



46.

Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

46. Krkine nagrade | 46th Krka Prizes

26. simpozij

Zbornik povzetkov

Poslanstvo

Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

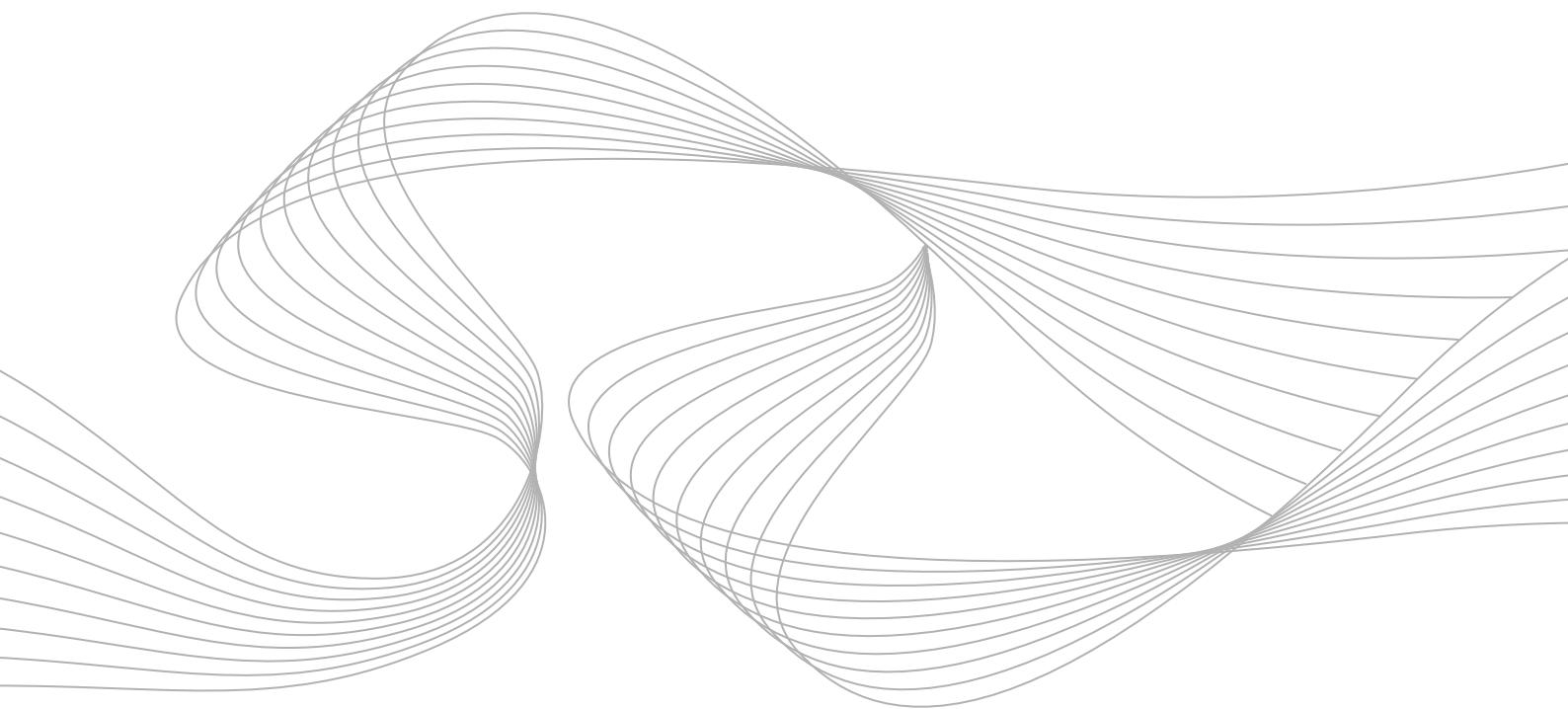
Spodbujamo mladostno zagnanost in stremljenje k odličnosti v raziskovalnem delu. Tlakujemo pot novim spoznanjem, ki bodo prispevala k novim izdelkom prihajajočih generacij.



46. Krkine nagrade
Z N A N O S T P O V E Z U J E .

26. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 14. oktober 2016



**Častni odbor
46. 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, mag. farm., 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. **Mihail Japelj**, častni predsednik

Znanstveni odbor

prof. dr. **Franc Vrečer**
doc. dr. **Aleš Gasparič**
dr. **Anita Mlakar**
Dušanka Oblak Božič
dr. **Leon Ščuka**
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

Teja Bašin, dr. Ana Bergant Simončič, dr. Jure Bezenšek, dr. Marko Bitenc, Tanja Blatnik, mag. Marko Boh, dr. Sergeja Bombek, dr. Blaž Brulc, dr. Nina Brvar, Nina Caglič, mag. Tatjana Cesar, mag. Lea Cvitkovič Maričič, dr. Irena Čarman, Luka Čičmir Vestič, dr. Katarina Dobrovoljc, doc. dr. Aleš Gasparič, mag. Alenka Glavač Povhe, dr. Ivan Gobec, Jana Golob, mag. Mojca Golob, Peter Hančič, dr. Žiga Hodnik, Jernej Hvala, mag. Miran Hvalec, Dušan Janežič, dr. Spela Jenko, dr. Boštjan Jerman, Saša Kajdič, Milena Kastelic, dr. Davor Kiđemet, Ksenija Kikelj, dr. Maja Kincl Skube, Nejc Koračin, Klemen Korasa, Primož Košir, mag. Helena Kotnik, 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. Brigita Lapornik, dr. Roman Lenaršič, mag. Denise Leskovar, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateovič Rojnik, dr. Lea Mauko, dr. Ana Medved, mag. Janja Medved, dr. Primož Meh, dr. Špela Miklič, dr. Anita Mlakar, mag. Tamara Nemeč, Dušanka Oblak Božič, dr. Renata Osolnik, mag. Vesna Pahor, mag. Andrej Paternost, dr. Matej Pavli, Mitja Pelko, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, dr. Miha Plevnik, mag. Marjeta Poznič Planinc, Aleša Primožič, mag. Ivan Radež, dr. Nataša Rebolj, dr. Tadej Recelj, Aleksander Rekič, dr. Matej Repič, Danijel Rojc, dr. Aleš Rotar, Miran Rudman, Miloš Ružič, Robert Sekereš, dr. Igor Simonič, Alenka Sitar Čurin, mag. Robert Skobe, Gordan Sladič, mag. Janika Slanc Vovk, dr. Elena Smirnova, dr. Janez Smodiš, dr. Polona Smrkolj, Matej Stergar, Tadej Stropnik, Katarina Svetičič Gobec, dr. Leon Ščuka, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Natalija Škrbina Zajc, dr. Jaroslav Tihi, dr. Elizabeta Tratar Pirc, dr. Katja Trontelj, mag. Robert Ucman, dr. Janez Valant, mag. Petra Vitežič, dr. Tanja Vnučec Popov, Tomislav Urbanc, dr. Miha Vrbinc, dr. Franc Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, dr. Rok Zupet

VSEBINA | CONTENT

46. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad
- 10 | Krkini nagrajenci 2016

26. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | Franc Vrečer, Znanstveni odbor Sveta Sklada Krkinih nagrad

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

- 18 | Aleksandar Aleksovski, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mini tablete in mini ogrodja kot večenotni dostavni sistemi s prirejenim sproščanjem
- 24 | Daniela Miloshevska, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Klinična farmakokinetika lamotrigina, okskarbazepina in topiramata pri bolnikih z epilepsijo
- 30 | Renata Režonja Kukec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom
- 36 | Sara Seršen, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza novih rutenijevih koordinacijskih spojin z možnimi biološkimi in katalitskimi učinki
- 42 | Luka Šenica, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza novih vinilogov in heterocikličnih analogov peptidov

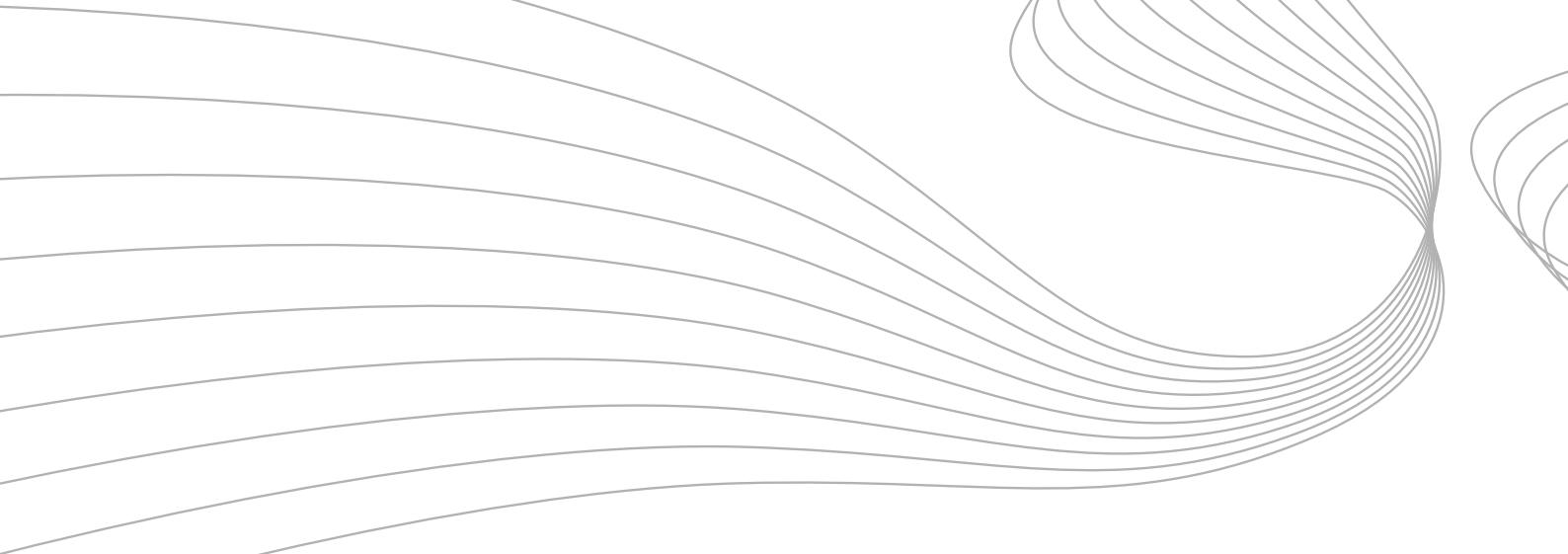
46. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Polona Bukovec**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Študij vpliva zgradbe in oblike kristalov na fizikalno-kemijske lastnosti zdravilnih učinkovin
- 52 | **Gregor Hostnik**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Termodinamične in transportne lastnosti vodnih raztopin alkalijskih soli poli(tiofen-3-il ocetne kisline)
- 53 | **Grega Hudovornik**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Optimizacija izdelave filmsko obloženih pelet v zvrtinčenih plasteh s pomočjo »in-line« tehnik
- 54 | **Urban Košak**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev holin-esteraz
- 55 | **Omar Naneh**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Biofizikalno-kemijske lastnosti človeškega rekombinantnega perforina in njegove interakcije z lipidnimi membranami
- 56 | **Lea Rems**, *Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani*
Uporaba teoretičnih modelov elektroporacije lipidne membrane
- 57 | **Sebastijan Ričko**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza potencialnih organokatalizatorjev na osnovi kafre
- 58 | **Piotr Sosnowski**, *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana*
Strukturni vpogled v substratno specifičnost katepsinov
- 59 | **Katarina Starkl Renar**, *Institut Jožef Stefan*
Študija sinteze nesimetričnih tetraoksanov in vrednotenje njihove potencialne biološke aktivnosti
- 60 | **Gregor Strle**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Novi načini priprave divodikovega trioksida in njegova uporaba za oksidacije organskih spojin
- 61 | **Katja Štajdohar**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Uporaba bioinformatike za razvoj metode identifikacije bakterije *Bacillus subtilis*

62 | **Valentina Božič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Izdelava in vrednotenje nanosuspenzij deksametazona za dermalno uporabo

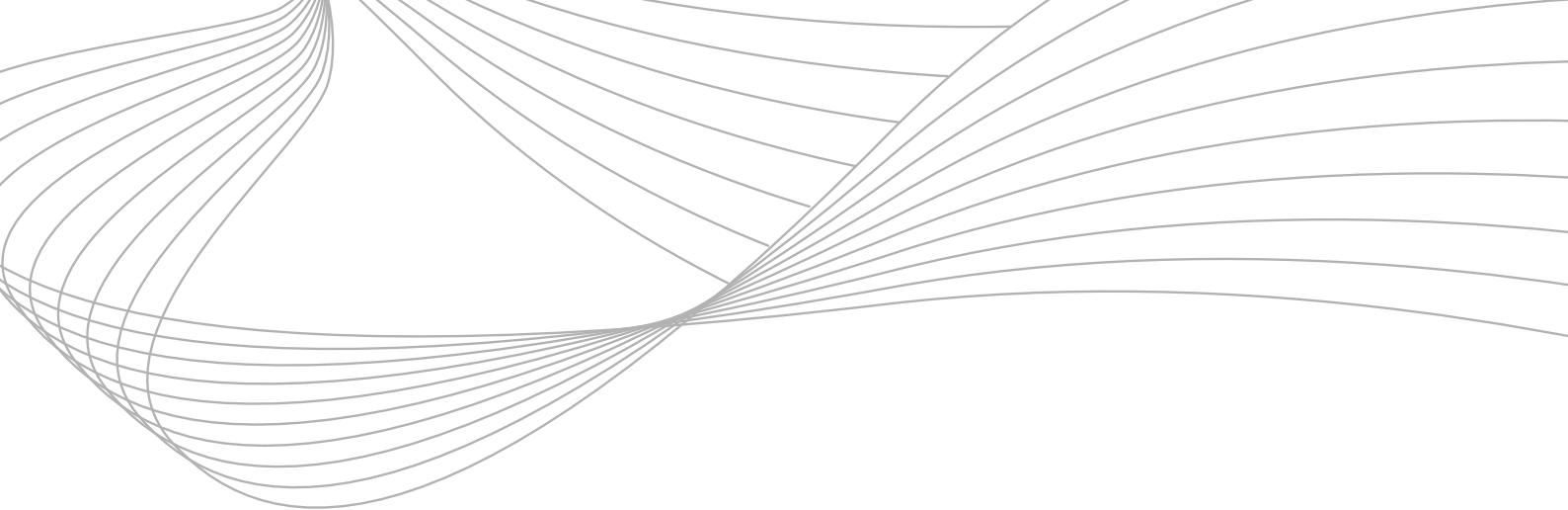
- 63 | **Miha Drev**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Obročne pretvorbe 4-acilamino-3-pirazolidinonov in nova sinteza heksahidropirazolo[1,5-a]piridinov
- 64 | **Matej Janežič**, Kemijski inštitut Ljubljana
In silico načrtovanje in ovrednotenje 1H-indazolnih zaviralcev človeške topoizomeraze IIα
- 65 | **Domen Kitak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vrednotenje obhodnih časov pelet v Wursterjevi komori z metodo fotoluminiscence
- 66 | **Luka Kosec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj metode za določanje aminokislin v proteinih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti
- 67 | **Tina Ličina**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Farmakokinetično-farmakodinamični model sedacije s fentanilom in midazolamom pri otrocih na umetnem predihavanju
- 68 | **Gašper Poklukar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje in sinteza tiazolinonskih zaviralcev ksantin-oksidaze
- 69 | **Nina Poljšak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Analiza alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v izvlečkih gabeza (*Symphytum officinale L.*) s kapilarno elektroforezo
- 70 | **Valentina Šavrič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Pomen nizkih serumskih koncentracij infliksimaba za klinični izid pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznjijo
- 71 | **Rok Šinkovec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Adicija dimetil acetilendikarboksilata na nekatere substituirane enaminone
- 72 | **Eva Španinger**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Računalniške simulacije direktne alkilacije DNK z akrilonitrilom
- 73 | **Nina Štravs**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Inženiring mikro- in nanodelcev z elektrostatskim razprševanjem za izdelavo zdravil
- 74 | **Miha Virant**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza paladijevih kompleksov s triazolilidenskimi ligandi in njihova uporaba v katalizi

- 75 | **Matja Zalar**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Vpliv kationov na zvijanje oligonukleotida d(G₄C₂), njihova lokalizacija in dinamika
- 76 | **Tristan Kovačič, Domen Kulovec, Uroš Prešern**, *Gimnazija Novo mesto*
Aktivno tarčenje cisteinskih katepsinov z liposomi, konjugiranimi s cistatinom C
- 77 | **Borut Šketa, Lucija Parkelj**, *Gimnazija Vič*
Načrtovana proteinska mreža kot perspektiven pameten nanomaterial
- 78 | **Klavdija Fortuna, Tatjana Pajk**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Odpornost enterokokov proti antibiotikom v klapavicah slovenskega morja
- 79 | **Luka Petravić, Jon Škerlj, Špela Turk**, *Gimnazija Novo mesto*
Metilacija arzena pri pacientih z akutno promielocitno levkemijo, zdravljenih z arzenovim(III) oksidom
- 80 | **Alenka Hafner**, *II. gimnazija Maribor*
Raziskovanje antimikrobnih lastnosti in ekstrakcija tujona iz *Thuja occidentalis*
- 81 | **Evgenija Burger, Tjaša Čukajne, Karmen Zupančič**, *Gimnazija Novo mesto*
Priprava in uporaba imobiliziranega encima CalB pri enantioselektivni hidrolizi dietil 3-hidroksi glutarata
- 82 | **Manca Novak, Zala Serianz**, *Gimnazija Jesenice*
Polifenoli v smrekovi kresilači (*Fomitopsis pinicola*)
- 83 | **Simon Iskra**, *Gimnazija Novo mesto*
Samočistilne superhidrofobne površine aluminija in njegovih zlitin
- 84 | **Nika Žurga**, *II. gimnazija Maribor*
Vsebnost aluminija v hrani, pripravljeni ali hranjeni v aluminijasti posodi in embalaži
- 85 | **Martina Velichkovska**, *II. gimnazija Maribor*
Analiza in določanje prisotnosti skupnih indolnih spojin v treh vzorcih prehranskega dopolnila mace (*Lepidium meyenii*) z uporabo ATR-FTIR-spektroskopije
- 86 | **Gabriela Štumberger, Doroteja Teja Pečovnik**, *II. gimnazija Maribor*
Vpliv najpogosteje uporabljenih umetnih in naravnih sladil na rast izbranih črevesnih mikroorganizmov
- 87 | **Primož Fabjan, Veronika Hrovat**, *Grm Novo mesto – Center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*
Flavanoli v kakavovih zrnih in čokoladi



Krkine nagrade so zavezane napredku. Drugače tudi ne more biti, saj je razvoj v najširšem pomenu te besede vtisnjen v naš, Krkin DNK. Vaše naloge na vseh stopnjah postajajo vse zahtevnejše, vanje je vloženih veliko prebliskov, poglobljenih razmislekov in vztrajnega dela. Verjamemo, da je temu primerno vaše veselje, pa tudi zadovoljstvo ob uspešnem zaključku. Posebej se moramo zahvaliti mentorjem, vodstvom šol, fakultet in visokih šol ter ne nazadnje staršem za posluh in razumevanje vaših želja in ambicij. Prepričani smo, da vas želja po ustvarjanju in iskanju novega ne bo zapustila in da boste svojo pot nadaljevali. Znanje je danes raztreseno po vsem svetu, kroži tako po virtualnem spletu kot v srcih in glavah raziskovalcev. A bolj kot to, kje raziskujemo ali ustvarjamo, je pomembno, do kod naši dosežki sežejo. Rezultati dela krkašev so zdravila, s katerimi segamo do bolnikov po vsem svetu. Lepo je v laboratoriju odkriti nekaj novega, prelomnega, a mi vemo, da je še lepše, ko rezultati Krkinega razvojnega dela sežejo tudi tja, kamor sami morda nikoli ne bomo prišli. Kjerkoli boste svojo raziskovalno pot nadaljevali, upamo, da bomo tudi v prihodnje skupaj iskali rešitve in razvijali zdravila na poti do zdravega življenja.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad



Krka Prizes are committed to progress. It cannot be any different as development is an essential part of Krka's DNA in the broadest sense. Your papers are becoming more and more complex at all levels and include many brainwaves, in-depth thoughts and hard work. We believe that your joy and also pleasure by having successfully concluded your papers are even more greater. Special thanks should go to mentors, management of schools, faculties and colleges as well to your parents for having listened and understood your wishes and ambitions. We are convinced that your desire for creation and search for new will not leave you and that your paths will continue. Knowledge is today dispersed all over the world and circulates in the virtual world as well as in the hearts and minds of researchers. It is more important to where our achievements reach than where you research or create. The results of work of Krka employees are medicinal products that reach patients all over the globe. It is good to discover something new and special in a laboratory, but we know that its even better when the results of Krka's development work reach to where we might never go. Wherever you continue your research work, we hope that in future we will together search for new solutions and develop medicinal products to a healthy life.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2016 | KRKA PRIZE WINNERS 2016

KRKINE NAGRADOVANE ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVANEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Aleksandar Aleksovski	doktor znanosti s področja farmacije	Rok Dreu	2579
Daniela Milosheška	doktorica znanosti s področja farmacije	Iztok Grabnar Tomaž Vovk	2580
Renata Režonja Kukec	doktorica znanosti s področja farmacije	Aleš Mrhar Tanja Čufer	2581
Sara Seršen	doktorica znanosti s področja kemije	Iztok Turel	2582
Luka Šenica	doktor znanosti s področja kemije	Jurij Svetec	2583

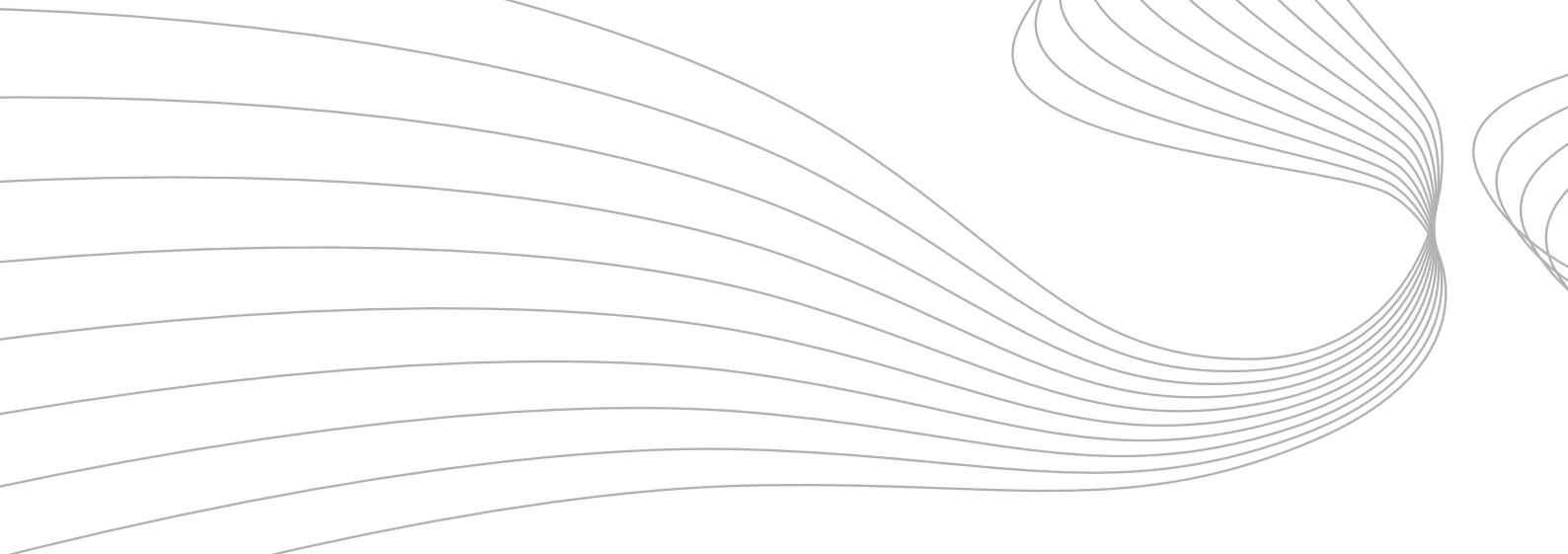
KRKINE NAGRADOVANE NA PODROČJU RAZISKOVANEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrainec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Polona Bukovec	doktorica znanosti s področja farmacije	Franc Vrečer	2584
Gregor Hostnik	doktor znanosti s področja kemije	Janez Cerar	2585
Grega Hudovornik	doktor znanosti s področja farmacije	Franc Vrečer	2586
Urban Košak	doktor znanosti s področja farmacije	Stanislav Gobec	2587

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Omar Naneh	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Gregor Anderluh	2588
Lea Rems	<i>doktorica znanosti s področja elektrotehnike</i>	Damijan Miklavčič Mounir Tarek	2589
Sebastijan Ričko	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Uroš Grošelj	2590
Piotr Sosnowski	<i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Dušan Turk	2591
Katarina Starkl Renar	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Jernej Iskra	2592
Gregor Strle	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Janez Cerkovnik	2593
Katja Štajdohar	<i>magistra mikrobiologije</i>	Tomaž Accetto Aleš Gasparič	2594
Valentina Božič	<i>magistra farmacije</i>	Petra Kocbek Roland Bodmeier	2595
Miha Drev	<i>magister kemije</i>	Jurij Svete	2596
Matej Janežič	<i>magister farmacije</i>	Andrej Perdih Tomaž Šolmajer	2597
Domen Kitak	<i>magister farmacije</i>	Rok Dreu Rok Šibanc	2598
Luka Kosec	<i>magister farmacije</i>	Jožko Cesar	2599
Tina Ličina	<i>magistra farmacije</i>	Iztok Grabnar Štefan Grosek	2600
Gašper Poklukar	<i>magister farmacije</i>	Marko Anderluh	2601

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Nina Poljšak	<i>magistra farmacije</i>	Nina Kočevar Glavač Stanko Srčič	2602
Valentina Šavrič	<i>magistra farmacije</i>	Joško Osredkar David Drobne	2603
Rok Šinkovec	<i>univerzitetni diplomirani kemik</i>	Branko Stanovnik	2604
Eva Španinger	<i>magistra kemije</i>	Urban Bren	2605
Nina Štravs	<i>magistra farmacije</i>	Julijana Kristl Zoran Lavrič	2606
Miha Virant	<i>magister kemije</i>	Janez Košmrlj	2607
Matja Zalar	<i>magistra biokemije</i>	Janez Plavec Primož Šket	2608

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Tristan Kovačič Domen Kulovec Uroš Prešern	dijak dijak dijak	Lovro Kramer Andreja Bratovš Boris Turk Branka Klemenčič	2609 2610 2611
Borut Šketa Lucija Parkelj	dijak dijakinja	Alenka Mozer Roman Jerala Helena Gradišar Nino Bašić	2612 2613
Klavdija Fortuna Tatjana Pajk	dijakinja dijakinja	Majda Golob Mateja Pate Irena Štrumbelj Drusany	2614 2615
Luka Petravić Jon Škerlj Špela Turk	dijak dijak dijakinja	Zdenka Šlejkovec Ingrid Farnoga Branka Klemenčič	2616 2617 2618
Alenka Hafner	dijakinja	Zdenka Keuc Bernarda Devetak Maša Knez Hrnčič Darija Cör	2619
Evgenija Burger Tjaša Čukajne Karmen Zupančič	dijakinja dijakinja dijakinja	Aleš Gasparič Branka Klemenčič	2620 2621 2622
Manca Novak Zala Serianz	dijakinja dijakinja	Katarina Trontelj Andrej Gregori	2623 2624
Simon Iskra	dijak	Ingrid Milošev Peter Rodič Janja Pust	2625
Nika Žurga	dijakinja	Sanja Cvar	2626
Martina Velichkovska	dijakinja	Zdenka Keuc	2627
Gabriela Štumberger Doroteja Teja Pečovnik	dijakinja dijakinja	Katja Holnhaner Zorec Rok Tkavc	2628 2629
Primož Fabjan Veronika Hrovat	dijak dijakinja	Irena Kurajić Vesna Glavnik	2630 2631



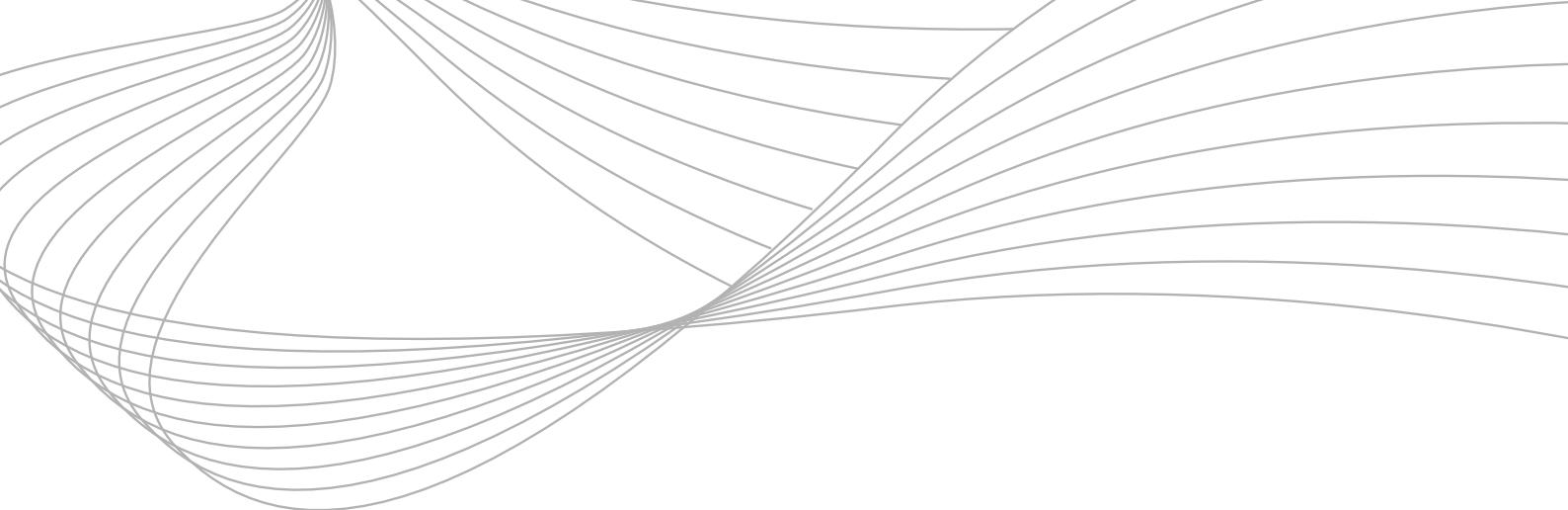
Letos potekajo že 46. Krkine nagrade, kar kaže na pravilnost odločitve takratnega Krkinega vodstva in tudi na njihovo prepoznavnost med mladimi raziskovalci in njihovimi mentorji. V Znanstvenem odboru Sveta Sklada Krkinih nagrad stremimo k stalnim izboljšavam razpisov in izboru najboljših nalog. Naše ključno vodilo je spodbujanje mladih k raziskovalnemu delu in njegova popularizacija med študenti in dijaki ter potencialnimi mentorji na izobraževalnih inštitucijah.

Prispele naloge vsako leto postrežejo s kakšnim presežkom. Letos lahko vsekakor izpostavimo število in kakovost nalog srednješolcev iz vse Slovenije. Na razpis se je odzvalo petdeset dijakinj in dijakov, ki so prijavili 28 nalog, od katerih smo jih s Krkinimi nagradami nagradili dvanajst. Kakovost nalog je na izjemnem nivoju, srednješolci pa so nas na predstavitvah navdušili tudi s strokovno podkovanostjo in suverenostjo. Ocenjevalci in člani Znanstvenega odbora smo imeli pri izboru najboljših nalog zaradi njihove izenačenosti nemalo težav. Veliko zaslug za »kvantni« preskok v kakovosti imajo gotovo mentorji in somentorji, ki so mlade raziskovalce navduševali in usmerjali.

V Znanstvenem odboru smo vsekakor zelo zadovoljni tudi s kakovostjo in tematsko širino študentskih nalog. Teme nalog v doktorskem in drugostopenjskih študijskih programih so zajele različna strokovna področja – od farmacije, različnih podpodročij kemije, medicine, biologije in biotehnologije do ekologije, strojništva in elektrotehnikе. Posebej pozitivno so nas presenetili študenti drugostopenjskih študijskih programov, ki so prijavili kar 40 nalog. Med njimi je bilo nekaj zares odličnih tako po znanstveni vrednosti – rezultati nekaterih nalog so bili vključeni v znanstvene objave – kot po aplikativnosti.

