube, an in-line optical method based on transmittance was developed. For comparison of the classical Wurster coater and swirl enhanced coater, three-dimensional simulations were performed. These simulations were additionally supported by pellet velocity profiles obtained by developed double exposure photography. For accurate determination of pellet coating thickness uniformity, a colour optical method was developed, which can measure a large number of particles in a short amount of time and can be used for accurate study of coaters performance.

Sinteze in uporaba novih diazenov in triazenov

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

Mentor: Janez Košmrlj, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sintetiziral sem diazendikarboksamide, za katere sem dokazal, da bi potencialno lahko zmanjševali znotrajcelično koncentracijo biološko pomembnega glutationa. Biološka testiranja so pokazala, da pripravljene spojine kažejo dobro aktivnost proti različnim tumorskim celičnim linijam. Izbrane diazene sem pretvoril v hidrazino spojine, pri čemer sem uspešno uporabil novorazvito metodo za redukcijo azo spojin. Razvil sem novo metodo za tvorbo vezi C–N, ki poteka v blagih pogojih, brez uporabe dragih katalizatorjev. Z združevanjem različnih biološko aktivnih fragmentov sem skušal pripraviti spojine z biološko aktivnostjo, povečano zaradi sinergističnega delovanja posameznih strukturnih podenot. Iz različnih anilinov sem pripravil serijo substituiranih 1,3-diariltriazenov z dobro aktivnostjo proti različnim mikobakterijskim sevom, bakterijam, ki povzročajo tuberkulozo. Zato sem izbrane triazene pretvoril v njihove acilirane adukte, zlasti takšne z izoniazidno skupino (s pomembno vlogo pri zdravljenju tuberkuloze), ter v triazenidne soli. Z različnimi biološkimi testi sem pokazal, da bi simetrične 1,3-diariltriazenske derivate potencialno lahko uporabljali za zdravljenje smrtonosnih bakterijskih okužb (npr. MRSA, tuberkuloza). Triazene sem uporabil tudi kot ligande pri pripravi rutenijevih koordinacijskih spojin, za katere se je izkazalo, da v primerjavi z njihovimi prekurzorji triazeni močno povečajo inhibicijo rasti različnih testiranih tumorskih celičnih linij.

Syntheses and Application of Novel Diazenes and Triazenes

JURE VAJS, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Janez Košmrlj, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

We have prepared diazenedicarboxamides and revealed their ability to potentially reduce the intracellular concentration of biologically important glutathione. Biological tests have demonstrated that the prepared compounds exhibit good activity against various tumor cell lines. Selected diazenes were thereafter converted to hydrazino compounds; the newly developed method for the reduction of azo compounds was successfully applied for their preparation. We have developed a new method for the formation of C–N bonds, taking place under mild conditions and without expensive catalysts. By combining various biologically active fragments we tried to prepare compounds displaying an increased biological activity due to the possibility of the synergistic effect upon linking together two structural subunits. Starting from various anilines we have prepared a set of substituted 1,3-diaryltriazenes, which demonstrated good activity against various mycobacterial strains such as the family of the bacteria which causes tuberculosis. Therefore, we decided to convert the selected triazenes into two types of derivatives: acylated containing an isoniazide group with an important role in the treatment of tuberculosis, and triazenide salts. With a variety of biological tests we have demonstrated that symmetrical 1,3-diaryltriazene derivatives could potentially be used to treat lethal bacterial infections (i.e. MRSA, tuberculosis). Furthermore, we have applied triazenes as ligands to prepare ruthenium coordination compounds, which in comparison with their precursors triazenes, showed a substantially increased inhibition of the growth of various tumor cell lines.

Sinteza alfa-D-manoziliranih glikokonjugatov kot ligandov za lektine, specifične za manozo

MAJA ANTONČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Marko Anderluh, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Anna Bernardi, Oddelek za organsko kemijo, Univerza v Milanu

Za razvoj infekcij je izjemno pomemben proces adhezije bakterij ali virusov na gostiteljske celice, pri katerem najpogosteje sodelujejo lektini. V nalogi smo se osredotočili na lektina, ki sta pokazala specifičnost za vezavo D-manoznih monosaharidov, lektin FimH in lektin DC-SIGN. Odločili smo se za načrtovanje in sintezo antagonistov, ki vsebujejo D-manozo kot jedro, na katero so pripete primerne hidrofobne skupine, ki povečajo vezavno afiniteto. V prvem delu naloge smo na monosaharidno jedro prek glicerolnega distančnika pripeli dve hidrofobni skupini, naftalen-1-il in 4-il-benzojsko kislino, in tako dobili spojino z visoko afiniteto vezave na receptor FimH. V drugem delu pa smo sintetizirali psevdomanozidno ogrodje, na katero smo z reakcijo kondenzacije vezali štiri različne amine. Dobili smo štiri končne spojine, pri katerih ravno zaradi psevdomanozidnega ogrodja pričakujemo pozitivne rezultate meritev vezave na DC-SIGN.

Synthesis of Alpha-D-Mannosyl Glycoconjugates Aimed to Target Mannose-binding Lectins

MAJA ANTONČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, University of Milan

Supervisor: Marko Anderluh, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Anna Bernardi, Department of Chemistry, University of Milan

Adhesion is of major importance for pathogenic bacteria or viruses in causing infection and it is usually mediated by lectins. In the thesis study we focused on two lectins that have shown specificity for binding D-mannose monosaccharides lectin FimH and lectin DC-SIGN. We decided to design and synthesize mannose-based antagonists of both receptors by attaching appropriate hydrophobic groups to increase binding affinity. In the first part of the study we attached two hydrophobic groups, naphthalene-1-yl and 4-yl benzoic acid, to the monosaccharide core by a glycerol linker, thus getting a compound with high affinity for the FimH lectin. In the second part of the study we formed a pseudo-mannose scaffold to which four different amines were attached, which gave us four final compounds. These are very promising with regard to effective binding to DC-SIGN, since a pseudo-mannoside structure has been demonstrated successful in targeting the receptor.

Raziskave migracije vode med strukturnimi polisaharidi in ostalimi komponentami trdnih farmacevtskih oblik

NASTJA BAŠELJ, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Tomaž Požrl, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Boštjan Jerman, Krka, d. d., Novo mesto

V magistrski nalogi smo raziskovali migracijo vode med snovmi v večkomponentnem heterogenem sistemu. Raziskali smo aktivnost vode in oblikovali komoro za opazovanje migracije vode med snovmi tako, da smo zagotovili prehajanje vode izključno med želenimi snovmi v komori. V prvem delu glavnega eksperimenta smo proučevali pristope, s katerimi lahko vplivamo na aktivnost vode. Pokazalo se je, da lahko z dodatkom MgCl₂ kot humektanta zmanjšamo aktivnost vode in tako kontrolirano vplivamo na potencialno migracijo v zmesi, saj MgCl₂ veže razpoložljivo vodo, pri čemer preide v hidratno obliko. Ugotovili smo še, da s spremembom velikosti delcev ne moremo vplivati na obseg vodne aktivnosti, ampak kvečjemu na hitrost sorpcije vode. V drugem delu eksperimenta smo s simulacijo binarnih zmesi dokazali, da voda migrira od snovi z večjo vodno aktivnostjo proti snovi z manjšo vodno aktivnostjo po zakonu o termodinamiki, ne glede na vsebnost vode v posamezni snovi. Za vsako komponento smo smer migracije in količino migrirane vode napovedali na osnovi sorpcijskih izoter (vsebnost vode v odvisnosti od vodne aktivnosti). Ta princip je dovolj natančno napovedal, koliko vode bo katera snov v večkomponentnem heterogenem sistemu sprejela ozziroma oddala. S takimi študijami lahko napovemo stabilnost končnega izdelka z vidika prenosa vode in sprememb vodne aktivnosti že v idejnih fazah razvoja izdelka.

Water Migration between Structural Polysaccharides and Other Components in Pharmaceutical Solid Dosage Forms

NASTJA BAŠELJ, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Tomaž Požrl, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Boštjan Jerman, Krka, d. d., Novo mesto

In this master's thesis study we investigated water migration between substances in multi-component formulations. We also studied water activity and designed a chamber that enabled observation of water migration between substances in airtight conditions and the limitation of water transport solely between examined substances in the chamber. We examined the technical procedures which can influence the activity of water. It has been shown that the addition of humectant MgCl₂ reduces water activity and as such influences the potential water migration in the formulation. It has also been shown that particle size reduction does not influence the scope of water activity but, at the most, only increases the kinetics of water sorption. In the second part of the experiment we demonstrated that water migrates from the substance with higher water activity to the substance with lower activity according to the law of thermodynamics, irrespective of the water content of individual substances. In the last part of the experiment we found that based on calibration curves of water sorption (mass change) as a function of water activity we can relatively accurately predict the amount of water that each substance can accept or release. This study will help us predict the stability of our final product in terms of water and water activity in the early conceptual stages of our development project.

