



47.

Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

47. Krkine nagrade | 47th Krka Prizes

27. simpozij

Zbornik povzetkov

Poslanstvo

Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

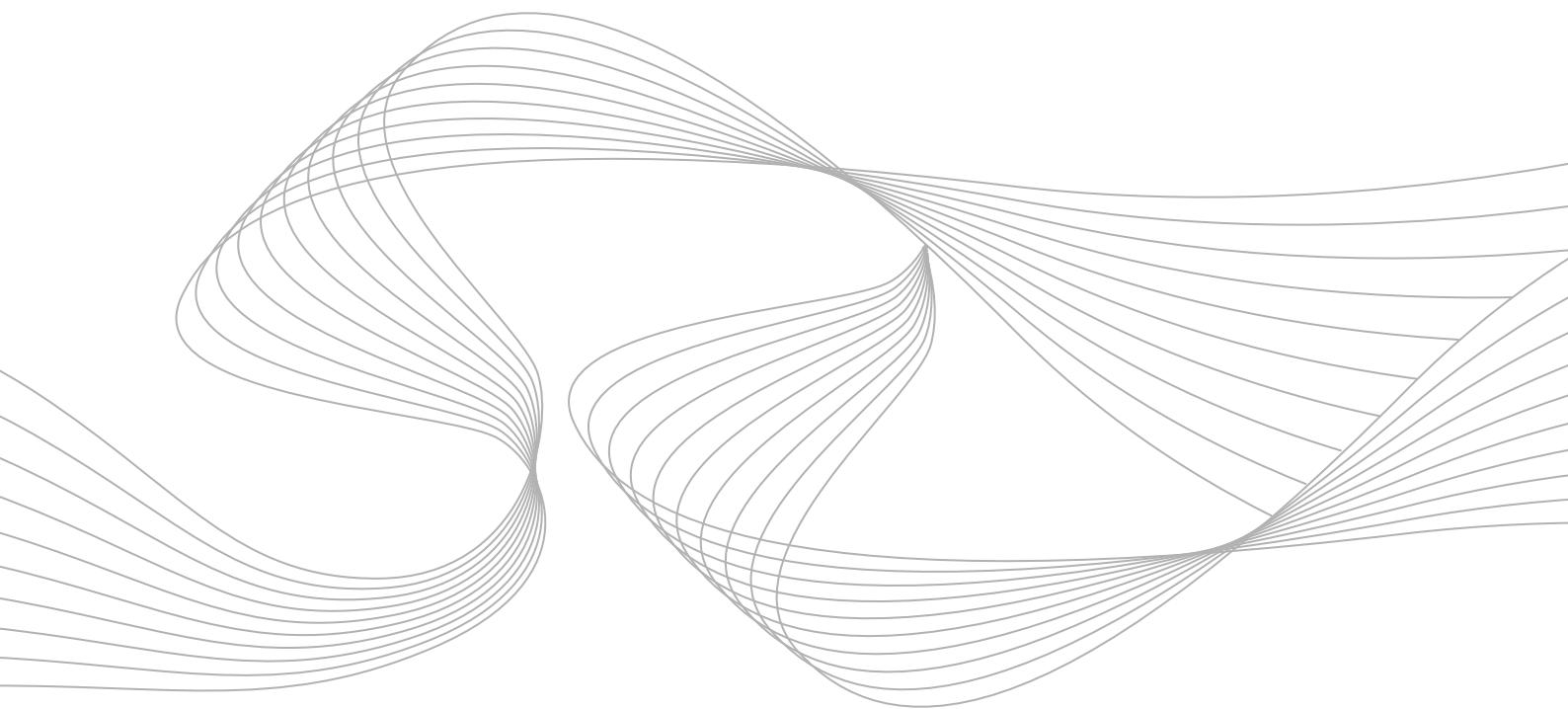
Spodbujamo mladostno zagnanost in stremljenje k odličnosti v raziskovalnem delu. Tlakujemo pot novim spoznanjem, ki bodo prispevala k novim izdelkom prihajajočih generacij.



47. Krkine nagrade
ZNANOST POVEZUJE.

27. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 13. oktober 2017



Častni odbor
47. Krkinih nagrad **Jože Colarič**, predsednik uprave in generalni direktor Krke akad. prof. dr. **Tadej Bajd**, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. **Igor Papič**, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. **Igor Tičar**, rektor Univerze v Mariboru
Matjaž Tuš, mag. farm., predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
prof. dr. **Venčeslav Kaucič**, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. **Radko Komadina**, 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**

Glavni in odgovorni urednik dr. **Miha Plevnik**

Recenzenti **Jože Arh**, **Breda Barbč Žagar**, **Tea Bašin**, dr. **Primož Benkič**, dr. **Ana Bergant Simončič**, dr. **Tadeja Bevec**, dr. **Jure Bezenšek**, **Tanja Blatnik**, mag. **Marko Boh**, dr. **Sergeja Bombek**, dr. **Rok Borštnar**, dr. **Blaž Brulc**, dr. **Nina Brvar**, **Alenka Colarič Wala**, dr. **Aleš Curk**, mag. **Lea Cvitkovič-Maričič**, dr. **Irena Čarman**, dr. **Katja Čerpnjak**, dr. **Katarina Dobrovoljc**, **Aleša Dular Vovko**, dr. **Aleš Gasparič**, dr. **Ivan Gobec**, **Jana Golob**, mag. **Mojca Golob**, **Mojca Hiti**, dr. **Žiga Hodnik**, dr. **Grega Hudovornik**, **Jernej Hvala**, mag. **Miran Hvalec**, **Dušan Janežič**, dr. **Boštjan Jerman**, **Jernej Jerman**, **Aleš Judež**, dr. **Davor Kiđemet**, **Ksenija Kikelj**, dr. **Maja Kincl Skube**, **Teja Kitak**, dr. **Drago Kočar**, dr. **Tanja Koleša Dobravc**, **Nejc Koračin**, **Klemen Korasa**, **Jernej Kos**, **Primož Košir**, mag. **Helena Kotnik**, dr. **Nevenka Kožuh Eržen**, **Irena Krajačič**, dr. **David Kralj**, mag. **Andrejka Kramar**, dr. **Zdenka Kranjc Gregorčič**, dr. **Vesna Krošelj**, mag. **Bojana Kržič**, **Andreja Kuhar**, dr. **Jernej Kužner**, dr. **Brigita Lapornik**, dr. **Roman Lenaršič**, **Irena Lindič**, mag. **Matej Luštek**, mag. **Bronja Manček**, dr. **Lea Mauko**, dr. **Špela Miklič**, dr. **Maja Milivojević Fir**, **Aleksander Miložič**, dr. **Anita Mlakar**, mag. **Damjan Možina**, **Aljoša Novaković**, **Dušanka Oblak Božič**, mag. **Irena Orel**, dr. **Renata Osolnik**, mag. **Vesna Pahor**, dr. **Matej Pavli**, dr. **Anica Pečavar**, dr. **Andreja Plaper**, mag. **Igor Plaper**, dr. **Miha Plevnik**, **Tamara Potočnik**, **Maja Preskar**, dr. **Gašper Pustovrh**, mag. **Ivan Radež**, dr. **Nataša Rebolj**, **Vojko Rebolj**, **Marjeta Redek**, **Aleksander Rekič**, dr. **Matej Repič**, dr. **Aleš Rotar**, dr. **Saša Rožman**, **Miloš Ružič**, **Robert Sekereš**, dr. **Igor Simonič**, **Gordan Sladič**, mag. **Janika Slanc Vovk**, dr. **Janez Smolič**, **Tadej Stropnik**, dr. **Leon Ščuka**, doc. dr. **Vida Škrabanja**, dr. **Marko Štefanič**, dr. **Anton Štimac**, dr. **Jaroslav Tihi**, mag. **Simona Torkar Flajnik**, mag. **Robert Ucman**, mag. **Aleš Urbančič**, mag. **Iztok Vidic**, dr. **Ana Vidmar**, mag. **Mojca Vidmar Berus**, mag. **Petra Vitezič**, dr. **Miha Vrbinc**, **Tomaž Vrbinc**, prof. dr. **Franc Vrečer**, dr. **Jernej Zadnik**, **Martina Zobarič**, mag. **Polonca Zupančič**, dr. **Silvo Zupančič**, mag. **Vojko Zupančič**, **Luka Žnidaršič**

VSEBINA | CONTENT

47. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad
10 | Krkini nagrajenci 2017

27. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

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

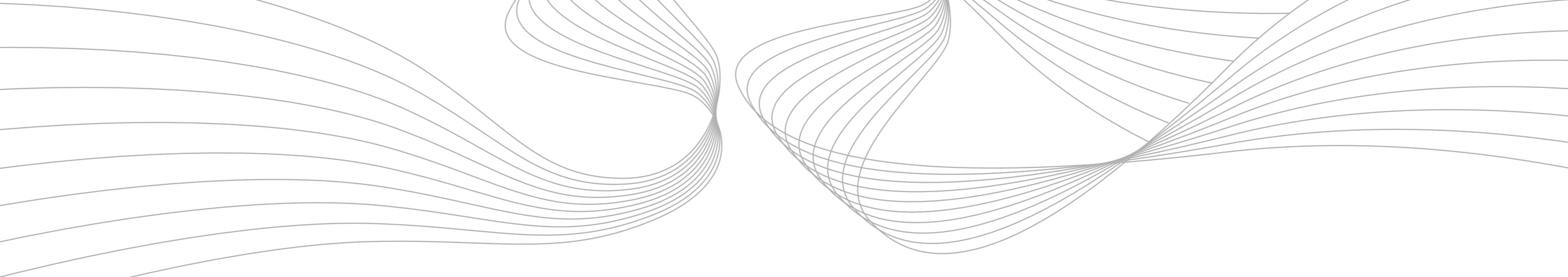
VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 18 | Damijan Knez, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje potencialnih učinkovin z multiplim mehanizmom delovanja za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni
- 24 | Eva Pušavec Kirar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Cikloadicije (*S*- α -aminoalkil inonov in enonov
- 30 | Maja Marušič, Kemijski inštitut Ljubljana
Sekundarne strukture z gvanini bogatih zaporedij iz genomov človeških papilomavirusov
- 36 | Jernej Luzar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Identifikacija in ovrednotenje mimotopov izbranih alergenov Fel d 1 in Ara h 2
- 42 | Miodrag Janić, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Pleiotropni učinki nizkih odmerkov zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov na arterijsko steno

47. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | Ana Mitrović, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vloga cisteinskih katepsinov B in X in njunih inhibitorjev pri epitelno-mezenhimskem prehodu tumorskih celic
- 52 | Špela Kos, Onkološki inštitut Ljubljana
Optimizacija genskega elektroprenosa v kožo za nadzorovan vnos plazmidne DNA
- 53 | Marina Gjorgjieva, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje zaviralcev DNA giraze B z benzotiazolskim skeletom
- 54 | Jerca Pahor, Institut Jožef Stefan
Novi pristopi k sintezi predzdravil fosfatov in fosforilirani derivati pantotenske kisline
- 55 | Tine Curk, Univerza v Cambridge
Modeliranje večivalentnih interakcij
- 56 | Miha Kastelic, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv dodane soli na stabilnost raztopin globularnih proteinov v vodi
- 57 | Ivana Klopčič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Raziskave endokrinih učinkov fenolnih analogov bisfenola A in njihovih mešanic *in silico* in *in vitro*
- 58 | Urška Dragin Jerman, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Interakcije rakavih in normalnih urotelijskih celic in vzpostavitev urotelijskega vezivnega nadomestka na amnijski membrani
- 59 | Urban Feguš, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Razvoj pilotne naprave za enkapsulacijo aromatičnih substanc v talino ogljikovih hidratov z uporabo visokotlačnega homogenizatorja
- 60 | Niko Oman Kadunc, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani
Spremljanje procesa oblaganja farmacevtskih pelet s strojnim vidom
- 61 | Mirijam Černe Prelovšek, Ekonomski fakulteta, Univerza v Ljubljani
Analiza odločanja skrbnikov hišnih ljubljencev pri nakupu zdravil za zdravljenje boljavosti in klopavosti
- 62 | Aleš Polovič, Krka, d. d., Novo mesto
Sinteza potencialnih nečistot pri zdravilni učinkovini
- 63 | Matjaž Grčman, Krka, d. d., Novo mesto
Določevanje izbranih ogljikovih hidratov z uporabo anionsko izmenjevalne kromatografije s pulzno amperometrično detekcijo

- 64 | **Luka Hribenik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Aerobno oksidativno halogeniranje tiolov s HCl/HBr v prisotnosti NH_4NO_3
- 65 | **Gašper Pisanec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Proučevanje funkcionalnega oblaganja zrnc z vrtinčnoslojno tehnologijo
- 66 | **Janja Lakner**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza trimetilsililnih estrov karboksilnih kislin pod reakcijskimi pogoji brez topil
- 67 | **Kristijan Skok, Kristijan Orthaber, Matevž Prstovnik**, Medicinska fakulteta,
Univerza v Mariboru
Vgradnja magnetnih nanodelcev v modelne medicinske obloge za kombinirano zdravljenje kožnih oblik raka
- 68 | **Alja Račič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Izdelava in vrednotenje delcev z dvojnim pH-odvisnim sproščanjem modelne spojine za enteralno aplikacijo suspenzije
- 69 | **Matic Bergant**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Določanje vsebnosti meglumina z derivatizacijo z natrijevim naftokinonsulfonatom in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti
- 70 | **Vesna Pirnat**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija procesa pretvorbe samomikroemulgirajočega sistema s karvedilolom v trdno obliko z metodo vrtinčnoslojnega granuliranja
- 71 | **Mitja Pohlen**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj in evalvacija predformulacijskih metod za napovedovanje stabilnosti trdnih disperzij, izdelanih s tehnologijo iztiskanja talin
- 72 | **Sandra Jančar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Karakterizacija polimernih pomožnih snovi z velikostno izključitveno kromatografijo in detekcijo na osnovi sipanja svetlobe
- 73 | **Ana Dolšak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje zaviralcev monoaminoksidaz A in B na osnovi 1-(prop-2-in-1-il)piperidina
- 74 | **Sandi Brdar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporaba tekočinske kalorimetrije in kromatografije za analizo proteoma človeške krvne plazme
- 75 | **Monika Tonejc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv natrijevega lavrilsufata in polisorbata 20 na sproščanje natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet
- 76 | **Nika Žurga, Eva Kerčmar**, II. gimnazija Maribor
Uporaba hidrokinonskih nanodelcev pri razvoju fluorescentnega nanosenzorja za detekcijo nizkih koncentracij Pb^{2+} ionov
- 77 | **Kaja Klemenc**, Gimnazija Jožeta Plečnika, Ljubljana
Načrtovanje nevrološko relevantnih inhibitorjev vnetnih procesov, vpletenih v nevrodegenerativne bolezni
- 78 | **Benjamin Božič, Tjaša Šentjurc**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana,
Gimnazija in veterinarska šola
Možnosti prenosa MRSA z rejnih živali na ljudi
- 79 | **Nika Zupančič, Zala Kink, Nika Brulc**, Gimnazija Novo mesto
Primerjava klasičnih kemijskih pristopov in pristopov z uporabo biokatalizatorjev na izbranih modelih spojin pri kemijskih pretvorbah
- 80 | **Luka Petravić, Evgenija Burger, Lucija Mrzel Djuranovič**, Gimnazija Novo mesto
Optimizacija in uporabnost metode za identifikacijo cianobakterij v okoljskih vzorcih na osnovi DNA
- 81 | **Ana Milošev**, Gimnazija Jurija Vege Idrija
Biokompatibilnost kovinskih materialov kot ortopedskih vsadkov in njihov vpliv na človeško telo
- 82 | **Tjaša Grabnar, Larisa Grubič, Luka Kunej**, Gimnazija Novo mesto
Proučevanje nastajanja biofilma v vodovodni vodi Gimnazije Novo mesto v odvisnosti od časa, hrane in materialov
- 83 | **Nastja Medle, Laura Medved, Barbara Jaklič**, Gimnazija Novo mesto
Uporaba *CalB* pri kiralni ločbi R/S-1-(1-naftil)etanola
- 84 | **Domen Pregelj**, Gimnazija Vič
Vpogled v učinek točkovne mutacije monoamino oksidaze B; ali lahko multiskalne simulacije razložijo nevropsihiatricne motnje?
- 85 | **Gabriela Štumberger**, II. gimnazija Maribor
Antimikrobne in antioksidativne lastnosti nabranih in gojenih gob mešanega gozda
- 86 | **Taja Skube, Larsen Cundrič, Matic Rajnar**, Gimnazija Novo mesto
Matični mleček in trans-10-hidroksi-2-deconojska kislina
- 87 | **Marjeta Mavri, Cita Jenko, Maša Skočir**, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija
Ocena primernosti monolitnih nosilcev za ločevanje krvnih celic
- 88 | **Sara Jamnik, Helena Perić**, Gimnazija Vič
Prehransko dopolnilo s sokom granatnega jabolka



Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!