Prejemnikom Krkinih nagrad v imenu članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in seveda v svojem imenu iskreno čestitam. Naj vas nagrade še dodatno spodbudijo k razvoju vaših raziskovalno-razvojnih potencialov in uporabi pridobljenega znanja ter okrepijo vaše želje po iskanju novih ciljev in novih poti do njihovega udejanjanja v delovnem okolju.

Prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.
Znanstveni odbor Sveta Sklada Krkinih nagrad



This year Krka Prizes celebrate their 46th anniversary, pointing at the right decision of the then management of KRKA, d. d., Novo mesto, and the Prizes' recognisability among young researchers and their mentors. The Scientific Committee of the Krka Prizes Council strives to regularly improve calls for papers and the selection of the best prizes whereby our key guideline is to encourage young people to conduct research work and raise its popularity among students and pupils, as well as potential mentors at educational institutions.

Among the papers which the Krka Prizes competition receives every year there are always some, which exceed all expectations. The Scientific Committee can this year definitely expose the quality and quantity of papers, sent by secondary school pupils from all around Slovenia. This year, 50 pupils sent 28 papers of which 12 were awarded. The quality of the research papers sent by pupils this year is exceptional and the pupils impressed us with their professionalism and independence, as well as with presentations of their papers. It was challenging for the assessors and members of the Scientific Committee to select the best. Mentors and co-mentors who encouraged and guided young researchers in their work, should be given a lot of credit for the enormous surge in the quality of high school research papers.

The Scientific Committee is very pleased with the quality and the wide range of topics of student research papers. The topics of student research papers at doctoral and 2nd cycle study programmes covered the fields of pharmacy, chemistry, medicine, biology, biotechnology, ecology, mechanical engineering and electrical engineering. We were particularly pleasantly surprised by 2nd cycle study programmes students who sent 40 research papers among which some were excellent in terms of scientific value – the results of some papers were included in scientific publications, as well as their applicability.

I would like to congratulate all the receivers of Krka Prizes in the name of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and myself for the received awards, which should serve as encouragement for further development of your research and development potential and use of the obtained knowledge, as well as the wish to search for new goals and ways for their realisation in the workplace.

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

46.



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

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners

SP300



Dr. ALEKSANDAR ALEKSOVSKI

*Strast do znanosti
in želja po
inovativnosti*

Aleksandar Aleksovski je bil že kot otrok željan znanja in njegov otroški raziskovalni duh je ponudil cel kup inovativnih idej. Že v osnovni in srednji šoli, ki ju je obiskoval v rodni Makedoniji, je bila njegova največja želja nekoč uspeti v poklicu, od katerega bi imeli koristi tudi drugi. Zato je izbral študij farmacije in kasneje farmacevtsko tehnologijo. Mladi raziskovalec navdušeno pove, da razvoj sodobnih farmacevtskih oblik z dodano vrednostjo tudi v farmacevtski industriji ponuja številne izzive. Doktorsko nalogu, v kateri je raziskoval mini tablete in mini ogrodja kot večenotne sisteme, ki omogočajo podaljšano sproščanje zdravila, je pod mentorstvom doc. dr. Roka Dreua na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani uspešno zagovarjal maja 2016.

»Modreci pravijo, da ni mej, če si nekaj resnično želiš. To drži tudi zame. Moja strast do znanosti in želja po inovativnosti sta gonilni sili, ki me ob trdni podpori mojih najbližjih vodita na poti doseganja vseh zastavljenih strokovnih ciljev,« navdušuječe priponuje prejemnik Krkine nagrade za posebne dosežke. V doktorski nalogi se je usmeril v razvoj mini tablet in ostalih podobnih mini matric, ki zagotavljajo podaljšano sproščanje zdravila, ter njihovo vgradnjo v večenotne sisteme. Pojasni še, da ti sistemi prinašajo terapevtske prednosti in izboljšujejo sodelovanje bolnikov. »Drugi cilj mojega raziskovanja je implementacija standardnih in inovativnih tehnik pri proizvodnji različnih mini ogrođij ter dokazovanje primernosti njihove uporabe. Ta ogrodja lahko uporabimo pri razvoju sistemov z več enotami, tako pri originalnih kot generičnih zdravilih, pa tudi pri upravljanju življenjskega cikla farmacevtskega izdelka.«

Zavzeti raziskovalec je prepričan, da so mini tablete in mini ogrodja zelo obetavna osnova za razvoj novih zdravil. »Postopoma bi lahko prevzele zelo pomembno mesto pri oblikovanju trdnih farmacevtskih oblik. Tudi iztiskanje talin in ohlajanje kapljic taline postajata v farmacevtski industriji vse bolj pomembna, saj gre za enostavni, robustni in ekološki tehniki, ki bi lahko izboljšali delovanje farmacevtske oblike in odpravili številne težave.«

Kot ključnega človeka, ki je bistveno prispeval k oblikovanju ideje in ves čas spodbujal njegovo raziskovalno delo, izpostavi mentorja doc. dr. Roka Dreua. »Zelo pomembno vlogo je odigral tudi prof. dr. Chris Vervaet s Fakultete za farmacevtske vede v Gentu v Belgiji, ki je omogočil, da smo mini matrice naredili z uporabo tehnik, kot so iztiskanje talin in ohlajanje kapljic taline.«

Krkine nagrade ocenjuje kot odličen način povezovanja akademskega sveta z industrijo, saj trdno verjame, da morajo imeti znanstveni dosežki ne le teoretično, ampak tudi praktično veljavno.

Zato se je tudi odločil, da svoje raziskovalno delo predstavi strokovnjakom v farmacevtski industriji. »Krkina nagrada za posebne dosežke me navdaja s ponosom. To je zame velika čast. Nagrada dokazuje, da moje znanstveno delo ni le zelo kakovostno in inovativno, ampak tudi uporabno v industriji, vsekakor pa mi daje dodatno motivacijo za nove dosežke v znanosti.«

»Ni nemogočih ciljev, če le premorete dovolj trdne želje za njihovo uresničitev in ste pripravljeni predano delati,« konča Aleksandar Aleksovski. V prihodnje se namerava usmeriti v odkrivanje novih farmacevtskih oblik, ki bodo temeljile na inovacijah, in jih uspešno implementirati v farmacevtsko industrijo in terapevtsko prakso.

Mini tablete in mini ogrodja kot večenotni dostavní sistemi s prirejenim sproščanjem

ALEKSANDAR ALEKSOVSKI, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

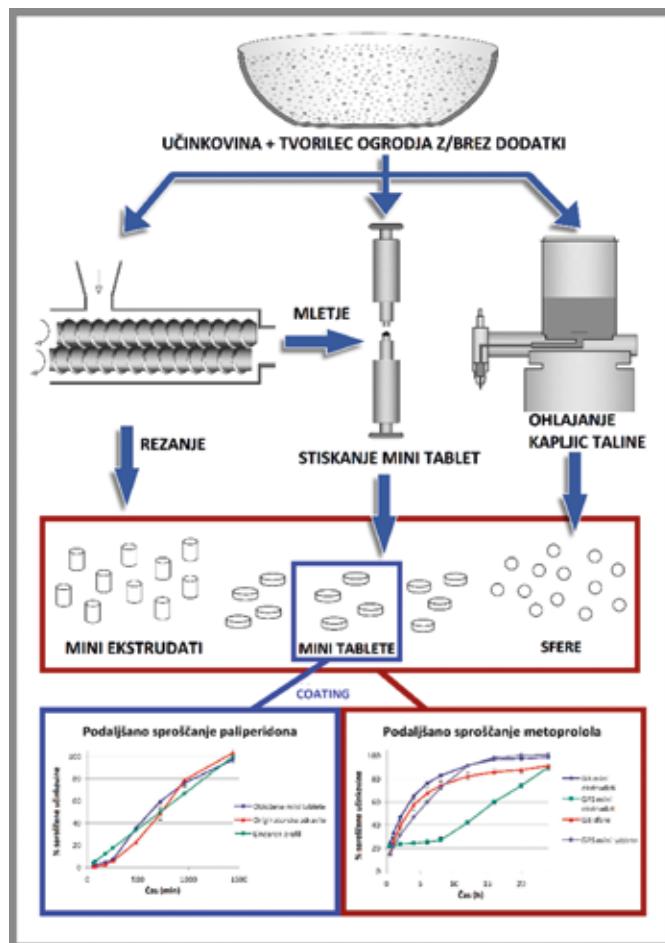
Mentor: Rok Dreu, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mini tablete so tablete s premerom, manjšim od treh milimetrov. Izdelujemo jih s procesom stiskanja na klasičnih tabletirkah, opremljenih s pečati z več konicami in z matricami z več matričnimi vdolbinami. Mini tablete so sodobna platforma za razvoj večenotnih farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem in imajo pred enoenotnimi sistemi podobne prednosti kot pelete. Kot večenotni sistemi omogočajo kombiniranje različnih (ne)kompatibilnih zdravilnih učinkovin in/ali različnih kinetik oz. načinov sproščanja učinkovine (podaljšano, zakasnjeno, pulzirajoče itd.). Z zmanjševanjem števila dnevnih odmerkov in reševanjem težav polifarmakoterapije lahko izboljšajo terapevtski izid in komplianco bolnikov. Pri enoenotnem sistemu pa lahko s sočasno aplikacijo dveh ali več mini tablet prilagajamo odmerek učinkovine glede na bolnikovo starost, težo ali fiziološke posebnosti. Poleg tega mini tablete zaradi velikosti ne povzročajo težav pri požiranju. Te prednosti so bistvenega pomena pri pediatričnih, geriatričnih in hospitaliziranih bolnikih, hkrati pa olajšajo individualizacijo terapije.

V okviru doktorske disertacije smo razvili večenotni dostavni sistem, ki temelji na kombinaciji mini tablet z variabilno sestavo ogrodja in filmske obloge. Namen razvoja sistema je bil zagotoviti specifično sigmoidno kinetiko podaljšanega sproščanja oz. v ločeni rešitvi še kinetiko ničtega reda sproščanja modelne zdravilne učinkovine paliperidon. Učinkovina je na trgu prisotna tudi v obliki, ki temelji na osmotski črpalki. Razvita rešitev kombiniranega večenotnega sistema je zasnovana na eni mini tablet, iz katere se sproščanje učinkovine s počasnejšo podaljšano kinetiko začne v duodenumu, in na treh mini tabletih, ki se začnejo sproščati v ileocekalni regiji, in sicer s hitrejšo podaljšano kinetiko. Podaljšano sproščanje različnih hitrosti je bilo doseženo z uporabo različnih razmerij polimerne zmesi polivinilacetata in polivinilpirolidona kot tvorilca ogrodja, laktez kot vodotopega polnila ter magnezijevega hidroksida kot pH-modifikatorja. Zakasnjeno sproščanje v obliki sigmoidnega profila je bilo glede na fiziološke pogoje v gastrointestinalnem traktu doseženo z oblaganjem mini tablet z različnima akrilnima polimeroma s pH-odvisno topnostjo. Navedeni formulacijski pristop je dal robusten in stabilen izdelek z *in vitro* profilom sproščanja, podobnim originatorskemu zdravilu. V okviru raziskave je bil uspešno zasnovan računalniški program, namenjen *in silico* rešetanju profilov sproščanja za identifikacijo alternativnih kombinacij mini tablet, ki dajo podobno kinetiko sproščanja kot originatorsko zdravilo ali teoretični linearni profil.

Iztiskanje talin (hot-melt extrusion, HME) in ohljanje kapljic taline (prilling) sta enostavna in kontinuirana procesa za proizvajanje večenotnih sistemov s podaljšanim sproščanjem brez uporabe topil. Pri iztiskanju talin se zmes praškov uvaja v segreto cev za iztiskanje, v kateri rotira eden ali več polžev. Ti omogočajo mešanje, gnetenje in potiskanje (delno) staljenega materiala proti matrici z ekstruzijskimi kanali, ki z velikostjo in obliko definirajo izgled končnega izdelka. Tehnologija ohlajanja kapljic taline je v farmaciji novejša tehnika. Temelji na kapljanju staljenega materiala skozi šobo v hladiльнem stolpu, kjer se kapljice strdijo v sfere z odličnimi pretočnimi lastnostmi, enakomerno obliko in velikostjo. Glavna pomanjkljivost teh dveh tehnik je izvajanje procesa pri povišani temperaturi, kar ni primerno za termolabilne komponente. Lipidi so kot farmacevtske pomožne snovi primerni za obdelavo s procesi, ki temeljijo na taljenju – iztiskanju talin ali ohljanju kapljic taline. Zanimivi so zaradi nizke temperature tališča, majhne viskoznosti taline, biozdravljivosti, inertnosti ter nizke cene. Zaradi pretežno hidrofobne narave so primerni za tvorbo ogrodij sistemov s podaljšanim sproščanjem. Glavna pomanjkljivost lipidov je fizikalna nestabilnost, do katere lahko pride med procesom ali med shranjevanjem, kar lahko negativno vpliva na končni rezultat razvoja izdelka.

V okviru doktorske naloge smo izdelali in ovrednotili mini ogrodja za podaljšano sproščanje dobro topne modelne učinkovine metoprolol tartrat. Kot tvorilca ogrodja smo uporabili različne deleže mešanega glicerida, bodisi gliceril behenata (GB) ali gliceril palmitostearata (GPS). Sistemi so bili izdelani s tremi tehnikami: iztiskanje talin, stiskanje mini tablet (direktno stiskanje ali stiskanje zrnc, pridobljenih s tehniko talin) ter ohlajanje kapljic taline. Procesa stiskanja mini tablet iz zrnc in iztiskanja talin sta robustna in ponovljiva. Metoda ohlajanja kapljic taline je bila zaradi občutljivosti za večjo viskoznost taline (suspenzije) primerna za uporabo le pri zmesi z najmanjšo vsebnostjo učinkovine. Direktno stiskanje praškaste zmesi zaradi slabih pretočnih lastnosti zmesi učinkovine in glicerida ni bilo primerno za izdelavo mini tablet. Sproščanje metoprolola je bilo pri sveži pripravljenih ogrodjih odvisno od njegovega deleža in od velikosti ogrodja oz. velikosti primarnih zrnc, stisnjениh v mini tableto. Enote, ki temelijo na GB, so bile bolj porozne in so omogočale hitrejše sproščanje učinkovine kot sorodna mini ogrodja, ki vsebujejo GPS. Pri GB-ogrodjih so bili profili sproščanja ne glede na tehniko izdelave podobni, kar pa se ni potrdilo pri GPS-enotah. S staranjem pri sobnih pogojih (samo GPS-enote) in pogojih s povišano temperaturo (GB- in GPS-enote) so se spremenile lastnosti gliceridov v trdnem stanju, kar smo zaznali s termično analizo in rentgensko praškovno difraktometrijo. Predvidevamo, da so te spremembe razlog za spremembe profilov sproščanja po staranju. Sestava medija za raztapljanje (pH, biorelevantne komponente), tehniko obdelave zmesi ter pogoji shranjevanja so manj vplivali na kinetiko sproščanja učinkovine iz GB-enot kot iz GPS-ogrodij. Na podlagi tega ocenjujemo, da je GB zanesljiv in robusten tvorilec ogrodja za izdelavo večenotnih sistemov s procesi, ki temeljijo na taljenju.



Slika 1. Grafični povzetek raziskave. Primerjava treh tehnik izdelave lipidnih mini ogrodnih sistemov s podaljšanim sproščanjem metoprolol tartrata in razvoj funkcionalno obloženih ogrodnih mini tablet s specifično 24-urno kinetiko sproščanja paliperidona.

Mini-Tablets and Mini-Matrices as Multiple-unit Systems Intended for Modified Drug Delivery

ALEKSANDAR ALEKSOVSKI, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Mini-tablets are defined as tablets with a diameter smaller than 3mm and can be compressed on a standard tablet machine using specific tooling, consisting of multi-tip punches and multi-bore dies. Mini-tablets are seen as a promising platform for developing multiple-unit drug delivery systems (MDDS), providing modified release and showing similar advantages over single unit systems as pellets. When formulated as MDDS they offer the possibility of combining different (in)compatible compounds and different release kinetics and patterns (extended release, delayed release, pulsatile release etc.) in only one system. These features may contribute to the improvement of the therapeutic outcome, patient compliance due to reduction in dosing frequency, and can solve problems of polypharmacotherapy. Additional benefits of mini-tablets are seen in providing flexible doses with regard to the patient's age, weight or physiological factors, and improvement of the drug swallowing (due to their small size). These benefits, brought by mini-tablets, are of substantial importance for vulnerable patient groups such as paediatrics, geriatrics and hospitalised patients and are a step forward towards individualisation of therapy.

Within the thesis thesis, a development of a specific MDDS, based on the combination of mini-tablets with different matrix and coating composition, was performed. The aim was to achieve specific sigmoidal and in the second instance, zero-order release kinetics of paliperidone, a model drug present on the market as an osmotic pump. In an adequate combination MDDS consisted of one mini-tablet aimed at starting drug release in the duodenum with a slower extended release pattern, and three mini-tablets aimed at starting slightly faster extended delivery of paliperidone in the ileo-colonic region. Extended drug delivery with different rates within 24 hours was achieved by using polymeric mixture of polyvinyl acetate and polyvinyl pyrrolidone (Kollidon® SR) as a matrix former in combination with different amounts of lactose as a soluble filler and magnesium hydroxide as a pH modifier. Additionally, by applying different acrylic polymers as a pH-dependent coat over mini-tablet cores, the desired delay in drug release with regard to specific GIT transit times and pH was obtained. The aforementioned approach assured robust drug release and stable product with *in-vitro* similar release pattern compared to the reference drug. During the study a computer based programme for screening drug release profiles was designed and successfully used in extracting alternative mini-tablet combinations, providing a similar drug delivery pattern as the original drug or alternatively zero order kinetics.

Hot-melt extrusion (HME) and prilling are seen as simple, continuous and solvent-free processes for the production of MDDS providing extended drug delivery. HME is based on processing powder mixture in a preheated barrel with rotating screw/s, where it is mixed, kneaded, (partially) melted and transported to an end plate die, which defines the shape and size of the final product. Prilling is a relatively new technique in the pharmaceutical field. It is based on the dripping of molten masses via a nozzle in a chilling tower, where drops are solidified into spherical particles with a uniform size and shape and superior flowability. The main disadvantage of HME and prilling is heat burden, which makes them unsuitable for thermolabile compounds. Among others, pharmaceutically approved lipids are gaining importance as suitable excipients to be processed by HME or prilling, which is due to their low melting temperatures, low viscosities of molten masses, biocompatibility, inertness and low cost. The predominant hydrophobic nature makes them suitable candidates for matrix formers in extended release dosage forms. The possible physical instability of lipids during processing and/or storage is seen as their main drawback, which may negatively affect the final outcome of product development.

Within thesis extended release mini-matrices containing metoprolol tartrate (MPT) as a highly soluble model medicine and mixed glyceride (either glyceryl behenate – GB or glyceril palmitostearate – GPS)

as matrix former, in various ratios, were developed and evaluated. Three technologies were used for production of mini-matrices: HME, prilling and compression of untreated powders or materials processed by melt granulation into mini-tablets. HME and compression of granules appeared as reproducible and robust methods for production of extended release mini-matrices. Prilling was susceptible to increased melt viscosity and was applicable only for mixtures with the lowest portion of the medicine, while direct compression approach was unsuitable for the intended purpose due to poor flow of the drug-glyceride powder mixtures. In general, medicine delivery from all the freshly produced matrices depended on the medicine amount and on the matrix unit or initial particle size. Units produced with GB had higher matrix porosity and delivered the drug faster compared to analogue units based on GPS. Regardless of the employed technology the group of GB units did not show a significantly different drug release pattern, which was not the case with GPS-based matrices. Changes in the solid state properties of the glycerides after storage at room conditions (GPS units only) and conditions of increased temperature (GB and GPS units) were detected by thermal and X-ray powder diffraction measurements. Observed changes were suspected to cause alteration in the drug release rate and pattern observed after storage. GB units were in general unaffected by the composition of the dissolution media (pH and presence of biorelevant compounds), the production process and storage conditions when compared to GPS matrices. Therefore, GB was identified as reliable and robust matrix former for development of extended release MDDS, produced by hot-melt technologies.

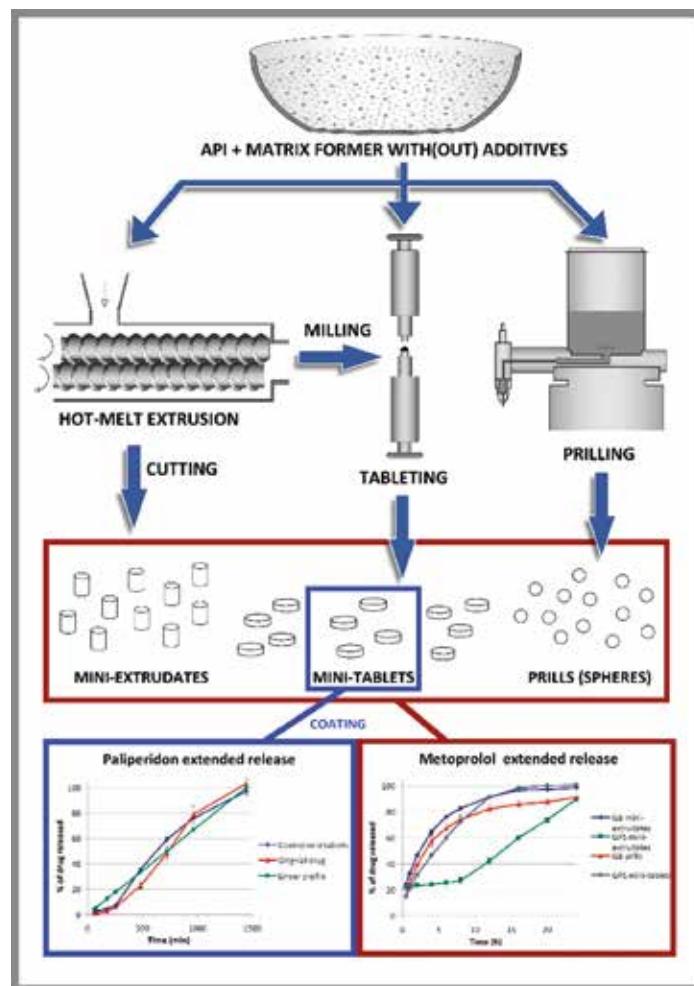


Figure 1. Graphical abstract – comparison of three different technologies for production of mixed glyceride-based mini-matrices with extended release of metoprolol tartrate and development of functionally coated matrix mini-tablets with specific 24-hour release of paliperidone.



**Dr. DANIELA
MILOSHESKA**

*Popolna predanost
raziskovanju*

Daniela Milosheska prihaja iz Makedonije. Po končani gimnaziji v Tetovu se je vpisala na Fakulteto za farmacijo v Skopju, leta 2007 končala magistrski študij kot najboljša študentka v generaciji, po opravljenem strokovnem izpitu pa tam odprla svojo lekarno. Pri vsakdanjem srečevanju z bolniki se je začela bolj poglabljati v njihove zdravstvene težave in se intenzivno zanimati za klinično farmacijo in osebno medicino. Ker je oboje v širši regiji najbolj razvito v Sloveniji, se je leta 2011 vpisala na podiplomski doktorski študij biomedicine na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Svojo interdisciplinarno doktorsko disertacijo s področja klinične farmakokinetike novejših protiepileptičnih zdravil je pripravila pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja in somentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka ter jo uspešno zagovarjala marca 2016.

»Kljud velikemu napredku na področju farmakoterapije epilepsije je zdravljenje še vedno problematično. Okoli 30 % bolnikov ne doseže dolgotrajne odsotnosti epileptičnih napadov in zahteva razširjeno klinično obravnavo,« poudari doktorica znanosti in še pojasni, da sta izbira zdravila in odmerjanje še posebej težavna pri dojenčkih in majhnih otrocih, saj so klinične raziskave zanje zelo redke. »Rutinsko spremljanje koncentracij je stalna praksa pri starejših bolnikih. Potrebne so dobro načrtovane študije o smiselnosti uporabe tega pristopa pri zdravljenju z novejšimi protiepileptičnimi zdravili.« Zato je v svoji raziskavi želeta pridobiti novo znanje o klinični farmakokinetiki pri izbranih predstavnikih druge generacije protiepileptičnih zdravil in s tem izboljšati izid zdravljenja. V sodelovanju z nevrološko in pediatrično klinikou sta bili v UKC Ljubljana izvedeni dve klinični študiji.

»Verjamem, da bodo rezultati raziskav, ki so bili objavljeni v nekaj znanstvenih člankih, pomembno prispevali v zakladnico znanja na področju osebne medicine, hkrati pa pripomogli k večjemu uvajanju terapevtskega spremljanja koncentracij učinkovin, farmakogenetskih raziskav in alternativnih načinov vzorčenja, kot so npr. posušeni krvni madeži, v rutinsko klinično prakso,« je prepričana dr. Milosheska, ki izjemno pomembno vlogo pri pripravi svoje disertacije pripisuje mentorju prof. dr. Iztoku Grabnarju in somentorju prof. dr. Tomažu Vovku.

»Raziskovanje je zame strast in večkrat izgubim občutek za čas, saj me delo popolnoma prevzame. A sem kljud temu našla ravnotežje med delom in družino. Veliko se ukvarjam s sinčkom, ki me zdaj najbolj potrebuje. Sem pa tudi aktivna članica v strokovnih združenjih in nevladnih organizacijah v Makedoniji in Sloveniji, ki promovirajo znanost, zdravje in aktivno državljanstvo, saj želim narediti spremembo v lokalni skupnosti,« navdušeno pripoveduje vsestranska znanstvenica, ki pravi,

da ima za njen uspeh veliko zaslug tudi mož, ki jo podpira pri vseh njenih prizadevanjih. Tudi pri naslednjem izzivu, podoktorskem projektu na fakulteti za farmacijo, s katerim želi pridobljeno znanje in izkušnje še nadgraditi.

Prijava na razpis za Krkine nagrade je bila zanjo samoumevna, saj Krko vidi kot edino gospodarsko družbo v Sloveniji, ki prepozna in nagradi odlična raziskovalna dela s področja farmacije in sorodnih ved. »Svojo raziskovalno nalogu sem želeta predstaviti širši javnosti, ker gre za osebno medicino, ki je danes eno najbolj dinamičnih področij. V čast si štejem, da sem se uvrstila med nagrajence za posebne dosežke. Nagrada mi pomeni dodatno potrditev, da je doktorska disertacija kakovostna, obenem pa je zame velika motivacija, da nadaljujem z raziskovalnim delom.«

Klinična farmakokinetika lamotrigina, okskarbazepina in topiramata pri bolnikih z epilepsijo

DANIELA MILOSHEŠKA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: Tomaž Vovk, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Klinična farmakokinetika je del klinične farmacije, ki pristope farmakokinetike uporablja za načrtovanje režimov odmerjanja zdravil za optimizacijo razmerja med koristmi in tveganji zdravljenja vsakega bolnika. V praksi se klinična farmakokinetika uporablja pri terapevtskem spremljanju zdravil (therapeutic drug monitoring, TDM) za zdravilne učinkovine z ozkim terapevtskim območjem in veliko variabilnostjo v farmakokinetiki, če je poznan odnos med koncentracijo zdravilne učinkovine in farmakološkim učinkom. TDM je multidisciplinarna klinična dejavnost. Namenjena je izboljšanju oskrbe bolnikov prek individualizacije odmerjanja zdravilnih učinkovin, za katere so v klinični praksi ali kliničnih študijah dokazali, da TDM izboljša izid zdravljenja tako v splošni kot v specifičnih populacijah. TDM se je uveljavil v zdravljenju s protiepileptičnimi zdravili (PEZ). Vzrok za to je dejstvo, da ima večina PEZ ozko terapevtsko okno, zlasti pri starejših PEZ pa je znana tudi velika variabilnost v farmakokinetiki. Dodaten razlog za uporabo TDM je narava epilepsije. Terapija s PEZ je preventivna, ker je pojavnost epileptičnih napadov nenapovedljiva, klinični simptomi in znaki toksičnosti pa so težko določljivi, saj še vedno ne poznamo zanesljivih označevalcev za terapevtsko učinkovitost in toksičnost PEZ. Po drugi strani je še vedno neopredeljena korist TDM za novejša PEZ, kamor spadajo tudi lamotrigin (LTG), okskarbazepin (OXC) in topiramat (TPM), ki imajo širše terapevtsko okno in bolj predvidljivo farmakokinetiko. Potrebne so dobro načrtovane študije o smiselnosti TDM pri novejših PEZ pri zdravljenju epilepsije v klinični praksi.

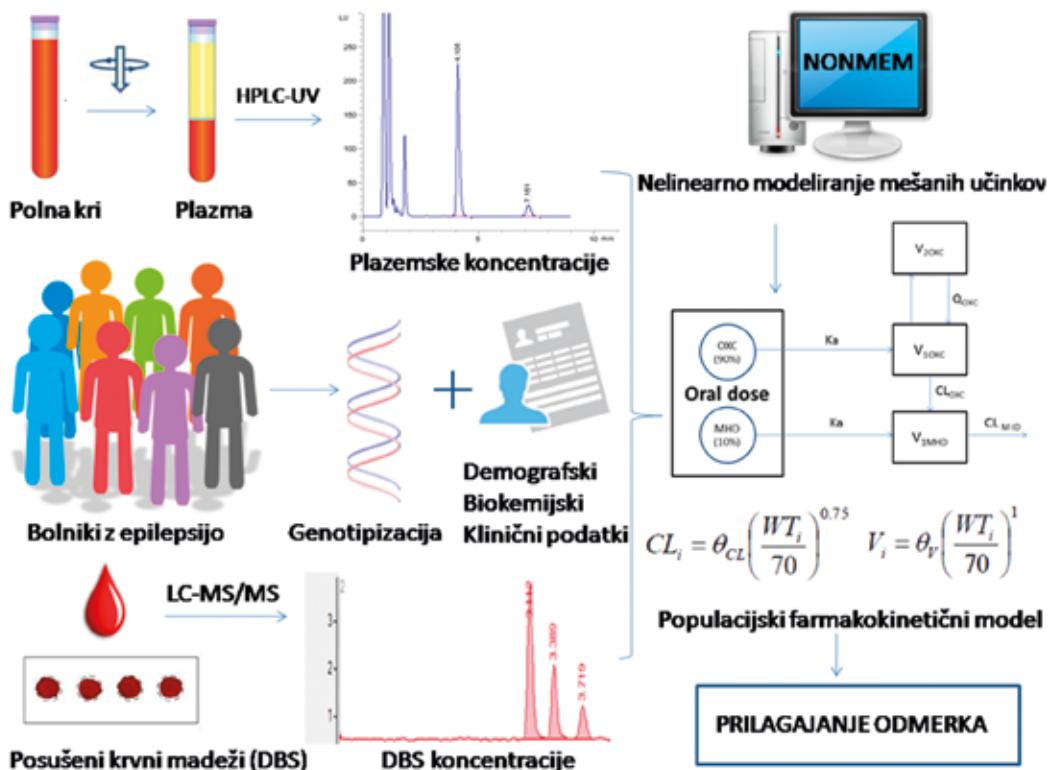
Osnovni namen doktorske disertacije je bil poglobiti znanje in pridobiti novo znanje o klinični farmakokinetiki LTG, OXC in TPM. V prvem delu naloge smo razvili kromatografske analizne metode za kvantifikacijo teh učinkovin in njihovih glavnih metabolitov v bioloških vzorcih. Razvili smo enostavno, občutljivo in zanesljivo analizno metodo, ki temelji na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC) z UV-detekcijo, za sočasno spremljanje koncentracij najpogosteje uporabljenih PEZ in nekaterih njihovih metabolitov v plazmi, vključno z LTG in OXC in njegovim aktivnim metabolitom 10-monohidroksikarbazepinom (MHD). Za kvantifikacijo TPM pa smo razvili in validirali analizno metodo, ki temelji na HPLC s fluorescenčno detekcijo, pri čemer smo uporabili predkolonsko derivatizacijo s 4-kloro-7-nitrobenzofurazanom kot fluorescenčnim reagentom za označevanje, saj je TPM zaradi posebne molekulske strukture in odsotnosti kromoforov neprimeren za UV-detekcijo. Dodatno smo razvili in validirali analizno metodo za sočasno spremljanje koncentracij TPM in njegovih glavnih metabolitov 2,3-desizopropiliden TPM, 4,5-desizopropiliden TPM, 10-hidroksi TPM in 9-hidroksi TPM, ki temelji na tekočinski kromatografiji ultravisoke ločljivosti, povezani s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Ustreznost razvitih analiznih metod smo potrdili z analizo realnih plazemskih vzorcev bolnikov z epilepsijo na stabilni protiepileptični terapiji.