Načrtovanje in sinteza analogov 4,5-dibromo-1*H*-pirola s tirozinskim fragmentom kot zaviralcev giraze B s protibakterijskim delovanjem

ANDREJ EMANUEL COTMAN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

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

Bakterijska DNA-giraza je dobro uveljavljena tarča nekaterih znanih protibakterijskih učinkovin, kot so fluorokinoloni, proti katerim pa se že pojavlja odpornost. Ker omenjene učinkovine ciljajo predvsem A-podenoto encima, je alternativni pristop načrtovanje novih učinkovin, ki ciljajo ATP-vezavno mesto na B-podenoti bakterijske giraze (GyrB). Pirol-2-karboksamidni fragment, ki se nahaja tudi v oroidinu, alkaloidu alg iz rodu *Agelas*, je znan strukturni element inhibitorjev GyrB. Načrtovali in sintetizirali smo 29 novih analogov oroidina in ovrednotili njihovo zaviralno delovanje na GyrB in protibakterijsko aktivnost. 15 sintetiziranih spojin je zaviralcev GyrB (najboljša spojina kaže srednjo inhibitorno koncentracijo $IC_{50} = 619 \text{ nM}$), od teh jih 7 kaže protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam (najboljša spojina ima minimalno inhibitorno koncentracijo $MIC_{90} = 14 \mu\text{g/ml}$ proti *Staphylococcus aureus* in *Enterococcus faecalis*) oziroma sevu po Gramu negativnih bakterij z izbitim genom za efluksno črpalko (najboljša spojina ima minimalno inhibitorno koncentracijo $MIC_{90}=2 \mu\text{g/ml}$ proti *Escherichia coli tolC*).

Design and Synthesis of 4,5-dibromo-1*H*-pyrrole Analogues with Tyrosine Fragment as Gyrase B Inhibitor with Antibacterial Activity

ANDREJ EMANUEL COTMAN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

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

Bacterial DNA gyrase is a well-established target of antibacterial agents, such as fluoroquinolones, but bacterial strains that have already developed resistance to known gyrase A subunit inhibitors are emerging. An alternative approach is to target the ATP binding pocket of gyrase B (GyrB). The pyrrole-2-carboxamide fragment that is also present in oroidin, an alkaloid from the genus *Agelas* sponges, is a known structural element of GyrB inhibitors. Twenty-nine oroidin analogues were designed, prepared and evaluated for GyrB inhibition and their antibacterial activity. Among them, 15 GyrB inhibitors were identified (the most potent derivative exhibited an IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) of 619 nM). Seven GyrB inhibitors also showed antibacterial activity against gram-positive bacteria (the most active derivative exhibited a MIC_{90} (minimum inhibitory concentration) of $14 \mu\text{g/ml}$ against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) or against an efflux-deficient strain derived from gram-negative bacteria (the most potent derivative exhibited a MIC_{90} of $2 \mu\text{g/ml}$ against *Escherichia coli tolC*).

Vpliv sestave disperzije za oblaganje tablet na izbrane lastnosti filmske oblage

JERNEJ KASTELIC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: Uroš Ocepek, Krka, d. d., Novo mesto

Lastnosti tabletnih filmskih oblog so odvisne tako od kvalitativnih kot kvantitativnih sprememb sestave. Proučevali smo filmske oblage na osnovi polivinil alkohola, ki so se med seboj razlikovale v skupnem deležu titanovega dioksida in smukca. S t. i. prostimi filmi, ki smo jih izdelali z metodo z razprševanjem disperzij na PVC-ploščice, smo določili permeabilnost filmov za zračno vlago. Delci titanovega dioksida in smukca so v vodi netopni in predstavljajo močno bariero za zračno vlago. Večji, kot je njun skupni delež, manjša je permeabilnost za zračno vlago. Študija mehanskih lastnosti prostih filmov je pokazala, da je obloga, ki vsebuje več titanovega dioksida in smukca, bolj rigidna in manj raztegljiva ter dosega manjšo natezno trdnost. Glede na to, da se fizikalne lastnosti proučevanih disperzij med seboj razlikujejo, smo s študijo vpliva tlakov razprševanja disperzij določili najbolj primerne nastavitev za optimalen curek kapljic posamezne formulacije. V nadaljevanju smo proučevali abrazivnost te vrste obloženih tablet, ki se lahko kaže v obliki sivih lis na izbočenih delih tablet.

The Influence of Tablet Film Coating Dispersion Composition on Selected Film Coating Properties

JERNEJ KASTELIC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Uroš Ocepek, Krka, d. d., Novo mesto

Tablet film coating properties are dependent both on qualitative and quantitative changes of its composition. We investigated film coatings that are based on polyvinyl alcohol and differ in the total proportion of titanium dioxide and talc. 'Free films' were made by spraying dispersions on plastic plates and their water vapour permeability was determined. Titanium dioxide and talc particles are water insoluble and represent a strong barrier for water vapour. The higher is their proportion, the lower is permeability. The study of the mechanical properties of 'free films' showed that more titanium dioxide and talc a coating contains, harder it becomes. It also elongates less and has a lower tensile strength. As there were differences in physical properties between dispersions, the influence of spraying pressure was studied and most appropriate settings for optimal spraying for each of the studied formulations were determined. In the following experiments we studied abrasion which is significant for this type of coated tablets and may be observed as grey spots on the convex parts of tablets.

Analiza parametrov razprševanja pri procesu oblaganja tablet

NEJC KORAČIN, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Iztok Golobič, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Ljubljani

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

V nalogi smo obravnavali parametre razprševanja pri procesu oblaganja tablet v farmacevtski industriji. Za analizo vpliva tlaka in pretoka zraka za atomizacijo ter viskoznosti disperzije na kakovost razpršenega curka smo zasnovali merilni sistem s hitrotekočo kamero in mikroskopom. Merilna proga omogoča spremljanje parametrov razprševanja. Na osnovi eksperimentalne analize razpršenih kapljic smo določili vpliv tlaka za atomizacijo, masnega pretoka disperzije in viskoznosti disperzije na kakovost razprševanja. Za analizirano šobo in disperzijo z 12- in 14-odstotnim deležem suhe snovi smo dobili obetavne rezultate razprševanja pri pretoku disperzije 30 g/min in tlaku zraka za atomizacijo 2,5 bara.

Analysis of Spraying Parameters in the Process of Tablet Coating

NEJC KORAČIN, Faculty of Mechanical Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: Iztok Golobič, Faculty of Mechanical Engineering, University of Ljubljana

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

The main subject of the present thesis is an analysis of parameters in the process of spray coating of tablets in pharmaceutical industry. A measuring system was designed using a high-speed camera and microscope in order to analyze the influence of atomizing air pressure and its flow rate as well as the viscosity of the dispersion. The measuring system helped us gather the data needed to assess the parameters of spraying. Based on experimental analysis of sprayed droplets we estimated the influence of atomizing air pressure, dispersion mass flow and viscosity on the quality of the process. Promising results were achieved with the dispersion containing 12% to 14% of dry mass at a flow rate of 30 g/min and atomizing air pressure of 2.5 bar.

Sferična kristalizacija lakoze

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

V zadnjem obdobju je veliko pozornosti posvečene inženiringu farmacevtskih delcev, s katerim bi lahko uspešno odgovorili na izzive pri izdelavi trdnih farmacevtskih oblik. Gre za formulacijo ali oblikovanje delcev z definirano morfologijo, velikostjo in porazdelitvijo velikosti ter sestavo, s čimer lahko izboljšamo njihove pretočne lastnosti in stisljivost. V okviru eksperimentalnega dela smo z metodo sferične kristalizacije izdelali porozne sferične aglomerate α -lakoze monohidrata ter proučili vpliv temperature, hitrosti mešanja reakcijske zmesi in začetne koncentracije lakoze na proces in lastnosti izdelanih delcev. Vrednotili smo različne fizikalno-kemijske in mehanske lastnosti izbranih serij sferičnih aglomeratov ter jih primerjali z nekaterimi komercialno dostopnimi α -laktozami monohidrat za direktno stiskanje. Temperatura reakcijske zmesi bistveno vpliva na morfologijo nastalih aglomeratov, velikost delcev in izkoristek procesa. Z večjo hitrostjo mešanja reakcijske zmesi se je velikost delcev manjšala, z večanjem začetne koncentracije lakoze v raztopini pa so se povečali delci in izkoristek procesa. Pretočne lastnosti sferičnih aglomeratov lakoze so sprejemljive za direktno stiskanje. Kompresibilnost, določena z Walkerjevo analizo, in kompaktibilnost, določena s kompaktibilnostnim profilom, sferičnih aglomeratov lakoze sta izrazito večji kot pri komercialno dostopnih laktozah za direktno stiskanje. Pokazali smo pozitivno korelacijo med kompresibilnostjo in kompaktibilnostjo. Pridobljeni sferični aglomerati lakoze imajo zaradi porozne strukture potencial za preprečevanje segregacije v zmeseh za stiskanje.

Spherical Crystallization of Lactose

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

In the recent period much attention has been devoted to engineering of pharmaceutical particles in order to overcome the present challenges in the formulation of solid dosage forms. This involves formation of particles with defined morphology, particle size distribution and composition to improve flow and compression properties. In the experimental work we produced porous spherical agglomerates of α -lactose monohydrate in the spherical crystallization process. Furthermore, we examined the influence of temperature, speed of mixing and initial concentration of lactose in aqueous solution on the process and prepared agglomerates. We evaluated various physicochemical and mechanical properties of selected series of spherically crystallized lactose agglomerates and compared them with some commercially available types of α -lactose monohydrate for direct compression. Temperature had an effect on agglomerate morphology as well as on their size and process yield. With increasing mixing speed the agglomerate size was reduced and with increasing initial concentration of aqueous lactose solution the process yield was higher and the agglomerates were larger in size. The flow properties of spherical agglomerates of lactose were satisfactory for direct compression. Compressibility, established with the Walker analysis, and compactibility, established with the compactibility profile, were distinctly higher in comparison with commercially available lactose types for direct compression. We demonstrated a positive correlation between compressibility and compactibility. The obtained spherical agglomerates of lactose have potential to prevent segregation in tabletting blends due to porous structure.