Tudi letos z veseljem opažamo napredek na vseh področjih, na katerih raziskujete in ustvarjate raziskovalci, ki ste šele na začetku svoje poti. Ne le vsako področje posebej, tudi širina nas navdaja s prepričanjem, da je napredek plod sistematičnega razmisleka in dela vodstev institucij, mnogih mentorjev in vseh vaših sodelavcev. Skladen in vzdržen razvoj različnih disciplin znanosti je za multidisciplinarno panogo, kakršna je farmacija, izrednega pomena. Ob tem je ključno, da raziskave nadgrajujejo sedaj prevladujoče tehnologije in odkrivajo tudi povsem nove pristope. Le s kombinacijo, ne pa z radikalnimi rešitvami, je mogoče na tako občutljivem področju, kot je zdravje, slediti potrebam in iskati nove priložnosti za bolnike. Končni rezultat vašega in našega dela je vedno lahko le zdravilo, terapija ali preventiva in predvsem zdravo in kakovostno življenje bolnikov, zaradi katerih raziskujemo in ustvarjamo.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

Dear Prize winners,

This year too we note with pleasure that progress has been made in all areas in which researchers at the start of their careers research and create. Not only each area individually but also the scope makes us believe that progress is the result of systematic thoughts and work of the managers of institutions, many supervisors and all your colleagues. A coherent and sustainable development of different disciplines is of utmost importance for a multidisciplinary branch such as pharmacy. It is key that research upgrade the existing technologies as well as discover fully new approaches. Only through a combination and not with radical solutions may the needs be followed and opportunities be searched for our patients in such a sensitive area as is health. The final result of your and our work may only always be a medicinal product, therapy or prevention, and particularly healthy and quality lives of patients for whom we research and create.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2017 | KRKA PRIZE WINNERS 2017

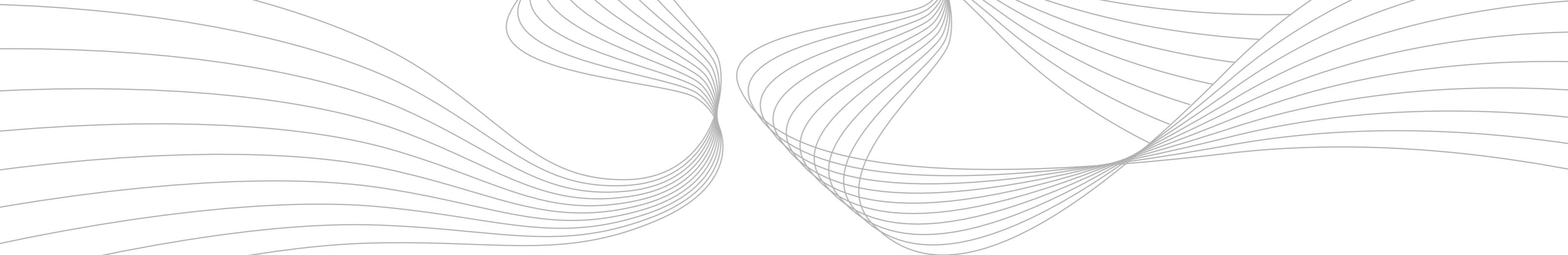
VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka	Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Damijan Knez	doktor znanosti s področja farmacije	Stanislav Gobec	2632	Miha Kastelic	doktor znanosti s področja kemije	Daan Frenkel Jure Dobnikar	2641
Eva Pušavec Kirar	doktorica znanosti s področja kemije	Jurij Splete	2633	Ivana Klopčič	doktorica znanosti s področja farmacije	Vojeslav Vlachy	2642
Maja Marušič	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Janez Plavec	2634	Urška Dragin Jerman	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Marija Sollner Dolenc Janez Mavri	2643
Jernej Luzar	doktor znanosti s področja farmacije	Mojca Lunder Peter Korošec	2635	Urban Feguš	doktor znanosti s področja kemije	Željko Knez	2645
Miodrag Janić	doktor znanosti s področja medicinskih ved	Mišo Šabovič Gorazd Drevenšek	2636	Nika Oman Kadunc	doktorica znanosti s področja elektrotehnike	Dejan Tomaževič	2646
				Mirijam Černe Prelovšek	magistrica znanosti s področja ekonomije	Mateja Kos Koklič	2647
				Aleš Polovič	magister kemije	Franc Požgan Sergeja Bombek	2648

KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka	Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Ana Mitrović	doktorica znanosti s področja klinične biokemije in laboratorijske biomedicine	Janko Kos	2637	Matjaž Grčman	magister kemije	Matevž Pompe	2649
Špela Kos	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Gregor Serša	2638	Luka Hribernik	magister kemije	Marjan Jereb	2650
Marina Gjorgjieva	doktorica znanosti s področja farmacije	Danijel Kikelj Lucija Peterlin Mašič	2639	Gašper Pisanec	magister farmacije	Odon Planinšek Matej Pavli	2651
Jerca Pahor	doktorica znanosti s področja kemije	Ajda Podgoršek Berke Stojan Stavber	2640	Janja Lakner	magistra kemije	Marjan Jereb	2652
				Kristijan Skok Kristijan Orthaber Matevž Pristovnik	študent medicine študent medicine študent medicine	Uroš Maver Irena Ban Janja Stergar	2653 2654 2655
				Alja Račič	magistrica farmacije	Rok Dreu	2656

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka	Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Matic Bergant	<i>magister farmacije</i>	Stane Pajk Jožko Cesar	2657	Nika Žurga Eva Kerčmar	<i>dijakinja dijakinja</i>	Zdenka Keuc	2664 2665
Vesna Pirnat	<i>magistra farmacije</i>	Alenka Zvonar Pobirk Matevž Luštrik	2658	Kaja Klemenc	<i>dijakinja</i>	Petra Sušjan, Darja Silan	2666
Mitja Pohlen	<i>magister farmacije</i>	Rok Dreu Karl G. Wagner	2659	Benjamin Božič Tjaša Šentjurc	<i>djak dijakinja</i>	Majda Golob, Mateja Pate Irena Zdovc, Gašper Jan Simon, Nada Udovč Knežević Irena Štrumbelj Drusany	2667 2668
Sandra Jančar	<i>magistra farmacije</i>	Stane Srčič Simona Peterlin	2660	Nika Zupančič Zala Kink Nika Brulc	<i>dijakinja dijakinja dijakinja</i>	Silvo Zupančič Aleš Gasparič Branka Klemenčič	2669 2670 2671
Ana Dolšak	<i>magistra farmacije</i>	Matej Sova	2661	Luka Petravič Evgenija Burger Lucija Mrzel Djuranič	<i>djak dijakinja dijakinja</i>	Marko Dolinar Mojca Juteršek Tanja Gačnik	2672 2673 2674
Sandi Brudar	<i>magister kemije</i>	Iztok Prislan	2662	Ana Milošev	<i>dijakinja</i>	Andrej Cör Magdalena Klasinc	2675
Monika Tonejc	<i>magistra farmacije</i>	Marija Bogataj Tjaša Felicijan	2663	Tjaša Grabnar Larisa Grubič Luka Kunej	<i>dijakinja dijakinja djak</i>	Maja Florjanič Janja Pust	2676 2677 2678
				Nastja Medle Laura Medved Barbara Jaklič	<i>dijakinja dijakinja dijakinja</i>	Aleš Gasparič Branka Klemenčič	2679 2680 2681
				Domen Pregeljc	<i>djak</i>	Urška Jug, Jernej Stare, Janez Mavri, Alenka Mozer	2682
				Gabriela Štumberger	<i>dijakinja</i>	Boštjan Vihar Katja Holnhaner Zorec	2683
				Taja Skube Larsen Cundrič Matic Rajnar	<i>dijakinja djak djak</i>	Janja Pust	2684 2685 2686
				Marjeta Mavri Cita Jenko Maša Skočir	<i>dijakinja dijakinja dijakinja</i>	Nasta Zupančič Helena Podgornik	2687 2688 2689
				Sara Jamnik Helena Perić	<i>dijakinja dijakinja</i>	Alenka Mozer Nataša Poklar Ulrich Mihaela Skrt	2690 2691



Razpis za že 47. Krkine nagrade je tudi letos izpolnil pričakovanja Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad tako glede kakovosti kot števila prijavljenih nalog in pestrosti področij, s katerih prihajajo mladi raziskovalci.

Člane Znanstvenega odbora nas posebej veselita stalno rastoča kakovost in številčnost raziskovalnih nalog dijakov, pri čemer je pomembno, da se srednjim šolam, v katerih je spodbujanje raziskovalnega dela postalo že ustaljena praksa, vsako leto pridružujejo nove in s tem omogočajo vstop v raziskovalno delo vedno širšemu krogu mladih. Ob tej priložnosti se želim zahvaliti vsem mentorjem, ki mladim omogočate raziskovalno delo in jih pri tem spodbujate, saj to zahteva precejšen del njihovega prostega časa in energije.

Po prepoznavnosti in odzivu tako mladih raziskovalcev kot njihovih mentorjev so Krkine nagrade odlično izhodišče in priložnost, da mlade odkrijemo in jim tako po strokovno-raziskovalni kot tudi po osebnostni plati omogočimo razvoj v odlične bodoče strokovnjake, ki bodo s svojim delom v gospodarstvu ali v drugih inštitucijah omogočili še večji družbeni napredok. Pred mladimi raziskovalci so številni izzivi in pasti, katerih reševanje pa jim prinaša neprecenljive izkušnje.

Kot poseben izzziv in hkrati past za mlade raziskovalce, posebej tiste, ki so na začetku znanstvenoraziskovalne poti, želim izpostaviti kritičen odnos tako do informacij, pridobljenih iz objavljenih virov, kot tudi kritičnost in objektivnost do lastnih raziskovalnih rezultatov in ugotovitev. Razvoj sodobnih medijev, posebej svetovnega spletja, omogoča enostaven dostop do informacij z vseh področij, tudi znanstvenih in strokovnih. Mladi raziskovalci se ne smejo zadovoljiti z instantnim povzemanjem člankov s spletja, ampak morajo vse tako pridobljene informacije sami ali s pomočjo mentorjev kritično ovrednotiti. Zato želim tukaj še posebej poudariti vlogo in odgovornost mentorjev, da mlade raziskovalce spodbujajo in usmerjajo. Takošen pristop bo omogočil razvoj odličnih raziskovalcev, ki bodo znali realno ocenjevati vrednost lastnih in tujih znanstvenih rezultatov, s tem pa bodo njihovi rezultati in objave pridobile večjo znanstveno vrednost.

Mladim raziskovalkam in raziskovalcem, prejemnikom Krkinih nagrad, v imenu članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in seveda v svojem imenu iskreno čestitam za prejete nagrade. Naj bodo samo še dodatna spodbuda k nadaljnemu razvoju vaših raziskovalno-razvojnih potencialov in uporabi pridobljenega znanja ter k želji po iskanju novih ciljev in poti do njihovega udejanjanja v delovnem okolju.

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

The call for the 47th Krka Prizes met the expectations of the Scientific Committee of the Krka Prizes in terms of the quality and number of submitted papers and the variety of research fields of young researchers.

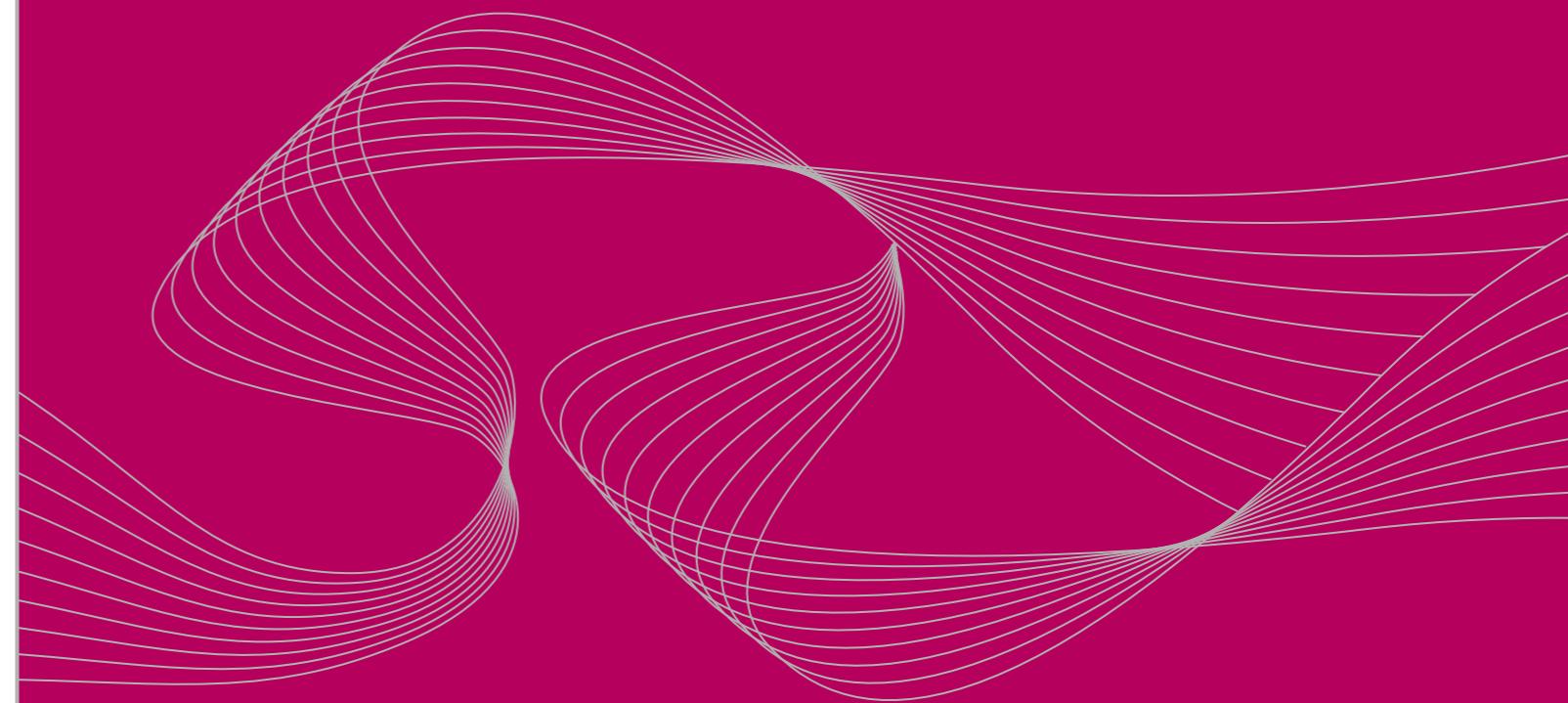
The members of the Scientific Committee are especially pleased with the continuing quality and quantity of the research papers submitted by secondary school students and the fact that every year new secondary schools join in and answer the call for papers, thus introducing young people to research. I would like to take this opportunity and thank all the mentors that enable young people to participate in research and encourage them along the way as I know that this can often take up a lot of free time and energy.