Ker je TDM smiselno izvajati na najbolj stroškovno ekonomičen, za bolnika primeren in klinično uporaben način, se je v zadnjih letih pokazala kot primerna alternativa za tradicionalne plazemske vzorce metoda s posušenimi krvnimi madeži (dried blood spots, DBS). Da bi potrdili možnost zamenjave plazemskih vzorcev z DBS za TDM pri epilepsiji, smo razvili dve občutljivi metodi LC-MS/MS za določanje LTG in njegovega glavnega metabolita LTG-N2-glukuronida ter za OXC in karbamazepin ter njunih metabolitov v vzorcih DBS. Metodi smo validirali in dodatno ovrednotili tudi vpliv specifičnih parametrov, kot so hematokrit in volumen nanesenega vzorca krvi v vzorcih DBS. Izvedli smo tudi klinično validacijo, s čimer smo potrdili konsistentnost pridobljenih rezultatov in dokazali, da so vzorci DBS ustrezni za rutinski TDM.

V drugem delu doktorske naloge smo izvedli klinični študiji, v kateri smo vključili bolnike z epilepsijo, ki se zdravijo z LTG ali OXC. Razvite metode smo uporabili za meritev koncentracij LTG in OXC ter njunih metabolitov v plazemskih vzorcih in vzorcih DBS. Izmerjene koncentracije v bioloških vzorcih

smo uporabili za razvoj farmakokinetičnih modelov z uporabo nelinearnega modeliranja mešanih učinkov. Prvo klinično študijo smo izvedli na 100 odraslih bolnikih z epilepsijo, ki se zdravijo z LTG. Namen te farmakokinetične analize je bil kvantitativno ovrednotiti vpliv genetskih dejavnikov (genetski polimorfizmi metabolnih encimov /UDP-glukuronoziltransferaze: UGT1A4 in UGT2B7/ in prenašalcev /P-glikoprotein ABCB1 in prenašalec organskih kationov SLC22A1/) ter vpliv demografskih, biokemijskih in kliničnih dejavnikov na farmakokinetiko LTG. Pri razvoju modela smo upoštevali tudi izmerjene koncentracije neaktivnega metabolita LTG-N2-glukuronida, da bi dobili boljši vpogled v metabolizem LTG. Ugotovili smo, da na farmakokinetiko LTG vplivajo polimorfizmi UGT2B7, telesna masa, ledvična funkcija, kajenje in sočasno zdravljenje z encim inducirajočimi ali inhibirajočimi zdravili. Na očistek metabolita sta vplivala bolnikova ledvična funkcija in telesna masa. V drugo klinično študijo smo vključili 18 pediatričnih bolnikov z epilepsijo, starih od 6 mesecev do 3 let, ki se zdravijo z OXC. Razvili smo populacijski farmakokinetični model s sočasnim prileganjem izmerjenim koncentracijam OXC in koncentracijam aktivnega metabolita MHD. Ovrednotili smo vpliv relevantnih dejavnikov za pediatrično populacijo na očistek OXC in MHD. Končni model je vključeval alometrično skalirano telesno maso in zrelost metabolnih funkcij, s čimer smo pojasnili znaten del interindividualne variabilnosti v farmakokinetiki. Ugotovitve raziskave pri otrocih bodo pripomogle k boljšemu razumevanju farmakokinetike OXC in bodo omogočile bolj kontrolirano zdravljenje.

Menimo, da so razvite analizne metode za terapevtsko spremljanje koncentracij protiepileptičnih učinkov in nekaterih njihovih metabolitov primerna analizna podpora za optimalno izvedbo farmakokinetičnih študij in rutinsko TDM v klinični praksi. Razvita populacijska modela za LTG in OXC na osnovi redkih meritev plazemske koncentracije omogočata optimizacijo in individualizacijo zdravljenja in na ta način lahko prispevata k povečanju učinkovitosti zdravljenja s PEZ in zmanjšanju pojavnosti neželenih učinkov.



Slika 1. Slikovni povzetek eksperimentalnega dela naloge. Populacijsko farmakokinetično modeliranje podatkov, pridobljenih iz rutinskega terapevtskega spremljanja koncentracij.

Clinical Pharmacokinetics of Lamotrigine, Oxcarbazepine, and Topiramate in Patients with Epilepsy

DANIELA MILOSHESKA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Iztok Grabnar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Tomaž Vovk**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

In clinical practice clinical pharmacokinetics is applied to therapeutic drug monitoring (TDM) for medicines that are characterized with a narrow therapeutic range and a large inter-individual variability in pharmacokinetics. TDM is a multi-disciplinary clinical specialty which aims at improving patient care by individually adjusting the dose of medicines for which clinical experience or clinical trials have shown an improved outcome in general or special populations. TDM is initiated for a number of antiepileptic medicines (AEDs) and is used to establish optimal therapy regimens in individual patients. This is particularly due to the episodic nature of epileptic seizures and difficulties to assess the clinical efficacy of AEDs. Initially TDM was employed in clinical practice for the old generation of AEDs due to the complex and variable pharmacokinetics. On the other hand, the benefit of TDM for the new generation of AEDs is often questioned as they have more favourable pharmacokinetics, a wider therapeutic range, reduced interaction profile, better tolerability and adverse effects profile. Therefore, future research is needed to better document the value of TDM of the new AEDs in clinical practice. The aim of the doctoral thesis was to provide deeper insight into the clinical pharmacokinetics of lamotrigine (LTG), oxcarbazepine (OXC) and topiramate (TPM), representatives of the second generation AEDs.

Suitable biological samples and the availability of analytical methods for the quantification of the medicines and their metabolites are needed for a successful study of clinical pharmacokinetics of any medicine. Therefore, firstly, we developed and validated analytical methods for quantification of the AEDs and their main metabolites in plasma samples. A simple, selective, sensitive, and reproducible HPLC method with UV detection, suitable for routine TDM of the most commonly used old and new AEDs and some of their metabolites including lamotrigine, oxcarbazepine and its active metabolite 10-monohydroxycarbazepine (MHD), was developed and validated. Since TPM is unsuitable for conventional detection due to the specific molecular structure characterized by absence of chromophoric groups, we developed a simple, sensitive and inexpensive HPLC method with fluorescence detection by using precolumn derivatization with fluorescent labeling agent 4-chloro-7-nitrobenzofuran for its quantification in plasma samples. Additionally, we developed and validated a simple, sensitive and reliable analytical method for simultaneous quantification of TPM and its main metabolites: 2,3-desisopropylidene TPM; 4,5-desisopropylidene TPM; 10-hydroxy TPM; and 9-hydroxy TPM in human plasma samples based on liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Suitability of the developed methods for routine measurements was confirmed by the analysis of real plasma samples from patients with epilepsy on stable AEDs therapy.

Traditionally, TDM of AEDs is performed by using plasma samples. However, nowadays, dried blood spots (DBS) are recognized as a convenient alternative sample for routine TDM. Therefore, in order to assess whether DBS samples can be used as a substitute to plasma samples for determining AEDs we developed two sensitive LC-MS/MS methods for the quantification of LTG, OXC, carbamazepine and their main metabolites in DBS samples. The methods were fully validated and the effects of haematocrite and blood spot volume on analyte concentrations as additional parameters specific for the DBS methods were evaluated. Moreover, clinical validation was performed in order to ensure consistency of the results obtained from DBS samples with those obtained from traditional plasma samples.

In the second part of the doctoral thesis two clinical studies involving patients with epilepsy on stable LTG or OXC therapy were conducted. Previously developed methods were used for quantification of LTG, OXC and their main metabolites in plasma and DBS samples. Measured concentrations were further used for the development of pharmacokinetic models for OXC and LTG by employing non-linear mixed effects

modeling approach for the purpose of therapy individualisation and optimisation in an individual patient group or in a specific group of patients.

The first clinical study was conducted in adult population and included 100 patients with epilepsy on LTG as mono or adjunctive therapy. The aim of the study was to develop a population pharmacokinetic model for quantitative evaluation of the influences of genetic variants in metabolic enzymes (UDP-glucuronosyltransferases: UGT1A4 and UGT2B7) and transporters (P-glycoprotein: ABCB1 and organic cation transporter: SLC22A1) on LTG pharmacokinetics while taking into account the influence of various clinical, biochemical and demographic factors. The study incorporated also the measurements of the main metabolite LTG-N2-glucuronide to provide better insight into the LTG metabolism. Results from the pharmacokinetic analysis showed that LTG pharmacokinetics are affected by UGT2B7 polymorphisms, body weight, renal function, smoking and co-therapy with enzyme inducing or inhibiting medicines, while clearance of LTG-N2-glucuronide depends on renal function and body weight. In the second pharmacokinetic study we included 18 paediatric patients (infants and toddlers, age 0.5 to 3 years) on stable OXC therapy. We aimed at developing a population pharmacokinetic model by simultaneous incorporation of the concentration measurements of the parent drug OXC and its active metabolite MHD while evaluating the influence of the relevant factors related to the paediatric population. The model that included both alometric scaling of body weight and maturation function on clearance explained the interindividual variability in OXC pharmacokinetics and was adopted as the final model. The results from the population analysis provide new insights into the OXC pharmacokinetics and can be used for dosing adjustments for a more effective use of the drug in the paediatric population.

We believe that developed analytical methods for measurements of the AEDs and their main metabolites can be used as an analytical tool to better design and perform future pharmacokinetic studies as well as for routine TDM in clinical practice. The results of our pharmacokinetic studies provide an important contribution to understanding the variability in pharmacokinetics of the antiepileptic drugs that were our main interest of research. Additionally, our findings can be valuable as an aid for dosing adjustments in patients with epilepsy and can be used for therapy optimisation and individualisation in routine clinical practice.

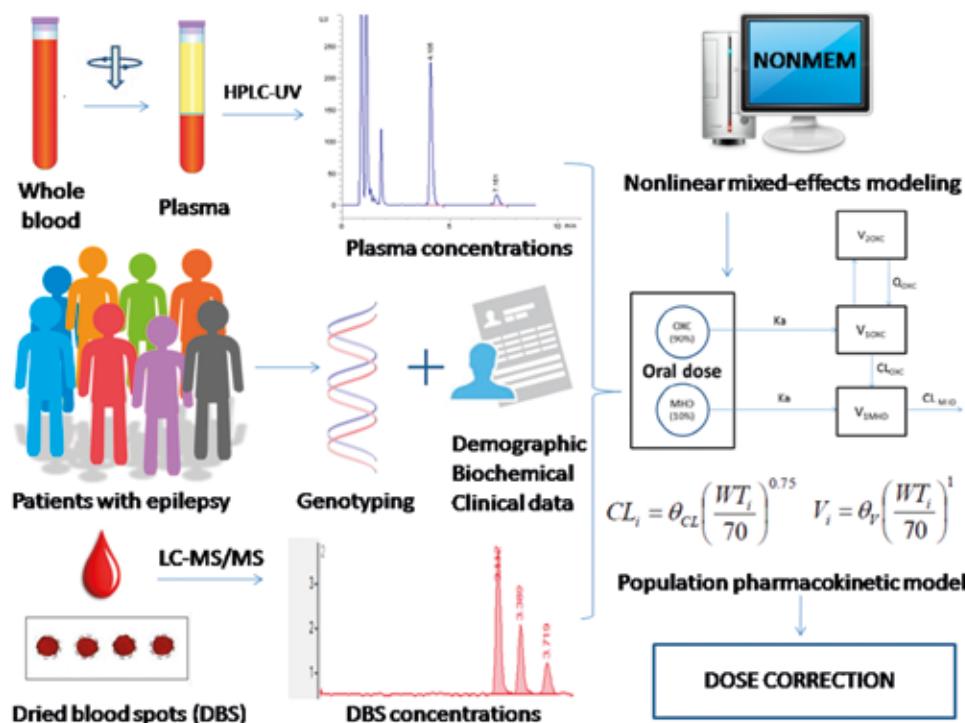


Fig. 1. Population pharmacokinetic modelling of routine therapeutic drug monitoring data.



Dr. RENATA REŽONJA KUKEC

Znanost naj koristi ljudem

Renato Režonja Kukec je že v osnovni šoli bolj zanimalo naravoslovje, predvsem delovanje človeškega telesa. Po končani Gimnaziji Franca Miklošiča v Ljutomeru se je odločala med študijem medicine in farmacije in se na koncu vpisala na Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani. Toda vez z medicino je vseskozi ohranjala. V doktorskem delu, ki ga je tako kot diplomsko delo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja opravljala tudi na Univerzitetni kliniki Golnik, je primarno raziskovala farmakokinetiko citostatika etopozida, ki je prva izbira pri zdravljenju drobnoceličnega pljučnega raka. Izzivom predana Prekmurka je od leta 2009, ko se je vpisala na podiplomski študij biomedicine, zaposlena na oddelku Medicinske raziskave in farmakovigilanca v Krki. Kot samostojna raziskovalka večkrat s pridom uporabi znanje in izkušnje, ki jih je pridobivala med doktorskim študijem.

»Namen moje doktorske raziskovalne naloge je bil optimizirati zdravljenje s kapsulami citostatičnega zdravila pri bolnikih z drobnoceličnim pljučnim rakom,« poudari doktorica znanosti in še pojasni, da se omenjeno zdravilo zaradi variabilne farmakokinetike najpogosteje uporabi intravensko, bolniki pa morajo biti hospitalizirani. »Z optimizacijo peroralnega odmerka etopozida bi lahko onkološkim bolnikom omogočili zdravljenje v domačem okolju, obenem pa gre tudi za stroškovno učinkovitejše zdravljenje,« je prepričana Renata Režonja Kukec, ki si je to raziskovalno področje izbrala zaradi želje po sodelovanju v klinični študiji.

»Raziskava je prispevala tudi k vse bolj razvijajoči se veji v znanosti, farmakogenetiki, ki z odkrivanjem genetskih lastnosti posameznika omogoča prilagajanje farmakoterapije, da je za bolnika čim bolj varna in učinkovita. »Farmakokinetični model, ki smo ga razvili, je uporaben v klinični praksi, pred tem pa priporočamo validacijo s klinično študijo,« pove nagrajenka in poudari, da so najboljše raziskovalne naloge rezultat uspešnega timskega dela, ki temelji na iskreni in učinkoviti komunikaciji ter navdušenju vseh sodelujočih.

In prav tako vzdušje je prevladovalo med strokovnjaki, ki so sodelovali pri njenem doktorskem delu. Bilo je namreč tudi organizacijsko in logistično zahtevno, saj je potekalo v dveh ustanovah – na Univerzitetni kliniki Golnik in Fakulteti za farmacijo. Mentor prof. dr. Aleš Mrhar je dobro povezal vse sodelujoče, k uspešnemu kliničnemu delu pa je pomembno prispevala tudi onkologinja prof. dr. Tanja Čufer.

»Da sem lahko dosegla cilj in leta 2015 končala doktorski študij, sem se moralna marsičemu odreči. Študirala sem ob delu, zato prostega časa ni bilo veliko. Tudi mož je takrat pripravljal doktorat, tako da sva ob večerih velikokrat sedela vsak za svojim

računalnikom in študirala ali pa skupaj reševala kakšen problem, ne nazadnje sva oba farmacevtva,« svojo podiplomsko študijsko pot opisuje srčna raziskovalka in od lanske jeseni tudi mamica sinčku Davidu, ki mu trenutno posveča večino časa. Veseli se tudi skupnih družinskih trenutkov ob koncu tedna, ko se radi zapeljejo do morja ali pa si z možem ogledata kakšen dober film.

Krkine nagrade, ki že dolga leta prepoznavajo in nagrajujejo znanstveno odličnost raziskovalcev in s tem povezujejo akademski svet in gospodarstvo, ceni in spoštuje. »K prijavi sta me po eni strani spodbudila ugled in znanstvena teža Krkinih nagrad, po drugi strani pa smo ugotovitve žeeli predstaviti gospodarstvu, ki bi z naprednimi farmacevtskimi oblikami morda lahko prispevalo k boljši kakovosti življenja onkoloških bolnikov. Znanost naj koristi ljudem,« konča Krkina nagrajenka, ki ji ta nagrada pomeni dodatno motivacijo na vseh področjih njenega delovanja.

Razvoj orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom

RENATA REŽONJA KUKEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

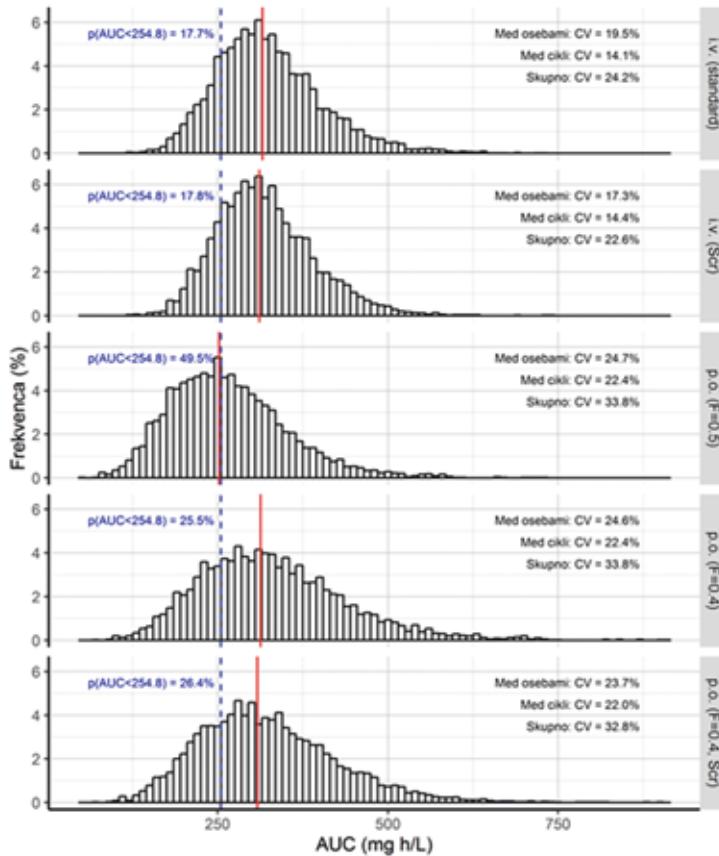
Mentor: **Aleš Mrhar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Tanja Čufer**, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Citostatik etopozid se v kombinaciji s cisplatinom ali karboplatinom uporablja kot prva izbira za zdravljenje drobnoceličnega pljučnega raka (SCLC). Zanj sta značilni intra- in interindividualna variabilna farmakokinetika, ki vodita v nepredvidljivo varnost in učinkovitost. Variabilnost je še posebej izrazita pri peroralnem (p.o.) načinu aplikacije zdravila, zato se v praksi večinoma uporablja intravenska (i.v.) oblika. Vendar pa ima p.o. aplikacija v primerjavi z i.v. številne prednosti tako z vidika bolnika kot z vidika optimizacije stroškov zdravljenja. To je bil razlog, da smo se odločili optimizirati p.o. odmerek etopozida, ki je tako kot i.v. trenutno prilagojen bolniku samo na podlagi telesne površine.

Dela smo se lotili s pregledom literature, v kateri smo iskali dejavnike, ki vplivajo na obseg absorpcije etopozida in na možnosti za njeno izboljšanje. Odločili smo se, da bomo odmerek etopozida poskušali optimizirati z Bayesovim ocenjevanjem individualnih farmakokinetičnih parametrov, za kar je potreben populacijski farmakokinetični model. Za razvoj tega modela smo potrebovali podatek o koncentracijah etopozida po znanem odmerku, zato je bilo treba izvesti farmakokinetično študijo in določiti plazemske koncentracije etopozida. Študijo smo začeli z razvojem protokola, v katerem smo med drugim določili, da bo bolnik v prvem krogu zdravljenja dobil etopozid i.v., v vseh ostalih krogih pa p.o. Še prej smo razvili analizno metodo za določanje koncentracij etopozida v plazmi. Po tej metodi smo med študijo rutinsko analizirali več kot 600 vzorcev bolnikov s SCLC. Dodatno smo razvili analizno metodo za določanje koncentracije etopozida v posušenem krvnem madežu (DBS). Ta metoda je za bolnika primernejša in omogoča enostavnejšo obdelavo vzorca. S primerjavo koncentracij etopozida v plazmi in posušenem krvnem madežu pri nekaterih bolnikih smo ugotovili, da so ob upoštevanju hematokrita (Hct) $[C_{PL} = C_{DBS}/(1-Hct)]$ koncentracije etopozida v posušenem krvnem madežu primerljive s plazemskimi koncentracijami etopozida, zato je lahko metoda določanja koncentracij v posušenem krvnem madežu alternativa metodi določanja plazemskih koncentracij etopozida.

Želeli smo preveriti, kateri dejavniki vplivajo na plazemske koncentracije etopozida. Za ta namen smo določili izbrane polimorfizme v genu MDR1, ki bi teoretično lahko vplivali na farmakokinetiko etopozida. Iz bolnišnične dokumentacije smo pridobili še demografske podatke o bolnikih, rezultate biokemijskih preiskav in podatke o farmakoterapiji. Vpliv vseh teh dejavnikov smo preverili s populacijskim farmakokinetičnim modelom, ki smo ga razvili v programu NONMEM. Ugotovili smo, da izmed vseh testiranih spremenljivk na farmakokinetiko etopozida značilno vplivajo bolnikove lastnosti in sočasno aplicirana zdravila, medtem ko vpliv genetskih dejavnikov ni bil značilen. Te dejavnike smo kot spremenljivke vključili v končni farmakokinetični model. Z njim smo določili tudi izpostavljenost (površina pod plazemsko koncentracijsko krivuljo, AUC) in variabilnost AUC etopozida med bolniki in med posameznimi krogi zdravljenja po obeh načinih aplikacije. Pokazalo se je, da so možnosti za učinkovito zdravljenje po p.o. aplikaciji v primerjavi z i.v. slabše (manjši odstotek bolnikov z $AUC > 254,8 \text{ mgh/L}$). Skupna variabilnost kot tudi interindividualna variabilnost in variabilnost med krogi zdravljenja je bila po p.o. aplikaciji etopozida višja (slika 1).



Slika 1. AUC etopozida (rdeča črta) in njegova variabilnost (med osebami, med cikli, skupno) po različnih režimih odmerjanja. Verjetnost za odstotek bolnikov z AUC, nižjim od 254,8 mgh/L (modra črta), se med različnimi režimi odmerjanja razlikuje.

Preverili smo, ali se varnost in učinkovitost zdravljenja po p.o. in i.v. aplikaciji etopozida razlikujeta. Primerjali smo neželene učinke v p.o. krogih in i.v. krogih. Rezultate glede učinkovitosti, tj. odgovora na zdravljenje, preživetja brez napredovanja bolezni in skupnega preživetja v naši študiji smo primerjali z rezultati iz literature po i.v. aplikaciji. Varnost in učinkovitost se po i.v. in p.o. aplikaciji nista razlikovali. Potrditev, da je iskanje možnosti za optimizacijo p.o. odmerka etopozida pri posameznem bolniku korak v pravo smer, je tudi ugotovljen presenetljivo visok delež nevtropenij, katerih stopnja je bila povezana z višino plazemske koncentracije etopozida.

Pokazali smo, da z izvedbo ustrezno zasnovane klinične študije, razvojem in uporabo ustrezne metode za določanje etopozida v plazmi ter razvojem ustreznega farmakokinetičnega modela lahko optimiziramo zdravljenje s p.o. etopozidom. Ugotovili smo sicer, da je z vidika farmakokinetične variabilnosti in boljših možnosti za učinkovito zdravljenje boljša i.v. aplikacija, vendar je tako pri i.v. kot pri p.o. načinu dajanja etopozida priporočljiva optimizacija odmerka glede na bolnikovo ledvično funkcijo in upoštevanje dejstva, da znaša obseg absorpcije po p.o. dajanju v povprečju 40 %.

Development of Tools for Optimization of Oral Etoposide Dose in Treatment of Small-cell Lung Cancer Patients

RENATA REŽONJA KUKEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Tanja Čufer, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik

Etoposide is used in combined therapy with cisplatin or carboplatin as first-line treatment for small cell lung cancer (SCLC). Etoposide pharmacokinetics is intra- and inter-individually variable, leading to unpredictable safety and efficacy. The intravenous formulation has been used more extensively as the variability is distinctive especially after oral administration. However, in comparison with intravenous administration, oral administration has numerous advantages for the patient as well as economic benefits. This was our reason for optimization of oral etoposide dose which is currently adjusted only to the body surface area.

Our research was started with the review of the literature about factors which have an impact on bioavailability of etoposide and options for its improvement. We decided to optimise an etoposide dose using the Bayesian estimation of individual pharmacokinetic parameters with a population pharmacokinetic model. Data on etoposide concentrations after administration of the known etoposide dose was needed for the development of a population pharmacokinetic model. It was necessary to carry out the pharmacokinetic study and to determine etoposide plasma concentrations after the known dose of etoposide. The study was started with the development of a protocol in which we defined intravenous etoposide administration in the first cycle and oral administration in the following cycles. The analytical method for determination of etoposide concentrations in plasma had been developed before the start of the study. More than 600 samples from SCLC patients were routinely analysed using this method. In addition, the analytical method for determination of etoposide concentration in the dried blood spot was developed. This method is more patient-friendly and enables simpler sample handling. By comparing etoposide plasma concentrations and etoposide concentrations in the dried blood spot in some patients, it was ascertained that etoposide concentrations in the dried blood spot were comparable to etoposide plasma concentrations when haematocrit (Hct) $[C_{PL} = C_{DBS}/(1-Hct)]$ was considered. The method for determination of an etoposide concentration in the dried blood spot can be an alternative for determining etoposide plasma concentrations.

We wanted to check which factors influence plasma etoposide concentrations. The selected polymorphisms in the MDR1 gene which could theoretically influence etoposide pharmacokinetics were determined for this purpose. Additionally, patient's demographic data, biochemical results and data on pharmacotherapy were obtained from hospital records. The influence of all these data was tested with the population pharmacokinetic model developed in the NONMEM program. Of all the tested variables, etoposide pharmacokinetics was influenced by patient's characteristics and concomitantly administered medicines, while the influence of genetic factors was not significant. These factors were included as covariates into the final pharmacokinetic model. The exposure (AUC) and inter-subject and inter-cycle variability in etoposide's AUC after both routes of administration were determined using the final model. In comparison with intravenous administration, oral etoposide administration showed worse options for effective treatment (a lower percent of patients with $AUC > 254.8 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$). The overall variability as well as inter-individual variability and between-cycle variability were higher after oral administration (Figure 1).

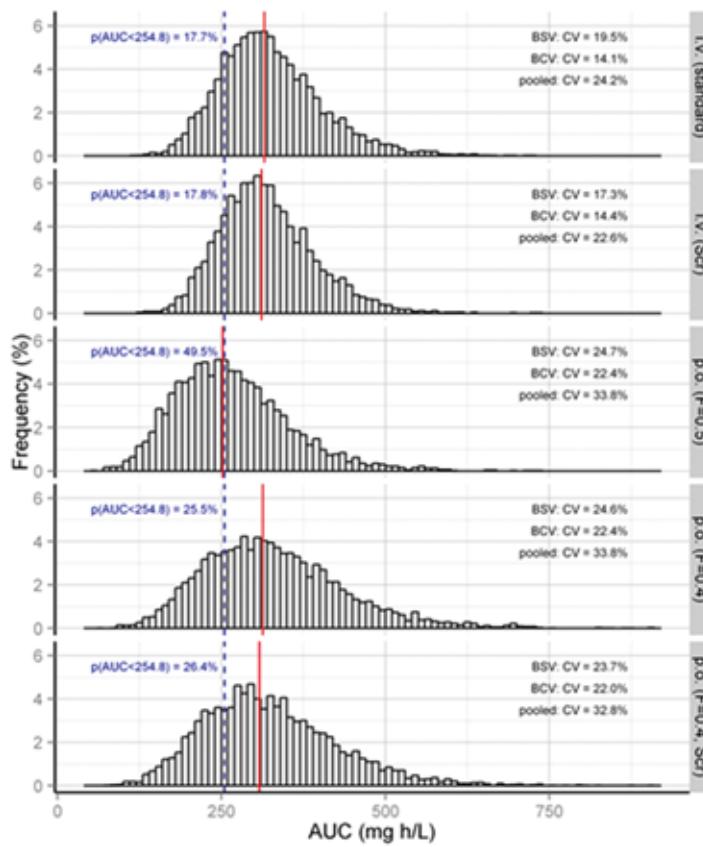


Figure 1. Etoposide AUC (red line) and its variability (BSV, BCV, pooled) after different dosing regimens. The probability for a percent of patients with AUC lower than 254.8 mg h/l (a blue dotted line) differs among various dosing regimens.

The existence of differences between oral and intravenous etoposide administration was examined. The adverse drug reactions in oral cycles were compared with intravenous cycles. The results of efficacy, i.e. response rate, progression-free survival and overall survival in our study, were compared with literature results after intravenous administration. The safety and efficacy did not differ between intravenous and oral administration. The confirmation that looking for possibilities for an oral etoposide dose optimization in an individual patient is a step in the right direction is also an estimated surprisingly high rate of neutropenias of which severity was related to the height of etoposide plasma concentrations.

It was shown that the appropriately performed clinical study, development and use of an appropriate method for the determination of etoposide in plasma and the development of an appropriate pharmacokinetic model provide optimization for oral etoposide treatment. Intravenous administration was better from the aspect of pharmacokinetic variability and higher probability for effective treatment. However, in both intravenous and oral etoposide administration, the dose optimization according to patient's renal function and an average bioavailability of 40% is recommended.



Dr. SARA SERŠEN

*Znanje in energija
za skupno dobro*

Saro Seršen je že od nekdaj podrobno zanimalo delovanje človeškega organizma. To je po končani Gimnaziji Šentvid pripomoglo k njeni odločitvi za študij na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Univerzi v Ljubljani. Tu je na podiplomskem študiju svoj znanstveni potencial usmerila predvsem na področje bioanorganske kemije, za kar jo je navdušil mentor prof. dr. Iztok Turel. Pod njegovim vodenjem je v doktorskem delu raziskovala vpliv posameznih funkcionalnih skupin oziroma ligandov pri ustvarjanju potencialnih učinkovin za zdravljenje raka. Mlada raziskovalka poudarja, da je v sodelovanju s slovenskimi in mednarodnimi inštitucijami prišla do pomembnih znanstvenih doganj, ki bodo v prihodnje lahko pripomogla k učinkovitim izboljšavam v zdravljenju bolnikov z rakom.

»V veliko čast si štejem, da je moje raziskovalno delo prepoznano kot izjemno in zato nagrajeno s Krkino nagrado za posebne dosežke,« je navdušena doktorandka Sara Seršen. S tem priznanjem je dobila tudi potrditev, da je na pravi poti. Pove tudi, da je bilo kar nekaj zanimivih in pomembnih ugotovitev iz njene raziskave že objavljenih v različnih znanstvenih člankih. »Nadaljnje raziskave še potekajo. Prepričana pa sem, da bi lahko veliko pripomogle k odkrivanju delovanja spojin, katerih mehanizem delovanja še ni popolnoma poznан. Če se bo izkazalo, da so takšne spojine resnično unikatne na določenem področju oziroma da so zelo učinkovite, jih bomo najverjetneje tudi patentirali, saj lahko v prihodnosti pomembno prispevajo k izboljšavam v zdravljenju rakavih bolnikov.«

Da je vloga mentorja pri raziskovalnem delu zelo pomembna, saj je prav on tisti, ki zna usmerjati mladega raziskovalca in ga voditi po pravi poti do skupnega cilja, pritrdi tudi Sara Seršen. »Moj mentor prof. dr. Iztok Turel je zame usklajeval sodelovanje s slovenskimi in mednarodnimi inštitucijami, s katerimi smo skupaj prišli do pomembnih znanstvenih spoznanj,« pojasni in doda: »Med doktorskim študijem tudi spoznaš, da delo raziskovalca ni le svobodno raziskovanje stvari, ki te zanimajo oziroma bi jih rad dokazal, ampak se moraš hkrati boriti tudi za denarna sredstva, ki so namenjena prihodnjim raziskavam. Pridobivanje projektov pa v današnjem času ni enostavno. Če želiš konkurirati drugim, tujim raziskovalcem, moraš trdno delati in biti dobro organiziran. Imam srečo, da prihajam iz Ljubljane in mi pot do fakultete in nazaj ni vzela veliko časa. Ker imam majhnega sinčka in si želim z njim preživeti čim več časa, se raziskovalnemu delu običajno posvetim tudi pozno v noč, ko se vse umiri.«

Krkina nagrjenka meni, da je v Sloveniji na splošno premalo povezovanja gospodarstva z znanostjo.