Sinteza novih pirazolovih analogov histamina na osnovi 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-c]pirimidina

KLARA LOMBAR, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Jurij Svetec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V magistrskem delu smo po dveh različnih sinteznih poteh pripravili knjižnico 18 bicikličnih karboksamidov kot novih predstavnikov histaminskih analogov. Sintezno pot smo začeli z N-benzilnim in z N-nesubstituiranim Boc-β-alaninom, ki smo ju prek Masamune-Claisenove kondenzacije s kalijevim monobenzil malonatom pretvorili v ustrezna Boc-zaščitena β-keto estra. Dobljena benzilna estra smo z enaminiranjem in nadaljnjo heterociklizacijo s hidrazin hidrokloridom pretvorili v Boc-zaščitena 5-(aminoethyl)pirazol-4-karboksilata. Z acidolitsko odstranitvijo Boc-zaščitne skupine smo pripravili prosta 5-(aminoethyl)pirazol-4-karboksilata dihidroklorida, ki smo ju nato s ciklizacijo z 1,1'-karbonyldiimidazolom pretvorili v N(6)-benzil- in N(6)-nesubstituiran tetrahydropirazolo[1,5-c]pirimidin-3-karboksilat. Slednjega smo alkilirali z benzil bromidom in metil jodidom ter tako prišli do N(6)-benziliranega in N(6)-metiliranega tetrahydropirazolo[1,5-c]pirimidin-3-karboksilata. Nastalima estroma smo s katalitskim hidrogeniranjem odstranili benzilno skupino in tako dobljeni karboksilni kislini z amidiranjem pretvorili v končne produkte, 6-alkil-7-okso-4,5,6,7-tetrahydropirazolo[1,5-c]pirimidin-3-karboksamide. Strukture vseh sintetiziranih spojin smo določili z NMR-spektroskopijo.

Synthesis of New Pyrazole Analogues of Histamine Based on 4,5,6,7-Tetrahydropyrazolo[1,5-c]pyrimidine

KLARA LOMBAR, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Jurij Svetec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In this work, two synthetic methods for the synthesis of a library of 18 bicyclic carboxamides as novel histamine analogues were developed. The synthesis started with Masamune-Claisen condensation of N-benzyl and N-unsubstituted Boc-β-alanine with potassium monobenzyl malonate to give the corresponding Boc-protected β-keto esters. Enamination and further heterocyclization with hydrazine hydrochloride led to the Boc-protected 5-(aminoethyl)pyrazole-4-carboxylates. Acidolytic removal of the Boc protecting group gave free 5-(aminoethyl)pyrazole-4-carboxylates dihydrochlorides, which were then cyclized with 1,1'-carbonyldiimidazole to give N(6)-benzyl and N(6)-unsubstituted tetrahydropyrazolo[1,5-c]pyrimidine-3-carboxylate. N(6)-unsubstituted benzyl ester was subsequently alkylated with benzyl bromide and methyl iodide to give the corresponding N(6)-benzylated and N(6)-methylated tetrahydropyrazolo[1,5-c]pyrimidine-3-carboxylate. Hydrogenolytic removal of the benzyl group led to the corresponding carboxylic acids, which were then amidated into the final products, 6-alkyl-7-oxo-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-c]pyrimidine-3-carboxamides. The structures of all compounds were determined by NMR spectroscopy.

Povečevanje topnosti in hitrosti raztopljanja karvedilola z elektrostatskim sukanjem

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

Majhna topnost in majhna hitrost raztopljanja zdravilnih učinkovin sta veliki težavi, s katerima se srečuje farmacevtska industrija, zato veliko časa nameni razvoju in optimizaciji metod, ki bi izboljšale topnost in hitrost raztopljanja takšnih učinkovin. Ena od metod je vgrajevanje težko topnih učinkovin v nanovlakna. Namen magistrskega dela je bil povečati topnost in hitrost raztopljanja karvedilola, ki je v vodi skoraj netopna lipofilna zdravilna učinkovina, z njegovo vgradnjo v polimerna nanovlakna iz polietilenoksida in poloxamera 407. Nanovlakna smo izdelali z metodo elektrostatskega sukanja. Ugotovili smo, da poloxamer 407 poveča topnost karvedilola v vodi, najverjetneje z mehanizmom solubilizacije. Topnost karvedilola je bila v raztopini s 3 % (m/m) poloxameru 407 približno 10-krat večja od topnosti učinkovine v prečiščeni vodi. Hitrost sproščanja karvedilola iz nanovlaken je bila večja kot hitrost sproščanja karvedilola iz filmov z enako sestavo in iz fizikalne zmesi polimerov in karvedilola. Večja hitrost sproščanja učinkovine iz nanovlaken je bila verjetno posledica neposrednega stika učinkovine s polimeroma, velike površine in poroznosti nanovlaken ter pretvorbe dela karvedilola iz kristalne oblike v amorfno. Z raziskovalnim delom smo pokazali, da nanovlakna iz polietilenoksida in poloxamera 407 predstavljajo sodoben in obetaven način povečevanja topnosti in hitrosti raztopljanja težko topnih učinkovin.

Carvedilol Solubility and Dissolution Rate Improvement by Electrospinning

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

Low solubility and low dissolution rates of drugs pose great challenges to the pharmaceutical industry; therefore, a lot of time is devoted to the development and optimization of methods that would improve the solubility and the dissolution rate of poorly soluble drugs. One of these methods is their incorporation into nanofibres. The aim of this master thesis study was to increase the solubility and dissolution rate of carvedilol, which is a practically insoluble lipophilic drug, via its incorporation into polymer nanofibres of polyethylene oxide and poloxamer 407. Nanofibres were produced by electrospinning. Poloxamer 407 increased the solubility of carvedilol in water, most likely due to solubilization. The solubility of carvedilol in 3% (m/m) poloxamer 407 solution was ~10 times higher than the solubility of the drug in purified water. The rate of carvedilol release from the nanofibres was higher compared to its release from the films, with identical composition, and from the physical mixture of polymers and carvedilol. The faster drug release from the nanofibers was most likely due to the direct contact of the drug with polymers, the large surface area and porosity of the nanofibres and the partial conversion of carvedilol from crystalline to amorphous form. With our research we have shown that nanofibres from polyethylene oxide and poloxamer 407 provide a modern and promising approach in increasing the solubility and dissolution rate of poorly soluble drugs.

Opredelitev zgradbe in delovanja mutanta listeriolizina O Y406A

SAŠA REZELJ, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Gregor Anderluh, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: Marjetka Podobnik, Kemijski inštitut Ljubljana

Listeriolizin O (LLO) je najbolj pomemben virulenčni dejavnik bakterije *Listeria monocytogenes*, povzročiteljice listerioze, ki se prenaša s hrano. LLO uvrščamo v družino od holesterola odvisnih citolizinov (CDC), proteinov, ki v membranah tarčnih celic tvorijo pore. Zaradi posebnih lastnosti je LLO izredno zanimiv za uporabo v farmaciji in medicini ter se danes že uporablja kot adjuvans cepivom. Pri našem delu smo pripravili mutanta LLO Y406A, pri katerem nam je z zamenjavo zgolj ene aminokisline uspelo ustvariti protein s pH-odvisno aktivnostjo. V heterolognem ekspresijskem sistemu smo s serijo biokemijskih in biofizikalnih metod pridobili in nato opredelili lastnosti mutanta LLO Y406A. Ugotovili smo, da mutacija verjetno vpliva na konformacijo proteina in s tem na lastnosti v raztopini. S testom hemolitične aktivnosti smo ugotovili, da je mutant sposoben tvorbe por samo v kislem pH, v čemer se razlikuje od divjega tipa LLO, ki je aktiven tudi v bazičnem okolju. Da se je LLO Y406A sposoben vezati v bazičnem okolju (kjer sicer ne tvori por) in da ga je možno naknadno aktivirati z nakisanjem okolja, smo neposredno dokazali s površinsko plazmonsko resonanco. Ravno zato, ker je aktivnost mutanta možno regulirati skoraj izključno s pH, je LLO Y406A izredno zanimiv za uporabo v farmacevtske in biotehnološke namene.

Structural and Functional Characterization of Listeriolysin O Mutant Y406A

SAŠA REZELJ, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Gregor Anderluh, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Marjetka Podobnik, National Institute of Chemistry Ljubljana

Listeriolysin O (LLO) is the most important virulence factor of the bacterium *Listeria monocytogenes*, which causes the foodborne disease listeriosis. LLO is a member of the protein family of cholesterol-dependent cytolsins (CDCs), which form transmembrane pores in target cells. LLO is very useful in pharmacy and medicine, where it is used as a vaccine adjuvant. We prepared the LLO mutant Y406A with a special pH-sensitive activity by replacing only one amino acid. The protein was produced in a heterologous expression system and characterized using various biochemical and biophysical methods. We discovered that the mutation probably affected the conformation of the protein and thus its behavior in solution. A test of hemolytic activity showed that LLO Y406A can only form pores at an acidic pH, in contrast with the wild type LLO which is also active in alkaline environment. We showed by surface plasmon resonance that, if LLO Y406A is bound to membranes at an alkaline pH, when its pore formation is inhibited, its pore forming activity can be restored upon acidification of the solution. This unique feature that allows pH regulation of the protein activity makes the LLO mutant Y406A very appealing for pharmaceutical and biotechnological applications.