From the recognisability and response of young researchers and their mentors we can say that Krka Prizes are an excellent starting point and an opportunity to discover young people and enable them to develop into outstanding future experts in terms of their expert and research knowledge and also personally, so that they can contribute with their work in the economic sector and other institutions, thus helping to achieve more social progress. Young researchers may face many challenges and traps, but the solutions to these result in priceless experiences.

I would like to take this opportunity to bring forward a special challenge, which is often also a trap for young researchers, especially those that find themselves at the beginning of their scientific and research careers and that is to approach the information obtained on the internet and published resources critically and to be objective and critical towards their own research results and findings. The development of modern media, especially the internet brings along easy access to all kinds of information from various areas, including scientific and professional. However, young researchers should not be content with instant references from the internet, but should critically evaluate the obtained information themselves or with the help of their mentors. That is why I would like to emphasise the role and responsibility of mentors in encouraging and guiding young researchers. Such an approach will enable the development of excellent researchers who will know how to realistically evaluate their own and others' scientific results. In this way, their results and published works will obtain an even greater scientific value. In the name of all the members of the Scientific Committee and myself I would like to congratulate young researchers, receivers of the Krka Prizes for the awards they received. I hope that the awards will serve as additional encouragement for the future development of your research and development potentials, the use of the obtained knowledge and the wish to seek new aims and paths to realise them at work.

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

47.



Velike Krkine nagrade za raziskovalno naloge
Krka Grand Prizes for Research

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners



Dr. DAMIJAN KNEZ

Znanost v korist človeštva

Damijan Knez je v celoti predan znanstvenoraziskovanemu delu. Že v otroštvu ga je zanimalo, iz česa je zgrajeno telo, kaj so atomi in molekule. Želja po spoznavanju naravoslovnih predmetov, zlasti kemije in biologije, sta v osnovni šoli in na gimnaziji, ki jo je obiskoval na Ravnah na Koroškem, le še naraščala. Zato se je leta 2008 odločil za študij farmacije na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. »Raziskovalno delo na področju protibakterijskih učinkovin na Katedri za farmacevtsko kemijo in želja, da pomagam ljudem, sta me dokončno prepričala, da je to področje, na katerem lahko izkoristim svoj potencial in po najboljših močeh prispevam k razvoju znanosti,« poudari mladi raziskovalec, ki je svojo doktorsko nalogu uspešno zagovarjal marca 2017.

Širše področje njegovega raziskovanja je farmacevtska kemija, ki se pri njem tesno prepleta z organsko kemijo, biokemijo in strukturno biologijo. »S sodelavci odkrivamo nove zdravilne učinkovine in njihovo sintezo ter jih poskušamo optimizirati do te stopnje, da bi se lahko uspešno izvedla vsa predklinična in klinična testiranja, ki so pogoj, da novo zdravilo vstopi na trg,« razloži. Kot še pojasni, spojine, ki jih je raziskoval v okviru doktorske naloge, predstavljajo nov, drugačen strukturni tip potencialnih učinkovin. »Načrtovali smo jih tako, da delujejo na več bolezenskih sprememb pri Alzheimerjevi bolezni in da ne bi le lajšale simptomov te bolezni, temveč prispevale k izboljšanju ali celo njeni ozdravitvi.«

Damijan Knez pri svojem znanstvenem delu neznansko uživa. »Ko raziskujem, se ponovno počutim kot otrok z vprašanji, kako in zakaj. Ko dobim odgovor na eno vprašanje, se mi že porodi naslednje. In vsaka rešitev problema pomeni nov zagon in zadovoljstvo ter še več navdušenja za naslednji iziv. Najboljše ideje me običajno prešinejo takrat, ko delam nekaj popolnoma drugega – doma, v naravi, preden zaspim. Bolj kot je situacija naključna, boljša je po navadi ideja,« z žarom pripoveduje doktor znanosti, ki se zaveda, da se rezultati njegovega dela morda zdijo še daleč od zdravila na trgu. Toda vsi koščki znanja in rezultatov sestavljajo mozaik v poznavanju bolezni in načinov zdravljenja in bodo nekoč pomagali pri odkritju novega zdravila. Ker se je najbolj pogobil v nevrodgenerativne bolezni, kjer je še veliko neznanega, bo to področje tudi v prihodnje središče njegovega raziskovanja.

Pomembno vlogo pri usmerjanju dela dr. Knez pripisuje mentorju. Ta, poudari, s svojimi izkušnjami, znanjem in kompetencami omogoča, da mladi znanstveniki po doktorski nalogi dosežejo visoko raven kritičnega razmišljanja, ki jim omogoča samostojno in kakovostno delo bodisi v industrijskem bodisi v raziskovalnem okolju. »Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani mi je vse

omenjeno omogočil mentor prof. dr. Stanislav Gobec.«

Sodelovanje med gospodarstvom in akademskim svetom je po besedah mladega raziskovalca ključno za razvoj novih tehnologij, izobraževanje visokokvalificiranih kadrov in razvoj farmacevtske stroke v Sloveniji. »Krkine nagrade predstavljajo eno od ravnih sodelovanja – Krka podpira delo akademskega okolja, hkrati pa akademsko okolje stopa v korak s potrebami gospodarstva. Nagrada je izjemna priložnost, da lahko svoje delo predstavim širši javnosti in industrijskemu okolju, zato je to zame velika čast. Je potrditev, da z zavzetim timskim delom lahko dosežemo kakovostne rezultate, ki jih prepoznajo tudi strokovnjaki zunaj fakultete in univerze.«

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Klub veliki količini dela, ki ga imam na Fakulteti za farmacijo, si še vedno vzamem čas tudi za družino in prijatelje na domačem Koroškem. V Ljubljani, kjer trenutno živim, pa sem na srečo zelo povezan tudi s sodelavci in lahko rečem, da je služba kot moj drugi dom.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Verjamem, da mi mešanica vztrajnosti, delavnosti in potrpežljivosti omogoča, da sem tako predan raziskovalnem delu, ki ga želim opravljati tudi v prihodnje. Zavedam se, da grem kdaj tudi z glavo skozi zid, a vse z namenom, da dosežem zadani cilj.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Delo raziskovalca zahteva celega človeka, a vredno je vztrajati in stremeti k visoki kakovosti dela in raziskav. Na ta način prispevamo v korist človeštva, naš trud pa je lahko prepoznan v industrijskem okolju in na mednarodni ravni.

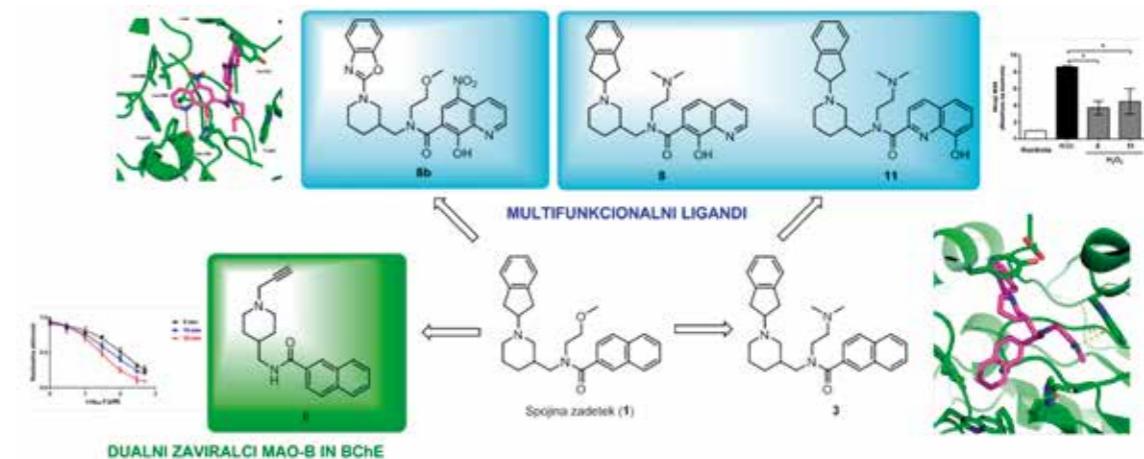
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje potencialnih učinkovin z multiplim mehanizmom delovanja za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

DAMIJAN KNEZ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Stanislav Gobec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Nevrodegenerativna obolenja so zaradi staranja prebivalstva in posledično večjega števila bolnikov pereč zdravstveni problem. Med najbolj prepoznanimi je Alzheimerjeva bolezen (AB), napredujoča motnja centralnega živčnega sistema, ki vodi v propad predelov možganov ter posledično v izgubo spomina in v motnje ostalih kognitivnih sposobnosti. Točen mehanizem nastanka in poteka bolezni še vedno ni pojasnjен, znano pa je, da do klinične slike vodi več patoloških procesov na molekularnem in celičnem nivoju. Izrazite poškodbe holinergičnega sistema in zmanjšanje koncentracije živčnega prenašalca acetilholina privedejo do tipičnih motenj v spominu, ki se lajšajo z zaviralci holin esteraz. Encim butirilholin esteraza (BChE) opravlja v nekaterih predelih možganov podporno vlogo pri zaključevanju holinergičnega prenosa, z napredovanjem bolezni pa lahko ta vloga celo prevlada, saj encim opravi glavnino hidrolazne aktivnosti. Zaradi povečane aktivnosti in izražanja v poznih stadijih bolezni predstavlja BChE pomembno tarčo za lajšanje simptomov na teh stopnjah AB. Poleg opisanega igrajo pri razvoju bolezni pomembno vlogo tudi številni drugi procesi. Nastanek in agregacija amiloida beta (A β) do amiloidnih plakov je ena od najbolj izrazitih patoloških sprememb, opaženih pri bolnikih. Različne zvrsti A β povezujejo z nevrotoksičnostjo, h kateri pomembno prispevajo tudi povečan oksidativni stres in motnje v porazdelitvi biološko pomembnih dvovalentnih kovinskih ionov. Trenutna simptomatska terapija AB nima velikega vpliva na potek bolezni. Za učinkovito zdravljenje in izboljšanje simptomov bi bilo zato treba delovati na več tarč hkrati. Razvoj potencialnih učinkovin, ki bi lahko vzročno vplivale na nastanek in potek bolezni, se je tako usmeril v načrtovanje učinkovin z multiplim mehanizmom delovanja (multifunkcionalni ligandi).

Selektivni zaviralec BChE **1** ($IC_{50} = 21,3 \text{ nM}$), ki je bil rezultat uspešnega strukturno podprtoga virtualnega rešetanja, in njegovo kristalno strukturo v kompleksu s človeško BChE smo uporabili kot osnovo za načrtovanje multifunkcionalnih ligandov, predstavljenih v tem doktorskem delu (slika 1). Ob upoštevanju pomembne vloge kovinskih ionov pri nastanku AB smo naftalen spojine **1** zamenjali z nitroksolinom, ki deluje kot kelator dvovalentnih kovinskih ionov. Spojina **8g** z nanomolarno zaviralno aktivnostjo na človeški BChE ($IC_{50} = 215 \text{ nM}$) selektivno kompleksira bakrove(II) ione in zavira spontano agregacijo A β , hkrati pa ima tudi šibek antioksidativni učinek. Kristalna struktura te spojine v kompleksu s človeško BChE je razkrila vezavo nitroksolina v acil vezavni žepek in s tem pokazala, da je ta del vezavnega mesta sposoben vezati tudi od naftalena večje fragmente.

Vzporedno z razvojem multifunkcionalnih ligandov sta potekala tudi optimizacija zaviralne aktivnosti spojine zadetka **1** ter raziskovanje odnosa med strukturo in zaviralnim delovanjem analogov. Velika večina sprememb v strukturi zaviralca je poslabšala zaviralno aktivnost. Z nadomestitvijo metoksietilne verige spojine **1** z 2-(dimetilamino)etilno verigo pa nam je uspelo izkoristiti še dodatno interakcijo s Trp82 človeške BChE, kar je povečalo moč zaviranja, ki se pri spojini **3** giblje v pikomolarnem območju.



Slika 1. Razvoj potencialnih učinkovin za zdravljenje AB z multiplim mehanizmom delovanja.

Glede na pomembno vlogo oksidativnega stresa in motenj pri porazdelitvi kovinskih ionov smo v molekulo najboljšega reverzibilnega zaviralca BChE s piperidinsko strukturo **3** uvajali različne fragmente s sposobnostjo kompleksacije kovinskih ionov in antioksidativnimi lastnostmi. Spojini **8** in **11** z IC_{50} -vrednostma za človeško BChE $13,8 \pm 0,6$ oziroma $11,1 \pm 0,6 \text{ nM}$ spadata med najboljše zaviralce iz te serije. Kristalna struktura kompleksa spojine **11** in človeške BChE je, podobno kot za nitroksolinski derivat, pokazala vezavo 8-hidroksikinolinskega fragmenta v acil vezavni žepek encima. Spojina je v kokristalu vezana tudi na površini med dvema monomeroma encima, kjer vezavno mesto tvorita dva plitva žepe. Alternativna vezava po vsej verjetnosti nima vpliva na aktivnost encima, spojina pa bi lahko bila potencialno uporabna kot iniciator kristalizacije človeške BChE. 8-hidroksikinolinska derivata **8** in **11** kažejo tudi dobre antioksidativne lastnosti in kompleksacijo bakrovih(II) ionov, ki po vezavi v kompleks niso več redoks aktivni. Kljub temu da spojini ne zavirata procesa spontane agregacije A β , spojina **11** ščiti nevroblastomske SH-SY5Y celice pred toksičnostjo fibrilov A β . Poleg navedenega oba analoga zmanjšata znotrajcelične koncentracije reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), s pasivno difuzijo prehajata membrane v celičnem modelu Caco2 ter nista substrata za prenašalne proteine (primer P-glikoprotein). Derivata **8** in **11** zaradi dobrega profila dodatnih aktivnosti v primerjavi z nitroksolinskimi analogi in spodbudnih rezultatov na celičnih testih predstavlja naslednjo generacijo izboljšanih multifunkcionalnih ligandov za terapijo AB.