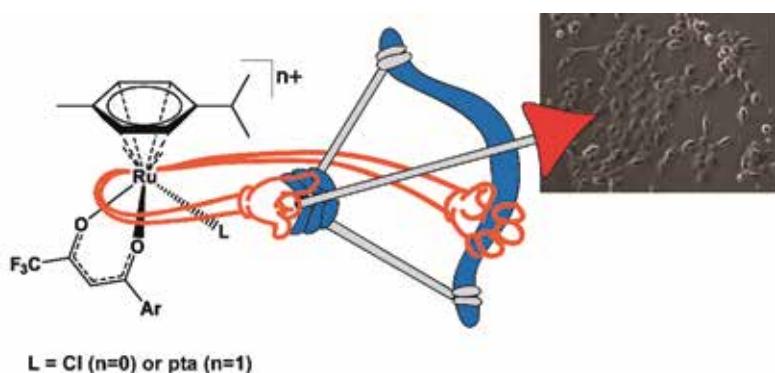
Krkine nagrade zagotovo pripomorejo k temu, da se lahko dobro znanstveno delo tudi primerno ovrednoti in nagradi. »K prijavi za Krkino nagrado me je pravzaprav spodbudila prijateljica, kajti sama sem kar nekoliko oklevala, zdaj pa sem ji neizmerno hvaležna, saj mi nagrada vlivajo veliko moči za naprej.« Kot pravi, še nima povsem začrtane poti za prihodnost, želi se izpopolniti še na kakšnem drugem (znanstvenem) področju in je pripravljena na vse izzive, ki jo še čakajo. »Vsekakor pa je moj namen, da svoje znanje in energijo pretvorim v nekaj, kar bo dobro za vse nas.«

Sinteza novih rutenijevih koordinacijskih spojin z možnimi biološkimi in katalitskimi učinki

SARA SERŠEN, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Iztok Turel**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

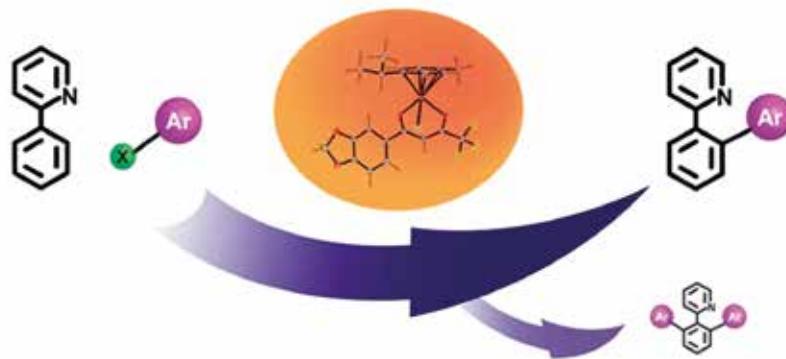
V šestdesetih letih prejšnjega stoletja so odkrili, da molekula cisplatin učinkovito zavira nadaljnje razmnoževanje rakavih celic v telesu. V prvih desetletjih po odkritju so se znanstveniki večinoma usmerili v razvijanje analognih kompleksov s platino, s katerimi so želeli razširiti spekter delovanja zdravila, omiliti stranske učinke in uspešno uničiti tudi proti cisplatinu odporne tumorje. Želja po čim boljšem zdravilu za zdravljenje raka je vodila do zdravilnih učinkovin s t. i. ciljno terapijo, pri kateri spojine specifično uničijo le rakave celice in ne pride do poškodb zdravih celic, kot je običajno pri klasični kemoterapiji. V zadnjem času se je pokazalo, da so na tem področju zelo perspektivne predvsem rutenijeve spojine. Dve učinkovini z rutenijem sta trenutno v drugi fazi kliničnih raziskav. Sinteza organorutenijevih spojin se je v zadnjih letih močno razširila, saj takšni kompleksi vključujejo nekatere za zdravilo pomembne lastnosti, kot sta stabilnost spojin in dobra reaktivnost kovine z različnimi vrstami ligandov. Žal pa mehanizmi delovanja zaenkrat še niso popolnoma razjasnjeni. Znano je le, da interagirajo z makromolekulami (encimi, proteini, DNA), ki so ključne v celičnih procesih in specifične za rast tumorskih celic.

Moje raziskovalno delo se je osredotočilo predvsem na sintezo in karakterizacijo novih rutenijevih spojin, ki so lahko potencialno uporabne kot učinkovine proti raku in tudi za katalizo organskih reakcij. S pripravo več podobnih kompleksov sem raziskovala učinke na lastnost kompleksa, ki jih določene spremembe povzročijo. V dosedanjih raziskavah so bili uspešno sintetizirani rutenijevi(II) organokovinski kompleksi $[(n^6-p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{O},\text{O}-\text{F}_3\text{CCOCHCOAr})\text{L}]^{n+}$ (Ar = fenil, 2-naftil, 2-tienil, 2-furil, 1,3-benzodioksolil, 4-klorofenil, L = Cl ($n=0$) ali pta ($n=1$)). Oba tipa kompleksov, tako »klorido« kot »pta« (slika 1), sta bila popolnoma fizikalno-kemijsko okarakterizirana s pomočjo NMR, IR, UV-VIS, ESI-MS, CHN elementne analize in rentgenske kristalne analize. Vseh 12 novih spojin je bilo testiranih na več celičnih linijah, pri čemer so pokazale neaktivnost na zdrave celice keranocitov in visoko protirakovno aktivnost na dveh tipih celic CH1 in MG63 (kostni rak in rak jajčnikov). Na primeru celic kostnega raka MG63 pa so se »pta kompleksi« pokazali za bolj aktivne v primerjavi s klorido analogi. Ugotovili smo, da »klorido spojine« pospešujejo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in so precej citotoksične, medtem ko njihovi pta analogi delujejo na povsem drugačen način in jih uvrščamo med citostatike.



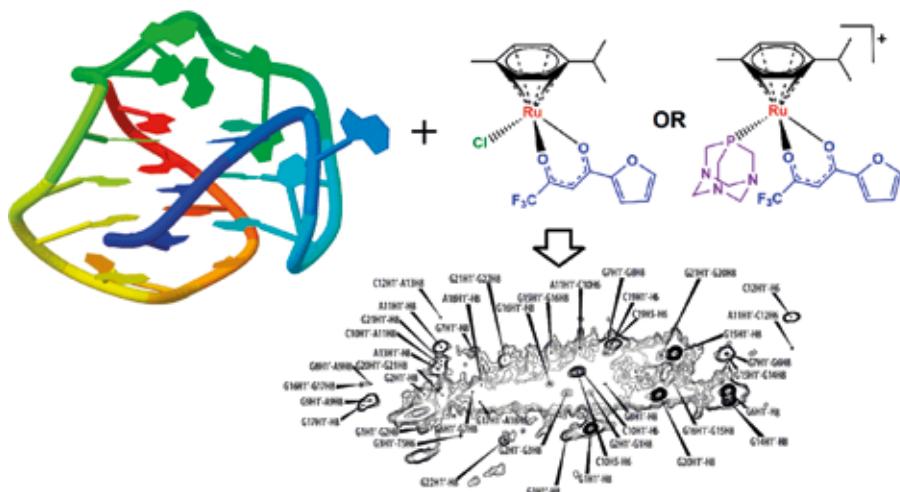
Slika 1. Organorutenijevi(II) kompleksi učinkovito vplivajo na zaviranje rasti rakavih celic.

V več znanstvenih študijah so pri določenih rutenijevih spojinah zdobrimi predispozicijami za bodoča zdravila že dokazali tudi veliko sorodnosti s podobnimi spojinami, ki so specifične za stereoselektivnost v organski sintezi. Pri rutenijevih kompleksih, bolj znanih kot Grubbsovi katalizatorji, se je pokazalo, da imajo veliko vlogo pri inhibiciji encimskih reakcij in vplivajo na celično rast ter celični metabolizem. Dokazali smo, da so omenjene »klorido spojine« tudi katalitsko aktivne, in sicer aktivirajo aromatske vezi C–H, saj omogočajo arilacijo aromatskih spojin, kot je 2-fenilpiridin (slika 2). Omenjeni postopek namreč omogoča enostavno pripravo multiarilnih sistemov, ki jih najdemo v biološko pomembnih spojinah, konjugiranih materialih, ali uporabo pri sintezi novih ligandov. Običajno za večjo učinkovitost katalitske reakcije preverjamo, kakšen vpliv imajo pri tem temperatura, čas mešanja, tlak, topilo. Mi pa smo želeli ugotoviti, kako sprememba katalizatorja vpliva na izkoristek reakcije. Na ta način smo ugotovili, da že zelo majhna sprememba v strukturi spojine popolnoma spremeni selektivnost in izkoristek katalitske reakcije. V našem primeru se je pokazalo, da je večja sterična oviranost katalizatorja zelo pomembna za boljši izkoristek reakcije.



Slika 2. Katalitska reakcija orto-arylacije 2-fenilpiridina z organorutenijevimi(II) kompleksi.

Da bi dobili vpogled v to, kako se takšne spojine obnašajo v bioloških sistemih, smo z jedrsko magnetno resonanco raziskovali, kako se obnašajo v vodnih medijih. Po pričakovanjih smo ugotovili, da se klorido spojine »aktivirajo« v vodi, medtem ko so spojine s pta obstojne in se v vodi ne spreminja. Spremljali smo tudi obnašanje nekaterih sintetiziranih spojin ob prisotnosti makromolekul, kot je G-kvadruplex (slika 3). Glede na to, da kakšnih kovalentnih povezav med njimi nismo zaznali, predvidevamo, da DNA ni glavna tarča organorutenijevih spojin. Povsem možno je, da za razliko od cisplatina te spojine vplivajo na proteine oziroma encime ali pa vplivajo na nekatere redoks procese v celicah in tako povzročijo smrt celic.



Slika 3. Raziskovanje interakcij med različnimi organorutenijevimi(II) kompleksi in G-kvadrupleksom z jedrsko magnetno resonanco.

Synthesis of Novel Ruthenium Complexes with Possible Biological and Catalytic Properties

SARA SERŠEN, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Iztok Turel**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

It was discovered in the 1960s that the cisplatin molecule exhibits excellent anticancer properties. Moreover, in the first decades after the discovery scientists focused on developing analogue complexes with platinum. The main strategy was to develop a compound with a broad spectrum of activity, less side effects and the ability to overcome cisplatin resistance. Research for a better medicine led to discovery of the so-called targeted therapy, where the complexes specifically attack cancer cells, leaving healthy cells unharmed, which differs from classical chemotherapy. Lately, ruthenium compounds have become recognized as very perspective among therapeutic drugs. Two compounds with ruthenium have already been studied in the preclinical and in the first two stages of clinical trials. The synthesis of organoruthenium drugs has spread widely in the past few years due to important properties these complexes obtain, such as good stability and great reactivity with several types of ligands. However, the mechanism of action in these systems has not yet been completely elucidated. So far it is known that ruthenium complexes interact with macromolecules (enzymes, proteins, DNA) that are involved in cellular processes, specifically in the growth of tumorous cells.

Our research was mainly focused on the synthesis and characterisation of novel ruthenium complexes that can be prospectively used as active ingredients in cancer medicines or as catalysts in organic reactions. The preparation of similar complexes with some small difference allowed us to explore the effects these differences cause to the compound properties. Organoruthenium(II) complexes $[(n^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{O},\text{O}-\text{F}_3\text{CCOCHCOAr})\text{L}]^{n+}$ ($\text{Ar} = \text{phenyl, 2-naphthyl, 2-tienyl, 2-furyl, 1,3-benzodioxolil, 4-chlorophenyl}$. $\text{L}=\text{Cl}$ ($n=0$) or PTA ($n=1$)) were successfully synthesised. Both types of complexes, chloride and PTA complexes, (Figure 1) were fully characterised with various physicochemical methods, such as NMR, IR, UV-VIS, ESI-MS, CHN elemental analysis and X-ray structural analysis. All 12 novel compounds were tested on different cell lines, where they were inactive against nonmalignant keratinocytes, but displayed variable activity against two cancer cell models, osteosarcoma CH1 and ovarian MG63 cell line. In the MG63 cell line, the complexes with PTA ligand tend to be more active in comparison with their chlorido complexes. Moreover, chlorido complexes were shown to induce the reactive oxygen species (ROS) production and were shown to be cytotoxic, whereas their PTA analogues have different mechanism of action and tend to be more cytostatic.

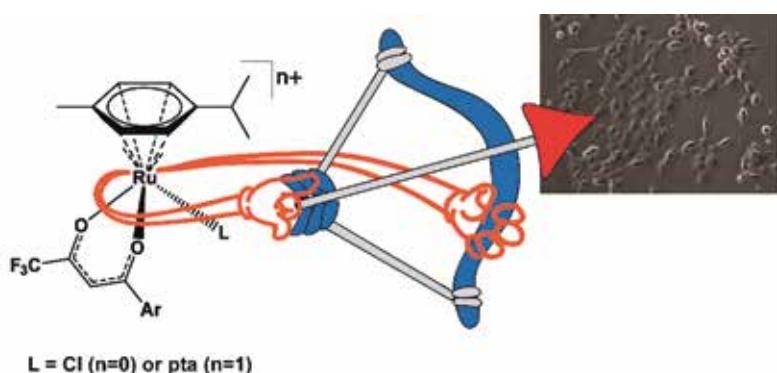


Figure 1: Organoruthenium(II) complexes have a great impact on the growth of cancer cells.

It has been demonstrated in many scientific studies that the prospective anticancer ruthenium compounds show similarities with complexes that are specific for stereoselectivity in organic synthesis. It has been shown for the group of ruthenium complexes, more known as Grubbs' catalysts, that they have an important role in inhibition of enzymatic reactions and affect the cellular growth and cellular metabolism. We have shown that the mentioned chlorido complexes have catalytic activity, more specifically in activation of aromatic C–H bonds and hence the ability to arylate compounds, such as 2-phenylpyridine (Figure 2). This allows us to easily synthesise multiaryl systems that can be found in biologically important compounds, conjugated materials or as a tool to synthesise new ligands. In order to enhance the yield of a catalytic reaction, scientists mostly optimise the temperature, time, pressure and different solvents. Our goal was to explore how the change of a catalyst effects the yield of such a catalytic reaction. The results have shown that even a small difference in the structure of a catalyst has an enormous effect on the selectivity and the yield. In our case, the higher steric hindrance was necessary for the higher yield.

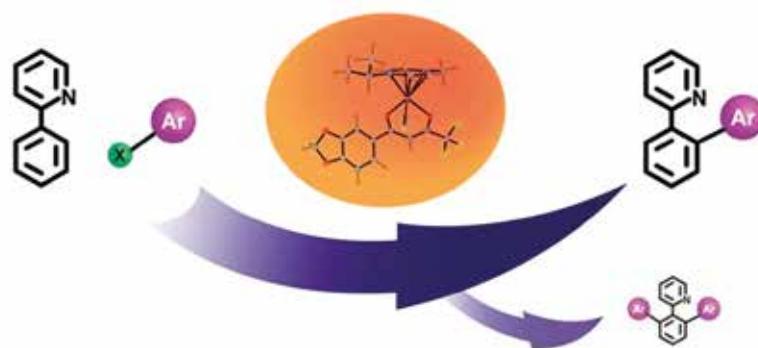


Figure 2: Catalytical reaction ortho-arylation of 2-phenylpyridine with organoruthenium(II) complexes.

To get an insight into the mechanism of action of our synthesised complexes, few experiments with nuclear magnetic resonance were performed. As we expected, the activation of chlorido complexes is the result of their hydrolysis in water, while the PTA complexes are quite stable in aquatic media. Moreover, the interactions with biomolecules, such as G-quadruplexes, were studied (Figure 3). As almost no differences were found between these two groups of complexes, we came to a conclusion that nucleobase binding is probably not the cause for their anticancer properties, as it is in the case of cisplatin. However, it is likely that such compounds impact some redox processes in the cells and, hence, cause the cell death.

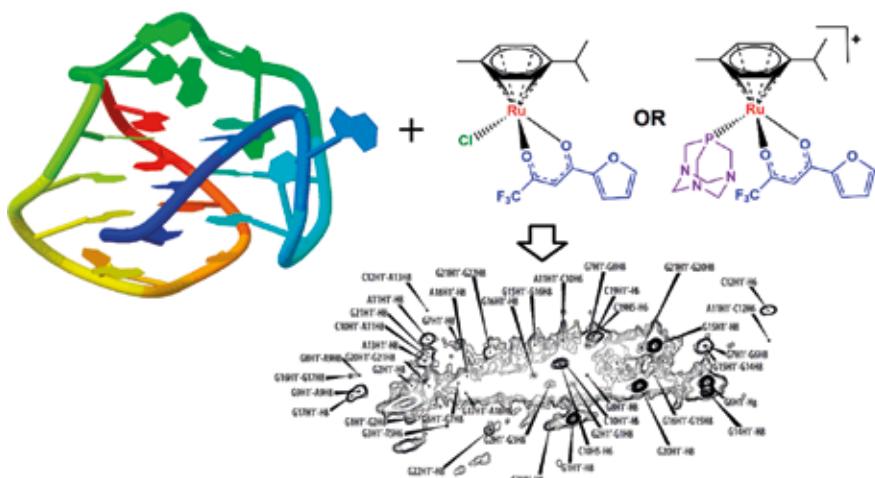


Figure 3: Exploration of interaction between different organoruthenium(II) complexes and G-quadruplex with the use of nuclear magnetic resonance.



Dr. LUKA ŠENICA

*Do najboljših rešitev
visoko v gorah*

Luka Šenica je naravoslovje vzljubil že kot osnovnošolec, ko se je začel spoznavati s prvimi kemijskimi poskusi. Na Gimnaziji Novo mesto se je njegovo navdušenje nad raziskovanjem, zlasti na področju kemije, le še poglobilo. Vpisal se je na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in na Katedri za organsko kemijo diplomiral na področju heterociklične kemije. Primarno področje njegove doktorske naloge, ki jo je pod mentorstvom prof. dr. Jurija Sveteta uspešno zagovarjal, je bila priprava modificiranih peptidov in njihovih heterocikličnih analogov. Danes je Luka Šenica zaposlen v Krkinem Razvoju analitike, kjer se ukvarja z reologijo, kar mu bo omogočilo raziskovanje njene uporabe v farmaciji.*

»Najprej sem želel postati meteorolog, vendar sem se ob spoznavanju prvih kemijskih reakcij kmalu prepričal, da sva si s kemijo ,na ti!« pravi mladi doktorand, ki je že kot srednješolec veliko časa namenil kemijskemu raziskovanju. Leta 2005 je prejel zlato Preglovo plaketo na državni ravni, s posebnim priznanjem pa ga je za predano raziskovalno delo nagradila tudi novomeška občina. Gimnazijo je končal kot zlati maturant in se vpisal na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani, kjer se je prava znanstvenoraziskovalna pot šele začela.

Ena od poti ga je med pripravo diplomske naloge vodila tudi na trimesečno študijsko prakso v Dublin na Irsko, kjer se je v raziskovalni skupini prof. dr. Declana Gilheanya spoznal z enantioselektivnimi oksidacijami fosfinov. »Kmalu po vrnitvi v Slovenijo sem diplomiral na področju heterociklične kemije in se kot mladi raziskovalec zaposlil na Katedri za organsko kemijo.« Pod mentorstvom prof. dr. Jurija Sveteta, ki ga je usmerjal že na dodiplomskem študiju, se je z vso vnemo lotil še doktorskega študija, kjer je bilo primarno področje njegovega raziskovanja priprava modificiranih peptidov in njihovih heterocikličnih analogov. Ob tem pojasni, da je namen modifikacije peptidov povečanje njihove stabilnosti, a morajo hkrati ohraniti neko aktivnost. »Za to tematiko me je mentor navdušil že pri diplomski nalogi, najpomembnejša pa je bila moja želja po raziskovanju še skritega kotička v svetu peptidov in izzivi, ki raziskovalca spremljajo na taki poti. Izjemno cenim, da mi je mentor pri pisanku novega poglavja v knjigi raziskovanja popolnoma zaupal. Njegova vloga pa je bila pomembna tudi takrat, ko sem se znašel v slepi ulici in me je s svojimi izkušnjami usmeril na pravo pot.«

Kot še poudari nagrjenec, je zanj pri raziskovalnem delu najpomembnejše, da ga tematika veseli oziroma postane neke vrste »obvezen« hob. »Najboljše rešitve se mi največkrat porodijo v prostem času, ko je glava hladna in tok misli

neovirano teče. To je običajno visoko v gorah na čistem zraku in na mestih, ki ponujajo najboljše razglede.« Znanstveno raziskovanje vsekakor zahteva veliko truda in časa, vendar je včasih treba stopiti korak nazaj, da bi lahko nadaljevali pot proti cilju, je prepričan. »Predvsem je pomembno, da se zna človek tudi sprostiti in si vzeti čas zase in za svoje hobije, da osebna sreča ni vezana le na rezultate dela.«

Zelo spodbudno je, da Krka že 46 let podeljuje nagrade za raziskovalno delo in tako pokaže, da jo zanima dogajanje na akademski ravni. V Sloveniji je tovrstnega povezovanja z industrijo premalo, poudarja mladi raziskovalec in dodaja: »Če hočemo rasti in biti vedno boljši, moramo razmišljati širše. Glede na mednarodna priznanja, ki potrjujejo dobro delo na naših fakultetah in raziskovalnih inštitutih, menim, da lahko tudi domača industrija iz tega veliko pridobi.«

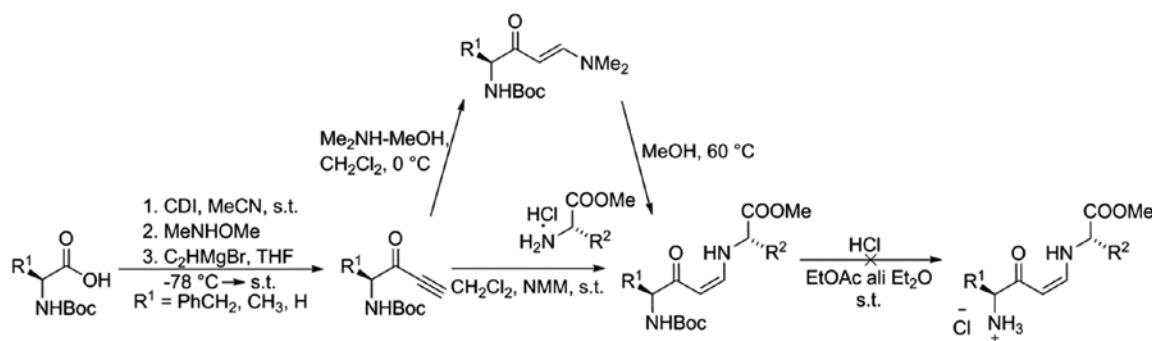
Na odločitev, da se prijavi na razpis za Krkino nagrado, sta vplivala pozitiven odziv komisije na fakulteti, ki je pregledala njegovo doktorsko nalogu, in spodbuda mentorja, ki je ocenil, da je primerna. »Uvrstitev na vidno mesto med številnimi odličnimi Krkinimi nagrajenci mi veliko pomeni, saj je potrditev dosedanjega raziskovalnega dela in velika spodbuda za nadaljevanje moje znanstvenoraziskovalne poti.«

**Reologija je interdisciplinarna veda, ki se ukvarja s proučevanjem deformacijskih stanj in tokovnega obnašanja snovi.*

Sinteza novih vinilogov in heterocikličnih analogov peptidov

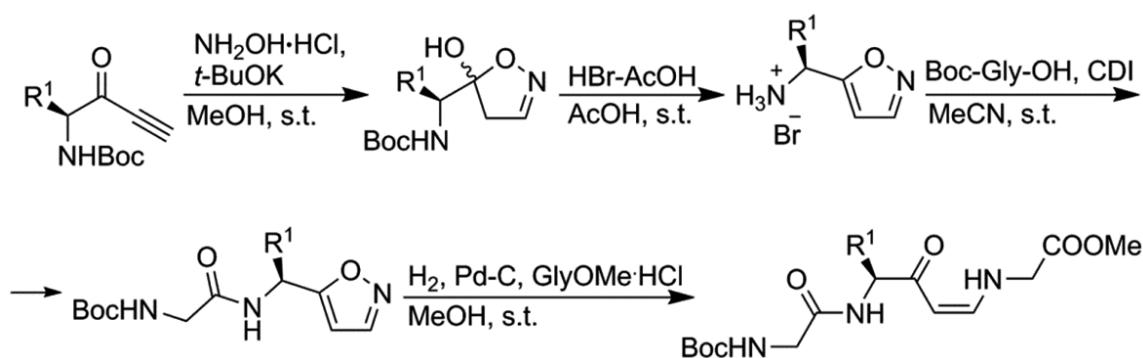
LUKA ŠENICA, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
 Mentor: **Juriš Svetec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sintetizirali smo nov tip vinilognih peptidov s C=C fragmentom, vstavljenim v CO–NH vez peptida. V prvi stopnji smo iz izbranih Boc-zaščitenih α -aminokislín pripravili ustrezne etinil ketone in jih z 1,4-adicijo dimetilamina pretvorili v njihove enaminonske derivate, zadicijo različnih aminokislinskih estrov pa smo pripravili vinilogne dipeptide. N,N-disubstituirane vinilogne amide smo izolirali kot (E)-izomere, N-monosubstituirane pa kot zmes večinskih (Z)- in manjšinskih (E)-izomerov. Aciliranje N-terminala pa se je pokazalo za precej problematično, saj je bil enaminonski fragment v acidolitskih pogojih izredno nestabilen (slika 1).



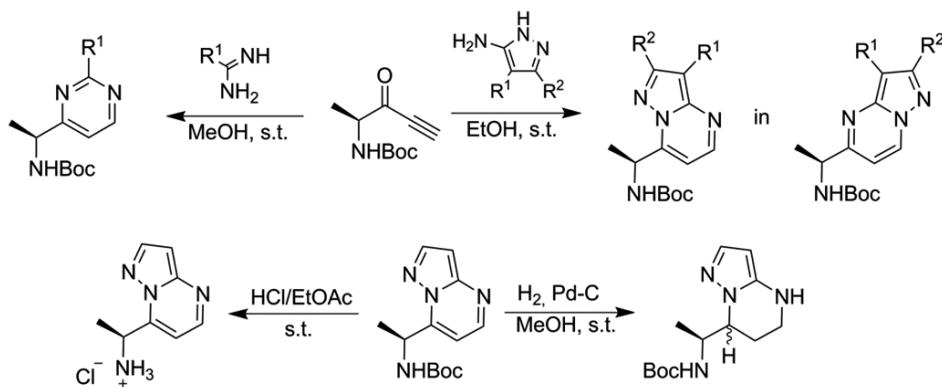
Slika 1. Sinteza vinilognih peptidov in poskus acidolitske odstranitve zaščite N-terminala.

Enaminonski fragment smo na inovativen način začasno zaščitili s ciklizacijo inona ali enaminona s hidroksilaminom do zmesi diastereomernih izoksazolinov. Naslednji stopnji pa je hkrati z odstranitvijo Boc skupine s HBr-AcOH potekla tudi dehidracija do izoksazolov. Tako dobljene proste amine smo z Boc-glicinom acilirali do ustreznih dipeptidov, enaminonski fragment pa smo nato pod hidrogenolitskimi pogoji v prisotnosti GlyOMe·HCl regenerirali in tako pripravili tripeptide z vinilognim amidom kot centralnim gradnikom (slika 2).



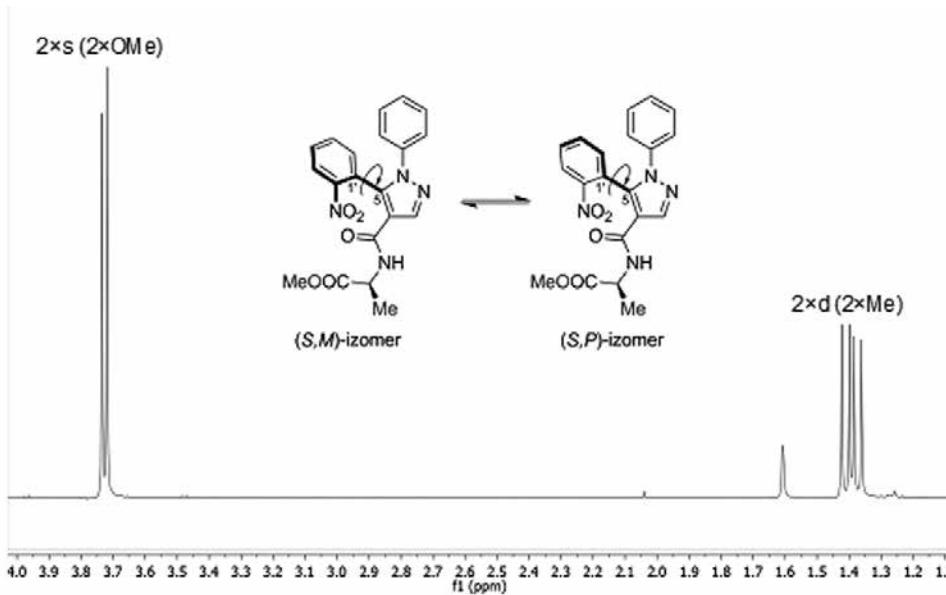
Slika 2. Začasna zaščita in regeneracija enaminonskega fragmenta.

V drugem delu raziskovalnega dela smo iz inona in njegovega sinteznega ekvivalenta enaminona pripravili nekaj kiralnih (*S*)-1-(heteroaril)-1-aminoetani. Pri ciklizaciji z amidini so nastali ustrezeni (*S*)-1-(pirimidin-4-il)-1-aminoetani, pri reakcijah z nesimetričnimi cikličnimi amidini pa regioizomerni (*S*)-1-(pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-5-il)-1-aminoetani in (*S*)-1-(pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)-1-aminoetani. Z acidolitsko odstranitvijo Boc-skupine smo pripravili proste amine, s katalitskim hidrogeniranjem pa diastereomerne 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]pirimidine (slika 3).



Slika 3. Sintesa in derivatizacija kiralnih (*S*)-1-(heteroaril)-1-aminoetanov.

V zadnjem delu smo sintetizirali nove, aksialno kiralne 1,4,5-trisubstituirane pirazole. Na mesto N(1) smo uvedli različno velike substituente ter tako poskušali doseči ločljivost diastereomerov z enim centrom kiralnosti, ki ju z NMR-spektroskopijo lahko ločimo zaradi prisotnosti osi kiralnosti. Rotacijo smo poskušali omejiti tudi z reduktivnim alkiliranjem nitrokarboksamidov in derivatizacijo aminokarboksamidov. Z NMR-spektroskopijo smo študirali dinamiko rotacije okrog C(5)-C(1') vezi atropizomerne zmesi nitrokarboksamidov (slika 4).



Slika 4. Odsek ^1H NMR-spektra zmesi diastereomernih nitrokarboksamidov.

Literatura

1. L. Šenica, U. Grošelj, M. Kasunić, D. Kočar, B. Stanovnik, J. Svete, Synthesis of enaminone-based vinyllogous peptides, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3067–3071.
2. L. Šenica, N. Petek, U. Grošelj, J. Svete, A four-step synthesis of novel (*S*)-1-(heteroaryl)ethan-1-amines from (*S*)-Boc-alanine, *Acta Chim. Slov.* **2015**, 62, 60–71.
3. L. Šenica, K. Stopar, M. Friedrich, U. Grošelj, J. Plavec, M. Počkaj, C. Podlipnik, B. Štefane, J. Svete, Synthesis and rotational isomerism of 1-substituted methyl (*S*)-[5-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carbonyl]alaninates, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 146–161.

Synthesis of Novel Vinylogues and Heterocyclic Analogues of Peptides

LUKA ŠENICA, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
 Supervisor: **Jurij Svetec**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

A series of a novel type of vinylogous peptides with the C=C fragment inserted into the peptide C–N bond were synthesised. Ethynyl ketones were first prepared from Boc-protected α -amino acids. 1,4-Addition of dimethylamine gave the corresponding enaminones, whereas addition of amino esters to inone led to vinylogous dipeptides. *N,N*-Disubstituted vinylogous amides were isolated as pure (*E*)-isomers, while the *N*-monosubstituted were obtained as mixtures of the major (*Z*)- and the minor (*E*)-isomers. Acylation of the N-terminus did not proceed so smoothly as we had to protect the acidolytically unstable enamino moiety first (Figure 1).