Določanje struktur apo in holo oblik CaM-domene α-aktinina 1 z jedrsko magnetno resonanco

URŠKA SLAPŠAK, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Janez Plavec, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: Kristina Djinović Carugo, Laboratoriji Maxa F. Perutza, Univerza na Dunaju

Protein α-aktinin 1 spada v spektrinsko naddružino proteinov, veže aktin in med seboj povezuje aktinske filamente. α-aktinin 1 je nemšična izoblika, njegovo delovanje je odvisno od prisotnosti/odsotnosti kalcijevih ionov (Ca^{2+}). Na N-koncu α-aktinina 1 je aktin vezavna domena, sestavljena iz dveh kalponinu homolognih domen CH1 in CH2. Prek peptidnega vratu je povezana s štirimi spektrinskimi ponovitvami, ki se na C-koncu zaključijo s kalmodulinu podobno (CaM) domeno. α-aktinin 1 je funkcionalen le kot antiparalelni dimer. CaM-domena je sestavljena iz štirih motivov EF-rok in ima štiri potencialna vezavna mesta za ione Ca^{2+} . Motivi EF-roke so zgrajeni iz strukturnega motiva vijačnica-zanka-vijačnica, znotraj katerega se kelira ion Ca^{2+} , in se nahajajo v parih. Za proteine z motivom EF-roke je značilno, da vezava ionov Ca^{2+} povzroči strukturne spremembe iz zaprte konformacije v odprto, te spremembe pa omogočijo interakcije z različnimi tarčnimi molekulami. Z NMR-spektroskopijo smo določili strukturi apo in holo oblik CaM-domene α-aktinina 1, ki je bila označena z izotopoma ^{13}C in ^{15}N . Z 800-megaherčnim NMR-VNMRS-spektrometrom smo posneli večdimensionalne heterojedrne spektre, ki smo jih potrebovali za določitev prostorskih struktur apo in holo oblik CaM-domene α-aktinina 1. Primerjava struktur apo in holo oblik CaM-domene α-aktinina 1 omogoča vpogled v delovanje in regulacijo α-aktinina 1.

Structure Determination of the Apo and Holo Forms of the CaM Domain of α-actinin 1 by NMR Spectroscopy

URŠKA SLAPŠAK, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Janez Plavec, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Kristina Djinović Carugo, Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna

The cytoskeletal actin-binding protein α-actinin 1 is a member of the spectrin superfamily and cross-links actin filaments. α-actinin 1 is a non-muscle cytoskeletal (calcium-sensitive) isoform. α-actinin 1 is composed of an N-terminal actin-binding domain that is linked through the neck peptide and followed by four spectrin repeats and a C-terminal calmodulin-like (CaM) domain. It is a functional antiparallel dimer. The CaM-like domain of α-actinin 1 has four EF-hand motives that can bind up to four calcium (Ca^{2+}) ions. Calcium signaling is mostly regulated by EF-hand proteins, characterized by a helix-loop-helix motif paired in functional domains. It is believed that calcium binding triggers a major conformational change of the CaM-like domain of α-actinin 1 from a closed into an open state. In this way, the protein is able to interact with different target partners, depending on its calcium binding state. The triple resonance (^1H , ^{13}C and ^{15}N) NMR experiments were performed with an 800 MHz NMR VNMRS spectrometer in order to gain high-resolution structures of the apo and holo forms of the CaM domain of the α-actinin 1. We have determined NMR solution state structures of both forms that were labelled with ^{13}C and ^{15}N isotopes. A comparison of the apo and holo forms of the CaM domain will provide insight into the conformational rearrangements and will offer new clues on the regulation of α-actinin 1.

Sovražnik mojega sovražnika je moj prijatelj – opis, priprava in učinkovitost bakteriofaga PC14, specifičnega za *Campylobacter jejuni*

JERCA KRISTAN, TJAŠA KITANOVSKI, Gimnazija Novo mesto

Mentorja: Matjaž Peterka, Eva Zaletel, Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolu

Somentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

Bakterijska vrsta *C. jejuni* je najpogostešji povzročitelj okužb s hrano v razvitem svetu. Povečanje števila okužb in odpornosti proti antibiotikom narekuje razvoj novih metod za zmanjševanje kontaminacije s temi bakterijami. Ena od metod je uporaba bakteriofagov. Dokazano je že, da jih lahko uspešno uporabimo za zmanjševanje kontaminacije z bakterijo *C. jejuni* v piščančjem črevesju. Vendar to zahteva poznavanje lastnosti bakteriofagov ter varnosti in značilnosti interakcije z gostiteljem. V nalogi smo namnožili bakteriofag PC14, ki je specifičen za bakterijsko vrsto *C. jejuni*, ter s preverjanjem njegovega litičnega spektra ugotovili, da okuži predvsem seve *C. jejuni* človeškega izvora. Bakteriofag PC14 smo v proizvodnem postopku očistili in inkapsulirali ter preverili učinkovitost delovanja na bakterijo *C. jejuni* v celičnem modelu Caco-2. Izračunali smo izkoristek proizvodnega postopka in postopka inkapsulacije. V celičnem modelu Caco-2 je bakteriofag PC14 zmanjšal število bakterij *C. jejuni*, pri čemer je bil prosti bakteriofag bolj učinkovit od inkapsuliranega.

The Enemy of My Enemy is My Friend – Description, Cultivation and Efficacy of *Campylobacter jejuni* Bacteriophage PC14

JERCA KRISTAN, TJAŠA KITANOVSKI, Novo mesto Grammar School

Supervisors: Matjaž Peterka, Eva Zaletel, Center of Excellence for Biosensors, Instrumentation and Process

Co-supervisor: Janja Pust, Novo mesto Grammar School

Bacterial species *Campylobacter jejuni* is the most common cause of gastrointestinal infections in developed countries. An increasing number of infections and an elevated level of resistance triggered a search for new antimicrobial strategies to control contamination with these bacteria and among them also bacteriophages. They have been proven to decrease the number of campylobacters in chickens. Bacteriophages used as antimicrobial agents have to be characterized in terms of identity and safety, including interaction with its host. Here, we propagated *C. jejuni* bacteriophage PC14. After purification we encapsulated it and calculated the yield through the production process. Through PC14 host range we discovered that they mostly lyse *C. jejuni* of human cells origin. We found that bacteriophage PC14 decreased the number of *C. jejuni* in the Caco-2 cell line model with free bacteriophage being more efficient than the encapsulated one.

Dva obraza pekoče paprike

NIKOLA RAKIĆ, II. gimnazija Maribor

Mentorka: Katja Holnhaner Zorec, II. gimnazija Maribor

Somentorka: Helena Rihtar, II. gimnazija Maribor

Pekoče paprike sintetizirajo snov capsaicin, ki je odgovorna za njihov pekoči okus. Mnoge raziskave so potrdile protimikrobní učinek kapsaicina, zaradi katerega bi ga lahko uporabljali kot konzervans. Po drugi strani so precej kontroverzna mnenja o njegovi mutagenosti. V raziskovalni nalogi smo proučevali toksični in genotoksični učinek etanolnega ekstrakta pekoče paprike na celice koreninskega vršička čebule vrste *Allium cepa L.*, protimikrobní učinek etanolnih ekstraktov različnih vrst pekočih paprik na različne mikroorganizme (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*), kvasovke iz mošta in mikroorganizme iz zraka ter vpliv na razvoj biofilmov bakterije *B. cereus* in kvasovk iz mošta. Čebulni test je pokazal nižjo raven toksičnosti in genotoksičnosti etanolnega ekstrakta pekoče paprike, ekstrakti vseh pekočih paprik pa so delovali protimikrobnò na vse preizkušene mikroorganizme, razen na *E. coli* in plesni. Najmočneje so zavirali razvoj bakterije *B. cereus*, negativno pa so vplivali na razvoj biofilmov bakterij in gliv.

The Two Faces of Hot Peppers

NIKOLA RAKIĆ, Maribor Second Grammar School,

Supervisor: Katja Holnhaner Zorec, Maribor Second Grammar School

Co-supervisor: Helena Rihtar, Maribor Second Grammar School

Hot peppers synthesize capsaicin, which is to be held responsible for the burning sensation. A plethora of research has confirmed that it inhibits the growth of microbes and due to this fact it can be used as a preservative. However there has been controversy regarding its mutagenic properties. In this research we have been studying the following: the toxic and genotoxic effect of the ethanol extract from hot peppers on the cells from the apical meristem of the onion *Allium cepa L.*, the antimicrobial effect of the ethanol extract from different sorts of hot peppers on different microorganisms; *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, yeasts from must and microorganisms from the air, the impact on the development of biofilms from bacteria *B. cereus* and yeasts from must. The allium test has shown lower levels of toxicity and genotoxicity of the ethanol extract from the hot peppers. The extracts from all hot peppers have had an antimicrobial impact on all tested microorganisms, with the exception of *E. coli* and mold. The development that was hindered the most was that from bacteria *B. cereus* and furthermore a negative effect could be seen when observing the development of bacterial biofilms and fungi.