Poleg vseh naštetih faktorjev je pri AB opazna tudi povečana aktivnost monoaminoooksidaze (MAO) v določenih predelih možganov. Povečana oksidativna deaminacija zmanjša koncentracijo živčnih prenašalcev, kar privede do motenj v vedenju. Pri metabolizmu nastane tudi več toksičnih produktov, ki dodatno prispevajo k oksidativnemu stresu in nevrodegeneraciji, zato predstavlja MAO dobro tarčo, prek katere lahko vplivamo tudi na vzroke nastanka AB. Zaviralna aktivnost na MAO se zelo pogosto združi z zaviranjem ene ali obeh holin esteraz. V tem primeru govorimo o t. i. dualnih zavircih, ki jih je v literaturi opisanih kar nekaj in jih lahko razdelimo v tri razrede: derivati propargilamina, kumarini in derivati naravnih spojin. Najbolj raziskana je zagotovo prva skupina, kjer spojina ASS234 in ladostigil kaže dobre rezultate v predkliničnih testiranjih, slednji pa tudi v kliničnih fazah testiran.

Prek uvedbe propargilne skupine na piperidinski dušik analoga spojine zadetka **1** smo pri spojini **6** dosegli dualno mikromolarno zaviranje dveh encimov, BChE ($IC_{50} = 2,6 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{M}$) in MAO-B ($IC_{50} = 53,9 \pm 4,8 \text{ } \mu\text{M}$). Zaviranje MAO-B je ireverzibilno in časovno odvisno, kar sovpada s podatki o zavircih propargilaminskega tipa iz literature. Spojina **6** v testu prehajanja s sistemom vzporednih umetnih membran kaže velik potencial za prehajanje krvno-možganske pregrade, za nevroblastomske celice ni citotoksična, sočasno pa jih ščiti tudi pred toksičnostjo A β . N-propargilpiperidinski dualni zavirali BChE in MAO-B so lahko dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj multiplih ligandov za terapijo AB.

Design, Synthesis and Evaluation of Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease with Multiple Mechanisms of Action

DAMIJAN KNEZ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Stanislav Gobec, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Due to the aging of the population and the concomitant increase in the number of people with neurodegenerative diseases, these disorders are becoming an enormous health care problem. One of these disorders is Alzheimer's disease (AD), a progressive disorder of central nervous system leading to dysfunctions in certain areas of the brain, and subsequent loss of memory and disturbances in other cognitive functions. The exact cause of the disease is still unknown, yet several pathological processes on molecular and cellular level lead to the observed clinical picture. Alterations in the cholinergic system and reduced levels of neurotransmitter acetylcholine lead to typical memory loss, which can be alleviated by cholinesterase inhibitors. Butyrylcholinesterase (BChE) helps with the termination of the cholinergic neurotransmission in some parts of the brain. With the progression of the disease its hydrolytic function becomes more important and can even take over the cholinesterase activity. Due to the increased activity and expression in latter stages of AD, BChE represents an important target for the alleviation of symptoms in the late stages of AD. Several other factors significantly contribute to the development of the disease. Aggregation of amyloid beta ($A\beta$) peptide and the formation of senile plaques are one of the hallmark pathological changes. Apart from various $A\beta$ species, increased oxidative stress and disturbances in bivalent metal ion distribution are also related to neurotoxicity. Current symptomatic management of AD does not have any significant effect on the disease progression, thus several pathological changes should be targeted simultaneously to address the underlying cause. The development of new drugs has therefore shifted towards multi-target-directed ligands (multifunctional ligands) capable of interacting with the factors related to the disease development and progression.

Selective BChE inhibitor **1** ($IC_{50} = 21.3 \text{ nM}$), a result of a successful structure based virtual screening, and its crystal structure in complex with human BChE was used as the basis for the design of multifunctional ligands presented herein (Figure 1). The naphthalene moiety of **1** was replaced with nitroxoline, a known chelating agent of bivalent metal ions, to yield the multifunctional ligand **8g**. Compound **8g**, with nanomolar inhibitory potency against human BChE ($IC_{50} = 215 \text{ nM}$), also selectively chelates copper(II) ions, inhibits $A\beta$ aggregation, and has weak antioxidant activity. The co-crystal structure of **8g** with human BChE reveals the binding of the nitroxoline into the acyl binding pocket and proves that this part of the active site gorge can indeed accommodate fragments, bigger than naphthalene.

In parallel to the development of multifunctional ligands, the optimization of compound **1** was performed in order to increase the inhibitory potency and to elucidate the structure-activity relationships. The majority of structural modifications led to diminished inhibitory potency. On the other hand, the replacement of methoxyethyl side chain of **1** with 2-(dimethylamino)ethyl moiety sequestered an additional interaction with Trp82 of human BChE, which led to increased inhibitory potency now being in picomolar range.

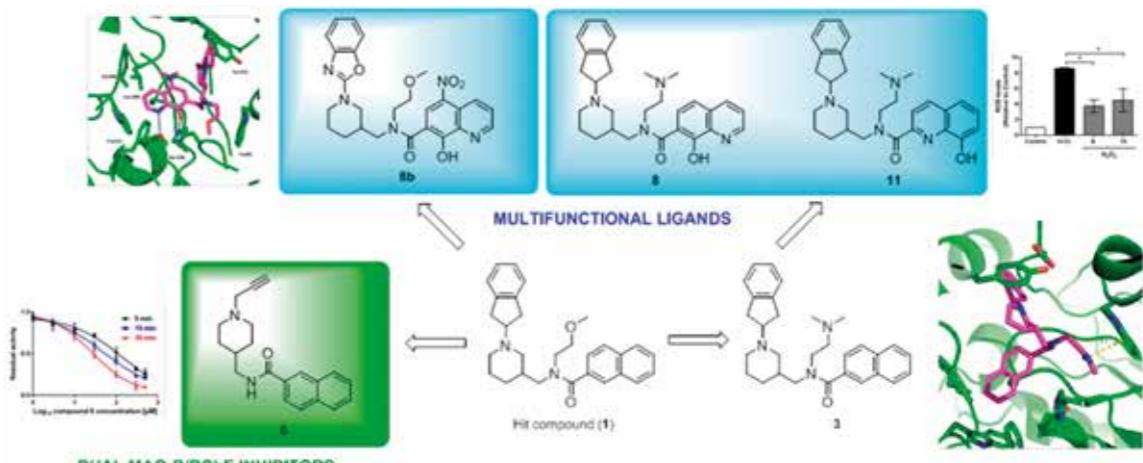


Figure 1: Development of potential multifunctional anti-Alzheimer's ligands.

The structure of the most potent reversible piperidine-based inhibitor **3** was used to design another series of multifunctional ligands with metal chelating and antioxidant properties. Compounds **8** and **11** with IC_{50} values for human BChE $13.8 \pm 0.6 \text{ nM}$ and $11.1 \pm 0.6 \text{ nM}$, respectively, are among the best inhibitors in the series. Resolved crystal structure of compound **11** in human BChE has once again confirmed the binding of 8-hydroxyquinoline moiety in the acyl binding pocket as observed before for the nitroxoline analog. The compound is also bound to the interface of monomeric units of BChE where the binding site is composed of shallow pockets, one on each monomer. This alternative binding probably does not affect the enzyme activity, nonetheless the compound could be useful as an inductor of human BChE crystallization. 8-Hydroxyquinoline derivatives **8** and **11** are also good antioxidants and chelators of copper(II) ions. The complexes of compounds **8** and **11** with copper(II) are not redox active. No effect on $A\beta$ aggregation has been observed, however compound **11** protects neuroblastoma SH-SY5Y cell from toxic $A\beta$ fibrils. Both analogs reduce the intracellular levels of reactive oxygen species, penetrate the membrane in the Caco2 cell model via passive diffusion, and are not substrates of any efflux systems (e.g. P-glycoprotein) in the mentioned cell line. These derivatives with additional activities in comparison to the nitroxoline analogs, and good results in the cell based assays represent the next generation of multifunctional ligands for the treatment of AD.

In addition to all of the described factors, increased activity of monoamine oxidase (MAO) is detected in particular areas of the brain. Higher level of oxidative deamination diminishes the concentrations of neurotransmitters and this further leads to disturbances in the behaviour. In the metabolic reactions of MAO additional toxic products are generated, which augment the observed oxidative stress and neurodegeneration. This enzyme thus represents another target through which the effect on the cause of the AD can be achieved. Often the inhibitory activity on MAO is combined with cholinesterases inhibition. Three main classes of dual inhibitors are described in the literature: propargylamine derivatives, coumarins and derivatives of natural compounds. The first group is the most studied one, where compound ASS234 and ladostigil display promising results in preclinical studies, the latter is also in clinical trials.

The attachment of the propargyl group onto the piperidine nitrogen of the hit compound **1** resulted in compound **6**, a dual micromolar BChE ($IC_{50} = 2.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$) and MAO-B ($IC_{50} = 53.9 \pm 4.8 \mu\text{M}$) inhibitor. The inhibition of MAO-B is time-dependent and irreversible, which is in accordance with the literature data on propargylamine based inhibitors. Compound **6** crosses the blood brain barrier as determined in vitro in parallel artificial membrane permeability assay, is not toxic to neuroblastoma cells, and protects them against $A\beta$ induced toxicity. N-propargylpiperidine based dual BChE/MAO-B inhibitors represent a solid ground for additional optimization and development of multifunctional anti-Alzheimer's disease agents.



Dr. EVA PUŠAVEC KIRAR

Vztrajnost se obrestuje

Eva Pušavec Kirar, ki prihaja z Otočca pri Novem mestu, se je nad kemijo navdušila že v osnovni šoli in kasneje še na novomeški gimnaziji. Zato je bila njena odločitev za študij kemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani pričakovana. Poglobljeno se je usmerila v študij organske kemije. Najprej je na Katedri za organsko kemijo uspešno zagovarjala diplomsko nalogu, nato pa se je na fakulteti zaposlila kot mlada raziskovalka in nadaljevala z doktorskim študijem kemijskih znanosti. »Ukvarjala sem se s sintezo in proučevanjem mehanizmov kemijskih reakcij in prišla do nekaterih novih ugotovitev ter poglobila znanje o tem tipu kemijskih reakcij. Nadaljnje študije o morebitni uporabi znanja v različnih aplikacijah še potekajo,« poudarja raziskovalka, ki je svoje znanstveno delo končala junija 2017.

Področje raziskovanja mlade znanstvenice je organska kemija, natančneje organska sinteza, predvsem heterociklična. Osnovni namen njene doktorske naloge je bilo proučevanje nekaterih reakcij 1,3-dipolarnih cikloadicij. »Skupaj s sodelavci smo ugotovili, da reakcije, ki smo jih izvajali, zelo učinkovito katalizira elementarni baker, torej bakrov prah ali bakrova žica. Gre za zanimivo odkritje, saj je baker lahko dostopen katalizator in po končani reakciji ga je enostavno ločiti od produktov. Proučevali smo, kaj se med reakcijo dogaja z molekulami, in pripravili več novih spojin, med drugim tudi predstavnike novega tipa heterocikličnih sistemov,« opisuje nagrajeno raziskovalno delo, pri čemer izpostavi pomembno vlogo mentorja prof. dr. Jurija Sveteta, ki jo je pravilno usmerjal in ji bil vedno na voljo za razpravo.

Pri raziskovalnem delu jo najbolj navdihujejo priložnosti, da lahko njene raziskave prispevajo k razumevanju kemijskih reakcij in znanosti in sploh, morda celo v gospodarstvu. »Najboljše ideje sem mi porodilo ob prebiranju znanstvenih člankov, pogosto tudi takrat, ko sem povsem sproščena, npr. ob jutranji kavi ali med pospravljanjem.« Seveda med raziskovanjem lahko pride tudi do neresljivih ugank, zato je po njenih besedah včasih enostavno treba pustiti kakšno stvar pri miru, jo odmisli, in se šele čez nekaj dni ali celo tednov vrniti nazaj. »Tudi nasvet sodelavca je lahko zelo dobrodošel. Pogosto česa ne vidimo prav zato, ker smo preveč 'v stvari', poudarja raziskovalka, ki tudi po doktoratu svoj znanstveni potencial razvija na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Na razpis za Krkine nagrade se je ob mentorjevi spodbudi prijavila zato, ker je v svojo doktorsko nalogu vložila veliko truda, zanimalo pa jo je tudi, kako jo bodo ocenili strokovnjaki iz gospodarstva. »Menim, da je v Sloveniji premalo povezav med akademskim svetom in gospodarstvom, zato je 47-letna tradicija podeljevanja Krkinih nagrad danes še toliko bolj cenjena,« pravi prejemnica

velike Krkine nagrade za raziskovalno nalogu, ki je zelo ponosna, da je bila njena naloga tudi v gospodarstvu prepoznana kot kakovostna. »Prestižna Krkina nagrada je zame velika spodbuda za nadaljnje raziskovalno delo.«

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Znanstvenoraziskovalno delo vsekakor vzame več kot osem ur na dan, ampak ker je zanimivo, mi ni težko ostati dlje ali pa kaj postoriti še zvečer ali ob koncu tedna. Kljub temu si je treba znati vzeti čas tudi zase, za prijatelje, družino in ... malo odklopiti. Potem je tudi delati lažje.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Zelo sem vztrajna in se vedno potrudim izpeljati stvari do konca, ne predam se tako zlahka. Pri tem mi nedvomno pomagajo tudi moja pozitivna naravnost, komunikativnost in iznajdljivost.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

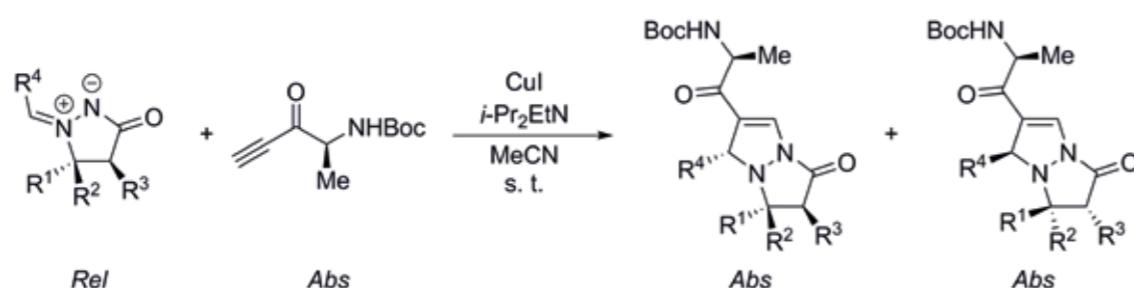
Svoje raziskovalno delo opravljajte z veseljem, vztrajnostjo in natančnostjo. Ne dopustite, da bi vas »neuspešni« poskusi demotivirali, ampak se iz njih raje učite.