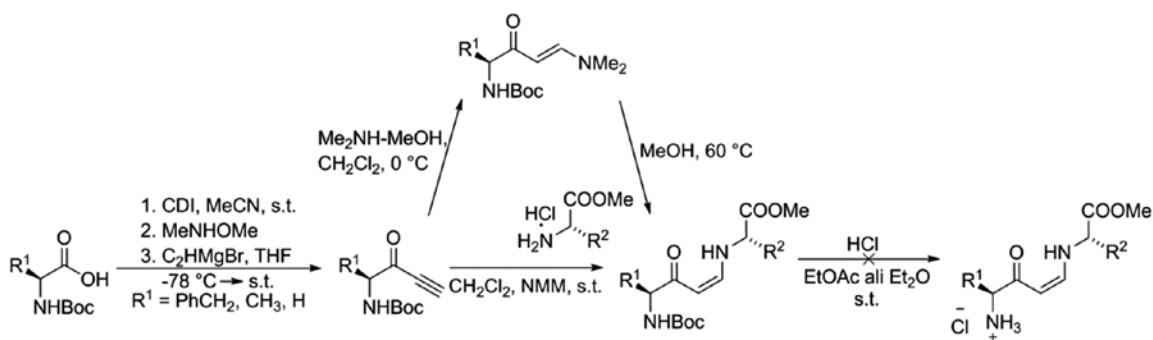


Figure 1: Temporary protection of the enamino fragment.

Cyclisation of ynene or enaminone with hydroxylamine led to diastereomeric isoxazolines, followed by removal of the Boc group with HBr-AcOH and simultaneous dehydration to afford isoxazoles. Free amines were then acylated with Boc-glycine to give the corresponding dipeptides. Finally, the hydrogenolytic deprotection of the enamino moiety in the presence of GlyOMe-HCl led to tripeptides with a vinylogous amide as the central building block (Figure 2).

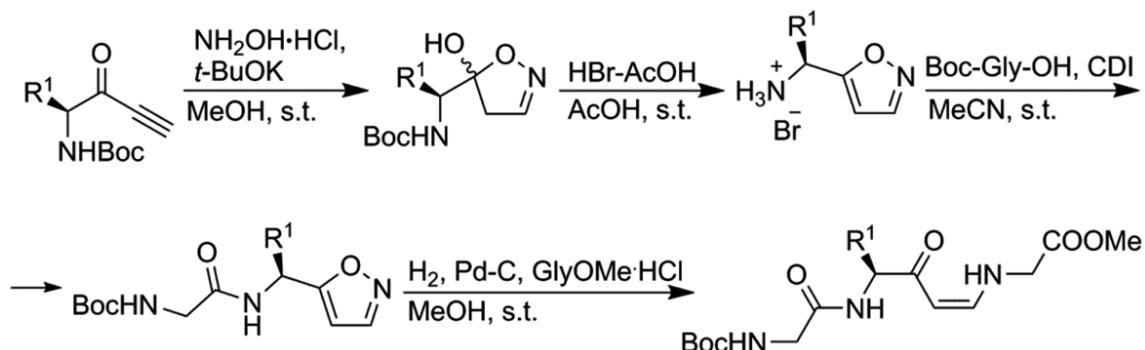


Figure 2: Temporary protection and regeneration of the enamino moiety.

In the second part of our research, some chiral (*S*)-1-(heteroaryl)-1-aminoethanes were synthesized from ynene and its synthetic equivalent, enaminone. Cyclisation with amidines led to the corresponding (*S*)-1-(pyrimidin-4-yl)-1-aminoethanes, while the reaction with unsymmetrical cyclic amidines afforded regioisomeric (*S*)-1-(pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5-yl)-1-aminoethanes and (*S*)-1-(pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-

7-yl)-1-aminoethanes. Acidolytic removal of the Boc group produced free amines, while the catalytic hydrogenation furnished the corresponding diastereomeric 4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines (Figure 3).

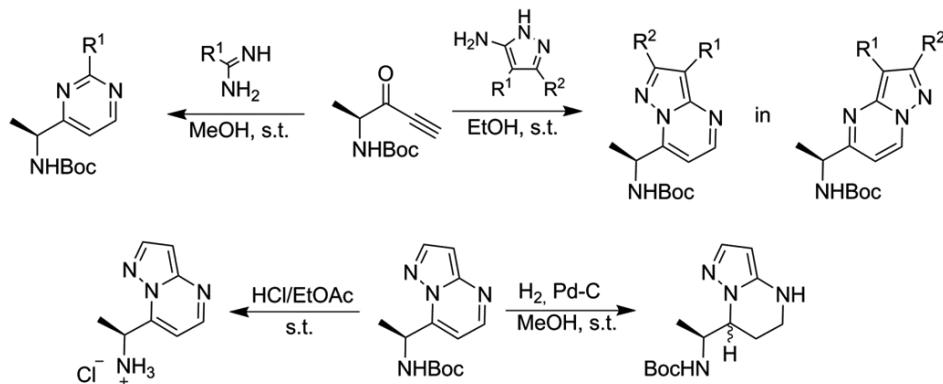


Figure 3: Synthesis and derivatization of chiral (*S*)-1-(heteroaryl)-1-aminoethanes.

In the last part of our work we synthesized some new, axially chiral, 1,4,5-trisubstituted pyrazoles. We introduced large groups at position N(1) in order to achieve chromatographic separation of diastereomers with single stereogenic center, which can be distinguished by NMR spectroscopy due to the presence of axial chirality. We tried to limit the rotation by reductive alkylation of nitrocarboxamides and by derivatization of aminocarboxamides. Rotational dynamics around the C(5)-C(1') single bond in atropizomeric nitrocarboxamides was studied using NMR spectroscopy (Figure 4).

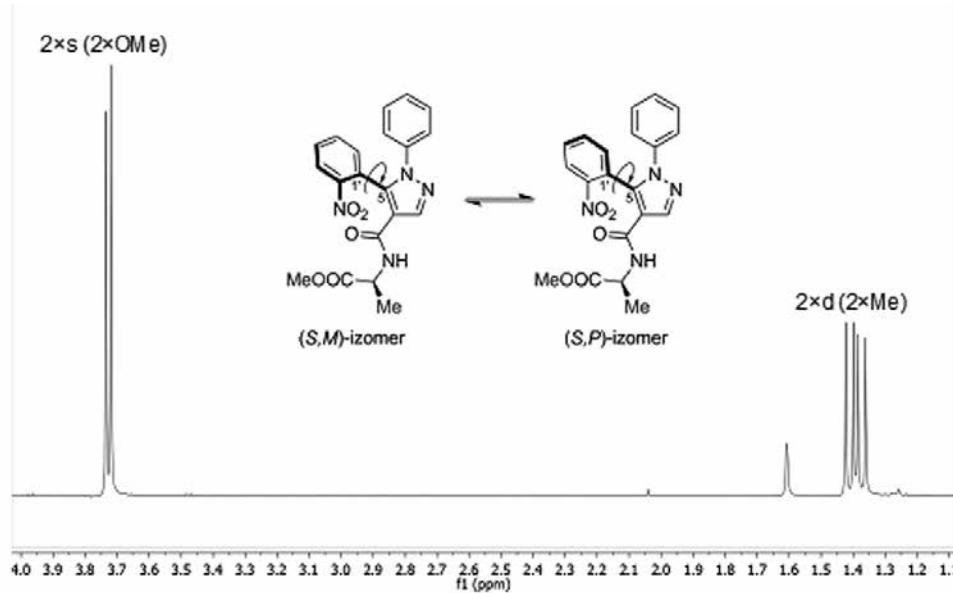
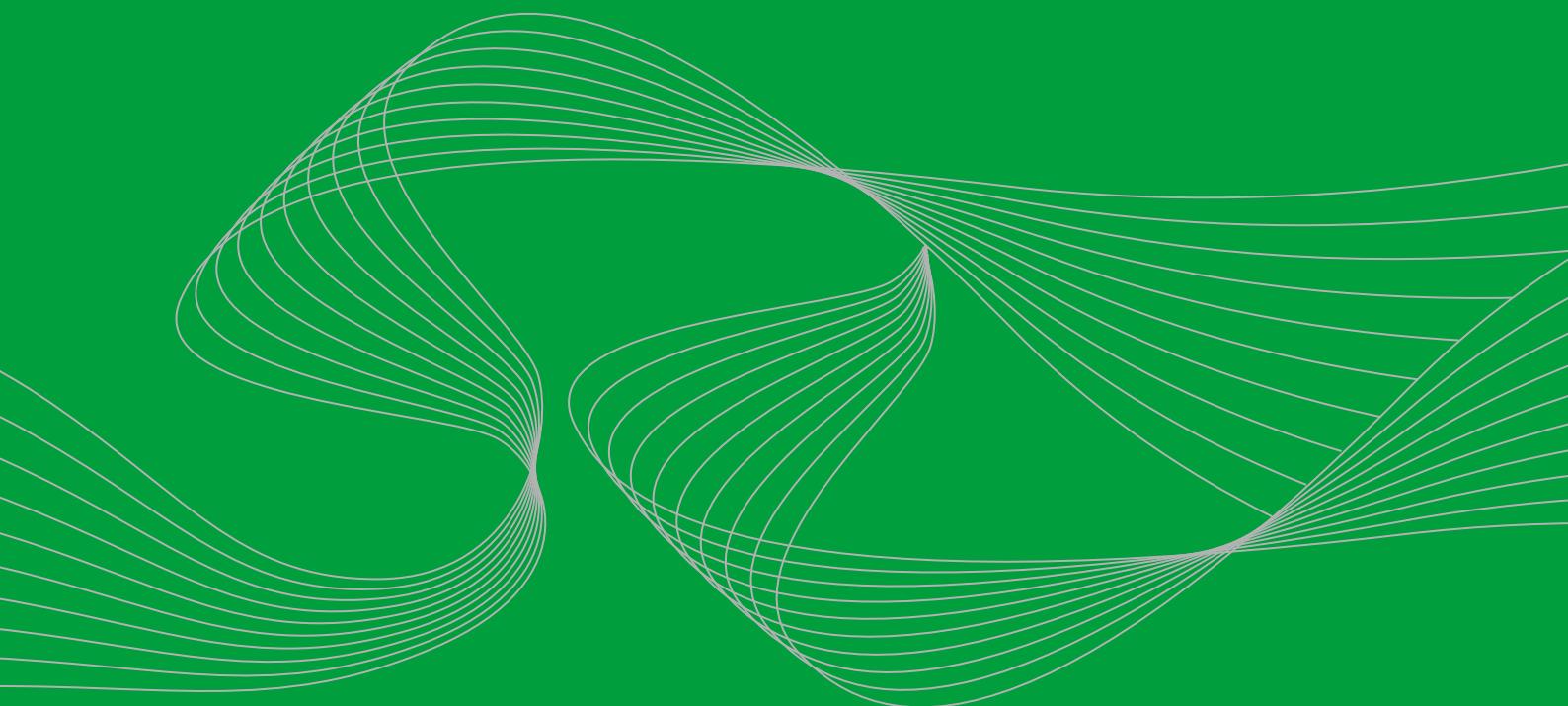


Figure 4: Partial ^1H NMR spectrum of mixture of diastereomeric nitrocarboxamides.

Literature:

1. L. Šenica, U. Grošelj, M. Kasunič, D. Kočar, B. Stanovnik, J. Svete. Synthesis of enaminone-based vinylogous peptides, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3067–3071.
2. L. Šenica, N. Petek, U. Grošelj, J. Svete. A four-step synthesis of novel (*S*)-1-(heteroaryl)ethan-1-amines from (*S*)-Boc-alanine, *Acta Chim. Slov.* **2015**, 62, 60–71.
3. L. Šenica, K. Stopar, M. Friedrich, U. Grošelj, J. Plavec, M. Počkaj, Č. Podlipnik, B. Štefane, J. Svete. Synthesis and rotational isomerism of 1-substituted methyl (*S*)-[5-(2-nitrophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carbonyl]alaninates, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 146–161.

46



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

*Povzetki
Abstracts*

Študij vpliva zgradbe in oblike kristalov na fizikalno-kemijske lastnosti zdravilnih učinkovin

POLONA BUKOVEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Franc Vrečer**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Izboljšane *in vivo* lastnosti končne farmacevtske oblike, ki vsebuje slabo topno zdravilno učinkovino, lahko dosežemo s spremjanjem fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine, ne samo v smislu prilagajanja notranje strukture, temveč tudi prek spremembe kristalnega habitusa. V delu so opisani koncept in teorija kristalnega inženiringa ter razprava o potencialnih metodah, prednostih in slabostih, ki jih prinaša proučevani način povečevanja hitrosti raztapljanja. Osredotočili smo se na vpliv pogojev kristalizacije na zunano obliko kristalov in dokazali, da lahko oblika signifikantno vpliva na hitrost raztapljanja in posledično predvidoma tudi na peroralno absorpcijo. Za pojasnitev tega pristopa smo na primeru simvastatina z mikroskopom na atomsko silo spremljali hitrost raztapljanja izoliranih večjih monokristalov, ki so imeli enako notranjo strukturo in so se razlikovali izključno v zunanji obliki kristala (ploščati in paličasti kristali). Hitrost raztapljanja določenih kristalnih ploskev je bila glede na ostale bistveno večja. Na osnovi poglobljene raziskave morfoloških lastnosti, orientacije monokristalov in asiganacije specifičnih funkcionalnih skupin za vsako izmed izraženih kristalnih ploskev smo ugotovili, da je bila razlika v hitrosti raztapljanja izoliranih monokristalov posledica večje pojavnosti bolj polarnih kristalnih ploskev paličastih kristalov, katerih rast je bila pogojena z izborom bolj polarnih topil.

Study of the Influence of Crystal Structure and Shape on Physico-Chemical Properties of Active Substances

POLONA BUKOVEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Franc Vrečer**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

In order to achieve better *in vivo* performance of the final dosage form comprising a poorly soluble active ingredient, the physicochemical properties of the active pharmaceutical ingredient can be altered not only by changing the solid state form but also through the conversion of their crystal habits. In the present work we have presented a concept and theory of crystal engineering, the discussion about the required analytical methods, the advantages and disadvantages which the studied way of dissolution rate enhancement could bring. To elucidate this approach on the case of simvastatin, the dissolution behaviour of large mono-crystals with the same internal structure, expressing different crystal habits (plate and needle-like morphology), was studied using the atomic-force microscope. The obtained differences in the dissolution were explained through the determination of crystal morphology, its orientation and assignation of the molecular functional groups that were emerging on the surface of the dissolving crystal face. The dissolution rates of the particular crystal faces were found to be distinctly higher than others. The dissolution rate of single crystals differed as a consequence of higher incidence of more polar faces in case of rod shaped crystals isolated from more hydrophilic solvent mixture which we have established through a thorough research of the single crystal morphology, orientation and the assignation of specific functional groups for each of the evolved crystal faces.

Termodinamične in transportne lastnosti vodnih raztopin alkalijskih soli poli(thiofen-3-il acetne kisline)

GREGOR HOSTNIK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Janez Cerar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sintetizirali in okarakterizirali smo poli(thiofen-3-il acetno kislino) (PTAA) ter pripravili raztopine različnih alkalijskih in tetralkilamonijskih (TAA) soli PTAA. Izmerili smo koncentracijsko in temperaturno odvisnost električne prevodnosti vodnih raztopin alkalijskih soli PTAA ter iz njih izračunali ekvivalentne molske prevodnosti soli PTAA. S kombinacijo meritev električne prevodnosti vodnih raztopin alkalijskih soli PTAA in transportnih števil polionske konstituente v teh raztopinah smo izračunali koncentracijsko odvisnost deleža prostih alkalijskih protionov v proučevanih raztopinah. Z NMR-spektroskopijo smo določili tudi koncentracijsko odvisnost deleža prostih protionov v raztopinah TAA soli PTAA in v raztopinah mešanih soli. V izotermnem titracijskem kalorimetru smo izmerili razredčilne topote vodnih raztopin alkalijskih in TAA soli PTAA ter topote mešanja vodnih raztopin alkalijskih soli PTAA z raztopinami alkalijskih in TAA kloridov. Dodaten vpogled v dogajanje na molekularnem nivoju smo dobili s simulacijo dinamike molekul (polje sil OPLS-T-SB, voda SPC). Pokazali smo, da je delež na PTAA vezanih alkalijskih protionov neodvisen od vrste alkalijskega protiona, medtem ko pri TAA stopnja vezanja narašča z naraščanjem dolžine alkilnih verig. Stopnja vezanja protionov vpliva na konformacijo PTAA. Vrednosti topot mešanja so povezane z entalpijo hidratacije dodanega protiona. Odvisnost je pri TAA protionih obratna kot pri alkalijskih. Na podlagi simulacij dinamike molekul lahko sklepamo, da so opažene razlike posledica hidrofobnih interakcij med alkilnimi verigami TAA protionov in aromatskimi obroči PTAA.

Thermodynamic and Transport Properties of Aqueous Solutions of Alkaline Salts of Poly(thiophen-3-ylacetic Acid)

GREGOR HOSTNIK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Janez Cerar**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Poly(thiophene-3-ylacetic acid) (PTAA) was synthesised and characterised, followed by the preparation of different PTAA alkali metal and tetraalkylammonium (TAA) salt solutions. The electrical conductivity concentration and temperature dependence of PTAA alkaline salt aqueous solutions were measured and equivalent molar conductivities were calculated. A combination of electrical conductivities and transport numbers of a polyon constituent was used to calculate the fraction of free counterions in the studied solutions. NMR-spectroscopy was applied in the same way to calculate the fractions of free counterions in aqueous solutions of PTAA TAA salts and in solutions of mixed salts. Isothermal titration calorimetry was used to determine enthalpies of dilution of PTAA alkaline and TAA salt aqueous solutions and enthalpies of mixing of PTAA alkaline salt aqueous solutions with solutions of alkaline and TAA chlorides. An additional insight into processes of solutions was obtained using molecular dynamics simulations (OPLS-T-SB force field, SPC water). It was shown that the fraction of alkaline counterions which bind to PTAA does not depend on the type of the alkaline ion while the fraction of free TAA becomes smaller when the length of TAA alkyl chains is increased. The degree of counterion binding has an influence on the PTAA conformation. Enthalpies of mixing depend on the enthalpies of hydration of the added counterion. The sign of dependence in case of TAA counterions is opposite to that for alkaline counterions. The results of molecular dynamics simulations suggest that the changed trend is a consequence of hydrophobic interactions between alkyl chains of TAA counterion and PTAA aromatic rings.

Optimizacija izdelave filmsko obloženih pelet v zvrtinčenih plasteh s pomočjo »in-line« tehnik

GREGA HUDOVRNIK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Franc Vrečer**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

S povečevanjem zahtevnosti in kompleksnosti postopkov izdelave zdravil ter povečevanjem regulatornih zahtev pri registracijah novih izdelkov se je v zadnjih letih začel bliskovit razvoj tehnik, ki omogočajo vrednotenje fizikalno-kemijskih parametrov farmacevtskih izdelkov med procesom izdelave. Te tehnike nam omogočajo pridobivanje večjega števila podatkov v realnem času, kar pomeni boljše poznavanje in hkrati boljši nadzor nad procesom izdelave kompleksnih farmacevtskih oblik, med katere sodijo tudi pelete. V okviru naloge smo proučevali uporabnost bližnje infrardeče spektroskopije (NIR) in dveh tehnik za merjenje velikosti delcev v realnem času, tehnike prostorskega filtra (SFT) in tehnike merjenja odboja fokusirane laserske svetlobe (FBRM) za spremljanje tehnoloških procesov. V okviru naloge smo sistematično preverili vpliv procesnih parametrov temperiranja pelet, obloženih s filmsko oblogo za podaljšano sproščanje, na hitrost sproščanja zdravilne učinkovine in proces temperiranja uspešno modelirali z NIR. Z NIR in SFT smo spremljali proces oblaganja pelet, za katerega smo uspešno izdelali model NIR za vrednotenje vlage v peletah in debeline pelet. Dodatno smo na modelnem sistemu pri granuliraju s talinami primerjali dve tehniki za merjenje velikosti delcev v realnem času ter ugotovili, da so rezultati obeh tehnik primerljivi. Rezultati in zaključki doktorskega dela bodo prispevali k boljšemu razumevanju uporabnosti »in-line« tehnik za spremljanje procesov v zvrtinčenih plasteh, še posebej oblaganja pelet. Z uporabo razvitih modelov NIR ter merjenjem velikosti delcev bistveno prispevamo k boljšemu razumevanju procesov, hkrati pa so dodatne informacije, ki jih pridobimo v realnem času, poleg procesnih parametrov ključnega pomena za vodenje in optimizacijo procesa oblaganja pelet.

Optimisation of Fluid Bed Pellet Film Coating Process Using In-line Techniques

GREGA HUDOVRNIK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Franc Vrečer**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Increasing complexity of the drug manufacturing process, on one hand, and the increased demands raised by regulatory agencies in the past years, on the other hand, led to a development of new techniques for the real-time monitoring of pharmaceutical processes. These techniques are able to acquire a vast amount of data during the process which increases the knowledge about the process and thus enables better process control. Our work focused on the research of applicability of NIR and two real-time particle size measurement techniques, namely Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) and Spatial filter technique (SFT), in monitoring of technological processes. Our work included a systematic approach in studying the influence of curing process of pellets coated with a prolonged release film coating on API release. We successfully developed NIR model to monitor pellet curing process. NIR and SFT were used to monitor the pellet coating process. We successfully developed NIR models for monitoring moisture in pellets and coating thickness prediction. Additionally, a comparison between SFT and FBRM using a model system in the process of hot-melt granulation was made. We concluded that both techniques provide comparable results. The results and conclusions presented in the thesis will attribute to better understanding of the in-line techniques used for fluid-bed process monitoring, especially the pellet coating process. Using the NIR models and in-line particle size measurement, a better process understanding is achieved which is the basis for control and optimisation of the pellet coating process.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev holin-esteraz

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

Alzheimerjeva bolezen je kronična progresivna nevrodegenerativna bolezen možganov. Ker je nevrodegeneracija najizrazitejša v holinergičnem živčnoprenašальнem sistemu, to povzroči motnje spomina, ki so značilne za bolnike z Alzheimerjevo bolezni. Zaviralci holin-esteraz, ki se uporabljajo za lajšanje simptomov bolnikov s to bolezni, imajo zaradi zaviranja acetilholin-esteraze številne slabosti, ki se jim da izogniti s selektivnim zaviranjem butirilholin-esteraze. Razvili smo serijo novih selektivnih zaviralcev butirilholin-esteraze. Med njimi je tudi zelo obetavna spojina za nadaljnji predklinični razvoj. Ta spojina tako *in vitro* kot *ex vivo* zavira butirilholin-esterazo v rezinah podganjih možganov. Razrešena kristalna struktura kompleksa tega zaviralca z butirilholin-esterazo razkriva njegov način vezave na aktivno mesto. Dokazali smo, da ta spojina ni strupena za celice in da živčne celice ščiti pred strupenim amiloidom β , ki povzroča Alzheimerjevo bolezen. Je tudi metabolno stabilna, v veliki meri se veže na plazemske proteine in po intraperitonealni aplikaciji prehaja v možgane podgan. Dokazali smo tudi njeno *in vivo* delovanje, saj izboljša spomin, učne sposobnosti in kognitivne funkcije miši v bolezenskem modelu zmanjšane holinergične aktivnosti pri Alzheimerjevi bolezni ter pri tem ne povzroča neželenih akutnih holinergičnih učinkov.

Design, Synthesis and Evaluation of Novel Cholinesterase Inhibitors

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

Alzheimer's disease is a chronic progressive neurodegenerative brain disorder. Since neurodegeneration is most severe in the cholinergic neurotransmitter system, this produces memory deficits that are characteristic for patients with Alzheimer's disease. The cholinesterase inhibitors for alleviating symptoms of patients with this disease have numerous limitations due to the inhibition of acetylcholinesterase, which can be overcome by selectively inhibiting butyrylcholinesterase. We developed a series of novel selective butyrylcholinesterase. One of them is a very promising candidate for further preclinical development. This compound inhibits butyrylcholinesterase *in vitro* as well as *ex vivo* in rat brain slices. The solved crystal structure of the complex of this inhibitor with butyrylcholinesterase reveals its binding mode in the active site. We have shown that it is not toxic to cells and protects neuronal cells from toxic amyloid β which causes Alzheimer's disease. It is also metabolically sufficiently stable, has high protein binding and partitions into the brains of rats after intraperitoneal injection. We have also shown its *in vivo* activity as it improves memory, learning abilities and cognitive functions of mice in a disease model of the cholinergic hypofunction in Alzheimer's disease without producing adverse acute cholinergic effects.

Biofizikalno-kemijske lastnosti človeškega rekombinantnega perforina in njegove interakcije z lipidnimi membranami

OMAR NANEH, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Gregor Anderluh**, Kemijski inštitut Ljubljana

Perforin (PFN) je poglavitni protein človeške imunosti. Citotoksični limfociti T in naravne celice ubijalke ga namreč izločajo v procesu odstranjevanja okuženih in tumorskih celic. PFN se v odvisnosti od Ca^{2+} in pH veže na membrane tarčnih celic, jih oligomerizira in preluknja, nastale pore pa sprožijo smrt celice. Kljub njegovemu pomenu pa sta vezava in oligomerizacija PFN na celični membrani še nepojasnjena procesa. Z bakulovirusnim sistemom za izražanje proteinov smo pridobili aktivni različici človeškega in mišjega PFN. Pokazali smo, da sistem omogoča tudi pridobivanje mutantov PFN za proučevanje mutacij, ki se pojavljajo pri človeku. S testi hemolitičnosti smo pokazali, da lahko nekateri ioni težkih kovin, npr. Cu^{2+} in Zn^{2+} , zavrejo delovanje PFN. To kaže na možen negativen učinek ionov težkih kovin na celični imunski sistem. S površinsko plazmonske resonanco, termoforezo in tehnologijo nanodiskov smo določili afiniteto PFN do Ca^{2+} . Afiniteta je v mikromolarnem območju in je močno odvisna od pH, saj je v kislem nižja. pH tako predstavlja pomemben regulacijski sistem interakcije PFN s Ca^{2+} in posledično njegove citotoksičnosti. Z računalniškim modeliranjem smo dodatno potrdili hipotezo, da vezava Ca^{2+} na PFN povzroči spremembo zgradbe proteina v konformacijo, ki je bolj ugodna za povezovanje z membrano. Ob interakciji se monomer PFN z membrano poveže pokončno, kar smo potrdili tudi s krionalektronsko mikroskopijo na nanodiske vezanih monomerov PFN. Študija prikazuje nov vpogled v značilnosti in regulacijo citotoksičnosti PFN.

Biophysical and Chemical Properties of Human Recombinant Perforin and its Interaction with Lipid Membranes

OMAR NANEH, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: **Gregor Anderluh**, National Institute of Chemistry Ljubljana

Perforin (PFN) plays a fundamental role in human immune response. In order to eliminate malignant and infected cells, cytotoxic lymphocytes T and natural killer cells release PFN. PFN then binds to target cell membranes in pH- and Ca^{2+} -dependent manner, oligomerises and forms pores that induce cell death. Despite its importance, PFN's binding and oligomerisation on the cell membrane are not well understood. Using the baculovirus expression system we produced active recombinant forms of mouse and human PFN. Our system enables the production of PFN mutants for the analysis of the effect of human pathological mutations on PFN's activity. With hemolytical tests we showed that heavy metal ions, such as Cu^{2+} and Zn^{2+} , inhibit PFN's activity. The results are an indication of negative effect of heavy metal ions on cellular immunity. Using surface plasmon resonance, microthermophoresis and nanodisc technology we evaluated the affinity of PFN for Ca^{2+} . The affinity is in micromolar range and significantly reduced at acidic pH. The pH thus represents an important regulation system of PFN's Ca^{2+} -dependent cytotoxicity. With *in silico* modelling, we additionally confirmed the hypothesis that Ca^{2+} induces conformational changes of PFN that allows its interaction with the membrane. Upon its association with the membrane, PFN orients perpendicular to the target membrane plane. We confirmed the model using cryo-electron microscopy of nanodisc-bound monomers of PFN. The results provide a new insight into the properties and regulation of PFN's cytotoxicity.

Uporaba teoretičnih modelov elektroporacije lipidne membrane

LEA REMS, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Mounir Tarek**, Université de Lorraine, Francija

Elektroporacija je fizikalna metoda, ki omogoča povečanje vnosa zdravilnih učinkovin, genskega materiala in drugih molekul v celice in tkiva. Temelji na izpostavitvi celic kratkim visokonapetostnim električnim pulzom, s katerimi dosežemo začasno neselektivno povečanje prepustnosti celičnih membran. Vendar pa je treba za doseganje želenih eksperimentalnih rezultatov skrbno optimizirati parametre električnih pulzov. Teoretično modeliranje učinkovito dopolnjuje načrtovanje eksperimentalnih in terapevtskih protokolov, ki temeljijo na elektroporaciji. S teoretičnim modeliranjem smo pokazali, da lahko električne pulze uporabimo za nadzorovano izlitje učinkovin iz liposomov, vnesenih v celice, pod pogojem, da so pulzi dolgi približno 10 ns. Nato smo pokazali, da se lahko z uporabo nanosekundnih električnih pulzov izognemo težavam pri elektrozlivljanju celic, ki so povezane z razliko v velikosti celic; npr. pri zlivanju limfocitov z mielomskimi celicami v hibridomni tehnologiji za proizvodnjo monoklonskih protiteles. Poleg tega smo razvili model špinačnega tkiva, pri čemer smo upoštevali podrobnosti celičnih struktur v tkivu, da bi optimizirali protokol povečanja odpornosti špinačnih listov proti zamrzovanju z elektroporacijo. Teoretični modeli so temeljili na do sedaj znanih teoretičnih opisih elektroporacije, tj. nastanka vodnih por v lipidnem dvoслоju. Dopolnili in izboljšali smo jih s simulacijami molekularne dinamike.

Applications of Theoretical Models of Lipid Membrane Electroporation

LEA REMS, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Mounir Tarek**, Université de Lorraine, France

Electroporation is a physical technique for increasing the uptake of medicines, genetic material, and other molecules into cells and tissues. The method is based on exposing the cells to short high-voltage electric pulses, which leads to a transient nonselective increase in the permeability of the cell membranes. However, in order to achieve the desired experimental outcome, the parameters of the electric pulses need to be carefully optimized. To this end, theoretical modeling can efficiently guide and complement the design of electroporation-based experimental and therapeutic protocols. Using theoretical modeling, we demonstrated that electric pulses could be used to control the release of active substances from intracellular liposomes, provided that the pulses are about 10 ns long. We further demonstrated that nanosecond electric pulses could be used to avoid issues in cell electrofusion, which are related to the difference in cell size; e.g., when fusing lymphocytes with myeloma cells in hybridoma technology for monoclonal antibody production. Furthermore, we developed a model of the spinach tissue with resolved cellular structure in order to guide the optimization of the electroporation protocol in cryopreservation of spinach leaves. The theoretical models were based on existing theoretical descriptions of electroporation, i.e. aqueous pore formation in the membrane lipid bilayer. We complemented and improved these theoretical descriptions by means of molecular dynamics simulations.

Sinteza potencialnih organokatalizatorjev na osnovi kafre

SEBASTIJAN RIČKO, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Uroš Grošelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Vpliv katalizatorjev na selektivnost pretvorb lahko izkoristimo v organski sintezi za tvorbo optično čistih spojin. Razvoj novih organokatalizatorjev je povezan s sintezo novih kiralnih diaminskih ogrodij iz molekul kiralnega bazena. V doktorski nalogi sem razvil sintezno metodologijo za pripravo novih 1,2-, 1,3- in 1,4-diaminskih kiralnih gradnikov na osnovi kafre, iz katerih sem pripravil ustrezne bifunkcionalne organokatalizatorje. Spojina na osnovi 1,3-diaminskega kiralnega ogrodja in skvaramidnega preostanka se je pokazala kot izjemno učinkovit katalizator za reakcijo asimetrične *Michaelove* adicije med 1,3-dikarbonili in *trans*- β -nitrostireni. Reakcije so odlično potekale v organskih nepolarnih topilih in v vodnem mediju (kvantitativni izkoristki in odlični enantiomerni presežki; $\geq 96\%$ ee). Priprava katalizatorja je enostavna, poleg tega je neobčutljiv za vodo in zrak. Njegovo ogrodje tvori nov privilegiran 1,3-diaminski kiralni gradnik na osnovi kafre, kar je zelo pomembno, saj je večina uspešnih bifunkcionalnih organokatalizatorjev zasnovana na 1,2-diaminskih gradnikih. To odkritje je pomembno za nadaljnji sintezni razvoj področja, saj je iskanje novih visokoaktivnih bifunkcionalnih organokatalizatorjev prednostni cilj organokatalize. Strukturo vseh novih diaminskih ogrodij na osnovi kafre lahko spremojamo skladno s sintezno metodologijo, razvito v mojem doktorskem delu. S temi modifikacijami lahko podrobno uravnnavamo lastnosti novih katalizatorjev za potrebe specifičnih kataliziranih reakcij.