Vpliv koncentracije AgNO₃ in načina sinteze na velikost srebrovih nanodelcev, njihovo protimikrobnno učinkovitost in uspešnost vključitve v hidrogel

SEBESTJAN PLUŠČEC, II. gimnazija Maribor

Mentorica: Zdenka Keuc, II. gimnazija Maribor

Somentorica: Helena Rihtar, II. gimnazija Maribor

V raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv koncentracije in načina sinteze (vpliv različnih reducentov) na velikost srebrovih (Ag) nanodelcev, njihovo obliko, protimikrobnno učinkovitost in možnost vključitve v dve vrsti hidrogelov (poliakrilat in polialginat) z namenom, da tovrstni hidrogeli pridobijo novo lastnost, to je protimikrobnno učinkovitost. Uporabili smo dva reducenta, in sicer NaBH₄ ter ekstrakt žajblja (*Salvia officinalis L.*). Nanodelci in hidrogeli so bili analizirani z UV-VIS-spektrofotometrijo ter TEM- in XRD-analizo. Protimikrobnno učinkovitost smo preverjali z metodo difuzije na trdem gojišču z diskami in s poskusom zaviranja rasti mikroorganizmov v 6,7-odstotni raztopini cvetličnega medu. Ugotovili smo, da v pogojih laboratorijske sinteze pri vseh koncentracijah AgNO₃, ki so večje ali enake 10 mM, prihaja do spontane in hitre aglomeracije. Najbolj primerne so bile koncentracije od 1 mM do 5 mM AgNO₃, pri katerih smo sintetizirali sferične oblike AgND v velikostnem razredu od 1 do 30 nm. Za stabilizacijo raztopin smo uporabili PVP. Ugotovili smo, da velikost nanodelcev ni bila linearno odvisna od koncentracije AgNO₃, ampak je z naraščanjem koncentracije eksponentno rastla. Oblika nanodelcev je v nasprotju z velikostjo kazala bolj linearen trend, saj se je s povečevanjem koncentracije AgNO₃ manjšalo število sferičnih in večalo število triangularnih oblik Ag-nanodelcev. Manjši nanodelci so kazali večjo protimikrobnno učinkovitost. Metoda sinteze hidrogela z vključenimi nanodelci, ki se reducirajo v hidrogelu, se je pokazala kot najbolj primerena metoda vključevanja AgND. Uporabili smo dva hidrogela – poliakrilatnega ter sinteznega poliakrilatnega. Za vključitev AgND se je kot primernejši pokazal poliakrilatni, ki je zaradi svoje strukture sposoren zadržati tudi zelo majhne delce AgND. Proučevanje protimikrobnne učinkovitosti hidrogelov z vključenimi AgND potrjuje hipotezo, da poliakrilatni hidrogeli z vključenimi AgND delujejo protimikrobeno.

The Effect of AgNO₃ Concentration and Synthesis on the Size of Silver Nanoparticles, Their Antimicrobial Activity and Effectiveness of Incorporation in the Hydrogel

SEBESTJAN PLUŠČEC, Maribor Second Grammar School,

Supervisor: Zdenka Keuc, Maribor Second Grammar School

Co-supervisor: Helena Rihtar, Maribor Second Grammar School

With the help of modern analytical methods such as TEM, XRD and UV-VIS spectroscopy it has been found that a very low concentration of AgNO₃ (1 mM) used in this investigation can be very effective since it allows the production of AgNPs in magnitude of about 3 nm; AgNPs produced have a perfect spherical shape and antimicrobial activity. Reduction is possible with NaBH₄ or plant extract with a high amount of antioxidants (e.g. sage extract). Prevention of agglomeration was done by PVP. Several methods of AgNP installation have been investigated. We found that the best method is the one where the reduction of silver ions occurs in the hydrogel. The method was successful only with a polyacrylate gel which forms a strong cross-linked polymer. An incorporation of AgNPs in polyacrylate has been successful because they were not removed from the gel. With the use of 6.7% honey solution, it has been found that polyacrylate gel with AgNPs also has antimicrobial properties, which makes it suitable for use in disposable diapers because it reduces the possibility of inflammation.

Odpornost bakterije *Salmonella infantis* proti antibiotikom v slovenski perutninski proizvodnji

ULA ANA LEBAN, IRIS ZAJC, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorica: Majda Golob, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Irena Štrumbelj Drusany, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

V zadnjih desetletjih se je z razvojem novih antibiotikov njihova uporaba v humani in veterinarski medicini močno povečala, kar je olajšalo zdravljenje različnih bakterijskih okužb ljudi in živali. Vendar pa je dolgotrajna in pogosto nekritična uporaba antibiotikov privedla do razvoja pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov. Odporni sevi se pojavljajo pri različnih rodovih bakterij in proti različnim skupinam antibiotikov. Posebej velik problem predstavljajo večkratno odporne bakterije (MDRB), med katere uvrščamo tudi *Salmonella infantis*. V raziskavi smo glede odpornosti proti različnim antibiotikom z mikrodilucijsko metodo testirali serovare *S. infantis*, pridobljene iz vzorcev okolja znotraj in zunaj perutninskega hleva pri enem od nosilcev perutninske dejavnosti. Naš namen je bil določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za 14 antibiotikov iz devetih različnih skupin ter s tem ugotoviti vzorce odpornosti proti protimikrobnim zdravilom znotraj ene epizootiološke enote. Največji delež odpornosti smo ugotovili v skupinah kinolonov oz. fluorokinolonov, sulfonamidov in tetraciklinov (100 %).

Antibiotic Resistance of Bacteria *Salmonella infantis* in Slovenian Poultry Production

ULA ANA LEBAN, IRIS ZAJC, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: Majda Golob, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: Irena Štrumbelj Drusany, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

With the development of many new antibiotics, their use in the human and veterinary medicine increased significantly in the last decades, which greatly facilitated the treatment of various bacterial infections in humans and animals. However, the lasting and often uncritical use of antibiotics has led to an increased selective pressure on the infectious agents and, consequently, on the development of acquired bacterial resistance to different groups of antimicrobials. One of the biggest problems is the multidrug resistant bacteria (MDRB), which comprise also some serovars of salmonellas, including *Salmonella infantis*. In our study, *S. infantis* strains from the inside and outside environment of the poultry house from one of the poultry holders were susceptibility-tested using a microdilution method to determine the minimal inhibitory concentration for 14 antibiotics from nine various groups. The aim of our study was to determine the antimicrobial resistance patterns within a single epizootiological unit. The highest proportion of resistance was detected in quinolones/fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines (100%).

Načrtovanje umetnih genskih omrežij

ANA MILOVANOVIĆ, ANA HALUŽAN VASLE, *I. gimnazija v Celju*

Mentorica: **Tina Lebar**, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Somentorica: **Mojca Alif**, *I. gimnazija v Celju*

Celice prepoznavajo signale, ki se prenašajo prek proteinov, imenovanih transkripcijski faktorji – ti nadzorujejo izražanje genov. Z vnosom genov za transkripcijske faktorje lahko obnašanje celice spremenimo tako, da se odzove na določen način, ter s tem ustvarjamo umetna genska omrežja. Modularne DNK-vezavne proteine lahko načrtujemo za vezavo na katerokoli zaporedje DNK in tako pripravimo različne proteine s podobnimi lastnostmi v skoraj neomejenem številu, kar omogoča načrtovanje kompleksnih genskih omrežij. Do danes so bili v uporabi TAL-efektorji, katerih sinteza je zaradi velikosti draga in počasna, vstavljanje več proteinov v celico pa pomeni metabolno obremenitev. Kot alternativo smo preizkusili sistem CRISPR/Cas, ki deluje prek vezave sgRNA na DNK. Dokazali smo, da so sistem CRISPR/Cas in TAL-efektorji po specifičnosti in učinkovitosti primerljivi, v isti celici pa sgRNA za tarčno ciljanje več vezavnih mest hkrati med seboj ne interagirajo. Rezultati kažejo, da je sistem CRISPR/Cas potencialno uporaben za sestavljanje kompleksnih umetnih genskih omrežij. Ta predstavljajo nove možnosti za usmerjeno celično terapijo, razvoj biosenzorjev za diagnostične in okoljske aplikacije ter uporabo v metabolnem inženiringu. Uporaba sistema CRISPR/Cas bi omogočila zmanjšanje metabolne obremenitve, učinkovitejšo optimizacijo, uporabo več regulatornih elementov hkrati ter tudi cenejše in hitrejše sestavljanje kompleksnih sistemov.

Designing Synthetic Gene Regulatory Networks

ANA MILOVANOVIĆ, ANA HALUŽAN VASLE, *Celje First Grammar School*

Supervisor: **Tina Lebar**, *National Institute of Chemistry Ljubljana*

Co-supervisor: **Mojca Alif**, *Celje First Grammar School*

Cells recognise various signals, transferred through proteins called transcription factors, which regulate gene expression. Artificial insertion of transcription factor genes can alter the behaviour of a cell for a specific response and can be used to create synthetic gene regulatory networks. Modular DNA binding proteins can be designed to bind to virtually any DNA sequence and prepare different proteins with similar properties in an almost indefinite number, enabling easier design of complex genetic networks. For this, TAL effectors have been used, but their main disadvantage are high expenses and slow synthesis due to size, while insertion of a vast number of large proteins into cells can be a metabolic burden. We tested CRISPR/Cas system as an alternative solution. The system works through specific binding of sgRNA to target DNA sequence. The comparison of specificity and efficiency of CRISPR/Cas system with TAL effectors resulted in great similarity. Using sgRNA in a single cell for targeting multiple binding sites showed that sgRNA do not interact with each other and that we can use them for assembly of complex synthetic systems. Results demonstrate that CRISPR/Cas system could potentially be used to construct synthetic gene regulatory networks. Such networks could provide new options for cell therapy, development of biosensors for diagnostic and environmental applications and for the use in metabolic engineering. The use of CRISPR/Cas system could decrease the metabolic burden of engineered cells, which would result in more efficient optimisation and use of a broad number of regulatory elements in a single cell. In addition, it would provide for a faster and cheaper assembly of complex biological systems.