Cikloadicije (*S*)- α -aminoalkil inonov in enonov

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

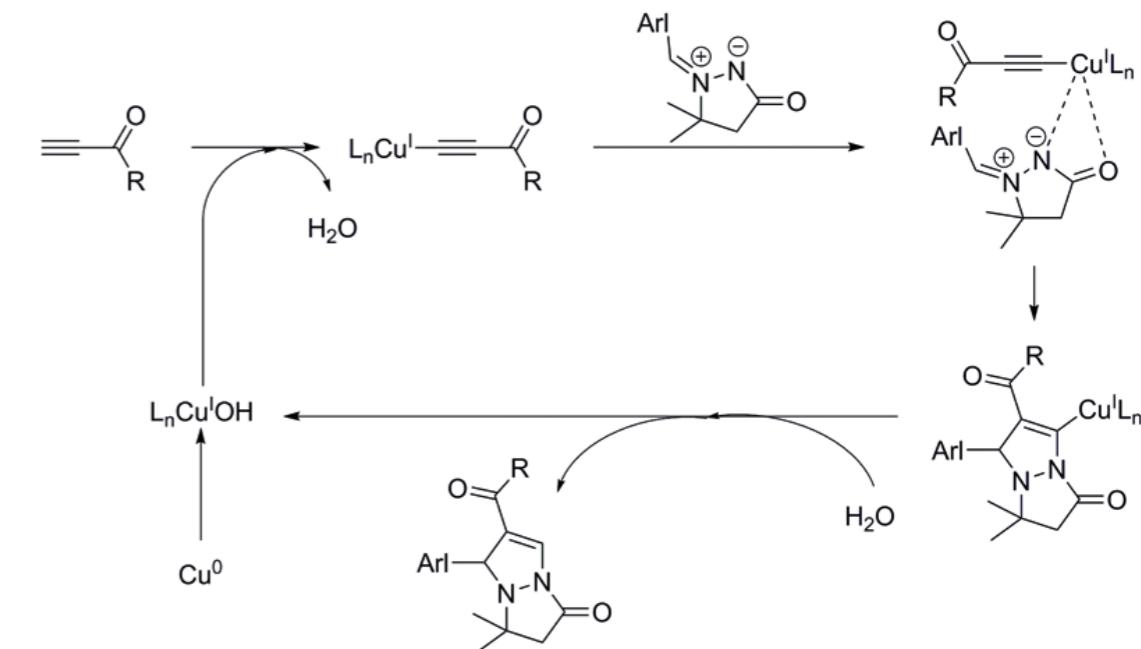
Ker so bile reakcije 1,3-dipolarnih cikloadicij inonov in enonov, pripravljenih iz aminokislin, še dokaj neraziskane, smo se odločili, da jih podrobneje proučimo. Zanje smo želeli poiskati nove katalizatorje, pripraviti nove heterociklične sisteme z aminokislinskim preostankom in razširiti uporabnost α -aminoalkil inonov in enonov v organski sintezi. Osredotočiti smo se nameravali zlasti na katalizirane reakcije z N,N-cikličnimi azometin imini. Pri delu smo uporabljali blage reakcijske pogoje, pri katerih ne pride do epimerizacije kiralnih centrov.

Z reakcijami 1,3-dipolarnih cikloadicij racemnih ali akiralnih N,N-cikličnih azometin iminov z neracemnim inonom, pripravljenim iz Boc-zaščitenega L-alanina, smo sintetizirali knjižnico 5-okso-6,7-dihidro-1*H*,5*H*-pirazolo[1,2-a]pirazolov (shema 1). Reakcije smo izvedli v prisotnosti bakrovega(l) jodida in Hünigove baze. Potele so z velikimi izkoristki, regio- in stereoselektivno. Nastala sta po dva neracemna diastereoizomera, ki smo ju ločili s preparativno kromatografijo. Strukturo nekaterih produktov smo določili z rentgensko strukturno analizo in VCD. Na podlagi primerjave spektroskopskih in optičnih lastnosti spojin smo določili še strukturo ostalih. Ugotovili smo, da lahko takšnim 5-okso-6,7-dihidro-1*H*,5*H*-pirazolo[1,2-a]pirazolom določimo strukturo že na podlagi podatkov, dobljenih z NMR-spektroskopijo in s specifičnim zasukom.



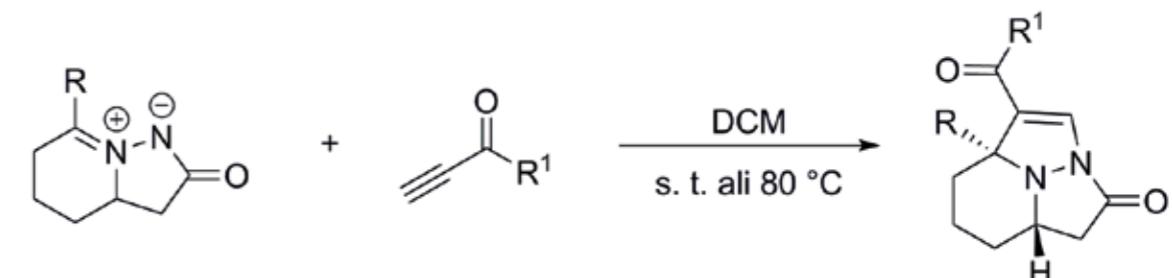
Shema 1. Reakcije 1,3-dipolarnih cikloadicij med N,N-cikličnimi azometin imini in inonom, katalizirane z bakrovim(l) jodidom in Hünigovo bazo.

Izvedli smo tudi reakcije akiralnih N,N-cikličnih azometin iminov z drugimi inoni, katalizirane z elementarnim bakrom. Uporabili smo baker v različnih oblikah: bakrov prah, granule, žico, baker na grafitu in z bakrom oblečen železov prah. Reakcije so potekale regioselektivno. Hitrost reakcije je bila odvisna od velikosti površine delcev bakra, kar smo ugotovili s primerjavo hitrosti reakcije v prisotnosti bakrovega prahu in enake mase bakrovih granul. V prisotnosti granul, ki imajo manjšo površino od prahu, je reakcija potekala bistveno počasneje. Kadar smo po začetku reakcije iz reakcijske zmesi odvzeli katalizator, se reakcija ni ustavila, kar pomeni, da ne poteka na površini katalizatorja, temveč v raztopini. Ko smo uporabili devterirani inon, je med reakcijo prišlo do izmenjave devterija, njegova vsebnost pa je bila v produktu bistveno manjša kot v inonu. Ta poskus je potrdil predpostavljeni mehanizem reakcije, po katerem kot intermedij nastane bakrov(l) acetilid (shema 2). Ugotovili smo, da je vir bakrovih(l) ionov elementarni baker in ne bakrov oksidi, ki so prisotni na njegovi površini. To so bili prvi primeri reakcij med inoni in N,N-cikličnimi azometin imini, kjer je bil kot katalizator uporabljen učinkovit in lahko dostopen elementarni baker.



Shema 2. Predpostavljeni mehanizem reakcij med N,N-cikličnimi azometin imini in inoni, kataliziranimi z bakrom(0).

Inoni so z bicikličnima azometin iminoma reagirali pri sobni ali povišani temperaturi in z dobrimi izkoristki izolirali diazaciklopenta[cd]indene, ki so bili do tedaj še nepoznani sistemi (shema 3). Reakcije so potekale regio- in stereoselektivno. Merili smo hitrost reakcij med enim od azometin iminov in butenonom v različnih topilih in ugotovili, da najverjetnejše potekajo koncentrirano in da med njimi ne nastane noben intermedij, saj so potele približno enako hitro v topilih različnih polarnosti. Iz podatkov, dobljenih iz meritev hitrosti reakcij pri različnih temperaturah, smo izračunali entalpijo, entropijo in prosto energijo prehodnega stanja. Rezultati so se dobro ujemali z vrednostmi, dobljenimi z računalniškimi izračuni.



Shema 3. Reakcije 1,3-dipolarnih cikloadicij med bicikličnimi azometin imini in inoni.

Izvedli smo tudi reakcije 1,3-dipolarnih cikloadicij z nekaterimi drugimi dipoli. Potele so med inoni in azidom, nitril oksidom in diazo estri. Tako smo pripravili nove petčlenske heterociklične spojine z aminokislinskim preostankom.

Reakcije 1,3-dipolarnih cikloadicij med N,N-cikličnimi azometin imini in butenonom so potekle v prisotnosti močnih kislin. Kadar smo uporabili TFA, smo izolirali zmes dveh stereoizomerov, kadar pa smo uporabili para toluensulfonsko kislino ali (+)-10-kafrasulfonsko kislino, pa so reakcije potekle stereoselektivno.

Cycloadditions of (S)- α -aminoalkyl Ynones and Enones

EVA PUŠAVEC KIRAR, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Jurij Svetec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

1,3-Dipolar cycloaddition reactions of yrones and enones, prepared from amino acids have not been fully researched. We decided to study these reactions. We planned to find new catalysts for such reactions, prepare new heterocyclic compounds with amino acid residue and expand the use of α -aminoalkyl yrones and enones in organic synthesis. Our main focus was catalysed N,N-cyclic azomethine imines reactions. The reactions were performed under mild reaction conditions to avoid chiral centre epimerization.

1,3-Dipolar cycloaddition reactions of racemic or achiral N,N-cyclic azomethine imines and nonracemic ynone, prepared from N-Boc L-alanine, were used in the synthesis of 5-oxo-6,7-dihydro-1H,5H-pyrazolo[1,2-a]pyrazoles with a combination of copper(I) iodide and Hünig's base as the catalyst (Figure 1). Reactions were regio- and stereoselective and gave products in high yields. All products were obtained as pairs of nonracemic diastereoisomers that were separated by preparative liquid chromatography. Structures of some products were determined by X-ray analysis and VCD. By comparing spectroscopic and optical properties of compounds, the structures of the rest of the products were determined as well. We have discovered that the structure of such 5-oxo-6,7-dihydro-1H,5H-pyrazolo[1,2-a]pyrazoles can be determined only from their NMR data and specific rotations.

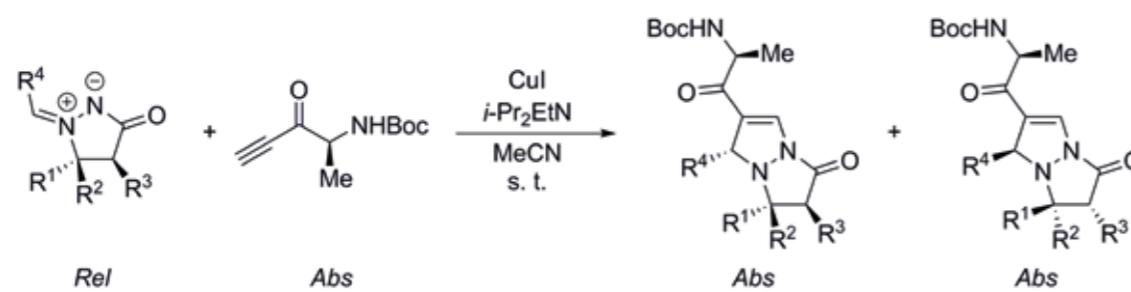


Figure 1. 1,3-Dipolar cycloaddition reactions of N,N-cyclic azomethine imines with ynone, catalyzed by copper(I) iodide and Hünig's base.

Reactions of other yrones with achiral N,N-cyclic azomethine imines were also performed with copper metal as a catalyst. Different forms of copper were used: copper powder, granules, wire, copper on graphite and copper-coated iron powder. Reactions were regioselective. The reaction rate strongly depended on the size of the catalyst surface, which showed when copper powder and the same weight of copper granules were used as catalysts. In the presence of granules, which have a smaller surface than powder, the reaction was much slower. However, when the catalyst was removed from the reaction mixture, the reaction still proceeded. It is therefore clear that the reaction does not occur on the surface of the catalyst. When deuterated ynone was used, we noticed that a deuterium exchange happens during the reaction. The percentage of deuterium in the product was much lower than in ynone. Our experiments were in line with the formation of copper(I) acetylides as the catalytic species in this reaction (Figure 2). The source of copper(I) ions was copper(0) and not copper oxides present on its surface. These were the first examples of reactions of N,N-cyclic azomethine imines with yrones, catalysed by effective and easily accessible copper(0).

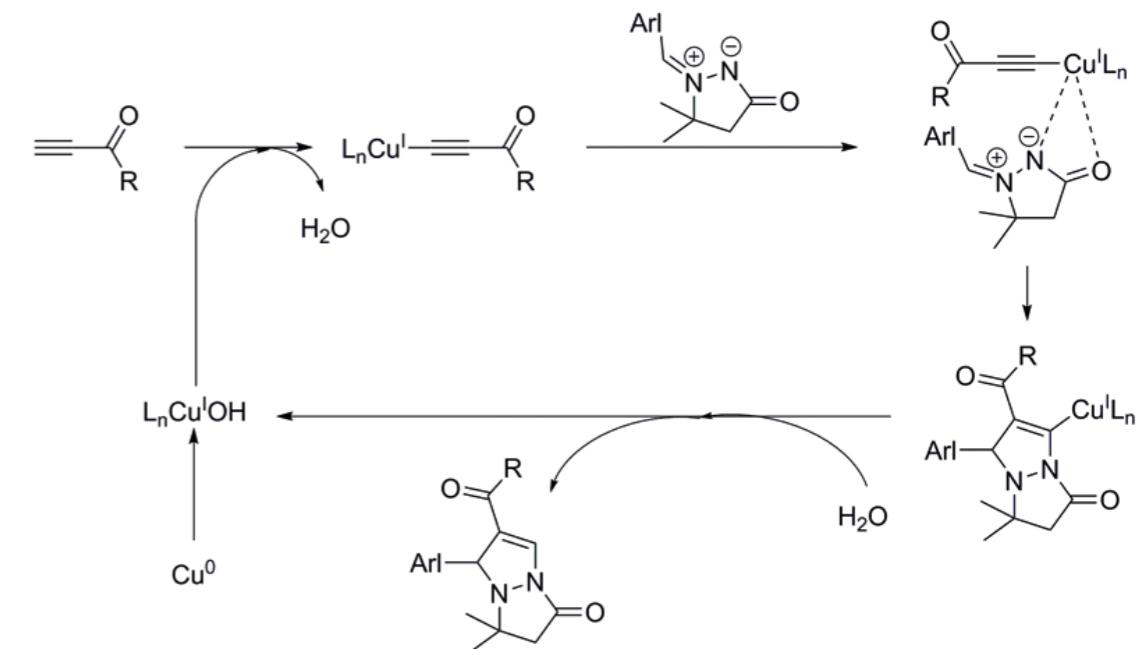


Figure 2. Proposed mechanism for copper(0) catalysed reactions of N,N-cyclic azomethine imines with ynes.

Ynes reacted with bicyclic azomethine imines at room temperature or at 80°C to give diazacyclopenta[cd]indenes with moderate yields, representing the first examples of such a heterocyclic system (Figure 3). Reactions were regio- and stereoselective. Reaction rates were measured for the reaction of one of the azomethine imines with butynone in different solvents. Measured rates were very similar for reactions in solvents with different polarity, which means the reaction proceeds without any intermediates being formed (a concerted mechanism). Enthalpy, entropy and free energy of transition state were calculated from reaction rates, measured at different temperatures. The results were in line with the results gained from computational methods.

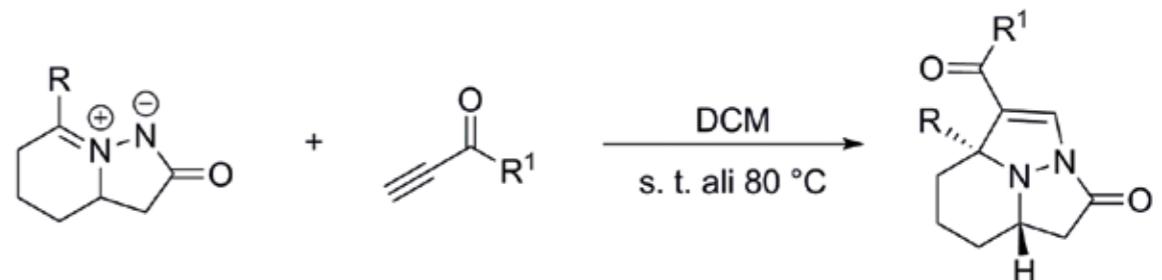


Figure 3. 1,3-Dipolar cycloaddition reactions of bicyclic azomethine imines and ynes.