Synthesis of Potential Camphor-derived Organocatalysts

SEBASTIJAN RIČKO, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University in Ljubljana
Supervisor: **Uroš Grošelj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University in Ljubljana

The catalyst impact on selectivity of transformations can be exploited in organic synthesis for the formation of optically pure compounds. The development of new organocatalysts is promoted by the synthesis of new chiral diamines from chiral pool molecules. In my doctoral dissertation, I developed new synthetic methodologies for the synthesis of novel camphor-derived 1,2-, 1,3- and 1,4-diamine chiral building blocks. Novel organocatalysts were prepared from them. A compound with a 1,3-diamine scaffold and a squaramide functionality proved to be a highly efficient organocatalyst in asymmetric *Michael* addition of 1,3-dicarboniles to *trans*- β -nitrostyrenes. Reactions proceed excellent in non-polar organic solvents and water (full conversions and excellent enantiomeric excesses; $\geq 96\%$ ee). The catalyst preparation is simple and it is insensitive to water and air. Its framework is a new privileged 1,3-diamine chiral camphor-derived building block, which is extremely important because the majority of successful bifunctional organocatalysts are based on 1,2-diamine scaffolds. The discovery is an important step for further synthetic development of the field because the search for new highly active bifunctional organocatalysts is a priority in organocatalysis. The structure of all the new camphor-derived diamines can be modified in accordance with the methodology developed in my PhD thesis. With these variations, properties of new catalysts can be regulated for the purpose of catalyzing other reactions.

Strukturni vpogled v substratno specifičnost katepsinov

PIOTR SOSNOWSKI, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana

Mentor: **Dušan Turk**, Institut Jožef Stefan

Lizosomski cisteinski katepsini so proteolitski encimi, ki sodelujejo v vrsti bioloških procesov, kot so endosomska proteinska razgradnja, antigensko procesiranje in remodeliranje kostnega tkiva. Katepsini so vključeni še v vrsto patoloških procesov, kot so rak, artritis in osteoporozna. V teh procesih cisteinski katepsini izvajajo omejeno in neomejeno razgradnjo proteinov. Trenutni izziv pri razumevanju fizioloških vlog katepsinov je pridobiti vpogled v interakcije med njihovimi naravnimi proteinskimi substrati in njihovo izbiro. To delo opisuje, na kakšen način smo vzpostavili eksperimentalno platformo za študij interakcij med cisteinskimi katepsini in njihovimi naravnimi substrati. Strukture kompleksov katepsina V C25S s peptidi in katepsina L C25S v kristalu kažejo peptidne preostanke, vezane vzdolž aktivnega mesta od mest S3 do S4'. Ti kompleksi potrjujejo, zdaj tudi s struktурno analizo, da se v aktivno mesto papainu podobnih encimov zares veže sedem aminokislinskih preostankov – kot sta v svojem pionirskem delu pokazala Schechter in Berger leta 1968. Poleg tega smo rešili več struktur katepsina K v kompleksu z nitrilnimi inhibitorji in tako razkrili specifične interakcije na S vezavnih mestih katepsina K.

Structural Insight in the Substrate Specificity of Cathepsins

PIOTR SOSNOWSKI, Jožef Stefan International Postgraduate School

Supervisor: **Dušan Turk**, Jožef Stefan Institute

Lysosomal cysteine cathepsins are proteolytic enzymes that take part in a number of biological processes such as endosomal protein degradation, antigen processing, bone remodeling. They are also involved in a number of pathological processes such as cancer, arthritis and osteoporosis. In these processes the cysteine cathepsins perform limited and unlimited proteolysis. The current challenge in understanding the physiological roles of cysteine cathepsins is to gain insight in the interactions with their natural protein substrates and their selection. This work describes how we established an experimental platform to study interactions between cysteine cathepsins and their natural substrates. The crystal structures of complexes of cathepsin V C25S with peptides and cathepsin L C25S show peptide residues along the whole active site cleft from the S3 to S4' subsite, confirming now also structurally that there are indeed seven residues interacting with the active site of a papain-like enzyme as shown biochemically by the pioneering work of Schechter and Berger in 1968. In addition, we solved structures of cathepsin K in complex with different nitrile inhibitors, which show specific interactions at the S subsites of cathepsin K.

Študija sinteze nesimetričnih tetraoksanov in vrednotenje njihove potencialne biološke aktivnosti

KATARINA STARKL RENAR, Institut Jožef Stefan

Mentor: Jernej Iskra, Institut Jožef Stefan

Nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksi so sintezi analogi naravnega peroksidnega produkta artemisinina, ki je izbirna učinkovina za zdravljenje malarije in molekula s protitumorskim, protivirusnim in protivnetnim delovanjem. Naraščajoča vloga artemisininov v terapiji in nedvoumni dokazi o veliki biološki aktivnosti tetraoksanov povečujejo interes za razvoj novih sinteznih metod za njihovo pridobivanje. V sklopu naših raziskav smo zato raziskali dvostopenjsko sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, ki poteka iz karbonilnih spojin in vodikovega peroksida v dveh stopnjah prek *gem*-dihidroperoksidov. V prvi stopnji reakcije so se *gem*-dihidroperoksi tvorili prek nestabilnih α -hidroperoksiyalkoholov in za sintezo slednjih smo razvili preprost in široko uporaben sintezi postopek. Druga stopnja sinteze nesimetričnih tetraoksanov je bila kislinsko katalizirana ciklokondenzacija sintetiziranih *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin. Glavna ovira reakcije je tvorba številnih stranskih produktov, zato smo podrobno proučili vplive na selektivnost tvorbe nesimetričnih tetraoksanov in jo izboljšali z uporabo optimalnih reakcijskih pogojev (reakcijski čas, temperatura, topilo, količina dodane kisline in reaktivnost izhodnih spojin). Razvito metodo za sintezo tetraoksanov smo uporabili za sintezo strukturno definiranega sklopa nesimetričnih tetraoksanov, med katerimi so imeli nekateri dobro protitumorsko aktivnost in obetavno protituberkulozno delovanje. Pri testiranih peroksidih ni bilo protibakterijskega delovanja proti *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

Study of the Synthesis of Unsymmetrical Tetraoxanes and Evaluation of Their Potential Biological Activity

KATARINA STARKL RENAR, Jožef Stefan Institute

Supervisor: Jernej Iskra, Jožef Stefan Institute

Unsymmetrical 1,2,4,5-tetraoxanes are synthetic analogues of artemisinin, a natural peroxidic product recommended as first-line treatment for malaria and a promising antitumor, antiviral and anti-inflammatory agent. An increasing prominence of artemisinins in therapy and indications of potent biological activity of tetraoxanes have spurred interest in the development of new approaches for synthesis of tetraoxanes. Unsymmetrical tetraoxanes can only be synthesized from carbonyl compounds and hydrogen peroxide in a two-step procedure via *gem*-dihydroperoxides. The first step of the reaction yielded *gem*-dihydroperoxide through the formation of α -hydroperoxyalcohol. The convenient procedure for synthesis of unstable α -hydroperoxyalcohols was developed. The second step of the synthesis of tetraoxanes was an acid-catalysed cyclocondensation of previously synthesized *gem*-dihydroperoxides and carbonyl compounds. The main obstacle of this reaction is the formation of many side products. For this purpose, the selective production of unsymmetrical tetraoxanes was enhanced by the optimisation of reaction conditions (reaction time, temperature, solvent, amount of acid and reactivity of starting material). The method developed for the synthesis of tetraoxanes was applied for the synthesis of structurally defined unsymmetrical tetraoxanes. Several exhibited good antitumor activity and a promising antitubercular activity. None of the tested peroxides had antibacterial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

Novi načini priprave divodikovega trioksida in njegova uporaba za oksidacije organskih spojin

GREGOR STRLE, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

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

Pripravili smo čiste raztopine divodikovega trioksida (HOOOH) brez kontaminantov, česar z do sedaj znanimi metodami priprave HOOOH ni bilo mogoče doseči. Razvili smo enostaven in učinkovit postopek imobilizacije dimetilsililnih skupin na zamrežen polistirenški nosilec, njegovo nizkotemperaturno ozonacijo (-78°C) in katalitsko (metiltroxorenij(VII), heteropolii kisline) transformacijo silyl hidrotrioksidnih skupin (ROOOH) na nosilcu ter hkratno sproščanje HOOOH v raztopino. V prvem delu študije smo imobilizacijo poskušali izvesti s pripenjanjem 4-(dimetilsilil)fenola na Merrifieldov polimerni nosilec. Z novo metodo smo za ta namen poleg 4-(dimetilsilil)fenola pripravili še vrsto sililiranih fenolov in benzonitrilov. Ker reakcija pripenjanja na Merrifieldov nosilec ni potekala po načrtih, smo uspešno kvantitativno imobilizacijo dimetilsililnih skupin dosegli z uporabo zamreženega 4-bromopolistirena, Oshimaovega reagenta ($i\text{-Pr}(n\text{-Bu})_2\text{MgLi}$) in dimetilklorosilana. Iz dimetilsilil derivatiziranega polistirena je v nadalnjem postopku ozonacije in katalitske transformacije moč kvantitativno sprostiti divodikov trioksid. Čiste raztopine HOOOH lahko koncentriramo z nizkotemperaturnim (-60°C) vakuumskim uparevanjem topila. Topilo lahko tudi povsem odstranimo in ga zamenjamo z drugim topilom. Izdelana metoda odpira pot raznovrstnim nadaljnjam raziskavam na področju kemije HOOOH in številnim aplikacijam. Predvsem so zanimive raziskave reaktivnosti HOOOH , zato smo s pripravljenimi raztopinami HOOOH študirali oksidacije nekaterih modelnih substratov, kot so sulfidi, olefini, trifenilfosfin in fenilhidroksilamin.

Novel Methods of Dihydrogen Trioxide Preparation and Its Use in Oxidation of Organic Compounds

GREGOR STRLE, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

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

We successfully prepared pure dihydrogen trioxide (HOOOH) solutions; free from contaminants, which could not be done by the so far known methods of preparing HOOOH . A simple and efficient method of immobilisation of dimethylsilyl groups on the cross-linked polystyrene, its low-temperature ozonation (-78°C) and catalytic (methyltrioxorhenium(VII), heteropoly acids) transformation of silyl hydrotrioxide groups (ROOOH) on the polymer resin with simultaneous release of HOOOH into the solution, was developed. In the first part of the study, we attempted the immobilisation of 4-(dimethylsilyl)phenol on Merrifield resin. With the newly developed method for this purpose, a series of silylated phenols and benzonitriles was prepared. As the reaction of Merrifield resin derivatization did not happen as planned, a new quantitative immobilisation of dimethylsilyl groups was successfully achieved, using cross-linked 4-bromopolystyrene, Oshima's reagent ($i\text{-Pr}(n\text{-Bu})_2\text{MgLi}$) and dimethylchlorosilane. In the further process of ozonation and catalytic transformation of dimethylsilyl-derivatized polystyrene, HOOOH was quantitatively released into solution, and HOOOH was concentrated by low temperature (-60°C) vacuum evaporation of the solvent. The solvent could be either completely removed, or replaced with another solvent. The developed method has opened up new possibilities for further research in diverse fields of HOOOH chemistry, and numerous applications. The prepared solutions of HOOOH were also tested in oxidation reactions with sulfides, olefins, triphenylphosphine and phenylhydroxylamine as model substrates.

Uporaba bioinformatike za razvoj metode identifikacije bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001 v probiotičnih izdelkih

KATJA ŠTAJDOHAR, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Tomaž Accetto, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

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

Metode za določanje istovetnosti mikrobnih proizvodnih sevov so se z razvojem molekularne biologije in bioinformatike osredotočile na identifikacijo specifičnih nukleotidnih zaporedij posameznih sevov. Z metodami preverjamo lastne izdelke in tako lahko zelo natančno in hitro ugotovimo morebitne odtujitve oz. nepooblaščeno uporabo Krkinih sevov. S tem namenom smo razvili metodo identifikacije bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS 117162), lastnega izolata Krke, d. d., Novo mesto. Njegove spore so vgrajene v probiotični izdelek Animavit®. Z uporabo bioinformacijskih orodij smo ugotovili edinstvene lastnosti genoma seva, tj. markerje. S programom Prokka smo v genomu velikosti 4053122 bp našli 4256 genov. Z orodjem BLAST smo nato ob manjšem naboru genomov *B. subtilis* (26) pridobili 74 edinstvenih genov seva KBL 001. Ob analizi 72 genomov sevov smo z modulom NRF programa Panseq našli 9 edinstvenih genomskega regija. Gene od KBL_03216 do KBL_03218 ter medgenske regije lahko uporabimo kot tarčo za presejalni test. Pri poizvedbi z modulom Pan-genome Analysis smo našli 1297 enonukleotidnih polimorfnih mest (SNP), kjer se KBL 001 razlikuje od drugih 58 genomov *B. subtilis*. Rezultate primerjalne analize vseh več kot 300.000 mest SNP 59 genomov sevov smo uporabili za izris dendrograma podobnosti. Izdelali smo bioinformacijski paket, ki na osnovi vnesenih sekvens analiziranih sevov omogoči natančen izpis sorodstvenih razmerij oz. z veliko zanesljivostjo potrdi istovetnost seva KBL 001.

Using Bioinformatics for the Development of Method for Identification of *Bacillus subtilis* KBL 001 in Probiotic Products

KATJA ŠTAJDOHAR, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Tomaž Accetto, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

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

Following the development of molecular biology and bioinformatics, methods for determining the identity of microbial production strains have focused on the identification of specific nucleotide sequences of individual strains. Such methods can be employed to test Krka's products and accurately and quickly detect any alienation or unauthorised use of Krka's strains. To this end, we developed a method for the identification of *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS 117162), which is an environmental isolate of Krka, d. d., Novo mesto. Its spores are used in Animavit®, a probiotic product. Using bioinformatics tools, we found unique characteristics of the genome of the strain, i.e. markers. With the Prokka software tool we annotated the 4,053,122 bp genome and found 4256 CDSs. By analysing 26 strains of *B. subtilis* using the BLAST tool, we obtained 74 unique genes of strain KBL 001. Then, we worked with the Panseq pan-genome sequence analysis program. With its NRF module we identified nine unique genomic regions when analysing 72 strains of *B. subtilis*. KBL_03216 – KBL_03218 genes and intergenic regions can be used as a target for a screening test. Using the Pan-genome Analysis module, 1297 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found, in which strain KBL 001 differs from the other 58 genomes of *B. subtilis* used in the analysis. The results of the comparative analysis included more than 300,000 SNPs of 59 genomes used to produce a similarity dendrogram. We created a bioinformatics package, which enables an accurate display of the relationship of the entered sequences of analysed strains and is capable of confirming the identity of the strain KBL 001 with a high degree of certainty.

Izdelava in vrednotenje nanosuspenzij deksametazona za dermalno uporabo

VALENTINA BOŽIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Roland Bodmeier**, Institute of Pharmaceutical Technology, Free University Berlin, Germany

Zmanjševanje velikosti delcev učinkovine je eden od pristopov, ki se uporablajo v farmacevtskem razvoju za izboljšanje lastnosti težko topnih učinkovin. Če zmanjšamo velikost delcev, se namreč fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin spremenijo. Nanosuspenzije se zaradi svojih prednosti (npr. izboljšana topnost in hitrost raztapljanja, večja adhezivnost in penetracija) že uporablajo v nekaterih farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih za dermalno uporabo. Kljub temu je večina raziskav osredotočena na njihovo peroralno in intravensko uporabo. V raziskavi smo velikost delcev zmanjšali z metodo mokrega mletja v krogličnem mlinu. Nanosuspenzije smo pripravili z dermalno sprejemljivimi stabilizatorji, tj. s poloksameroma 188 in 407, hidroksilpropilmethylcelulozo (HPMC) in vitaminom E polietenglikol sukcinata (vitamin E TPGS). Ovrednotili smo jih glede na velikost delcev (fotonska korelacijska spektroskopija, laserska difrakcija, svetlobna mikroskopija) in zeta potencial (laserska Dopplerjeva anemometrija). Najmanjšo povprečno velikost delcev smo določili v nanosuspenziji, stabilizirani s poloksamerom 407 (pribl. 300 nm, PI do 0,3), z zeta potencialom približno -22 mV. Stabilizator HPMC je v kombinaciji z vitaminom E TPGS ohranil najboljšo fizikalno stabilnost. Testirali smo tudi tri konzervanse: propilenglikol, sorbinsko kislino v kombinaciji s kalijevim sorbatom in benzilni alkohol. Dokazali smo, da propilenglikol najmanj vpliva na fizikalno stabilnost nanosuspenzij. Kratkoročni test stabilnosti in mikrobiološki test na agarju sta potrdila, da nanosuspenzija, stabilizirana s poloksamerjem 407, zahteva 16 % (m/m) propilenglikola, da je rast mikrobov popolnoma zavrtta in da je nanosuspenzija še vedno fizikalno stabilna.

Preparation and Characterisation of Dexamethasone Nanosuspensions for Dermal Application

VALENTINA BOŽIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Roland Bodmeier**, Institute of Pharmaceutical Technology, Free University Berlin, Germany

Nanosizing is one of the approaches used to deal with poorly soluble medicines in commercial pharmaceutical development nowadays. Physico-chemical properties of the medicine change with particle size reduction. Due to their advantages (e.g. improved solubility and dissolution rate, increased adhesiveness and penetration), nanosuspensions are already being used in some pharmaceutical and cosmetic dermal formulations. However, the majority of studies still focuses on oral and intravenous administration of nanosuspensions. The aim of this study was to prepare and evaluate nanosuspension formulations with dexamethasone for dermal administration. Pearl milling was chosen as a method for particle size reduction. Nanosuspensions were prepared using dermally acceptable stabilizers: poloxamer 188 and 407, hydroxylpropyl methylcellulose (HPMC) and vitamin E polyethylene glycol succinate (vitamin E TPGS). Nanosuspensions were characterised according to their particle size (photon correlation spectroscopy, laser diffraction, light microscopy) and zeta potential (laser Doppler anemometry). Nanosuspensions stabilized with poloxamer 407 have shown the smallest average particle size (~300 nm, polydispersity index up to 0.3) and zeta potential around -22 mV, indicating good physical stability. Stabilizer HPMC and its combination with vitamin E TPGS presented the best ability to maintain nanosuspension physical stability. Among the tested preservatives (propylene glycol, sorbic acid/potassium sorbate and benzyl alcohol) propylene glycol was shown to have the smallest impact on the physical stability of nanosuspensions. Short-term stability test and microbiological test on agar plates confirmed that nanosuspension stabilized with poloxamer 407, required 16% (w/w) of propylene glycol to fully inhibit microbial growth. This concentration did not affect the physical stability of nanosuspension.

Obročne pretvorbe 4-acilamino-3-pirazolidinonov in nova sinteza heksahidropirazolo[1,5-a]piridinov

MIHA DREV, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jurij Svetec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Pri raziskovalnem delu smo proučevali nenavadno obnašanje akrilatov, ki imajo na mestu 3 substituirane aromatske substituente, saj ti pri reakciji s hidrazin hidratom poleg 3-pirazolidinonov tvorijo tudi amino hidantoine. Naše študije so pokazale, da gre v teh primerih za tekmovanje med 1,2- in 1,4-adicijo, pri kateri nastane 3-pirazolidinon, medtem ko pri prvi nastane amino hidantoin. Prav tako smo dokazali, da v reakciji 3-pirazolidinona s hidrazin hidratom ne poteka odpiranje in ponovno zapiranje obroča v hidantoinski sistem, ampak poteka reduktivna cepitev benzilne vezi C-N v 3-pirazolidinonskih sistemih. V drugem delu smo razvili novo sintezno pot za pripravo 7-substituiranih 2-oksoheksahidropirazolo[1,5-a]piridin-8-azometin iminov. Izhajali smo iz 5-substituiranih 5-oksopentanojskih kislin, ki smo jima zaščitili karbonilno skupino. Sledila je homologacija z Masamune-Claisenovo kondenzacijo, pri kateri smo dobili β -keto estra, ki smo jima reducirali β -karbonilno skupino in dobljeno hidroksi skupino v nadaljnji stopnji pretvorili v meziloksi skupino. Sledila je ciklizacija s hidrazin hidratom v pirazolidinona ter simultana odščita karbonilne skupine in tvorba azometin iminov. Na te smo nato izvedli šeadicijo Grignardovega reagenta in v nadaljnji stopnji metilirali ter benzylirali obročni dušikov atom. S tem smo pokazali možno pretvorbo dobljenih azometin iminov.

Ring Transformation of 4-acylamino-3-pyrazolidinones and Novel Synthesis of Hexahydropyrazolo[1,5-a]pyridines

MIHA DREV, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Jurij Svetec**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Unusual reactivity of acrylates which have aromatic substituents on position 3 has been studied. Their reaction with a hydrazine hydrate in addition to 3-pyrazolidinones also results in amino hydantoines. Our study shows competition between 1,2-addition, which leads to hydantoins and 1,4-addition, which leads to 3-pyrazolidinons. We have also demonstrated that 3-pyrazolidinons do not open in reaction with a hydrazin hydrate with the following formation of hydantoins but a reductive C-N bond cleavage occurs in the 3-pyrazolidinons system. In the second part of our research we developed novel synthesis of 7-substituted azomethin imines. For parent compounds we used 5-substituted 5-oxopentanoic acids. Their carbonyl group was protected with dioxolane protection group. The next step was homologation with Masamune-Claisen condensation leading to corresponding β -keto esters. Their β -keto group was reduced and then transformed into the mesiloxy group. The β -mesiloxy esters were cyclized with hydrazine hydrate to the corresponding pyrazolidinones, followed by simultaneous deprotection of a carbonyl group and formation of the azomethyn imines. With addition of Grignard reagent to azomethine imines and following methylation and benzylation of a ring nitrogen atom we showed a possible transformation of the prepared azomethyn imines.

***In silico* načrtovanje in ovrednotenje 1*H*-indazolnih zaviralcev človeške topoizomeraze IIa**

MATEJ JANEŽIČ, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Andrej Perdih, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: Tomaž Šolmajer, Kemijski inštitut Ljubljana

Človeška DNA topoizomeraza IIa je del družine topoizomeraz, skupine encimov, ki so sposobni spreminjati topologijo molekule DNA. Topoizomeraza IIa je nujna za nemoteno celično delitev, saj sodeluje pri sproščanju in razpletanju DNA med procesom prepisovanja in podvojevanja. Zaradi specifičnega izražanja je primerna in validirana tarča za protirakave učinkovine. V raziskavah smo s kombinacijo metod *in silico* in *in vitro* izvedli dvostopenjsko načrtovanje novih katalitičnih zaviralcev človeške topoizomeraze IIa. Na prvi stopnji smo zgradili farmakofojni model in z njim prerezetali interno knjižnico spojin. Aktivnost izbranih zadetkov smo ovrednotili z encimskim testom *in vitro* in identificirali nov razred 1*H*-indazolnih zaviralcev človeške topoizomeraze IIa. Na drugi stopnji smo na podlagi dobljenih aktivnosti sestavili usmerjeno knjižnico analogov aktivnih spojin in jo ovrednotili s pomočjo molekulskega sidranja. Izbranim zadetkom smo izmerili inhibicijsko aktivnost in uspešno razširili nabor aktivnih spojin. Z dodatnimi encimskimi testi smo študirali še mehanizem inhibicije. Opravili smo test ATPazne aktivnosti in (kompetitivni) test spodbujanja cepitve DNA, s katerima smo potrdili, da spojine delujejo kot katalitični inhibitorji. Z mikrotermoforezo (MST) smo izvedli vezavne študije in potrdili vezavo na ATPazno domeno topoizomeraze IIa. Z MTT-testom smo študirali citotoksičnost naših spojin. Postavili smo tudi *in silico* vezavni model v vezavnem mestu za ATP in ga proučili s pomočjo molekulske dinamike (MD). Naši rezultati so dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj katalitičnih zaviralcev topoizomeraze IIa.

***In silico* Design and Evaluation of 1*H*-indazole Inhibitors of the Human Topoisomerase IIa**

MATEJ JANEŽIČ, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Andrej Perdih, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Tomaž Šolmajer, National Institute of Chemistry Ljubljana

The human DNA topoisomerase IIa is part of the family of topoisomerases, a group of enzymes that are able to induce topological changes in the DNA. It is essential for cell proliferation as it helps to relax and decatenate DNA during transcription and replication. Due to the nature of its expression, it is a viable and validated target for anti-cancer research. In this research we combined *in silico* and *in vitro* methods in a two-stage process in an effort to discover new inhibitors of the topoisomerase IIa. In the first phase we constructed a pharmacophore model and screened our internal library of molecules. The activity of selected hits was assayed in *in vitro* enzymatic assay and a new class of 1*H*-indazole topo IIa inhibitors was discovered. In the second phase, based on the obtained data, a library of analogues of active compounds was compiled and then screened using molecular docking. Selected hits were then assayed providing deeper insight into the SAR of this compound class. Additional enzymatic assays were performed to study the inhibitory mechanism. With cleavage, competitive cleavage and ATPase activity assays we were able to elucidate the mechanism of action; we proved that our compounds act as catalytic inhibitors. Binding studies with MicroScale Thermophoresis (MST) confirmed binding to the ATPase domain. With the MTT assay we evaluated the citotoxicity of our compounds and we also constructed an *in silico* binding model and investigated it using molecular dynamics (MD). Our results represent a promising starting point for future development and improvement of human DNA topoisomerase IIa catalytic inhibitors.

Vrednotenje obhodnih časov pelet v Wursterjevi komori z metodo fotoluminiscence

DOMEN KITAK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Rok Dreu**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Rok Šibanc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Procesna oprema izbora za serijsko oblaganje pelet je Wursterjeva komora, ki temelji na vrtinčnoslojni tehnologiji. Končna debelina obloge je kritičen atribut kakovosti pelet, ki je pomemben za doseganje zastavljene funkcionalnosti. V vzorcu pelet so zaradi velikostne porazdelitve vedno hkrati večje in manjše pelete, ki se lahko v različnih procesih različno prednostno obložijo, lahko pa pride tudi do variabilnosti debeline obloge znotraj skupine pelet enake velikosti. Neenakomerno kroženje in senčenje pelet v območju oblaganja sta temeljna procesa, ki vodita v variabilnost debeline obloge pelet in ju lahko obravnavamo ločeno. Da bi razložili izvor variabilnosti debeline obloge pelet med procesom oblaganja v Wursterjevi komori, smo razvili sistem za zaznavo obhodnih časov fotoluminescenčno označene pelete. Proučevali smo vpliv procesnih spremenljivk, npr. velikosti pelet, pretoka zraka za fluidizacijo in razmika med razmejitvenim valjem in distribucijsko ploščo, na porazdelitev obhodnih časov pelet ter ovrednotili povprečni delež prispevka variabilnosti obhodnih časov na celotno variabilnost debeline obloge pelet.

Evaluation of Pellet Cycle Times in a Wurster Chamber Using a Photoluminescence Method

DOMEN KITAK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Rok Dreu**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Rok Šibanc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Fluid-bed coating using a Wurster chamber is the preferred method for coating pellets. The final coating thickness of pellets is an important critical quality attribute that influences desired coating functionality. Due to the size distribution of pellets, a difference between coating processes can be observed in the coating thickness of smaller versus larger pellets. In addition, variability in the coating thickness can also be observed within the same pellet size. Variability in cycle times and the shading effect of pellets in the coating zone are two fundamental processes that lead to the overall variability of the coating thickness of pellets and can be addressed separately. In order to understand the origin of the variability of the coating thickness of pellets that arises during a Wurster coating process, a dedicated photoluminescence detection system for tracing pellet cycle times was developed. The system was used to study the influence of process variables, such as pellet size, fluidisation air flow rate and partition gap on the cycle time distributions of pellets, and to evaluate the contribution of the variability of cycle times on the variability of the coating thickness of pellets.

Razvoj metode za določanje aminokislin v proteinih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

LUKA KOSEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jožko Cesar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Proteinska prehranska dopolnila so enostavno dostopni in pogosto uporabljeni pripravki za pospeševanje povečevanja mišične mase. Zaradi pogosto ugotovljenih odstopanj vzorcev od specificiranih vrednosti je njihova kakovost vprašljiva. Namen raziskovalnega dela je bil preveriti kakovost na trgu dostopnih dopolnil ter ovrednotiti točnost specifikacij in ustreznost vzorcev. Za ta namen smo postavili in optimizirali metodo za izvajanje aminokislinske analize. Aminokislinska analiza je sestavljena iz treh korakov. Izvajali smo kislinsko hidrolizo v tekoči fazi s 6 M HCl in 1-odstotnim fenolom ob 24-urnem segrevanju pri 110 °C. Derivatizacijo smo izvajali avtomatizirano z uporabniškim programom (UDP) na avtomatskem vzorčevalniku. Za derivatizacijo primarnih aminokiselin smo uporabili ortoftalaldehid (OPA), za derivatizacijo sekundarnih pa fluorenilmetiloksikarbonil klorid (FMOC-Cl). Ločevanje derivatov smo izvedli na reverznofaznem HPLC z mobilno fazo s pH 8,2, gradientno elucijo in pretokom 1,5 ml/min. Za določanje istovetnosti aminokiselin smo uporabili retencijski čas. Odzive smo kvantificirali s pomočjo parametra AUC/IS in uporabo hidroliziranega zunanjega standarda. Uspešno smo kalibrirali 8 od 18 aminokiselin in vse proteine. S končno metodo smo analizirali 10 vzorcev. Pri določanju točnosti specifikacij smo ugotovili, da jih je večina zunaj postavljenega tolerančnega območja 10 % od določene vrednosti. Pri analizi ustreznosti vzorcev smo ugotovili, da ne ustreza nobeden od 6 vzorcev s celotnimi aminokislinskimi profili in da ustreza vsi 4 vzorci z eno samo vrednostjo za vse proteine. To ni posledica boljše kakovosti, temveč pomanjkanja referenčnih specifikacij. Poleg tega je bila večina posameznih analiznih rezultatov neustrezna, saj so bili zunaj predpisane območje od 70 do 200 % določene vrednosti.

Developing a Method for Amino Acid Analysis in Proteins by High Performance Liquid Chromatography

LUKA KOSEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Mentor: **Jožko Cesar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Protein dietary supplements are widely available and used by professional and amateur sportsmen to induce and maintain muscular hypertrophy after physical activities. Due to frequent irregularities in specifications, their quality is often questionable. The aim of our research was to determine the quality of selected supplements available in the Slovenian market by determining the accuracy of their specifications and their adequacy. For this purpose we developed and improved a method for performing amino acid analysis. Amino acid analysis compiles three steps. Hydrolysis was performed in liquid phase using 6 M HCl and 1% phenol heated at 110°C for 24h. Derivatization was executed automatically using user defined programme and auto sampler. For primary amino acids we used orto-phtalaldehyde (OPA), and for secondary amino acids fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl). Separation of derivates was accomplished on reverse phase HPLC with mobile phase at pH 8.2, gradient elution and flow of 1.5 mL/min. Retention time was used for identification. We quantified responses by using AUC/IS and by using a hydrolysed external standard. We successfully calibrated 8 out of 18 amino acids and total protein content. With the finalised method we analysed 10 samples. Testing accuracy of their specifications showed that a majority of values was outside the 10% tolerated deviation. Investigating the adequacy of samples showed that all 6 samples with fully specified amino acid content were inadequate and all 4 with specified only total protein content were adequate. This is not due to quality reasons, but due to a lack of specified reference values. In addition most of the analytical results were found to be outside of the advised deviation from 70% to 200% of the reference value.

Farmakokinetično-farmakodinamični model sedacije s fentanilom in midazolamom pri otrocih na umetnem predihavanju

TINA LIČINA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Iztok Grabnar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Štefan Grosek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Odmerjanje sedativov pri otrocih je v primerjavi z odmerjanjem pri odraslih zahtevno zaradi velikih razlik v farmakokinetiki in farmakodinamiki in tudi zaradi interindividualnih razlik med otroki. Namen magistrskega dela je bil razviti farmakokinetično-farmakodinamični (FK-FD) model sedacije, ki bo omogočil individualizacijo režima odmerjanja fentanila in midazolama za doseganje optimalne stopnje sedacije pri otrocih na umetnem predihavanju. Razvili smo populacijski FK-model fentanila, ki smo ga skupaj z meritvami kazalnikov učinka (lestvico COMFORT-B in bispektralnim indeksom, BIS) uporabili pri razvoju FK-FD-modelov sedacije. Pri razvoju smo spremenjali strukturo modela, število naključnih spremenljivk, ki opisujejo interindividualno variabilnost, ter model za rezidualno variabilnost. Opisali smo vpliv tolerance in vključili vplive sočasnih spremenljivk. Ugotovili smo vpliv genotipa COMT na intrinzično jakost fentanila, ki je pri homozigotih in heterozigotih variantnega tipa skoraj za 80 % večja kot pri homozigotih divjega tipa, vpliv genotipa ABCB1 na maksimalni učinek fentanila ter vpliv pomenstrualne starosti – starejši otroci potrebujejo večjo koncentracijo fentanila za doseganje enake stopnje sedacije.