Priprava in lastnosti ekstraktov biološko aktivnih učinkovin šentjanževke, *Hypericum perforatum* L.

ŽAN ZEMLJIČ, II. gimnazija Maribor

Mentor: Marko Jeran, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Sanja Cvar, II. gimnazija Maribor

Številne študije potrjujejo antidepresivno, antivirulentno, protibakterijsko in protitumorsko delovanje ekstraktov šentjanževke (*Hypericum perforatum* L.). Razvijali smo optimalni sistem za učinkovito ekstrakcijo po Soxhletu, ki bo služila za izolacijo hipericina kot glavne bioaktivne komponente iz posušenih cvetov in listov šentjanževke. Z metodo difuzijskih antibiogramov na vidni svetlobi smo raziskovali protimikrobní učinek etanolnih ekstraktov na po Gramu pozitivne (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) in po Gramu negativne bakterije (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*). Kot najbolj optimalna se je pokazala ekstrakcija iz posušenih cvetov v etanolu, med 15 in 20 ekstrakcijskimi cikli. Vsebnost hipericina v etanolnih ekstraktih cvetov je bila približno 4-krat večja kot v listih. Rezultati biološke aktivnosti v teh pogojih v nasprotju z nekaterimi študijami niso pokazali protimikrobní aktivnosti.

Preparation and Properties of Extracts of Bioactive Substances from St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)

ŽAN ZEMLJIČ, Maribor Second Grammar School

Supervisor: Marko Jeran, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Sanja Cvar, Maribor Second Grammar School

There is a growing demand for the medical plant *Hypericum perforatum* L. as it has been shown to possess various biological activities such as antidepressant, antiviral, antitumor, antioxidant and antibacterial effects. The aim of the experimental work was to develop the most optimum and efficient extraction procedure for the production of hypericin, a main bioactive compound, from dried flowers and leaves. With disk diffusion assay the antibacterial activity of ethanolic extracts on gram positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) and gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) under the presence and absence of visible light was investigated. The results indicate that the best solvent for the effective extraction of hypericin is ethanol and that the hypericin content in extracts is decreasing with decreased solvent polarity. The content of hypericin per dry plant mass is significantly higher in flowers in comparison with leaves (4 times), but it was not even detected in the roots. The most optimum number of extraction cycles was found to be somewhere between 15 and 20 cycles. Contrary to some studies, results of disk diffusion assays did not show any signs of antibacterial activity in any of the tested samples of gram positive nor gram negative bacteria.

Prevalenca metljavosti in zatiranje metljavosti pri govedu v severovzhodni Sloveniji

ANDREJA KAMENIK, PATRICIJA ŠTAINER, Biotehniška šola Maribor

Mentor: Andrej Toplak, Biotehniška šola Maribor

Somentor: Jože Matavž, Veterinarska postaja Gornja Radgona

Namen raziskovalne naloge je bil predvsem proučiti prevalenco metljavosti in učinek tretiranja goveda proti malemu in velikemu metljaju. Cilj raziskovalne naloge je bil tudi proučiti epizootiološko situacijo metljavosti v severovzhodni Sloveniji. Raziskovalno delo je temeljilo na pregledu literature, klinični diagnostiki, laboratorijskem delu in anketiranju rejcev goveda, da bi tako pridobili natančno čredno anamnezo. Z anketiranjem rejcev goveda sva žeeli spoznati tudi njihovo poznavanje problematike metljavosti in soočanje z njo. V sklopu klinične diagnostike so bili na obravnavanih kmetijah opravljeni klinični pregledi živali in odvzeti vzorci blata za koprološke preiskave. Začetna kvalitativna diagnostika metljavosti je bila opravljena na desetih kmetijah. V vseh desetih rejah so bila pri koproloških preiskavah v vzorcih iztrebkov ugotovljena jajčeca metljajev. Za nadaljnje raziskovalno delo smo izbrali štiri kmetije, na treh smo živali tretirali z antiparazitiki, ena pa je bila kontrolna. Na vseh treh kmetijah smo pri tretiranih živalih ugotovili veliko zmanjšanje števila jajčec v pregledanih vzorcih blata. S pomočjo rezultatov pregleda organov na klavni liniji smo ugotovili, da je bila od leta 2012 metljavost ugotovljena pri 2,5–3,9 % zaklanega goveda. Rezultati so predstavljeni v grafih in tabelah.

Prevalence and Treatment of Fluke Infections in Cattle in Northeastern Slovenia

ANDREJA KAMENIK, PATRICIJA ŠTAINER, Biotechnical School Maribor

Supervisor: Andrej Toplak, Biotechnical School Maribor

Co-supervisor: Jože Matavž, Veterinary Station Gornja Radgona

The main aim of this study was to highlight the prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis in cattle in Northeastern Slovenia and the effect of antiparasitic treatment. Our goal was also to determine the epizootiological situation regarding fluke infections in cattle in Northeastern Slovenia. For this purpose we have studied the literature on this topic and carried out clinical and laboratory diagnostics. We have also prepared a questionnaire for cattle farmers to determine the herd anamnesis (rearing conditions, medical history, nutrition etc.). We were also interested in how the cattle farmers are dealing with problems caused by fluke infections. Basic qualitative coprological investigations were carried out on collective excrement samples from ten cattle farms. The parasitic eggs of liver flukes were found in all ten collective samples. For further investigation four cattle farms with the highest parasitic egg count were selected. Cattle on three selected farms was treated with antiparasitics. One farm was used as a control. The antiparasitic treatment markedly reduced the parasitic egg count. The prevalence of fluke infections in slaughtered cattle ranged between 2.5 and 3.9%. The results are presented in graphs and tables.

Protikoroziska zaščita in vrednotenje koroziskih procesov s »pametnimi« hibridnimi sol-gel prevlekami na železu in jeklu

SIMON ISKRA, NIKOLAJ CANELLARI, Gimnazija Novo mesto

Mentorja: Peter Rodič, Ingrid Milošev, Institut Jožef Stefan

Somentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

Korozija je težko zaznaven destruktivni kemijski proces, ki poteka na površini kovine oz. zlitine. Ker koroziski procesi močno uničijo material in lahko povzročijo veliko materialno škodo, smo raziskovali načine, kako material učinkovito zaščititi pred korozijo in kako korozijo zaznati, še preden bistveno uniči material. Sintetizirali smo ekološko sprejemljivo silansko prevleko, v katero smo vgradili indikatorja fenolftalein in kalijev heksacianidoferat $K_3[Fe(CN)_6]$, s katerima smo koroziske procese zaznali že v začetni stopnji. Tako smo sintetizirali novo »pametno« hibridno sol-gel prevleko, ki omogoča detekcijo korozije že v začetni stopnji in sanacijo ogroženih delov kovine, še preden nastane na materialu kakrsnakoli škoda. Takšne prevleke so pomemben korak v razvoju pametnih prevlek in so aplikativne v industriji, kjer bi jih lahko uporabili za zaščito jeklenih in železnih specializiranih aparatur ter jeklenih in železnih konstrukcij.

Corrosion Protection and Evaluation of Corrosion Processes on Iron and Steel

SIMON ISKRA, NIKOLAJ CANELLARI, Novo mesto Grammar School

Supervisors: Peter Rodič, Ingrid Milošev, Jozef Stefan Institute

Co-supervisor: Janja Pust, Novo mesto Grammar School

Corrosion is a destructive chemical process that occurs on the surface of metals and their alloys. Corrosion is difficult to detect and our aim was to research different possibilities of corrosion detection on metal surfaces. To protect the surface of the metals we synthesized a sol-gel coating that enhances the materials' protective properties. Because our aim was not only to protect the material but also to detect corrosion we designed a 'smart' hybrid coating that enables us to detect corrosion before it significantly damages the surface. Therefore, we installed two chemical compounds, phenolphthalein and potassium ferricyanide $K_3[Fe(CN)_6]$. We designed a smart hybrid sol-gel coating that not only protects the material but also enables the user to detect possible weak spots on the material and protect and repair the spots before significant damage could occur. Such coatings present an important step in the development of smart coatings suitable for different industrial applications.