1,3-Dipolar cycloadditions of ynes were also performed with some other dipoles. Reaction proceeded with an azide, nitrile oxides and diazo esters. Thus, new five-membered heterocyclic compounds with amino acid residue were prepared.

Reactions of N,N-cyclic azomethine imines with butenone gave products in the presence of strong acids. When TFA was used, mixtures of two diastereoisomers were isolated. Para-toluenesulfonic acid and (+)-10-camphorsulfonic acid only gave one.



Dr. MAJA MARUŠIČ

Usklajeno do najboljših rešitev

Maja Marušič je zaradi odličnih učiteljev, ki so jo kot znanja željno deklico spodbujali na različnih področjih, že osnovno izobraževanje končala z misljijo, da je v življenju vse mogoče, če se le potrudiš. Kljub zelo raznolikim interesom, npr. astronomiji, slovenščini in književnosti, sta bili biologija in kemija tisti, ki sta jo najbolj navduševali že v osnovi šoli, ki jo je obiskovala v Krškem, in na Gimnaziji Brežice. Odločitev za študij biokemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani je bila logično nadaljevanje njene poti. »Na fakulteti sem spoznala podobno misleče navdušence nad kompleksnostjo kemijskih procesov v živih bitjih,« poudari mlada raziskovalka, ki je svojo doktorsko nalogu v okviru skupine na Kemijskem inštitutu uspešno zagovarjala januarja 2017.

»Osnovno področje mojega raziskovanja so strukture nukleinskih kislin, glavna metoda pa jedrska magnetna resonanca,« razloži doktorica znanosti, ki svoje znanje nadgrajuje na doktorskem študiju v Stockholm na Švedskem, kjer je s struktturnimi raziskavami deoksiribonukleinskih kislin prešla na ribonukleinske kisline in se bolj podrobno posveča dinamiki teh molekul.

Sporočilo njene doktorske naloge je, da imajo človeški papilomavirusi, ki so povzročitelji raka materničnega vrata in drugih vrst raka, v dednem zapisu mesta, ki predstavljajo ovire pri njihovem razmnoževanju. »Z vezavo učinkovin na ta mesta bi lahko razmnoževanje papilomavirusov preprečili, kar pomeni, da se rakovo obolenje ne bi moglo razviti,« razloži dr. Marušičeva in še poudari, da so v raziskavi določili vrsto in strukturo teh mest, kar je nujno potreben korak pri načrtovanju dobrih učinkovin. »Ugotovitve so praktične narave, saj napovemo, kateri tipi človeških papilomavirusov bi bili primerni za ciljanje z učinkovinami.« Od ideje in prvih rezultatov do dejanske učinkovine je seveda še zelo dolga pot, a ugotovitve so potrebna začetna točka. Za nadaljevanje raziskave bi bilo treba vključiti raziskovalce z drugih področij.

Pri raziskovalnem delu jo najbolj navdihuje kompleksnost in hkrati elegantnost izzivov in njihovih rešitev. »Vedno znova me navdušuje dejstvo, da je pri delovanju živih bitijh vse posledica sil, koncentracijskih razlik, prileganja in spremenjanja strukture.« Najboljše ideje se ji največkrat porodijo zunaj službe. Pomaga jí telesna dejavnost, pri kateri se znanstveni izzivi preusmerijo v ozadje in jih lahko možgani v miru premlevajo in iščejo asociacije. »Ko znanost postane nerešljiva uganka, pobrskam po literaturi, večkrat povprašam kolege in mentorja, ponovno preverim literaturo in poskusim narediti nekaj novega.«

Vloga mentorja je za mlado raziskovalko zelo pomembna. »Poleg bogatega znanja lahko ponudi še veliko več – od sodelovanja z drugimi raziskovalci

do ustreznega odzivanja v različnih situacijah,« poudari mlada raziskovalka, ki je s svojim mentorjem prof. dr. Janezom Plavcem zelo usklajeno sodelovala. »Pomoč in nasvete mi je ponudil ravno takrat, ko sem jih najbolj potrebovala, sicer pa mi je pustil proste roke, kar mi je zelo ustrezalo. Priznam, imam veliko srečo, da lahko sodelujem z njim, saj ga spoštujem kot strokovnjaka in človeka.«

Krkine nagrade ocenjuje kot uveljavljeno priznanje najbolj vidnim raziskovalcem na kemijskem in farmacevtskem področju. »Odlično je, da Krka že 47 let podeljuje te nagrade, saj raziskovalci, sploh na začetku svoje poklicne poti, redko dobijo priznanje. K prijavi za Krkino nagrado za diplomsko delo me je spodbudil mentor, zato je bila prijava z doktorskim delom že kar samoumevna. Ponosna sem, da sem vnovič prejemnica Krkine nagrade.«

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Zaenkrat dobro usklajujem službene in družinske obveznosti. Imam dva sinova, in ker želim prosti čas preživeti z njima, se držim pravila, da poskušam svoje delo učinkovito opraviti v osmih urah. Seveda se morava s partnerjem prilagajati, sploh zdaj, ko živimo na Švedskem. V prihodnje se želim bolj posvetiti športu in drugim konjičkom, ki sem jih v zadnjih letih opustila.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Zelo sem vztrajna. Včasih sem veliko plavala, tekla in se ukvarjala z amaterskim radiogoniometriranjem, bolj poznam kot lovom na lisico. To je tehnično-sportna disciplina, v kateri morajo tekmovalci (radiogoniometri ali lisičarji) s posebnimi sprejemniki z usmerjeno anteno na omejenem naravnem razgibanem območju v čim krajšem času odkriti skrite oddajnike (lisice).

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Uživajte v izkušnji, vendar ne pozabite na svoje hobije in stvari, ki vas osrečujejo poleg raziskovanja in službe.

Sekundarne strukture z gvanini bogatih zaporedij iz genomov človeških papilomavirusov

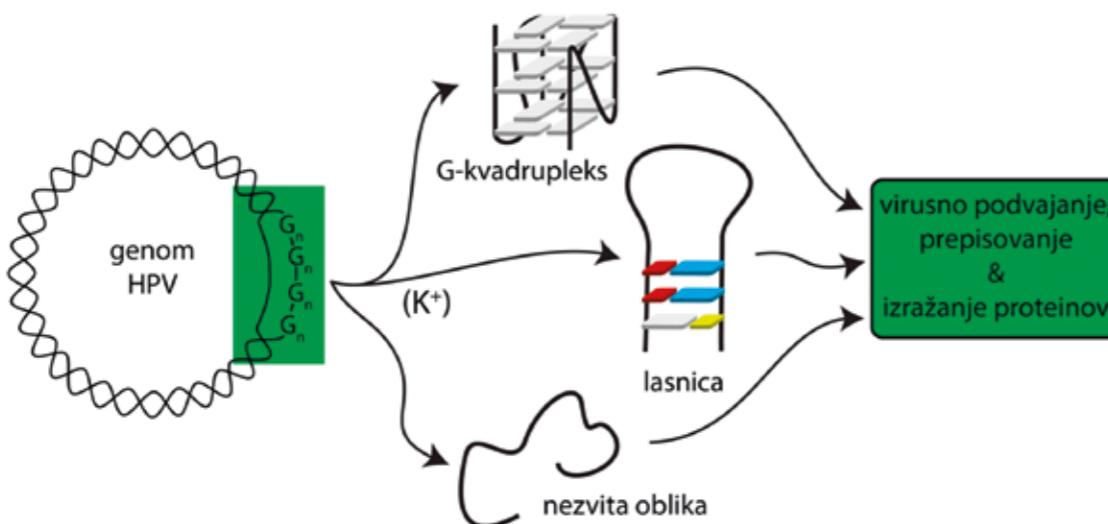
MAJA MARUŠIČ, Kemijski inštitut Ljubljana
Mentor: Janez Plavec, Kemijski inštitut Ljubljana

Človeški papilomavirusi (angl. human papillomaviruses, HPV) so povzročitelji raka glave in vratu, kože ter anogenitalnih predelov. Skupaj so odgovorni za 5 % rakovih obolenj na svetu, s preprečitvijo ali zdravljenjem okužbe pa bi lahko na primer število primerov raka materničnega vratu zmanjšali za 99 %. V genomih nekaterih genotipov HPV najdemo z gvanini bogata zaporedja, ki se lahko zvijejo v alternativne štirivijačne strukture DNA, imenovane G-kvadrupleksi. Značilno z gvanini bogato zaporedje je

$$G_n N_x G_n N_y G_n N_z G_n$$

kjer so G_n t. i. gvaninski trakti z dolžino vsaj dveh nukleotidov, ki bodo tvorili jedro G-kvadrupleksa, ter $N_{x/y/z}$ vmesna zaporedja iz poljubnih nukleotidov, ki bodo tvorila zanke. Štirivijačna struktura ali G-kvadruples nastane pri povezavi štirih gvaninov v planarni kvartet in z nalaganjem kvartetov enega na drugega prek π - π interakcij. Zvijanje z gvanini bogatega zaporedja sprožijo monovalentni kationi, ki zmanjšajo odboj med karbonilnimi kisikovimi atomi v središču G-kvarteta.

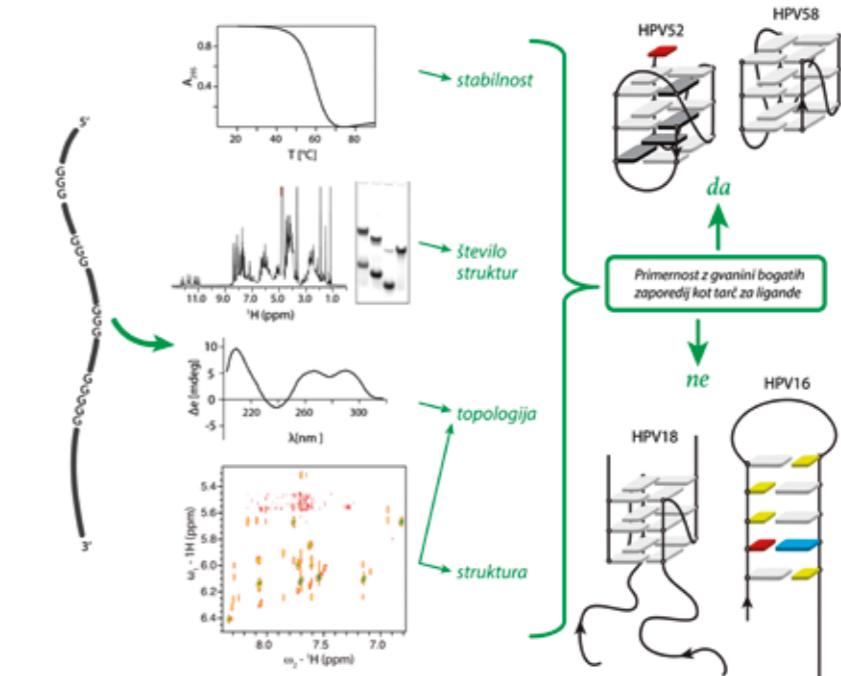
Številni raziskovalci so pokazali, da lahko nastanek stabilnih DNA G-kvadrupleksov v celici vpliva na podvajanje, prepisovanje in rekombinacijo DNA. Z vezavo ligandov bi lahko dosegli stabilizacijo G-kvadrupleksov in s tem vplivali na podvajanje genoma HPV ali izražanje virusnih proteinov, kar bi onemogočilo virusno razmnoževanje ter posledično razvoj raka.



Slika 1. Z gvanini bogata zaporedja iz genomov HPV se lahko zvijejo v različne sekundarne strukture, ki vplivajo na razmnoževanje virusov.

Namen naše raziskave je bil strukturalni opis z gvanini bogatih zaporedij iz genomov HPV v prisotnosti biološko pomembnih kalijevih ionov ter določitev termične stabilnosti struktur *in vitro*. To bi nam omogočilo oceniti primernost z gvanini bogatih zaporedij kot tarč za ligande. Zaradi velikega števila in raznolikosti proučevanih z gvanini bogatih zaporedij iz genomov HPV smo poleg tega že zeleli lastnosti zaporedja povezati z opaženimi topološkimi značilnostmi sekundarnih struktur. To je še posebej pomembno na hitro razvijajočem se področju G-kvadrupleksov, kjer je razumevanje zvijanja odvisnosti od zaporedja trenutno zelo omejeno.

S spektroskopskimi (CD-, UV- in NMR-spektroskopija) in elektroforeznimi (PAGE) metodami smo proučevali zvijanje z gvanini bogatih zaporedij iz genomov trinajstih različnih genotipov HPV (3, 9, 16, 18, 25, 32, 42, 52, 57, 58, 67, 81 in 82) v prisotnosti kalijevih ionov. Da bi vključili vsa z gvanini bogata zaporedja, za katera so trenutno na voljo podatki, smo v zbirkri GenBank poiskali tudi z gvanini bogata zaporedja s polimorfizmi. Skupaj smo analizirali 54 z gvanini bogatih oligonukleotidov in opazili zelo različno obnašanje, ki je bilo odvisno od koncentracije oligonukleotida in kalijevih ionov, temperature, časa in načina priprave vzorca. Večina oligonukleotidov tvori G-kvadruples, razen zaporedij z velikim deležem citozinskih ostankov (HPV16 in HPV25). Enostavno zvijanje in robustno obnašanje, neodvisno od termične zgodovine, smo opazili pri HPV3, HPV52 in HPV82. V določenih primerih je bilo prileganje pri višji temperaturi ključno za uspešno zvijanje oligonukleotida v G-kvadruples (HPV9₍₂₋₅₎, HPV18, HPV57 in HPV81_a), medtem ko so oligonukleotidi z večjim številom zaporednih gvaninov tvorili agregate po daljšem časovnem obdobju ali po prileganju pri višji temperaturi (HPV32, HPV42, HPV81_a in HPV81_b). Določili smo topologije devetih z gvanini bogatih oligonukleotidov, ki se zvijejo v paralelni (HPV18, HPV58 10A>G, HPV81_a in HPV82), antiparalelni (HPV3 in HPV52₍₂₋₅₎ 3G>A) in (3+1) G-kvadruples (HPV9₍₂₋₅₎ in HPV52₍₁₋₄₎) ter lasnično strukturo (HPV16 7G>C). Določili smo 3D-strukturo HPV52₍₁₋₄₎ pri 25 °C ter pokazali, da je del molekule vključen v počasnejši dinamični režim kot preostanek molekule.



Slika 2. Določanje topologije z gvanini bogatih zaporedij in ocenjevanje njihove primernosti kot tarč za ligande.

Rezultati raziskave omogočajo oceniti primernost z gvanini bogatih regij kot tarč za nadzor prepisovanja in podvajanja genoma HPV. Najbolj zanimivi za takšno oceno so najpogosteši povzročitelji raka, kamor spadajo genotipi HPV16, HPV18, HPV52 in HPV58. Medtem ko HPV16 in 18 kot tarči zaradi tvorbe različnih struktur in majhne stabilnosti nista primerni, sta HPV52 in HPV58 s strukturnega stališča primerni. Poleg tega nam je veliko število določenih topologij omogočilo proučevanje odvisnosti med zaporedjem in topologijo. Ugotovili smo, da prekinitev G-trakta z vrinjenim nukleotidnim ostankom vodi v nastanek izbokline, ki ne predstavlja ovire za zvijanje. Prav tako zelo dolge zanke niso problematične za nastanek G-kvadruplesa, kadar preostanek molekule omogoča tvorbo stabilne strukture. Pokazali smo tudi, da je pri napovedovanju topologije pomembna prepoznavana potencialnih (de)stabilizacijskih strukturnih elementov, kot so adeninski ostanek na prvem mestu v zanki, GC-bazni pari, robne GNA-zanke ter nalaganje baz na zunanje kvartete.