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Sedation with Fentanyl and Midazolam in Mechanically Ventilated Children

TINA LIČINA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Iztok Grabnar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Štefan Grosek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Dosing sedative agents in paediatrics is challenging since children differ in pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters from adult patients and have increased interindividual variability. The aim of this thesis was to develop a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model of sedation, which will assist in the dosing individualisation of fentanyl and midazolam for optimal sedation of intubated paediatric patients. Firstly, population PK model of fentanyl was developed, which was used to evaluate the associations with indicators of pharmacodynamic effects (COMFORT-B scale and bispectral index, BIS) to develop PK-PD models of sedation. The structure of PK-PD models, the number of covariates which describe interindividual variability and the model for residual variability (measurement error) differed between the models. The effect of tolerance and covariate effects were included. COMT genotype was associated with intrinsic potency of fentanyl, while ABCB1 influenced efficacy. Patients who are carriers of variant COMT allele had 80% higher intrinsic potency of fentanyl compared with patients with homozygous wild type genotype. Additionally, we found the effect of postmenstrual age, as older children needed higher doses of fentanyl to achieve the same sedation.

Načrtovanje in sinteza tiazolinonskih zaviralcev ksantin-oksidaze

GAŠPER POKLUKAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Marko Anderluh**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Ksantin-oksidaza je encim, vpletен в patofiziologijo protina in drugih bolezenskih stanj. Ker sta na svetovnem trgu od zaviralcev ksantin-oksidaze prisotna le allopurinol in febuksostat, obstaja interes za razvoj novih učinkovin tega razreda. Na podlagi nedavno objavljenih 2-amino-5-alkilidene-tiazol-4-onskih zaviralcev ksantin-oksidaze smo sintetizirali knjižnico 22 spojin z enakim osnovnim skeletom, a drugačnim naborom substituentov, pripetim nanj. S tem smo dodatno raziskali kemijski prostor in spremnili fizikalno-kemijske lastnosti teh zaviralcev. Ustreznost spojin smo ovrednotili z uporabo tehnik kemijske analitike. Z metodami *in silico* smo predvideli dva možna načina vezave na aktivno mesto encima. Knjižnico smo poslali na biološka testiranja zaviranja ksantin-oksidaze, kjer se je pokazalo, da so najmočnejši zaviralci derivati s para-karboksi skupino na benzilidenskem delu molekule. Najmočnejša zaviralca sta pokazala veliko afiniteto do encima in jakost zaviralnega delovanja, primerljivo z allopurinolom. Ker so tiazolinoni v literaturi pogosto označeni kot t. i. PAINS (Pan-Assay Interference compoundS), smo proučili možnost neselektivnega delovanja sintetiziranih spojin. Preizkusili smo reaktivnost našega najmočnejšega zaviralca v prisotnosti biološko relevantnih nukleofilov in analizirali njegovo sposobnost za tvorbo agregatov v raztopinah ter absorpcijo svetlobe v UV-vidnem delu spektra. Rezultati kažejo, da spojina ne deluje po nespecifičnem mehanizmu in da je njena aktivnost posledica nekovalentnih specifičnih interakcij s tarčnim encimom.

Design and Synthesis of Thiazolinone Xanthine Oxidase Inhibitors

GAŠPER POKLUKAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Marko Anderluh**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Xanthine oxidase is an enzyme involved in the pathophysiology of gout and other diseases. Since allopurinol and febuoxostat are the only xanthine oxidase inhibitors used around the world, there is much interest in the development of new medicines from this class. Based on the recently published 2-amino-5-alkylidene-thiazole-4-one xanthine oxidase inhibitors we have synthesized a library of 22 compounds with the same basic structure, yet a different set of substituted scaffolds. By doing so, we have explored the chemical space and chemico-physical properties of these inhibitors. We have evaluated the compounds using standard analytical techniques. *In silico* test results show two possible binding modes to the enzyme active site. The entire library was then assayed on xanthine oxidase. Derivatives with a para-carboxy group on the benzylidene moiety have turned out to be the most potent inhibitors. The two derivatives with the highest potency have shown high affinity towards the enzyme with inhibitory constants comparable to allopurinol. Since thiazolinones are often labelled as PAINS ("Pan-Assay Interference compoundS") in the literature, we have studied the possibility of non-selective mechanisms of action of synthesized compounds. We have tested the reactivity of our hit compound towards biologically relevant nucleophiles, analysed its tendency to form aggregates in solutions and evaluated its UV-VIS absorbance. Our results show that the compound probably does not act through a non-specific mechanism and that its activity is a consequence of non-covalent specific interactions with the target protein.

Analiza alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v izvlečkih gabeza (*Symphytum officinale L.*) s kapilarno elektroforezo

NINA POLJŠAK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Nina Kočevar Glavač, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Navadni gabez je zdravilna rastlina, ki jo že dolgo uporabljamo tako v ljudski medicini kot tudi za terapevtske namene v okviru uradne medicine. Izvleček gabeza vsebuje sestavine, ki pospešujejo celjenje ran, poleg tega pa vsebuje tudi pirolizidinske alkaloide, ki delujejo kancerogeno. 100 µg pirolizidinskih alkaloidov na dan je dovoljena količina, ki jo lahko 4 do 6 tednov neprekinjeno nanašamo na kožo, ne da bi s tem ogrožali bolnikovo zdravje. Želeli smo preveriti, koliko pirolizidinskih alkaloidov na dan bolnik nanese na kožo z uporabo »gabezove kreme«, ki jo razvija podjetje Koželj, d. o. o., Dob. Najprej smo pirolizidinske alkaloide izolirali iz izvlečkov, pridobljenih po postopku, ki ga uporablja podjetje, in s kapilarno elektroforezo ugotovili njihovo vsebnost v izvlečkih. Zaključili smo, da dnevne omejitve 100 µg pirolizidinskih alkaloidov s temi izvlečki ob predvideni uporabi skoraj ni mogoče preseči. Poleg vsebnosti pirolizidinskih alkaloidov smo ugotavljali tudi vsebnost alantoina, saj je ena najpomembnejših učinkovin v gabezovem izvlečku. Če želimo zagotoviti veliko vsebnost alantoina v kremljih, moramo uporabljati izvlečke gabezovih korenin z rodovitnih in obdelanih rastišč, saj je v njih največ alantoina.

Analysis of Allantoin and Pyrrolizidine Alkaloids in Comfrey (*Symphytum officinale L.*) Extracts by Capillary Electrophoresis

NINA POLJŠAK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Nina Kočevar Glavač, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Stanko Srčič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The common comfrey is a medicinal plant used for therapeutic purposes in both official medicine and traditional medicine. The comfrey extract contains ingredients that accelerate wound healing; in addition it contains pyrrolizidine alkaloids that engage in carcinogenic activity. A total of 100µg of pyrrolizidine alkaloids is the acceptable daily quantity that is allowed to be applied to skin for the duration of 4 to 6 weeks, without having to compromise our patients' health. We wanted to investigate the quantity of pyrrolizidine alkaloids that patients daily apply onto their skin with the comfrey creme developed by the company Koželj d.o.o. Dob. First we isolated pyrrolizidine alkaloids from the extracts gained according to the method used in the company, and with capillary electrophoresis we have established their content in the extracts. We have concluded that the daily limit of 100µg is almost impossible to exceed. In addition to the content of pyrrolizidine alkaloids, we also determined the content of allantoin as it is one of the most important active ingredients in the comfrey extract. We established that in order to make a cream containing a large quantity of allantoin, the extracts from roots grown on fertile and cultivated land have to be used.

Pomen nizkih serumskih koncentracij infliksimaba za klinični izid pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo

VALENTINA ŠAVRIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Joško Osredkar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: **David Drobne**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Največji problem pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB), ki se zdravijo z infliksimabom, je izguba učinka zdravila po tem, ko se bolniki sprva odzovejo na indukcijsko zdravljenje. V raziskavi smo žeeli ugotoviti, ali z določanjem serumskih koncentracij infliksimaba in protiteles proti infliksimabu lahko predvidimo uspešnost zdravljenja z infliksimabom, tj. možnost za dokončno odpoved infliksimaba, in ali lahko predvidimo uspešnost optimizacije odmerka infliksimaba, če so serumski koncentracije infliksimaba nezaznavne in/ali so prisotna antiinfliksimabna protitelesa. Ugotovili smo, da so bili bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami infliksimaba dlje časa uspešno zdravljeni z infliksimabom in so imeli manjše število dokončnih odpovedi infliksimaba kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami. Dokazali smo, da ima prisotnost protiteles proti infliksimabu ključno vlogo pri uspešnosti zdravljenja bolnikov s KVČB, saj je bila pri bolnikih s prisotnimi protitelesi ogroženost za dokončno odpoved infliksimaba in večje število dokončnih odpovedi infliksimaba bistveno večja kot pri bolnikih brez prisotnih protiteles proti infliksimabu. Prav tako je bila pri bolnikih s prisotnimi protitelesi proti infliksimabu možnost za dvig serumskih koncentracij po optimizaciji odmerka infliksimaba izrazito manjša kot pri bolnikih brez prisotnih protiteles.

The Importance of Undetectable Infliximab trough Levels for Clinical Outcome of Patients with Inflammatory Bowel Disease

VALENTINA ŠAVRIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Joško Osredkar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **David Drobne**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

The biggest problem in patients with inflammatory bowel disease (IBD) treated with infliximab is the loss of response to infliximab after they had initially responded to induction therapy. We aimed to explore whether the determination of serum concentrations of infliximab and antibodies to infliximab can predict the success of treatment with infliximab, i.e. permanent infliximab failure, and a successful infliximab dose optimisation in case of undetectable infliximab concentrations with or without antibodies to infliximab. We have found that the patients with always detectable serum concentrations of infliximab had a lower risk for loss of response to infliximab and experienced the permanent loss of response to infliximab less frequently than the patients with at least once undetectable serum concentrations. The presence of antibodies to infliximab plays a key role in the successful treatment of patients with IBD. We have observed a major negative impact of high antibodies to infliximab because those patients had a much higher risk for permanent loss of response to infliximab than the patients without antibodies. The antibodies to infliximab also importantly influenced the success of infliximab dose optimisation, as only few patients with antibodies to infliximab developed detectable serum concentration after dose optimisation compared to patients without antibodies to infliximab.

Adicija dimetil acetilendikarboksilata na nekatere substituirane enaminone

ROK ŠINKOVEC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

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

V diplomskem delu so predstavljeni rezultati reakcij adicije nekaterih substituiranih enaminonov na dimetil acetilendikarboksilat. Izhodne etil ketone smo z reagentom *N,N*-dimetilformamid dimetil acetalom pretvorili v ustrezne (*E*)-3-(dimetilamino)-2-metil-1-(substituirane)prop-2-en-1-one. V naslednji stopnji smo te spojine z dimetil acetilendikarboksilatom v reakciji [2+2] cikloadicije pretvorili v ustrezne (*2E,3E*)-2-[(dimetilamino)methilen]-3-[1-oxo-1-(substituirane)propan-2-ilidene]sukcinate. V zadnji stopnji smo (*2E,3E*)-2-[(dimetilamino)methilen]-3-(1-oxo-1-phenylpropan-2-ilidene)succinat z amonijevim acetatom pretvorili v dimethyl 5-methyl-6-phenylpyridin-3,4-dikarboksilat. Pri sintezi Michaelovih aduktov so bile izhodne spojine različni metil ketoni, ki smo jih z *N,N*-dimethylacetamid dimetil acetalom pretvorili v ustrezne (*E*)-3-(dimetilamino)-1-substituirane but-2-en-1-one. Te smo nato z amonijevim acetatom pretvorili v (*Z*)-3-amino-1-(substituirane)but-2-en-1-one, ki smo jih v zadnji stopnji z DMAD v reakciji Michaelove adicije pretvorili v dimethyl 2-[(*Z*)-3-amino-1-oxo-1-(substituirane)but-2-en-2-yl]fumarate.

Addition of Dimethyl Acetylenedicarboxylate to some Substituted Enaminones

ROK ŠINKOVEC, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

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

The diploma thesis presents the results of addition reactions of some substituted enaminones to dimethyl acetylenedicarboxylate. The starting ethyl ketones were converted to (*E*)-3-(dimethylamino)-2-methyl-1-(substituted)prop-2-en-1-ones with *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal. In the following step, these compounds were transformed into (*2E,3E*)-2-[(dimethylamino)methylene]-3-[1-oxo-1-(substituted)propan-2-ylidene]succinates in [2+2] cycloaddition reaction with dimethyl acetylenedicarboxylate. In the last step, (*2E,3E*)-2-[(dimethylamino)methylene]-3-(1-oxo-1-phenylpropan-2-ylidene)succinate was converted to dimethyl 5-methyl-6-phenylpyridine-3,4-dicarboxylate with the use of ammonium acetate. In the synthesis of Michael adducts, the starting compounds were various methyl ketones that were converted to (*E*)-3-(dimethylamino)-1-substituted but-2-en-1-ones with *N,N*-dimethylacetamide dimethyl acetal. These were then transformed into (*Z*)-3-amino-1-(substituted)but-2-en-1-ones with ammonium acetate. In the last step, these compounds were reacted with DMAD to afford dimethyl 2-[(*Z*)-3-amino-1-oxo-1-(substituted)but-2-en-2-yl]fumarates.

Računalniške simulacije direktne alkilacije DNK z akrilonitrilom

EVA ŠPANINGER, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Mentor: **Urban Bren**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Pogostost raka nas zavezuje k proučevanju delovanja kancerogenih snovi na organizem, predvsem na dedni material. Akrilonitril sodi med kancerogene substance in se po dosedanjih predvidevanjih presnavlja predvsem po oksidativnem mehanizmu, vendar pa alternativni mehanizem – mehanizem direktne alkilacije oz. Michaelove adicije akrilonitrila na DNK – še ni dovolj proučen. Zato smo v magistrskem delu študirali mehanizem Michaelove adicije prek računalniških kvantnomenhanskih simulacij na podlagi več različnih metod *ab initio* s programskim paketom Gaussian 09. Za upoštevanje vpliva topila smo uporabili naslednje implicitne modele vode: model polarizabilnega kontinuma, metodo Langevinovih dipolov ter model AMSOL za semiempirične metode. Pridobljene aktivacijske proste energije kažejo, da je reakcija direktne alkilacije z vidika prostoenergijske pregrade povsem mogoča. Skladno z eksperimentalnimi študijami naši rezultati nakazujejo, da je guanin najbolj podvržen direktni alkilaciji s strani akrilonitrila, precej verjetni pa sta tudi alkilaciji akrilonitrila na adenin in citozin. Primerjava naših rezultatov z rezultati adicije cianoetilen oksida na DNK je razkrila, da je mehanizem direktne alkilacije morda celo verjetnejši od oksidativnega mehanizma presnove akrilonitrila. Nadaljnje proučevanje mehanizma Michaelove adicije akrilonitrila na DNK je torej bistvenega pomena, saj je lahko eden od ključnih mehanizmov kancerogeneze.

Computer Simulations of Direct DNA Alkylation with Acrylonitrile

EVA ŠPANINGER, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor
Supervisor: **Urban Bren**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

The prevalence of cancer obliges us to study the impact of carcinogenic substances on organisms or, more importantly, on their genetic material. Acrylonitrile is a well-known chemical carcinogen and its primary carcinogenic mechanism is presumed to be exerted through the oxidative pathway, although the Michael addition pathway has not yet been studied in sufficient detail. Therefore, we have addressed this mechanism through quantum mechanical simulations using several *ab initio* methods incorporated in the Gaussian 09 series of programs. To consider the impact of the solvent, we have used the following implicit water models: the polarisable continuum model, the Langevine dipoles method, and the AMSOL model for semi-empirical calculations. Based on the calculated activation free energies, we concluded that direct alkylation of DNA by acrylonitrile is perfectly plausible. In accordance with the experimental data, the results show that guanine represents the most reactive nucleobase to acrylonitrile; however, direct alkylations of adenine and cytosine with acrylonitrile are highly probable as well. The comparison of our results with the results of cyanoethylene oxide alkylation of DNA have shown that the investigated mechanism might even be more energetically favourable than the oxidative mechanism, thus possibly making the direct Michael addition a more plausible mechanism of acrylonitrile-induced carcinogenesis. Further studies of the Michael addition of acrylonitrile to DNA are required as it may represent one of its key carcinogenic mechanisms.

Inženiring mikro- in nanodelcev z elektrostatskim razprševanjem za izdelavo zdravil

NINA ŠTRAVS, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Zoran Lavrič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Za izdelavo učinkovitega in stabilnega zdravila je pri načrtovanju potrebna skrbna izbira fizikalnih lastnosti zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi za vse vrste farmacevtskih oblik. Velikost, porazdelitev velikosti in oblika delcev lahko pomembno vplivajo na lastnosti formulacij in tudi na končno kakovost, izvedljivost, stabilnost in videz izdelanega zdravila. Danes vemo, da razvoj novega izdelka kritično omejuje majhna topnost učinkovin v vodi, kar se posledično lahko pokaže v nezadostni hitrosti raztopljanja in biološki uporabnosti. Med številnimi razpoložljivimi tehnikami za izdelavo mikro- in nanodelcev predstavlja elektrostatsko razprševanje inovativno in obetavno tehnologijo za elektrohidrodinamično atomizacijo raztopin. Pri raziskovanju smo načrtovali in razvili proces elektrostatskega razprševanja za izdelavo polimernih mikro- in nanodelcev polikaprolaktona in polivinilpirolidona, mikrodelcev učinkovin klaritromicina in ciprofloksacin ter kombinacije obeh, polimera in učinkovine. Rezultati kažejo, da pri optimiziranem procesu nastanejo kapljice z ozko porazdelitvijo velikosti, po izhlapevanju topila pa nastanejo trdni delci z definirano velikostjo, ozko porazdelitvijo in specifično morfologijo. Ne glede na uporabljeni vrsto polimera so izdelani polimerni mikro- in nanodelci sferični. Nasprotno je morfologija delcev učinkovin v največji meri odvisna od učinkovine: nastali delci klaritromicina so v obliki okroglih, nagubanih ploščic ali votlih delcev, medtem ko dajejo raztopine ciprofloksacina sferične mikrodelce s homogeno površino. Enako morfologijo delcev dobimo po elektrostatskem razprševanju raztopin polimera in učinkovine pri razmerju 1 : 1. Najustreznejše preliminarne rezultate smo nadalje uporabili za načrtovanje eksperimentov. Pri tem smo statistično ovrednotili vpliv procesnih in formulacijskih parametrov na velikost mikrodelcev, izdelali model in ga tudi preverili.

Micro- and Nanoparticles Engineering with Electrospraying for Medicine Production

NINA ŠTRAVS, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Zoran Lavrič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

To produce an efficacious and stable medicine, a careful selection of physical properties of active pharmaceutical ingredients (API) and excipients is required for each type of dosage forms. The size, distribution and shape of the particles can affect bulk properties, product performance, process-ability, stability and appearance of the final product. It is now generally recognized that poorly water-soluble drugs represent a rate-limiting step in dissolution and subsequent bioavailability. Among many techniques, available for the formulation of defined micro- or nanosized particles, electrospraying is rapidly emerging as an innovative technology for electrohydrodynamic atomisation of solutions. In the present study, an electrospraying process for preparation of micro- and nanoparticles, comprised of pure polymer (PCL, PVP), pure active ingredient (ciprofloxacin, clarithromycin), or mixtures of polymer and API, was designed and developed. The results show that solvent evaporation from droplets with a narrow size distribution led to the particle formation with a defined size, distribution and morphology. Irrespective to the polymer type, their solutions resulted in spherical particles. In contrast, API particle morphology depended mainly on its type: clarithromycin formed wrinkled, round platelets or hallow spheres, while the solutions of ciprofloxacin produced spherical particles with homogeneous surfaces. The described morphology was preserved when the API and polymer were present in the ratio of 1:1. Further on, the obtained formulation and process parameters were chosen for the Design of Experiments, where the importance of electrohydrodynamic process parameters on particle properties was evaluated, and the process optimized with regard to the desired particle properties.

Sinteza paladijevih kompleksov s triazolilidenskimi ligandi in njihova uporaba v katalizi

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

Tvorba vezi ogljik-ogljik predstavlja eno najpomembnejših pretvorb v sintezni organski kemiji tako v akademskem kot v industrijskem merilu. Mnoge od teh pretvorb na žalost potekajo le v prisotnosti dragih in neobstojnih paladijevih katalizatorjev, pa tudi v prisotnosti različnih ekološko neprijaznih dodatkov, ki po končani operaciji predstavljajo ekonomsko in naravovarstveno problematičen odpadek. Ena takšnih kataliziranih tvorb vezi ogljik-ogljik je alkinylieranje aromatskih halogenidov, ki tradicionalno, tudi v industrijskem merilu, poteka v prisotnosti velikih količin paladija in bakra in v prisotnosti organske baze, ki sočasno služi kot reakcijsko topilo. Mi smo za omenjeno pretvorbo razvili nov paladijev katalizator, ki deluje bolje od vseh do sedaj poznanih. Alkinylieranje aromatskih halogenidov katalizira v zelo majhnih količinah in v vodi kot edinem topilu brez kakršnihkoli dodatkov. Delovanje smo med drugim prikazali na velikem naboru substratov. Eden od teh je bil intermediat, ki je ključen za industrijsko pripravo zdravila za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni. Študij poteka omenjene reakcije z našim katalizatorjem je pokazal, da poteka po do sedaj še neopisanem mehanizmu.

Synthesis of Palladium Complexes with Triazolylidene Ligands and their Application in Catalysis

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

One of the most important transformations in synthetic organic chemistry, increasingly important in both industry and academia, is the formation of carbon-carbon bond. Many of these transformations, however, still require the use of expensive and unstable metallic catalysts, as well as other additives, which among others result in economically and environmentally problematic waste. Alkylation of aromatic halogenides, known as the Sonogashira reaction, is an important example. It traditionally proceeds in the presence of considerably large amounts of palladium catalyst, copper co-catalyst and organic base, which also serves as a solvent. In this context, we have developed a new palladium catalyst, which is superior to previously known analogues in both stability and activity. The alkylation of aromatic halogenides with our catalyst is enabled in very small loadings, in water as the only reaction solvent, and without other additives. A broad scope of substrates was demonstrated to be cross-coupled by using our catalyst with extremely high robustness. To prove the concept, our catalyst was used for the synthesis of an intermediate that has been used in the industrial preparation of a neurodegenerative medicine. In addition, we have facilitated an insight into the reaction mechanism of the cross-coupling reaction with our catalyst. Interestingly, the mechanism proceeds via two interconnected palladium cycles with homogenous Pd⁰ and Pd^{II} species, and is unprecedented in the palladium catalysed reactions.

Vpliv kationov na zvijanje oligonukleotida d(G₄C₂), njihova lokalizacija in dinamika

MATJA ZALAR, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Janez Plavec, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: Primož Šket, Kemijski inštitut Ljubljana

Povečano število ponovitev heksanukleotidnega zaporedja GGGGCC v nekodirajoči regiji gena *c9orf72* je povezano z nastankom amiotrofne lateralne skleroze in frontotemporalne demence. Natančen mehanizem nastanka bolezni še ni znan, dokazano pa je, da tovrstne heksanukleotidne ponovitve v odvisnosti od števila ponovitev tvorijo različne tipe DNA in RNA G-kvadrupleksov. V okviru magistrskega dela smo strukturne lastnosti heksanukleotida d(GGGGCC) proučevali z jedrsko magnetno resonanco in komplementarnimi spektroskopskimi tehnikami. Ugotovili smo, da oligonukleotid d(GGGGCC) v odsotnosti ionov tvori stabilno predzvito strukturo, v prisotnosti $^{15}\text{NH}_4^+$ ionov pa se zvije v tetramolekularni paralelni G-kvadruplex s štirimi G-kvarteti in tremi vezavnimi mesti za $^{15}\text{NH}_4^+$ ion. Proučili smo potek izmenjave $^{15}\text{NH}_4^+$ ionov s K⁺ ioni in ugotovili, da prisotnost K⁺ ionov povzroči dimerizacijo dveh monomernih enot [d(GGGGCC)]₄ G-kvadrupleksa v simetričen 5'-5' dimer. Izračunali smo tudi strukturi z atomsko resolucijo [d(GGGGCC)]₄ G-kvadrupleksov, ki se tvorita v prisotnosti $^{15}\text{NH}_4^+$ in K⁺ ionov. Za razumevanje lastnosti modelnega sistema je poleg strukture pomembna tudi njegova dinamika izmenjave ionov med vezavnimi mesti znotraj G-kvadrupleksa in z okoliško raztopino, ki smo jo okarakterizirali s pomočjo NzExHSQC eksperimentov.

Influence of Cations on Folding of Oligonucleotide d(G₄C₂), their Localization and Dynamics

MATJA ZALAR, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Janez Plavec, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Primož Šket, National Institute of Chemistry Ljubljana

The GGGGCC hexanucleotide repeat expansion mutation, located in the noncoding regions of the *c9orf72* gene, is the most common mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. The exact mechanism of disease is not known to date; however it has been shown that both DNA and RNA hexanucleotide repeats form various types of G-quadruplexes, depending on the number of repeats. Utilizing nuclear magnetic resonance and complementary spectroscopic methods we studied structural properties of oligonucleotide d(GGGGCC). In the absence of cations, d(GGGGCC) forms stable prefolded structure. Upon addition of $^{15}\text{NH}_4^+$ ions, d(GGGGCC) folds into a parallel tetrameric G-quadruplex with four G-quartets and three binding sites for $^{15}\text{NH}_4^+$ ions. Upon titration with K⁺ ions, $^{15}\text{NH}_4^+$ ions gradually exchange with K⁺ which causes dimerization of two monomeric [d(GGGGCC)]₄ units into a symmetrical 5'-5' head-to-head dimer. We have also determined high resolution structure of G-quadruplexes formed by d(GGGGCC) in the presence of K⁺ and $^{15}\text{NH}_4^+$ ions. Since the understanding of dynamic properties of the model system is of crucial importance, we have investigated the exchange of $^{15}\text{NH}_4^+$ ions between binding sites and with a bulk solution and determined the exchange rates for individual movements using NzExHSQC experiments.

Aktivno tarčenje cisteinskih katepsinov z liposomi, konjugiranimi s cistatinom C

TRISTAN KOVAČIČ, DOMEN KULOVEC, UROŠ PREŠERN, Gimnazija Novo mesto

Mentorja: Lovro Kramer, Andreja Bratovš, Institut Jožef Stefan

Somentorja: Boris Turk, Institut Jožef Stefan, Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

V zadnjih letih se je močno povečalo število raziskav v zdravljenju raka. Ena izmed novejših oblik zdravljenja rakastih obolenj je tudi tarčno zdravljenje, ki izkorišča patofiziološke lastnosti tumorskih celic in tumorskega mikrookolja ter omogoča veliko koncentracijo zdravilne učinkovine v rakastih tkivih v primerjavi z njeno koncentracijo drugod po telesu. Cilj raziskovalne naloge je bil pripraviti tak sistem, ki bo omogočal aktivno tarčno zdravljenje raka. Sistem sestavlja liposom, konjugiran s cistatinom C. V liposom lahko enkapsuliramo zdravilno učinkovino, medtem ko cistatin C služi kot tarčni ligand. Cistatin C je inhibitor cisteinskih katepsinov, med katere spada tudi katepsin B. Ti se nahajajo v lisosomih, kjer je njihova funkcija hidroliza beljakovin. Raziskave kažejo na njihovo povečano koncentracijo zunaj lisosomov v rakastih celicah in tumorskem mikrookolju, kar lahko izkoristimo za aktivno tarčenje rakastih tkiv s cistatinom C. Prvi del naloge obsega izražanje cistatina C v bakteriji *E. coli*. Zapis za cistatin C smo pred izražanjem mutirali tako, da smo v cistatin C vpeljali dodatno tiolno skupino, kar nam je kasneje omogočilo konjugacijo z liposomom. Po izražanju smo mutirani cistatin C izolirali iz celičnega lizata in preverili njegovo inhibicijsko aktivnost. Pripravili smo PEG-liposome, ki smo jih nato konjugirali s cistatinom C in na koncu preverili inhibicijsko aktivnost konjugiranega sistema.

Active Targeting of Cysteine Cathepsins Using Liposomes Conjugated with Cystatin C

TRISTAN KOVAČIČ, DOMEN KULOVEC, UROŠ PREŠERN, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisors: Lovro Kramer, Andreja Bratovš, Jožef Stefan Institute

Co-supervisors: Boris Turk, Jožef Stefan Institute, Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto Grammar School

In recent years there has been a significant increase of research papers written in the field of cancer treatment. One of the newer forms of treatment is also the so-called targeted drug delivery, which uses the pathophysiological properties of tumour cells and tumour microenvironment. This method enables high concentration of drugs in cancer tissues compared to the concentration elsewhere in the body. The main goal of our research was to prepare a system capable of active targeting of tumour cells. The system is composed of liposome, conjugated with cystatin C. A cytotoxic drug can be encapsulated inside the liposome, whilst the cystatin C works as a target ligand. Cystatin C is an inhibitor of cysteine cathepsins, a member of which is also cathepsin B. This substance is found in lysosomes, where their function is the hydrolysis of proteins. Researchers suggest a high concentration of cathepsin B outside lysosomes in cancer cells and tumour microenvironment, which can be used for active targeting of cancer tissues with cystatin C. The first part of our research consisted of cystatin C synthesis with *E. coli*. Cystatin C DNA sequence was mutated before the expression in a way that we added an additional thiol group, which later enabled a conjugation of cystatin C with the liposome. After the expression, the cystatin C was isolated from the cell lystate and tested for its inhibitory activity. We prepared PEG liposomes and conjugated them with cystatin C and in the end tested the inhibitory activity of the conjugated system.

Načrtovana proteinska mreža kot perspektiven pameten nanomaterial

BORUT ŠKETA, LUCIJA PARKELJ, Gimnazija Vič

Mentorica: **Alenka Mozer,** Gimnazija Vič

Somentorji: **Roman Jerala, Helena Gradišar,** Kemijski inštitut Ljubljana, **Nino Bašić,** Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

V raziskavi smo proučevali načrtovanje modela 2D-proteinske kvadratne mreže, ki bi se samosestavila iz preprostih osnovnih gradnikov. Najprej smo proučili geometrijske značilnosti stabilne kvadratne mreže in poiskali ustrezne rešitve, temu je sledil prevod matematične rešitve v proteinsko mrežo, v kateri vsak rob predstavlja dimer ovite vijačnice. Z eksperimentom smo nato potrdili oblikovanje take mreže, in sicer s samosestavljanjem dveh osnovnih gradnikov – dveh polipeptidnih verig. Vsaka veriga je zgrajena iz štirih segmentov, ki tvorijo ovite vijačnice, njihovo zaporedje pa je natančno določeno. Polipeptide smo pripravili v celicah *E. coli* in jih očistili. Po mešanju ekvimolarnih raztopin proteinov pride do samosestavljanja načrtovane mreže. Dobljene strukture smo karakterizirali z merjenjem parametrov zvitosti vijačnic, termične stabilnosti in velikosti delcev. Obliko samosestavljenje strukture smo dokazali s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Rezultati potrjujejo uspešno pripravo načrtovane kvadratne mreže. Raziskovanje je trajalo približno dve leti in je potekalo v sodelovanju s Kemijskim inštitutom.

Bioengineered Protein Lattice as a Promising Sustainable Smart Nanomaterial

BORUT ŠKETA, LUCIJA PARKELJ, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: **Alenka Mozer,** Gimnazija Vič Grammar School

Co-supervisors: **Roman Jerala, Helena Gradišar,** National Institute of Chemistry Ljubljana, **Nino Bašić,** Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana

We investigated the design of a modular 2D protein square lattice that would self-assemble from simple building blocks. First we modelled the geometry of a stable square lattice followed by the translation of the mathematical solution into a protein-based lattice, in which each edge is presented by a coiled-coil dimer. We experimentally demonstrated the formation of such a lattice by self-assembling two building blocks – two polypeptide chains, each composed of four coiled-coil forming segments in a defined order. The polypeptides were produced in *E. coli* and purified. After mixing the equimolar protein solution we characterized the obtained structures by measuring the α -helical content, the thermal stability, the size of the particles and imaged the shape of the self-assembled structure by using transmission electron microscopy. The results indicated that we successfully prepared the designed square lattice. Our research took about two years in collaboration with the National Institute of Chemistry.