Razvoj diagnostične metode za določanje Downovega sindroma iz krvi nosečnic

ROMANA VRANEŠIČ, VITO ŠUKLJE, PETER MATEK, *Srednja šola Črnomelj*

Mentor: Borut Štrukelj, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Somentor: Jernej Luzar, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Downov sindrom ali trisomija 21 je kromosomska motnja, pri kateri se v celicah človeka pojavi tretja kopija 21. kromosoma. Danes se za diagnosticiranje Downovega sindroma med nosečnostjo še vedno uporabljajo invazivne metode, njihova največja slabost pa je tveganje za sprožitev spontanega splava pri 1 do 2 % testiranih nosečnic. Odkritje zunajcelične fetalne DNA v materinem krvnem obtoku je ponudilo nove možnosti za razvoj neinvazivnih diagnostičnih metod, ki bi temeljile na odvzemu krvnega vzorca nosečnice. Fetalna DNA je na določenih regijah bolj metilirana od materine, kar lahko izkoristimo pri ločevanju ene od druge. Metoda, ki smo jo uporabili pri svojem laboratorijskem delu, temelji na uporabi zunajcelične fetalne DNA in izkorišča njeni visoko stopnjo metiliranosti. Metodo smo natančno proučili in jo prilagodili laboratorijski opremi, ki nam je bila na voljo na Fakulteti za farmacijo. Praktična uporaba metode je bila uspešna. Z njo smo določili vrednosti D dveh vzorcev. Vrednost D predstavlja mejo, ki ločuje pozitivne vzorce od negativnih. Izračun smo morali spremeniti, in sicer tako, da smo iz njega izvzeli problematično regijo EP7. Z modificiranim izračunom se je metoda pokazala za natančno, kar kaže na možnost njene diagnostične uporabe v praksi.

Development of Diagnostic Method for Determining Down Syndrome Based on Maternal Blood Sampling

ROMANA VRANEŠIČ, VITO ŠUKLJE, PETER MATEK, *Črnomelj Secondary School*

Supervisor: Borut Štrukelj, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Co-supervisor: Jernej Luzar, *Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana*

Down syndrome or Trisomy 21 is a chromosomal disorder caused by the presence of a third copy of chromosome 21 in human cells. Today, diagnosing Down syndrome during pregnancy is still performed using invasive methods. The greatest concern of these methods is the risk of causing a miscarriage in 1–2% of all tested pregnant women. The discovery of cell-free foetal DNA in maternal blood flow has offered new possibilities for the development of non-invasive diagnostic methods based on maternal blood sampling. The foetal DNA is more methylated than maternal DNA in certain regions, which can be used to separate one from another. The method which we applied in our laboratory work is based on using cell free foetal DNA and take advantage of its high level of methylation. We carefully examined the method and adapted it to the laboratory equipment, which was available at the Faculty of Pharmacy. Practical implementation of this method was performed successfully. We used the method to determine the D values of two samples. The D value represents the limit which separates the positive samples from the negative ones. We had to exclude the problematic region EP7 from the equation. The method with a modified equation proved to be accurate and precise, which shows potential for its practical use in diagnostics.

Izolacija disintegrinov iz strupa modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*) in ocena njihovega antimetastatskega potenciala

TEJA KOSMAČ, JULIJA KRIŽAJ, MAJA ŠUBIC, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Mentorja: Adrijana Leonardi, Toni Petan, Institut Jožef Stefan

Somentorica: Magdalena Kunc, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Modras (*Vipera ammodytes ammodytes*, Vaa) je najbolj strupena kača v Sloveniji. V njegovem strupu so prisotni proteini, imenovani disintegrini (Vaa-Dis), za katere je značilno, da se specifično vežejo na integrinske receptorje na celicah. Motnje v delovanju integrinov lahko med drugim vodijo do rakavih obolenj, zato so bili prepoznani kot pomembne tarče protitumorske terapije. Vaa-Dis v strupu zaradi vzpostavljanja specifičnih interakcij z integrini predstavlja skupino potencialnih antimetastatskih spojin. Odločili smo se, da bomo v raziskovalni nalogi preverili antimetastatski potencial Vaa-Dis. Najprej smo jih iz surovega kačjega strupa izolirali z gelsko izključitveno, ionsko izmenjevalno in visokotlačno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na obrnjenih fazah. S pripravljenim vzorcem smo izvedli poskuse na visokoinvazivnih celicah raka dojke. Najprej smo naredili test viabilnosti celic in v skladu z dobljenimi rezultati z uporabo testa celične rane preverili še antimetastatski potencial Vaa-Dis na celicah. Rezultati so pokazali, da Vaa-Dis uspešno upočasnujejo migracijo rakavih celic ter preprečujejo njihovo širjenje. To potrjuje njihov antimetastatski potencial, kar je dober obet za razvoj novega zdravila proti raku.

Isolation of Disintegrins from *Vipera ammodytes ammodytes* Venom and Assessment of Their Anti-metastatic Potential

TEJA KOSMAČ, JULIJA KRIŽAJ, MAJA ŠUBIC, Jurij Vega Idrija Grammar School

Supervisor: Adrijana Leonardi, Toni Petan, Jozef Stefan Institute

Co-supervisor: Magdalena Kunc, Jurij Vega Idrija Grammar School

The nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes* – Vaa) is the most venomous snake in Slovenia. Its venom contains proteins called disintegrins (Vaa-Dis) which interact specifically with integrin receptors that are present on the cells. Various dysfunctions of disintegrins may also result in cancer pathology, so they have been recognized as important targets of anti-tumour therapy. Because of certain interactions between Vaa-Dis and integrins, the Vaa-Dis represents a group of potential anti-metastatic substances. In our research, we decided to focus on the anti-metastatic potential of the Vaa-Dis. First, we purified these proteins from the raw Vaa venom using gel filtration, ion-exchange and high-pressure reversed-phase liquid chromatography. By using a purified sample we performed experiments on the highly-invasive cancer cells. First, we performed a cell viability test and based on these results, the anti-metastatic potential of Vaa-Dis was evaluated using a wound-healing assay. Our results indicated that Vaa-Dis efficiently prevent migration and thus the spreading of cancer cells. This confirms their anti-metastatic potential and provides a good prospective for their development in the direction of a new anti-cancer drug.

Metoda za hitro določanje koncentracije nitastih fagov: verižna reakcija s polimerazo v realnem času

NADJA ŠKAFAR, MAJA ŠPILAK, MATEJA ŽNIDARIČ, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorja: Miha Vodnik, Jasna Šlenc, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Marija Meznarič, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mikrobiološka titracija je enostavna, uveljavljena in občutljiva metoda za določanje koncentracije nitastih fagov. Vendar pa je zamudna in neprimerna, kadar imamo opraviti z velikim številom vzorcev, kot npr. pri delu s fagnim prikazom. Razvili smo metodo za določanje koncentracije fagov z verižno reakcijo s polimerazo. S specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki smo pomnožili odsek fagne DNA in z agarozno gelsko elektroforezo potrdili ustreznost njegove dolžine. Nato smo v bakterijah *E. coli* pomnožili in očistili fag M13 ter ga uporabili za izdelavo umeritvene krivulje z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). Ugotovili smo, da je linearno območje med 106 in 109 pfu/ml. Vzorce, ki so vsebovali različne koncentracije fagov, smo analizirali s qPCR in mikrobiološko titracijo ter ugotovili, da se vrednosti zelo dobro ujemajo pri velikih koncentracijah fagov. Pri majhnih koncentracijah pa je prišlo do odstopanj, pri čemer smo s qPCR izmerili večje koncentracije. Najverjetnejši vzrok odstopanj je kontaminacija osnovne zmesi s fagno DNA, ki smo jo zaznali v vseh negativnih kontrolah. Metoda qPCR je hitra in omogoča sočasno analizo velikega števila vzorcev. V določenih primerih je zato bolj primerna kot mikrobiološka titracija. Z obema metodama smo preverili tudi vzorce vode iz Ljubljane in Prekmurja. V nasprotju s pričakovanji v nobenem nismo zasledili nitastih fagov.

A Fast Method for Determining the Concentration of Filamentous Phages with the Polymerase Chain Reaction

NADJA ŠKAFAR, MAJA ŠPILAK, MATEJA ŽNIDARIČ, Franc Miklošič Grammar School Ljutomer

Supervisors: Miha Vodnik, Jasna Šlenc, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-Supervisor: Marija Meznarič, Franc Miklošič Grammar School Ljutomer

Microbiological titration (plaque assay) is a frequently used, simple and sensitive method for quantification of filamentous phages. However, it is time consuming and inappropriate for the analysis of a large number of samples, e.g. in phage display. We have developed a method for determining the concentration of phages with the polymerase chain reaction (PCR). A DNA fragment specific for filamentous phages was amplified and analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm its correct length. Phages M13 were amplified in *E. coli*, purified and used for construction of a calibration curve with real-time polymerase chain reaction in (qPCR). The linear range was found to be between 106 and 109 pfu/mL. Samples that contained different concentrations of phages were analyzed by qPCR and plaque assay. We found that the values match very well at high concentrations of phages. At lower concentrations, there have been deviations, where the qPCR measured higher concentrations. The most likely explanation is the contamination of master mixes with the phage DNA, which was detected in all negative controls. The qPCR method is fast and allows simultaneous analysis of many samples. In certain cases it is therefore more suitable than plaque assay. Both methods were used to analyze water samples from Ljubljana and Prekmurje, but contrary to expectations we have not found filamentous phages in any of them.