Guanine Rich Sequences of Human Papillomaviruses Genomes and Their Secondary Structures

MAJA MARUŠIČ, National Institute of Chemistry Ljubljana
Mentor: Janez Plavec, National Institute of Chemistry Ljubljana

Human papillomaviruses (HPV) can cause cancer of head and neck, skin and anogenital regions, accounting for 5 % of all cancer cases. Prevention or treatment of HPV infection could, for example, reduce burden of cervical cancer by 99 %. Genomes of certain HPVs contain guanine-rich sequences that have the capability of forming alternative four-stranded DNA structures or G-quadruplexes. Typical guanine-rich sequence is:

$$G_n N_x G_n N_y G_n N_z G_n$$

where G_n represents guanine tracts with length of at least two nucleotides that will form G-quadruplex core and $N_{x/y/z}$ represent the sequences of arbitrary nucleotides that typically form loops. G-quadruplex is formed by $\pi-\pi$ stabilized stacks of guanine quartets and is stabilized by monovalent cations that reduce repulsions of carbonyl oxygen atoms in the center of G-quartets.

Researchers have shown that formation of stable DNA G-quadruplexes in the cells affects replication, transcription and recombination. Binding of ligands that stabilize G-quadruplex structures could therefore affect HPV genome replication or protein expression, which would impair viral replication and prevent cancer development.

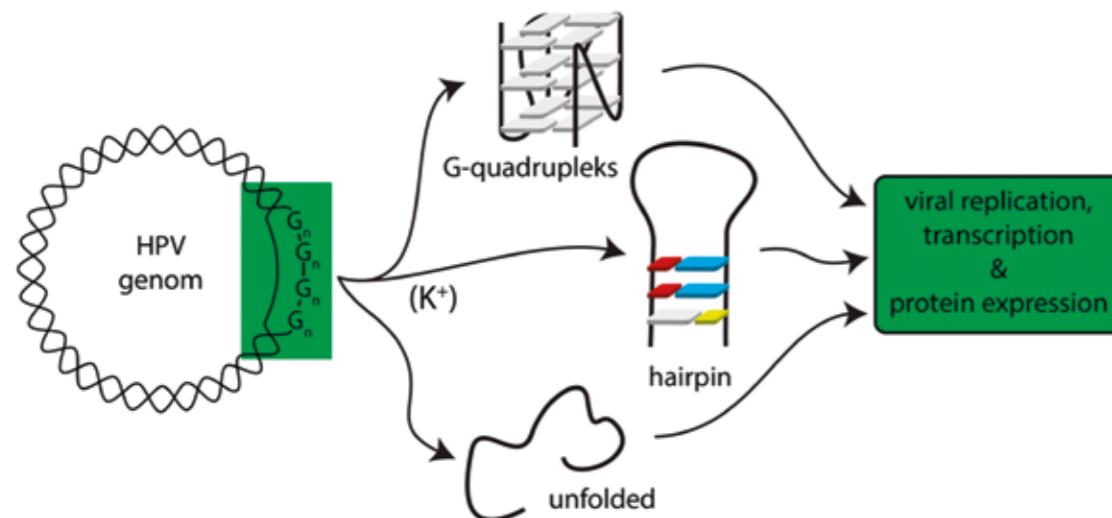


Figure 1. Guanine rich sequences found in genomes of HPV can fold into different secondary structures that affect viral replication.

The aim of our study was structural characterisation of guanine-rich sequences found in genomes of HPV in the presence of biologically relevant potassium cations *in vitro*. The results of the study should enable us to assess potential of G-rich sequences to be targeted with stabilizing ligands. A large number and diversity of investigated G-rich sequences should also allow us to correlate sequence and topology of structures, which is a particularly relevant topic in the fast developing field of G-quadruplexes.

We have characterized the formation of G-quadruplex structures of G-rich oligonucleotides found in genomes of thirteen different HPV types (HPV 3, 9, 16, 18, 25, 32, 42, 52, 57, 58, 67, 81 and 82) with spectroscopic (CD, UV and NMR spectroscopy) and electrophoretic (PAGE) methods. Moreover, G-rich sequences with polymorphisms that were found in GenBank database were also included. Altogether 54 different G-rich oligonucleotides have been analyzed. They display very different behaviour dependent on oligonucleotide and potassium cation concentration, temperature, time and sample preparation. Most of G-rich oligonucleotides folded into G-quadruplexes, the exception being oligonucleotides with high amount of cytosine residues (HPV16 and HPV25). Quick folding and annealing-independent behaviour was observed for HPV3, HPV52 and HPV82. Annealing at high temperature was crucial for the folding of some oligonucleotides (HPV9₍₂₋₅₎, HPV18, HPV57 in HPV81_a), while it lead to the formation of aggregates for those with long G-tracts (HPV32, HPV42, HPV81_a in HPV81_b). Topologies of nine oligonucleotides have been determined: HPV18, HPV58 A10>G, HPV81_a and HPV82 form parallel, HPV3 and HPV52₍₂₋₅₎ 3G>A antiparallel, and HPV9₍₂₋₅₎ and HPV52₍₁₋₄₎ (3+1) G-quadruplex, while HPV16 7G>C forms hairpin structure. We have determined a 3D structure of HPV52₍₁₋₄₎ at 25 °C and shown that part of the molecule exhibits slower dynamics than the rest of the molecule.

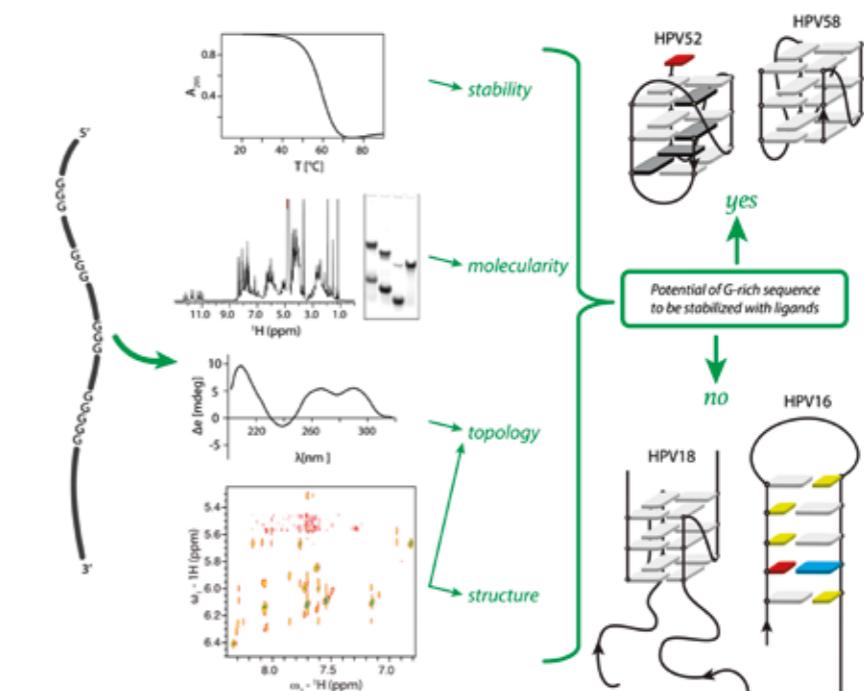


Figure 2. Schematic representation of workflow to determine G-rich sequence topology and assess ligand targeting potential.

Based on our results potential of G-rich sequences of HPVs as drug targets that could affect transcription and replication of HPVs can be evaluated. Most interesting for such assessment are the most carcinogenic types HPV16, HPV18, HPV52 and HPV58. HPV16 and HPV18 are considered poor targets due to high polymorphism (HPV16) and low stability and dimeric form (HPV18). HPV52 and HPV58, on the other hand, are considered appropriate targets from a structural point of view due to their low number of polymorphisms and high thermal stability. Additionally, a high number of determined topologies allows us to expand our understanding of G-quadruplex folding. We have noticed that the interruption of G-tract with non-guanosine residue or presence of a very long loop does not have a detrimental effect on G-quadruplex formation if the rest of the molecule forms a stable G-quadruplex structure. For topology prediction on the basis of the sequence alone, it is important to recognize potential (de)stabilizing structural elements, such as the position of adenine residue in the loop, GC base pairs, GNA edgewise loops and stacking of the loop residues.



Dr. JERNEJ LUZAR

*Pričakuj
nepričakovano*

Jernej Luzar prihaja iz Novega mesta, kjer je obiskoval osnovo šolo in gimnazijo. Svojo izobraževalno pot je nadaljeval na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Takoj po uspešno končanem dodiplomskem študiju farmacije leta 2012 se je kot mladi raziskovalec zaposlil na Katedri za farmacevtsko biologijo, in sicer v skupini za farmacevtsko biotehnologijo, ter nadaljeval z doktorskim študijem biomedicine. Konec leta 2016 je z zagovorom doktorske naloge, v kateri je postavil temelje za razvoj učinkovitih in varnih bioloških zdravil za zdravljenje alergij, pridobil naziv doktorja znanosti in se v začetku leta 2017 zaposlil v Krki, d. d., Novo mesto kot samostojni raziskovalec v organizacijski enoti Farmacevtska tehnologija.

»Biotehnologija je hitro rastoča znanost, ki ima ogromen potencial za razvoj novih bioloških zdravil za zdravljenje bolezni, pri katerih se z običajnimi zdravili dosegajo slabši rezultati,« kot ključni dejavnik za proučevanje področja biotehnologije navaja mladi raziskovalec. »Pri raziskovanju sem stremel k pripravi potencialnih terapevtskih produktov, iz katerih bo možno pripraviti biološka zdravila za vsakdanjo uporabo – torej zdravila za ozdravitev ljudi z alergijskimi boleznimi in ne le za lajšanje znakov in simptomov bolezni.«

»Pravi čar raziskovanja je ravno v tem, da lahko vedno pričakuješ nekaj nepričakovanega,« pravi doktor znanosti, ki navdih za raziskovanje vidi v inovativnem in kreativnem delu. A ko izziv postane nerešljiva uganka, si je treba vzeti čas za razmislek. Poudari, da je treba proučiti vse, kar je že narejeno, razmisliti o novih pristopih in se sistematično lotiti nadaljnjega dela. »Včasih je treba misli usmeriti na povsem drugo področje ter svojim možganom dopustiti, da poiščejo novo rešitev. Pogosto se najboljše ideje porodijo kar same od sebe.«

Pri usmerjanju raziskovalca ima po besedah dr. Luzarja ključno vlogo nedvomno mentor. »Njegova vloga je, da te obdrži na pravi poti do cilja. Obenem je zelo pomembno, da raziskovalcu dopusti tudi svobodo odločanja in uveljavljanje zamisli. To je vseskozi udejanjala tudi moja mentorica, izr. prof. dr. Mojca Lunder,« pravi raziskovalec, ki bo svoj znanstveni potencial v prihodnje usmeril v zamisli in rešitve, pomembne za rast in razvoj tovarne zdravil Krka, katere ključni člen želi postati.

Tudi k prijavi za Krkino nagrado, ki jo vidi kot prepotreben most med akademskim svetom in gospodarstvom, ga je spodbudila misel, da svoja raziskovalna odkritja deli z ljudmi, ki delujejo v farmacevtski industriji. »Dodano vrednost Krkine nagrade vidim v tem, da je moje raziskovalno delo prepoznano kot zanimivo, inovativno in potencialno za nadaljnje proučevanje. Verjamem,

da bo v prihodnosti predstavljalo pomemben delček v mozaiku znanja, ki bo prispevalo k lepšemu in boljšemu življenju številnih ljudi.«

PROFESSIONALNO IN ZASEBNO

Ker se v službenem času v celoti prepustim raziskovalnemu delu, mi je zelo pomembno, da si po koncu delovnika vzamem čas zase, za svoje najbližje in prijatelje. Pomemben mi je tudi čas, ki ga namenim rekreaciji in hobijem. Takrat umirim svoje misli, obenem pa se mi porodi tudi kakšna nova zanimiva zamisel ali rešitev.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Sem zanesljiva in prilagodljiva oseba. Trudim se za dobro razumevanje in spoštljiv odnos do sodelavcev ter za sproščeno delovno okolje. Pri delu sem učinkovit in vedno stremim k doseganju ciljev. Rad imam delo, ki je polno različnih dogodkov in nepredvidljivih situacij. Ker nisem ljubitelj rutine, včasih izbiram različne pristope do istega cilja.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Sledite svoji radovednosti in domišljiji ter raziskujte, saj raziskovanje pelje k novim odkritjem in razvoju človeštva. Treba pa se je zavedati, da je raziskovalna pot tudi polna neuspelih poskusov, a prav ti nas usmerjajo k cilju, ki predstavlja novo odkritje. To pa raziskovalcu daje zadovoljstvo in potrditev, da prispeva nekaj novega, kar lahko izboljša naš svet.

Identifikacija in ovrednotenje mimotopov izbranih alergenov Fel d 1 in Ara h 2

JERNEJ LUZAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Mojca Lunder, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Peter Korošec, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Alergija je bolezensko stanje, ki se pojavi kot posledica neustreznega uravnavanega imunskega odziva. Povezana je z motnjami imunske tolerance, kjer neškodljivi antigeni postanejo alergeni. Alergeni so odgovorni za sprožitev T-celičnega imunskega odziva tipa 2. Alergijski imunski odziv je škodljiv za naš organizem in lahko sproži živiljenje ogrožajoče sistemske reakcije. Specifična imunoterapija je edini pristop k zdravljenju vzroka alergijske bolezni in ne le njenih simptomov. Z uporabo naravnih ali rekombinantnih alergenov v specifični imunoterapiji induciramo imunsko toleranco za alergene. Toda uporaba celotnih alergenov lahko pomeni nevarnost za sprožitev anafilaktičnega šoka. Zaradi tega so raziskave v zadnjih desetletjih usmerjene v iskanje molekul z zmanjšano ali popolnoma odstranjeno alergogenostjo in potekajo na spremenjenih alergenih, delih alergenov, peptidnih fragmentih alergenov in mimotopih alergenov.

Prvi del doktorske disertacije obsega pregled alergenskih mimotopov, ki so bili odkriti z uporabo tehnologije bakteriofagnega prikaza. Pregled se nanaša predvsem na uporabnost bakteriofagnih peptidnih knjižnic. S pomočjo teh knjižnic lahko odkrijemo mimotope s potencialom za razvoj imunoterapije. Knjižnice nam pomagajo pri identifikaciji prevladujočih B-celičnih epitopov in določanju IgE-profilov posameznih bolnikov. Odkritje epitopov in individualnih IgE-profilov nam je v pomoč pri razvoju diagnostike in imunoterapije tako za splošno uporabo kot za individualizirano zdravljenje. Z bakteriofagnimi peptidnimi knjižnicami si pomagamo tudi pri proučevanju navzkrižne reaktivnosti med alergeni. Vsi omenjeni prispevki bakteriofagnih peptidnih knjižnic so nepogrešljivi sestavnici deli za razumevanje alergijske patogeneze in za razvoj novih imunoterapij. Poleg uporabe v bakteriofagnih peptidnih knjižnicah se bakteriofagi vedno bolj uporabljajo in testirajo kot imunogeni nosilci različnih peptidov in tako združujejo odkrivanje mimotopov in imunizacijo v eno skupno platformo.