Odpornost enterokokov proti antibiotikom v klapavicah slovenskega morja

KLAUDIJA FORTUNA, TATJANA PAJK, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorici: **Majda Golob, Mateja Pate,** Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

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

Sredozemska ali mediteranska klapavica (*Mytilus galloprovincialis*) je ena od najbolj razširjenih školjk v Evropi in je tudi v svetovnem merilu gospodarsko najpomembnejša školjka. V Sloveniji klapavice gojijo na treh lokacijah: Sečovlje, Strunjan in Debeli rtič. Školjke dnevno precejajo veliko morske vode, kar pomeni, da lahko v svojih tkivih kopičijo številne mikrobe (tudi patogene) in druge, za človeka potencialno škodljive snovi. Redno spremljanje odpornosti indikatorskih mikroorganizmov, med katere poleg bakterij vrste *Escherichia coli* (*E. coli*) uvrščamo tudi enterokoke, je izrednega pomena za analizo tveganja odpornosti pri bakterijah, ki se prenašajo na ljudi prek prehranske verige. Enterokoki so komenzalne bakterije, ki so sicer normalne predstavnice črevesne mikrobiote, vendar lahko povzročajo različne okužbe pri ljudeh in živalih. Zaradi primarne odpornosti proti različnim skupinam antibiotikov so lahko rezervoar genov za odpornost. V raziskavi smo potrdili prisotnost odpornih in potencialno patogenih sevov enterokokov v slovenskih školjkah. Največji delež odpornih enterokokov, ne glede na vrsto, je bil odporen proti skupini tetraciklinov. Uživanje surovih ali nezadostno toplotno obdelanih školjk iz slovenskega morja bi lahko bilo zdravju škodljivo, zato veljaupoštevati pravila dobre gospodinske prakse.

Antibiotic Resistance of Enterococci in Mediterranean Mussel Grown in Slovenian Sea Waters

KLAUDIJA FORTUNA, TATJANA PAJK, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisors: **Majda Golob, Mateja Pate,** Veterinary Faculty, University of Ljubljana

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

The Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) is one of the most prevalent shells in Europe. In addition, it is also the most economically important shell worldwide. In Slovenia, mussels are grown at three locations: Sečovlje, Strunjan and Debeli rtič. Shells filter a vast amount of sea water every day, which means that they can accumulate many microbes in their tissues (including pathogens) and other substances potentially harmful to humans. Regular monitoring of the resistance of the indicator microorganisms, which include *Escherichia coli* (*E. coli*) and enterococci, is very important to determine the risk of resistance of bacteria which may be transmitted to humans through the food chain. Enterococci are commensals which are a part of human intestinal microbiota, but can also cause various infections in humans and animals. Because of their primary resistance to different groups of antibiotics they may also represent a reservoir of the resistance genes. In the present study, we have confirmed the presence of resistant and potentially pathogenic strains of enterococci in shells grown in Slovenian sea waters. The largest proportion of resistant enterococci, irrespective of the species, has been found against the group of tetracyclines. Consuming raw or insufficiently heat-treated shells from the Slovenian sea could be harmful, so the rules of a good household practice should be kept in mind.

Metilacija arzena pri pacientih z akutno promielocitno levkemijo, zdravljenih z arzenovim(III) oksidom

LUKA PETRAVIĆ, JON ŠKERLJ, ŠPELA TURK, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Zdenka Šlejkovec, Institut Jožef Stefan

Somentorici: Ingrid Falnoga, Institut Jožef Stefan, Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

Namen našega dela je bil spremljati metilacijo arzena v urinu in serumu pri bolnikih, zdravljenih z arzenovim trioksidom (ATO), in prostovoljcih, ki so bili izpostavljeni arzenu v hrani. Ugotovili smo, da se anorganski arzen As(III) po intravenski infuziji hitro izloča z urinom, obenem pa tudi oksidira do As(V) in metilira v manj strupeni spojini monometil in dimetil arzenovo kislino (MMA in DMA), ki se prav tako izločata z urinom. Takoj po infuziji so koncentracije As(III) pričakovano najvišje, najnižje pa so pred naslednjo infuzijo. Visoke koncentracije As(III) so optimalne za zdravljenje. V naključno izbranih vzorcih serumu smo potrdili prisotnost istih spojin, le da v nižjih koncentracijah. Po pričakovanju so bile v urinu prostovoljcev koncentracije arzena zelo nizke, razen pri tistih, ki so uživali z arzenom bogato hrano (morski sadeži in ribe), ki vsebuje veliko nestrupenega arzenobetaina. Zaradi znanega medsebojnega razstrupljanja arzena in selenia (tvorjenje kompleksov in izločanje) smo v urinu bolnikov spremljali tudi selen, ki se je v prvih dneh zdravljenja z ATO pospešeno izločal.

Arsenic Methylation in Patients with Acute Promyelocytic Leukaemia, Treated with Arsenic(III) Oxide

LUKA PETRAVIĆ, JON ŠKERLJ, ŠPELA TURK, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Zdenka Šlejkovec, Jožef Stefan Institute

Co-supervisors: Ingrid Falnoga, Jožef Stefan Institute, Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto Grammar School

The purpose of our work was to trace methylation of arsenic compounds in the human body. We analysed the urine samples and serum of the patients receiving ATO treatment and the urine samples of the volunteers who were not exposed to arsenic or had ingested it with food. The data analysis shows that inorganic arsenic As(III) after intravenous infusion quickly excretes in the urine and also oxidises to As(V) and methylates into less toxic compounds monomethyl and dimethyl arsenic acid (MMA and DMA), which also excretes in the urine. The concentrations of As(III) were, expectedly, the highest immediately after the intravenous infusion and the lowest just before the intravenous infusion. High As(III) concentrations are optimal for treatment. With an analysis of randomly picked serum samples of the patients treated with arsenic, we confirmed the presence of the same compounds, but in lower concentrations. In the urine of the volunteers who were not exposed, we detected low concentrations of arsenic. In the samples of the volunteers who consumed arsenic-rich food like seafood, which is high in arsenobetaine contents, we found significantly increased concentrations of arsenic. Because of known mutual detoxification of arsenic and selenium (generating complexes and excretion), we also followed selenium levels in patients' urine, which excreted fast in the first days of ATO treatment.

Raziskovanje antimikrobnih lastnosti in ekstrakcija tujona iz *Thuje occidentalis*

ALENKA HAFNER, II. gimnazija Maribor

Mentorka: **Zdenka Keuc**, II. gimnazija Maribor

Somentorice: **Bernarda Devetak**, II. gimnazija Maribor, **Maša Knez Hrnčič**, **Darija Cör**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Cilj raziskovalne naloge je bil odgovoriti na raziskovalno vprašanje, kakšne so antimikrobne lastnosti različnih ekstraktov *Thuje occidentalis*. Nanj sem skušala odgovoriti v štirih raziskovalnih fazah. V prvi sem z difuzijskim antibiogramom pokazala, da etanolni ekstrakt *Thuje occidentalis* res inhibira rast bakterij *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in *Pseudomonas aeruginosa*. V naslednji raziskavi sem z metodo štetja kolonij na antibiogramu z *E. coli* pokazala, da koncentracija etanolnega ekstrakta rastline vpliva na njen antibakterijski učinek. Zaradi učinkovitosti etanolnega ekstrakta in podatkov iz literature sem sklepala, da je tujon potencialna aktivna molekula v ekstraktu. Sledila je ekstrakcija tujona iz liofiliziranega materiala s superkritičnim CO₂ ter preverjanje sestave pridobljenega ekstrakta z IR-spektroskopijo in tankoplastno kromatografijo. Rezultati so pokazali, da pridobljeni ekstrakt vsebuje 13,5 % tujona. Ekstrakt sem v zadnji raziskovalni fazi uporabila v difuzijskem antibiogramu, kjer se je pokazalo, da učinkuje na *Staphylococcus aureus*. Sklepam, da je tujon ena izmed aktivnih učinkovin in ima farmakološki potencial, a je na tem področju potrebnega še veliko raziskovanja.

Research into the Antimicrobial Properties and the Extraction of Thujone from *Thuja Occidentalis*

ALENKA HAFNER, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Zdenka Keuc**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisors: **Bernarda Devetak**, II. Gimnazija Maribor Grammar School, **Maša Knez Hrnčič**, **Darija Cör**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

In this research paper our goal was to find the answer to the following research question: "What are the antimicrobial properties of different extracts of *Thuja occidentalis*?" To obtain an answer we conducted four research phases. In the first step we have shown, using the disk diffusion antibiogram, that the ethanol extract of *Thuja occidentalis* does indeed inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. In the next research phase, we have shown through the colony counting method on an antibiogram of *Escherichia coli* that the concentration of the ethanol extract has an influence on its antibacterial effect. Because of the efficiency of the ethanol extract and data from literature we have deduced that thujone is a potentially active ingredient in the extract. The extraction of thujone from the lyophilised plant material and the extraction with supercritical CO₂ followed. The content was checked by using IR – spectroscopy and thin-layer chromatography. The results showed that the extract contained 13.5% thujone. In the last phase of the research we used this extract in a disk diffusion antibiogram which showed to be effective against *Staphylococcus aureus*. We have concluded that thujone is one of the active ingredients with a pharmacological potential, but much more research is required in this area.

Priprava in uporaba imobiliziranega encima CalB pri enantioselektivni hidrolizi dietil-3-hidroksi glutarata

EVGENIJA BURGER, TJAŠA ČUKAJNE, KARMEN ZUPANČIČ, Gimnazija Novo mesto

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

Somentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali s pomembnostjo in uporabnostjo imobiliziranih encimov v industriji ter njihovo stereoselektivnostjo, ki je ključnega pomena pri proizvodnji zdravilnih učinkovin v farmacevtski industriji. Pri delu smo uporabili encim CalB, ki je industrijsko zelo ugoden zaradi velike stabilnosti, stereoselektivnosti in sposobnosti delovanja tudi pri višjih temperaturah. Zagotavlja pretvorbo zelo širokega nabora substratov in je uporaben za hidrolizo v vodnih medijih in za vrsto drugih reakcij v nevodnih medijih (aminoliza, alkoholiza itd.). V nalogi smo encim CalB imobilizirali na trden nosilec, izračunali njegovo aktivnost ter njegovo delovanje preizkusili v treh različnih reaktorjih. Reakcija, ki je pri tem potekala, je bila hidroliza diestra dietil-3-hidroksi glutarata in sinteza intermediata za učinkovino atorvastatin, vrsto zdravil, imenovanih hipolipemiki. Pri tem smo aktivnost imobiliziranega encima CalB primerjali s komercialnim neimobiliziranim CalB. Dokazali smo, da je imobilizirani encim tako z ekonomskega kot ekološkega vidika primernejši za uporabo.

The Preparation and Use of Immobilised Enzyme CalB in Enantioselective Hydrolysis of the Diethyl-3-hydroxy Glutarate Diester

EVGENIJA BURGER, TJAŠA ČUKAJNE, KARMEN ZUPANČIČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

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

Co-supervisor: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto Grammar School

In our paper we researched the importance and applicability of immobilised enzymes in the pharmaceutical industry, and their stereoselectivity, which is key in medicine production. We used the CalB enzyme, which is favourable in the industry because of its high stability, stereoselectivity, and its capability of transforming a large number of substrates. It is used for hydrolysis in water solvents, and other reactions in non-water solvents (aminolysis, alcohoholysis etc.). In our work, we immobilised the CalB enzyme and tested its activity in three different reactors. The reaction that took place was the hydrolysis of the diethyl-3-hydroxy glutarate diester and the synthesis of an intermediate used in medicine called atorvastatin, which is a statin. In the meantime we also tested and compared the activity of the immobilized CalB and the commercial non-immobilized CalB. We proved that the immobilized enzyme is much more useful than the non-immobilized one both from the economical as well as ecological standpoint.

Polifenoli v smrekovi kresilači (*Fomitopsis pinicola*)

MANCA NOVAK, ZALA SERIANZ, Gimnazija Jesenice

Mentorka: **Katarina Trontelj, Gimnazija Jesenice**

Somentor: **Andrej Gregori, MycoMedica, d. o. o.**

Glive imajo v ekosistemu in tudi v človekovem življenju številne pomembne vloge. Veliko manj pa so poznani njihovi zdravilni učinki, čeprav se nekatere snovi, ki izvirajo iz gliv, že dolgo uporabljajo v farmacevtski industriji. Glive namreč vsebujejo številne sekundarne metabolite, med katere spadajo tudi fenoli z antioksidativnim delovanjem, ki imajo verjetno kompleksno zaščitno vlogo, dokazana pa je tudi vrsta zdravilnih učinkov na človeka. V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na drevesno gobo smrekovo kresilačo (*Fomitopsis pinicola*), ki pogosto raste tudi v naših gozdovih. Določili smo vsebnost skupnih fenolov v metanolnih ekstraktih posušenih trosnjakov, nabranih z debel v gozdu rastočih smrek. Vsebnost fenolov smo določali po Folin-Ciocalteuvi metodi. Naredili smo primerjalno analizo vsebnosti polifenolov glede na starost trosnjaka in oddaljenost od drevesa. Rezultate smo primerjali tudi z vsebnostjo fenolov v znani in dobro raziskani zdravilni glivi svetlikavi pološčenki (*Ganoderma lucidum*). Ugotovili smo, da vsebuje največ fenolov skorja trosnjaka in da je vsebnost fenolov v smrekovi kresilači nekoliko manjša kot v zdravilni glivi svetlikavi pološčenki.

Polyphenols in Red-Belt Conk (*Fomitopsis pinicola*)

MANCA NOVAK, ZALA SERIANZ, Gimnazija Jesenice Grammar School

Supervisor: **Katarina Trontelj, Gimnazija Jesenice Grammar School**

Co-supervisor: **Andrej Gregori, MycoMedica, d.o.o.**

Fungi present an important role in the ecosystem and the human life. Even though, they have been used in the pharmaceutical industry, not all medical effects they possess are well researched. Fungi contain many secondary metabolites, including phenolics with antioxidant effects, which probably have complex, protective role and possess an important range of healing properties. In our research project we focused on *Fomitopsis pinicola*, which grows in our woods. We determined the content of total phenols in methanol extracts of dried fruiting bodies, harvested from spruce trees trunks. The total phenols content was determined using the Folin – Ciocalteu's method. In addition, a comparative analysis of phenols content was performed, based on fruiting body age and distance from the observed tree trunk. Results were compared with the content of phenols in well known and researched medical fungus *Ganoderma lucidum*. We have come to the conclusion that *Fomitopsis pinicola* does not contain the same amount of phenols as the well known *Ganoderma lucidum*, however the highest phenol proportion was determined in the cortex of the *Fomitopsis pinicola* fruiting body.

Samočistilne superhidrofobne površine iz aluminija in njegovih zlitin

SIMON ISKRA, Gimnazija Novo mesto

Mentorja: **Ingrid Milošev, Peter Rodič**, Institut Jožef Stefan

Somentorica: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto

Superhidrofobnost je fenomen, pri katerem voda zaradi lastnosti podlage površine ne omoči. Ker so take površine izjemno aplikativne, smo raziskali možnosti za sintezo superhidrofobnih aluminijevih površin z jedkanjem in površinsko modifikacijo ter možnosti za pripravo korozjsko odpornih superhidrofobnih površin. Superhidrofobne površine smo sintetizirali z jedkanjem s kloridi cerija, cinka, železa in bakra. Optimizirali smo proces jedkanja ter ovrednotili spremembe v morfologiji in njihov vpliv na lastnosti površine. Površina je bila modificirana z optimalno modifikacijsko spojino FAS. Izvedene so bile meritve korozjske odpornosti, obstojnosti v korozivnih medijih, odpornosti proti zaledenitvi vode na površini, protibakterijske odpornosti ter test samočistilnosti. Vsi vzorci so bili odporni proti zaledenitvi in so imeli samočistilne lastnosti. Aluminijeva površina, jedkana s cerijem, je bila v primerjavi z aluminijem korozjsko odpornejša. Taka površina zaradi obstojnosti ponuja veliko možnosti za aplikacijo v širokem spektru industrijskih panog. Možne so aplikacije v industrijskih obratih, specializiranih površinah strojev, reakcijskih kotlih, strehah, satelitskih krožnikih, letalski industriji in športu.

Self-cleaning Superhydrophobic Aluminium and Aluminium Alloy Surfaces

SIMON ISKRA, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisors: **Ingrid Milošev, Peter Rodič**, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Superhydrophobicity, also known as the Lotus effect, is a phenomenon where a surface is extremely difficult to wet by water because of special surface properties. Due to many possible applications of such surfaces we researched the possibility of making anti-corrosive superhydrophobic aluminium surfaces via etching and surface modification. Various superhydrophobic surfaces were obtained by etching with copper, zinc, ferric and cerium chlorides. In addition to the etching process optimisation, we analysed changes in surface morphology after etching. In the second step, etched surfaces were modified with the optimal hydrophobic agent named FAS. Afterwards the tests of corrosion resistance, resistance in corrosive liquids, anti-icing properties, anti-bacterial properties and self-cleaning properties were performed. The results show that all superhydrophobic surfaces show good anti-icing and self-cleaning properties. The superhydrophobic surface etched with cerium chloride shows improved anti-corrosive properties compared to bare aluminium. Corrosive resistance opens a wide range of various industrial applications. Such surfaces are useful in factories aircrafts, ships, specialized surfaces, roofs, satellite dishes and sport.

Vsebnost aluminija v hrani, pripravljeni ali hranjeni v aluminijasti posodi in embalaži

NIKA ŽURGA, II. gimnazija Maribor
Mentorka: **Sanja Cvar**, II. gimnazija Maribor

Namen raziskovalne naloge je bil proučiti, kolikšna količina aluminija preide iz aluminijaste posode v hrano pri kuhanju in iz aluminijaste folije pri shranjevanju hrane v njej. Zanimalo me je tudi, kako se vsebnost aluminija spreminja glede na pH živila in čas kuhanja. Namesto živil sem za model uporabila vodne raztopine, da sem lahko laže izmerila koncentracijo aluminijevih ionov. Koncentracijo sem določila spektrofotometrično z uporabo kromogena eriokrom cianin R (ECR). Dobljene vrednosti sem primerjala z oceno tveganja za aluminij. Iz razpoložljivih raziskav, ki povezujejo vsebnost aluminija v hrani z različnimi boleznimi, sem poskušala izpeljati paralele in nakazati možna področja nadaljnega raziskovanja.

Concentration of aluminium ions in food, prepared or stored in an aluminium container and packaging

NIKA ŽURGA, II. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: **Sanja Cvar**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

The purpose of my research work was to find out the concentration of aluminium ions that passes from an aluminium container into food during cooking, and from aluminium foil into food wrapped in the foil. I also investigated the dependence of the concentration of aluminium ions on pH value of foods and time of cooking. Instead of food, water solutions were used as a model for simpler measure of the concentration of aluminium ions. The concentration was determined with UV-VIS spectrometry, using a reagent Eriochrome Cyanine R (ECR). The values were then compared with risk assessment for aluminium. From the available research on the link between the content of aluminium in food and different diseases, I tried to draw some parallels and point at possible areas of further research.

Analiza in določanje prisotnosti skupnih indolnih spojin v treh vzorcih prehranskega dopolnila mace (*Lepidium meyenii*) z uporabo ATR-FTIR-spektroskopije

MARTINA VELICKOVSKA, II. gimnazija Maribor

Mentorka: **Zdenka Keuc**, II. gimnazija Maribor

Hormonske težave običajno zdravimo z nadomestno hormonsko terapijo (HRT), prosti trg pa ponuja tudi prehranska dopolnila na rastlinski osnovi, ki naj bi bila podobno učinkovita, a naj bi pri uporabi zagotavljala večjo varnost. Eno od teh je mace (*Lepidium meyenii*). Kemijska sestava mace še ni povsem poznana kot tudi ne aktivna učinkovina, ki bi lahko imela učinke na vzpostavljanje hormonskega ravnovesja. Na osnovi študija literature sem postavila hipotezo, da bi to lahko bil indol-3-karbinol (I3C), zato me je zanimalo, ali so v vzorcih mace, ki je dostopna na slovenskem trgu (maca v prahu /Superfoods/; tablete po 500 mg /PlanetBio/ in tablete po 500 mg /Now/), prisotne tudi indolne spojine in v kakšnem obsegu. Z ATR-FTIR-spektroskopijo je bilo ugotovljeno, da se vzorci mace razlikujejo v kemijski zgradbi. Delež skupnih indolnih spojin se je gibal od 2,43 mg/g do 0,96 mg/g ($\pm 0,02$ mg). Samo za en vzorec od treh lahko predvidevamo, da vsebuje tudi indolne snovi. Izračunane količine glede na ekvivalent I3C ne dosegajo terapevtskih vrednosti, zato I3C ne more biti najpomembnejša aktivna učinkovina v maci. Da bi dobljene rezultate potrdili, bi morali izvesti še referenčno analizo (npr. GC-MS).

Analysis and Determination of Indole Substances in Three Supplements of Maca (*Lepidium meyenii*) with ATR FTIR Spectroscopy

MARTINA VELICKOVSKA, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Zdenka Keuc**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Hormonal imbalance is an issue faced by many people. It is usually treated with Hormone Replacement Therapy (HRT). However, recent trends show that the HRT is often replaced by plant extract supplements based on 'natural products', which in turn are not tested enough. Maca (*Lepidium meyenii*) is one of the most popular supplements of this type on the Slovene market and its active components are still not known. In this research an Indole-3-Carbinol (I3C) is hypothesized to be its active component. Therefore, the following research question was stated: Do all available Maca supplements on the Slovene market contain indole substances and to what extent? We found that Maca supplements available on the Slovene market differ in their chemical structure and therefore are not pure compounds as is stated on labels. With the help of ATR FTIR spectroscopy and Beer-Lambert law, it was found that total indole compounds in investigated Maca samples are in the range of 2.43 mg/g to 0.96 mg/g Maca ($\pm 0,02$ mg). Only for one sample out of three it can be assumed that it also contains indole compounds. The calculated concentrations do not achieve the therapeutic dose, so it has been concluded that I3C is not the component responsible for Maca bioactivity. To prove these results some reference methods have to be used, such as gas chromatography with mass detection (GC-MS).

Vpliv najpogosteje uporabljenih umetnih in naravnih sladil na rast izbranih črevesnih mikroorganizmov

GABRIELA ŠTUMBERGER, DOROTEJA TEJA PEČOVNIK, II. gimnazija Maribor

Mentorica: Katja Holnthaner Zorec, II. gimnazija Maribor

Somentor: Rok Tkavc, Uniformed Services University of Health Sciences

Alternativna sladila so snovi, drugačne od sladkorja, ki se uporabljajo za slajenje hrane in pičače. V zadnjih desetletjih se je njihova uporaba povečala, v glavnem zaradi nižjih stroškov izdelave in domnevnih pozitivnih učinkov pri hujšanju. Študije kažejo, da lahko alternativna sladila pomembno vplivajo na črevesne mikrobne združbe, nekatere celo trdijo, da so umetna alternativna sladila vzrok za porast debelosti in diabetesa. Cilj naloge je bil proučiti vpliv treh naravnih sladil (steviol glikozid, ksilitol, eritritol) in treh umetnih sladil (natrijev ciklamat, natrijev saharinat, kalijev acesulfam) na rast črevesnih mikroorganizmov: bakterij *Escherichia coli* in *Lactobacillus plantarum* ter kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Ugotavljni smo sposobnost metaboliranja sladil in uporabe izbranih sladil kot edinega vira ogljika ter vpliv izbranih sladil na rast ob prisotnosti glukoze. Ugotovili smo, da so vsi trije mikroorganizmi sposobni uporabiti steviol glikozid kot edini vir ogljika. *S. cerevisiae* lahko presnavlja tudi ksilitol in eritritol. Ob prisotnosti glukoze rast najbolj pospešuje steviol glikozid. Ksilitol in eritritol rast *L. plantarum* ter *S. cerevisiae* pospešujejo. Ksilitol na rast *E. coli* ne vpliva, eritritol pa jo zavira. Ostala tri sladila rast večine mikroorganizmov zavirajo, najbolj kalijev acesulfam.

Effect of Commonly Used Natural and Artificial Sweeteners on the Growth of Selected Gut Microorganisms

GABRIELA ŠTUMBERGER, DOROTEJA TEJA PEČOVNIK, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: Katja Holnhaner Zorec, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisor: Rok Tkavc, Uniformed Services University of Health Sciences

Alternative sweeteners are substances other than sugar, used to sweeten food and drink and their use over the past few decades has increased. Studies have shown that alternative sweeteners can significantly impact our gut microbiota; some even claim that non-caloric artificial sweeteners are one of the causes for obesity and diabetes. The aim of our research was to see how 3 natural (steviol glycoside, xylitol and erythritol) and 3 artificial (sodium cyclamate, sodium saccharin and acesulfame potassium) influence the growth of gut microorganisms: bacteria *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum*, and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The ability of given microorganisms to metabolize these sweeteners, the ability to use these sweeteners as a sole carbon source and the effect of these sweeteners on microorganism growth in the presence of glucose was investigated. It has been found that all 3 microorganisms are capable of using steviol glycoside as a sole carbon source. *S. cerevisiae* can also use xylitol and erythritol. In the presence of glucose, growth is most significantly stimulated by steviol glycoside. Xylitol and erythritol stimulate the growth of *L. plantarum* and *S. cerevisiae*. While xylitol does not affect the growth of *E. coli*, erythritol inhibits it. The other sweeteners inhibit the growth of most microorganisms, most significantly potassium acesulfame.

Flavanoli v kakavovih zrnih in čokoladi

PRIMOŽ FABJAN, VERONIKA HROVAT, *Grm Novo mesto – Center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija*

Mentorici: **Irena Kurajić,** *Grm Novo mesto – Center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija,*
Vesna Glavnik, *Kemijski inštitut Ljubljana*

V raziskovalni nalogi smo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) določili vsebnost flavanolov (-)-epikatehina in procianidina B2 v različnih vzorcih kakavovih zrn in čokolade. Ugotovili smo, da 100 g različnih vzorcev kakavovih zrn vsebuje od 14,2 do 143,5 mg (-)-epikatehina in od 18,3 do 199 mg procianidina B2. V 100 g različnih vzorcev čokolad pa smo določili od 39,8 do 98,5 mg (-)-epikatehina in od 20,7 do 87,6 mg procianidina B2. V vseh vzorcih, razen pri kakavovih zrnih iz Peruja, je bila vsebnost (-)-epikatehina večja od vsebnosti procianidina B2. Vsebnost obeh flavanolov je bila v čokoladah nekoliko manjša kot v kakavovih zrnih. Količine flavanolov, ki naj bi imele pozitivne učinke na zdravje ljudi, se glede na izsledke raziskav gibljejo med 200 in 1000 mg. Za dosego take količine bi morali dnevno zaužiti več kot 140 g kakavovih zrn oz. več kot 200 g čokolade, kar pa je s stališča zdrave varovalne prehrane nesprejemljivo. Bolj smiselno bi bilo (-)-epicatechin in procyanidin B2 pridobiti iz luščin kakavovih zrn in ju uporabiti za izdelavo učinkovitega prehranskega dopolnila.

Flavanols in Cocoa Beans and Chocolate

PRIMOŽ FABJAN, VERONIKA HROVAT, *Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Grm Agricultural School and Biotechnical Grammar School*

Supervisors: **Irena Kurajić,** *Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Grm Agricultural School and Biotechnical Grammar School,* **Vesna Glavnik,** *National Institute of Chemistry Ljubljana*

In our study thin-layer chromatography (TLC) was used to determine the content of two flavanols (-)-epicatechin and procyanidin B2 in different samples of cocoa beans and chocolate. We have found out that 100 g of different cocoa beans contained from 14.2 to 143.5 mg of (-)-epicatechin and from 18.3 to 199 mg of procyanidin B2, while 100 g of analysed chocolate samples contained from 39.8 to 98.5 mg of (-)-epicatechin and from 20.7 to 87.6 mg of procyanidin B2. In all the samples, except in cocoa beans from Peru, there was more (-)-epicatechin than procyanidin B2. The amount of both flavanols in chocolate was slightly smaller than in cocoa beans. Based on the findings from different studies the amount of flavanols that is supposed to have beneficial effects on human health ranges from 200 to 1000 mg. To achieve that amount of flavanols we would have to consume more than 140 g of cocoa beans or more than 200 g of chocolate per day, which is unacceptable from the point of view of healthy and protective nutrition. It would be more reasonable to get (-)-epicatechin and procyanidin B2 from cocoa beans mulch and use them to produce an effective food supplement.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

18	Aleksandar Aleksovski	69	Nina Poljšak
62	Valentina Božič	76	Uroš Prešern
51	Polona Bukovec	56	Lea Rems
81	Evgenija Burger	30	Renata Režonja Kukec
81	Tjaša Čukajne	57	Sebastijan Ričko
63	Miha Drev	82	Zala Serianz
87	Primož Fabjan	36	Sara Seršen
78	Klavdija Fortuna	58	Piotr Sosnowski
80	Alenka Hafner	59	Katarina Starkl Renar
87	Veronika Hrovat	60	Gregor Strle
53	Grega Hudovornik	70	Valentina Šavrič
52	Gregor Hostnik	42	Luka Šenica
83	Simon Iskra	71	Rok Šinkovec
64	Matej Janežič	79	Jon Škerlj
65	Domen Kitak	77	Borut Šketa
66	Luka Kosec	72	Eva Španinger
54	Urban Košak	61	Katja Štajdohar
76	Tristan Kovačič	73	Nina Štravs
76	Domen Kulovec	86	Gabriela Štumberger
67	Tina Ličina	79	Špela Turk
24	Daniela Milosheksa	85	Martina Velichkovska
55	Omar Naneh	74	Miha Virant
82	Manca Novak	75	Matja Zalar
78	Tatjana Pajk	81	Karmen Zupančič
77	Lucija Parkelj	84	Nika Žurga
86	Doroteja Teja Pečovnik		
79	Luka Petravić		
68	Gašper Poklukar		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

61	Tomaž Accetto	86	Katja Holnthaner Zorec
55	Gregor Anderluh	59	Jernej Iskra
68	Marko Anderluh	77	Roman Jerala
77	Nino Bašić	80, 85	Zdenka Keuc
62	Roland Bodmeier	76, 79, 81	Branka Klemenčič
76	Andreja Bratovš	80	Maša Knez Hrnčič
72	Urban Bren	62	Petra Kocbek
52	Janez Cerar	69	Nina Kočevar Glavač
60	Janez Cerkovnik	74	Janez Košmrlj
66	Jožko Cesar	76	Lovro Kramer
80	Darija Cör	73	Julijana Kristl
84	Sanja Cvar	87	Irena Kurajić
30	Tanja Čufer	73	Zoran Lavrič
80	Bernarda Devetak	56	Damijan Miklavčič
18, 65	Rok Dreu	83	Ingrid Milošev
70	David Drobne	77	Alenka Mozer
79	Ingrid Falcogna	30	Aleš Mrhar
61, 81	Aleš Gasparič	70	Joško Osredkar
87	Vesna Glavnik	78	Mateja Pate
54	Stanislav Gobec	64	Andrej Perdih
78	Majda Golob	75	Janez Plavec
24, 67	Iztok Grabnar	83	Janja Pust
77	Helena Gradišar	83	Peter Rodič
82	Andrej Gregori	69	Stanko Srčič
67	Štefan Grosek	71	Branko Stanovnik
57	Uroš Grošelj	42, 63	Jurij Svete

- 65| **Rok Šibanc**
75| **Primož Šket**
79| **Zdenka Šlejkovec**
64| **Tomaž Šolmajer**
78| **Irena Štrumbelj Drusany**
56| **Mounir Tarek**
86| **Rok Tkavc**
82| **Katarina Trontelj**
36| **Iztok Turel**
76| **Boris Turk**
58| **Dušan Turk**
24| **Tomaž Vovk**
51, 53| **Franc Vrečer**

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Maja Oberstar Falkner

Jezikovni pregled (slovenski jezik) Ksenija Kosem

Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik) Mojca Ceferin, mag. Nina Bostič Bishop

Produkcija Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk Tiskarna Vek Koper, d. o. o., Koper

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

www.krkinenagrade.si

416 Q