Biološka razgradnja hormonskih motilcev v pilotnih bioreaktorjih

TOMAŽ ŽIGON, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorica: Ester Heath, Institut Jožef Stefan

Somentorica: Irena Štrumbelj Drusany, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Hkrati z odpadno vodo izpuščamo v okolje tudi sledove zdravil in škropiv. Ob tem v okolje prehajajo tudi različne snovi, ki so zanj nevarne. Med njimi so tudi tako imenovani hormonski motilci. Če želimo preprečiti njihov izpust v okolje, moramo uporabiti posebne postopke čiščenja odpadnih vod. Najbolj je razširjeno biološko čiščenje odpadnih vod. V projektnem delu smo žeeli z znanimi biološkimi postopki iz odpadne vode odstraniti izbrane hormonske motilce (bisfenol A, parabene in triklosan), ki so bili dodani v umetno odpadno vodo. Odstranitev smo izvajali v pilotnih bioreaktorjih, ki simulirajo delovanje čistilnih naprav. Učinkovitost odstranitve izbranih hormonskih motilcev smo določili z analitskim postopkom, ki je vključeval ekstrakcijo na trdnem nosilcu, derivatizacijo in analizo s plinskim kromatogramom, sklopljenim z masnim spektrometrom. Med postopkom čiščenja so bili prav vsi izbrani hormonski motilci večinoma odstranjeni ($> 96,99\%$), a so bile njihove koncentracije v odpadni vodi še vedno dovolj velike, da so bile potencialno nevarne za okoljske organizme (v povprečju 612 ng/l). Delovanje bioreaktorjev ni bilo optimalno. Z njihovo optimizacijo in daljšim časom izpostavitve spojin mikroorganizmom (hidravlični zadrževalni čas) bi bilo učinek čiščenja možno povečati.

Biological Decomposition of Endocrine Disrupting Chemicals

TOMAŽ ŽIGON, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: Ester Heath, Jozef Stefan Institute

Co-supervisor: Irena Štrumbelj Drusany, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

As people dispose wastewater, traces of medicines and pesticides are released into the environment as well. Therefore hazardous compounds including endocrine disrupting chemicals (EDC) are released. To prevent this release, which is often the result of the use of medicines and pesticides, we should apply wastewater treatment, where conventional biological treatment is the most common. With the present project work we intended to completely remove the selected endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, parabenes and triclosan) from artificial wastewater to which they were added. Removal was performed in pilot bioreactors which simulate the operation of wastewater treatment plants. The efficiency of selected EDC removal in bioreactors was determined with an analytical procedure, which included the extraction with the solid-phase extraction, derivatisation and the analysis with gas chromatograph coupled to mass spectrometer. The results have shown that all of the selected endocrine disrupting chemicals were mostly removed ($> 96.99\%$) during the wastewater treatment in bioreactors, however their concentrations in wastewater were still sufficiently high to have potential toxic effects to environmental organisms (on average 612 ng/l). Bioreactor performance was not optimal. The efficiency of EDC removal may be improved with the optimization of pilot bioreactors and their longer exposure to microorganisms (hydraulic retention time).

Antibiotični učinki eteričnih olj na rast patogenih kožnih bakterij *Staphylococcus epidermidis*

PETRA KERN, ALJAŽ MULEJ, ANJA ŠIVIC, Biotehniški center Naklo
Mentorica: Marjetka Kastelic Švab, Biotehniški center Naklo

Številni mladostniki se vsak dan srečujejo z mozoljavostjo in aknavostjo, ki se zaradi spremenjenega ravnovesja hormonov v krvi pojavljata predvsem v puberteti. V raziskovalni nalogi smo žeeli te težave s kožo premagati z znanjem iz mikrobiologije. Ker pa se danes vse preveč zatekamo k proizvodnji in nakupu polsintetičnih in sintetičnih kemoterapeutikov, ki imajo enak ali vsaj podoben zdravilni učinek kot naravni antibiotiki, smo se odločili, da za zaviranje rasti bakterij, ki povzročajo mozoljavost, uporabimo naravna eterična olja. Z raziskovalno nalogo smo žeeli ugotoviti antibiotične učinke desetih izbranih eteričnih olj na rast patogene vrste kožnih bakterij *S. epidermidis*. Pri eksperimentalnem delu smo uporabili različne laboratorijske metode: od odvzema brisa, aseptične tehnike, priprave gojišč, izolacije in gojenja bakterijske kulture, tehnik zasejevanja in priprave čistih kultur, opisov bakterijskih kultur na različnih gojiščih, barvanja mikroskopskih preparatov bakterijskih razmazov in biokemijskih metod identifikacije bakterij do metode difuzijskega antibiograma za določanje občutljivosti bakterije za antibiotične snovi eteričnih olj. Z raziskavo smo dokazali, da sta v boju s povzročiteljem mozoljavosti, bakterijo *S. epidermidis*, najbolj učinkoviti eterični olji cimeta in timijana.

Antibiotic Effects of Essential Oils on Growth of Pathogen Skin Bacteria *Staphylococcus epidermidis*

PETRA KERN, ALJAŽ MULEJ, ANJA ŠIVIC, Biotechnical Centre Naklo
Supervisor: Marjetka Kastelic Švab, Biotechnical Centre Naklo

As teenagers we are confronted with pimples and acne on a daily basis. With our knowledge in microbiology we wanted to help ourselves and others with different skin problems. Today, we tend to overuse artificial substances which have the same or at least a similar effect to natural plant extracts. That is why we decided to use natural essential oils instead of artificial antibiotics. We researched several methods of determining the efficacy of antimicrobial agents (antibiograms). We learnt about the structure of essential oils and tested the techniques in laboratory. Besides researching the antimicrobial effect on the growth of bacterial culture (*Staphylococcus epidermidis*) we also focused on isolation and identification of certain species of bacteria. In our research, we used ten different kinds of essential oils. Our goal was to establish which of the used oils is the most efficient in preventing the growth of bacterial culture. Our research showed that the most efficient of the ten oils were the essential oils of cinnamon and thyme.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

66	Maja Antončič	88	Aljaž Mulej
67	Nastja Bašelj	73	Urša Nagode
18	Aljoša Bolje	57	Mitja Pišlar
51	Maša Bošnjak	78	Sebastijan Pluščec
83	Nikolaj Candellari	58	Barbara Pogorelčnik
68	Andrej Emanuel Cotman	59	Benjamin Prek
24	Katja Čerpnjak	60	Lara Prosen
30	Jana Erjavec	36	Maja Radivojša Matanović
52	Rok Gaber	77	Nikola Rakić
53	Jure Gujt	74	Saša Rezelj
80	Ana Halužan Vasle	61	Aleš Ručigaj
63	Simon Iskra	62	Maša Sinreich
82	Andreja Kamenik	63	Marko Slana
69	Jernej Kastelic	75	Urška Slapšak
88	Petra Kern	64	Rok Šibanc
76	Tjaša Kitanovski	88	Anja Šivic
54	Tanja Koleša Dobravc	86	Nadja Škafar
70	Nejc Koračin	86	Maja Špilak
85	Teja Kosmač	82	Patricija Štainer
76	Jerca Kristan	85	Maja Šubic
85	Julija Križaj	84	Vito Šuklje
71	Dejan Lamešić	42	Eva Tavčar Benković
79	Ula Ana Leban	65	Jure Vajs
55	Jasna Lojk	84	Romana Vranešič
72	Klara Lombar	79	Iris Zajc
50	Gregor Lorbek	81	Žan Zemljič
84	Peter Matek	87	Tomaž Žigon
80	Ana Milovanović	86	Mateja Žnidarič

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

62	Jerzy Adamski	73	Petra Kocbek
38	Pegi Ahlin Grabnar	65	Janez Košmrlj
80	Mojca Alif	61	Matjaž Krajnc
66	Marko Anderluh	44	Samo Kreft
74	Gregor Anderluh	85	Magdalena Kunc
66	Anna Bernardi	62	Tea Lanišnik Rizner
53	Marija Bešter Rogač	80	Tina Lebar
57	Marija Bogataj	85	Adrijana Leonardi
81	Sanja Cvar	84	Jernej Luzar
61	Zdenko Časar	82	Jože Matavž
59	Kristina Djinović Carugo	54	Anton Meden
64	Rok Dreu	86	Marija Meznarič
68	Rok Frlan	83	Ingrid Milošev
28	Mirjana Gašperlin	57	Aleš Mrhar
79	Majda Golob	69	Uroš Ocepek
70	Iztok Golobič	63	Vesna Pahor
38	Iztok Grabnar	55	Mojca Pavlin
87	Ester Heath	54	Franc Perdih
77	Katja Holnhaner Zorec	58	Andrej Perdih
44	Damjan Janeš	85	Toni Petan
52	Roman Jerala	76	Matjaž Peterka
81	Marko Jeran	70	Odon Planinšek
67	Boštjan Jerman	75	Janez Plavec
88	Marjetka Kastelic Švab	74	Marjetka Podobnik
78	Zdenka Keuc	67	Tomaž Požrl
68	Danijel Kikelj	83	Janja Pust

- 32| **Maja Ravnikar**
77, 78| **Helena Rihtar**
83| **Peter Rodič**
56| **Damjana Rozman**
60| **Gregor Serša**
63| **Marija Sollner Dolenc**
59| **Branko Stanovnik**
72| **Jurij Svete**
86| **Jasna Šlenc**
58| **Tomaž Šolmajer**
84| **Borut Štrukelj**
79, 87| **Irena Štrumbelj Drusany**
82| **Andrej Toplak**
86| **Miha Vodnik**
28, 69, 70| **Franc Vrečer**
76| **Eva Zaletel**

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, mag. Nina Bostič Bishop

Produkcija Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk PEAKPRINT, grafično središče d. o. o.

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

www.krkinenagrade.si