V drugem delu doktorske disertacije sem se osredotočil na alergijo na mačke, ki pri alergičnem posamezniku pogosto vodi v razvoj astme. Za zdravljenje alergije na mačke se trenutno uporabljajo le pripravki s celotnimi alergeni, kar lahko pri prevelikem odmerku vodi do sprožitve anafilaksije. Zaradi tega predstavlja identifikacija epitopov in mimotopov mačjih alergenov pomembno odkritje za razvoj učinkovite in varne specifične imunoterapije. Z uporabo tehnologije bakteriofagnega prikaza smo identificirali pet strukturnih mimotopov glavnega mačjega alergena Fel d 1. Računalniško smo jih prilegali na površino alergena in definirali možno epitopno mesto na alergenu. Z vezavo specifičnih protiteles razreda IgE iz serumov bolnikov, alergičnih na mačke, smo potrdili IgE-reaktivnost mimotopov. Mimotope smo v večjem številu izrazili na površini nitastih bakteriofagov. Bakteriofage smo izbrali kot imunogeni nosilec, ki je zmožen spodbuditi ustrezni imunski odziv. Dokazali smo, da mimotopi niso alergogeni, saj niso aktivirali bazofilcev, kar kaže na njihov potencial za razvoj hipoalergenih terapevtskih produktov. Bakteriofagi z izraženimi mimotopimi so spodbudili močan T-celični imunski odziv, usmerjen v tip 1. So pa mimotopi prispevali k T-celičnemu odzivu tipa 1, saj so povečali produkcijo interleukinka 2. Identificirani mimotopi in izbrani nosilec lahko pripomorejo k razumevanju in načrtovanju razvoja hipoalergenih pripravkov za zdravljenje alergije na mačke.

Tema tretjega dela doktorske disertacije je bila alergija na arašide, ki predstavlja veliko nevarnost za sprožitev anafilaksije. Anafilaksija je pri alergijski reakciji posledica sistemskih odzivov in je eden od glavnih razlogov, da so raziskave usmerjene v iskanje varnih in učinkovitih produktov za peroralno imunoterapijo. To je bil razlog, da smo se odločili identificirati mimotope z zmanjšano alergogenostjo v primerjavi s celotnimi alergeni. Z uporabo tehnologije bakteriofagnega prikaza smo uspešno

identificirali mimotop Ara h 2, ki je glavni alergen v arašidih. Odkriti mimotopi so se prilegali na površino strukture Ara h 2, kjer se nahaja tudi dominantni epitop. Združene s sidrno domeno smo mimotope izrazili na površini *Lactococcus lactis*, katere smo uporabili kot imunogene nosilce. Tako pripravljeni konstrukti so vezali protitelesa razreda IgE iz serumov bolnikov, alergičnih na arašide. Pri identificiranih mimotopih je bila alergogenost zmanjšana, razen pri mimotopu L7-N40, ki je ohranil delno alergogenost. Omenjeni mimotop je bil najbolj podoben dominantnemu epitopu. Naši konstrukti, še posebej konstrukt z mimotopom L7-N40, so bili zmožni sprožiti T-celični imunski odziv. V primerjavi s celotnim alergenom so signifikantno povečali produkcijo IFN-γ, kar kaže na usmeritev imunskega odziva v T-celični odziv tipa 1. Naši konstrukti z mimotopi predstavljajo zanimiv dostavni sistem z imunomodulatornimi lastnostmi za ciljanje mukoznih površin v gastrointestinalnem traktu.

Doktorska disertacija je pomoč k razumevanju in razvoju varne in učinkovite specifične imunoterapije, ki bo pripomogla k zdravljenju alergije na mačke in arašide z uporabo hipoalergenih terapevtskih pripravkov.

Identification and Characterization of Allergens Fel d 1 and Ara h 2 Mimotopes

JERNEJ LUZAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Mojca Lunder, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Peter Korošec, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik

Allergy is a disease state which is the result of an unsuitably regulated immune response. It is connected with dysfunction of immune tolerance where harmless antigens become allergens. Allergens are responsible for eliciting type 2 T cell immune response. Allergic immune response is harmful to our organism and can trigger life-threatening systemic reactions. Specific immunotherapy is the only way to cure an allergic disease. The use of natural and recombinant allergens in specific immunotherapy induces immune tolerance to allergens but represents a danger for triggering anaphylactic shock. Hence, investigations in recent decades have been aimed at finding substances with lower or completely removed allergenic activity. Research on altered allergens, parts of allergens, peptides derived from allergens, and mimotopes of allergens is underway.

The first part of the doctoral thesis contains a review of allergen mimotopes discovered by phage display technology. The review mostly refers to usefulness of phage display peptide libraries. With the help of these libraries we can discover mimotopes with the potential to develop immunotherapy. The libraries help us to identify dominant B-cell epitopes and determine IgE profiles of individual patients. Epitope discovery and individual IgE profiles serve as help to develop diagnostics and immunotherapy for common use as for individual treatment. Phage display peptide libraries also help us with studying cross-reactivity among allergens. All these different contributions of phage display peptide libraries are indispensable components for understanding allergic pathogenesis, and for the development of new immunotherapies. In addition to the function of bacteriophages in peptide libraries, they are increasingly used and tested as immunogenic carriers of different peptides. Bacteriophages combine mimotope discovery and immunization into one complete platform.

The second part of the doctoral thesis focuses on cat allergy which often leads to the development of asthma in an allergic individual. Presently the preparations for the treatment of cat allergy contain whole allergens which can lead to triggering anaphylaxis as an effect of an overdose. Epitope and mimotope identification of cat allergens represents an important discovery for the development of effective and safe specific immunotherapy. We identified five conformational mimotopes of the major cat allergen Fel d 1 by using phage display technology. Identified mimotopes were mapped to the surface of the allergen and a potential epitope spot was defined. The binding of specific IgE from sera of cat-allergic patients confirmed IgE reactivity of mimotopes. Mimotopes were displayed in multiple copies on the surface of filamentous bacteriophages which were chosen as immunogenic carriers able to elicit a suitable immune response. We demonstrated that mimotopes alone are not allergenic because they did not activate basophils. This shows their potential for the development of hypoallergenic therapeutic products. The prepared construct elicited a strong type 1 directed T cell immune response. Mimotopes alone contributed to type 1 T cell response by increasing the production of interleukin 2. Identified mimotopes and selected carriers can contribute to progress in the development of hypoallergenic preparations for the treatment of cat allergy.

The third part of the doctoral thesis was peanut allergy, which represents a high risk of triggering anaphylaxis in allergic individuals. Anaphylaxis, a systemic response in allergic reaction, is a reason research works generally aim at discovering safe and effective products for oral immunotherapy. This was the reason we decided to investigate mimotopes which have lower allergenic activity in comparison with whole allergens. We successfully identified mimotopes of Ara h 2, the major peanut allergen, by using phage display technology. Discovered mimotopes were mapped to the dominant surface epitope

of Ara h 2. Fused with anchoring domain we displayed mimotopes on the surface of *Lactococcus lactis* used as immunogenic carriers. The prepared constructs bound IgE antibodies from the sera of peanut-allergic patients. Mimotopes had lower allergenic activity except for mimotope L7-N40, which partially preserved the allergenic activity. The mentioned mimotope showed the highest similarity with the dominant epitope. Our constructs, especially the construct with mimotope L7-N40, were able to elicit T cell immune response. In comparison with the allergen they had significantly higher production of IFN- γ demonstrating type 1 directed T cell response. Our constructs with mimotopes present an interesting delivery system with immunomodulatory characteristics to target mucosal surfaces in the gastrointestinal tract.

The doctoral thesis contributes to understanding and developing a safe and effective specific immunotherapy, which will contribute to the treatment of cat and peanut allergies by using hypoallergenic therapeutic preparations.



Dr. MIODRAG JANIĆ

Verjamem v moč tima

Miodrag Janić je raziskovalec s srbskimi koreninami. Rodil se je v Kraljevu, kjer je preživel del otroštva, njegova celotna izobraževalna pot, obogatena z nagradami, pa je povezana s Slovenijo. V Ljubljani je obiskoval osnovno šolo in Gimnazijo Bežigrad, ki jo je končal kot zlati maturant. Med študijem na Medicinski fakulteti je za raziskovalno naloge prejel univerzitetno Prešernovo nagrado, diplomiral pa je cum laude (z odliko). Po opravljenem strokovnem izpitu se je kot specializant interne medicine zaposlil v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Decembra 2016 je svojo znanstvenoraziskovalno pot nadgradil še z uspešnim zagovorom doktorske naloge, v kateri je skupaj s sodelavci želel potrditi učinkovitost novega pristopa proti staranju arterij.

Osnovno področje njegovega raziskovanja je ateroskleroza, njene predklinične oblike in spremembe v arterijski steni, do katerih pride s staranjem. Zanimajo ga tudi pridružene bolezni, kot sta sladkorna bolezen in hiperholesterolemija. »V okviru doktorata sem s sodelavci želel potrditi učinkovitost novega pristopa proti staranju arterij. Kot je znano, staranje povzroča spremembe v vseh organskih sistemih. V primeru arterij to pomeni, da postajajo bolj toge in slabše odzivne, kar dolgoročno pripelje do zvišanja krvnega tlaka, nastanka aterosklerotičnih sprememb in njenih posledic (miokardni infarkt, možganska kap, periferna arterijska bolezen) ter popuščanja srca. Da bi te spremembe preprečili ali vsaj ublažili, smo proučili pristop z uveljavljenimi zdravili, kot so sartani in statini. Ugotovili smo, da ta zdravila v bistveno nižjem odmerku, kot se jih običajno predpisuje, omenjene procese že po mesecu dni zdravljenja upočasnijo, pri čemer ni neželenih učinkov,« razloži doktor znanosti in še pojasni, da bo implementacija v klinično prakso odvisna od nadaljnjih raziskav na večjem številu preiskovancev in dolgoročnih izidov srčno-žilne umrljivosti.

»Pri raziskovalnem delu me najbolj navdihuje dejstvo, da o medicini, kljub njenemu napredku, v resnici še vedno zelo malo vemo,« priznava doktor medicine, a kot poudari, lahko z znanjem, ki ga imamo, ogromno prispevamo in bolnikom omogočimo bolj kakovostno življenje. »Najboljše ideje se mi običajno porodijo v pogovorih z mentorjem in sodelavci, ko razpravljamo o različnih pogledih in nadaljnjih usmeritvah. Nerešljiva znanost pa je lahko le dodaten iziv, da še bolj napnemo moči in naredimo vsaj majhen korak k novi rešitvi.«

Mentorstvo prof. dr. Miša Šaboviča, dr. med., je bilo na njegovi strokovni in raziskovalni poti izredno pomembno, saj je, kot pravi, večkrat odigral ključno vlogo. »Prvič pri študentski raziskovalni nalogi, drugič pri kliničnem delu in tretjič pri usmerjanju do zagovora doktorata. V vsem tem času je dajal

najrazličnejše ideje, nasvete in pobude, ki so na koncu prispevale k nečemu velikemu,« poudari dr. Janić, ki verjame, da lahko v prihodnje uspešno združuje delo kliničnega zdravnika in raziskovalca. »Zelo me veseli tudi delo s študenti, zato si želim, da bi lahko kariero nadaljeval tudi na pedagoškem področju.«

Krkine nagrade so zanj dokaz, da industrija spoštuje raziskovalno delo akademskega sveta. »Na razpis sem se prijavil zato, ker sem verjel, da je moja naloga kakovostna in za Krko potencialno zanimiva. Dodano vrednost Krkine nagrade vidim v njeni odmevnosti v širšem slovenskem prostoru, vidno mesto v skupini Krkinih nagrajencev pa je zame posebna čast.«

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Tudi v klinični medicini je pomembna predanost znanstvenoraziskovalnemu delu, ki se mu lahko posvetim v prostem času, kar je največkrat pozno ponoči. Moj delovnik v UKC Ljubljana je zelo natrpan, a če mi čas le dopušča, ga posvetim priateljem, kulturnim prireditvam, branju in pisanku strokovnih člankov, knjigam ...

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Verjamem v moč tima, da s skupinskim pristopom k reševanju težav in s kompromisi lahko dosežemo veliko več. V mislih imam delo na kliniki in v raziskovanju. Individualizem po mojem mnenju ni ključ do zmage.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Bodite radovedni in ne obupajte ob prvi oviri, naj vam te raje dajejo zagon za naprej. Tudi dobri mentorji, ki navdušujejo in širijo znanje, so ključni za svetlo prihodnost vsakega raziskovalca.

Pleiotropni učinki nizkih odmerkov zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov na arterijsko steno

MIODRAG JANIĆ, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Mentor: **Mišo Šabovič**, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Somentor: **Gorazd Drevenšek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

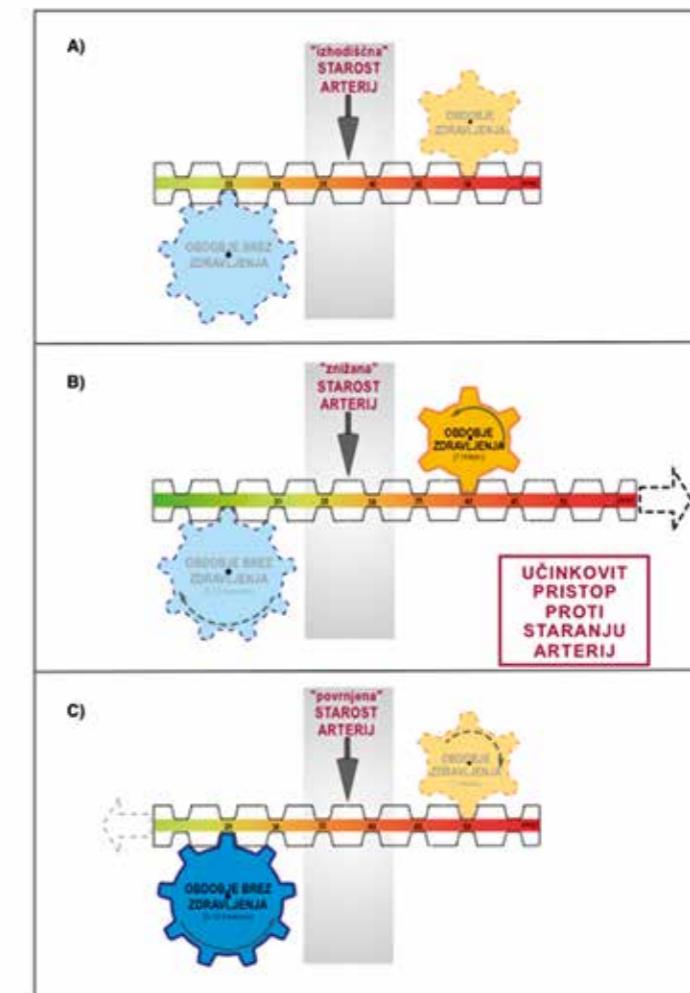
Uveljavljeni načini zdravljenja z aterosklerozo pogojenih srčno-žilnih bolezni so usmerjeni v vplivanje na dejavnike tveganja (kajenje, hiperholisterolemija, arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen) in tarčno zdravljenje njenih manifestnih oblik (miokardni infarkt, možganska kap in gangrena uda). Manj uveljavljen dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze je staranje, saj neodvisno od naštetih vodi v okvaro arterijske stene. Ta se kaže z okvarjenimi funkcionalnimi (okrnjeno delovanje endotelija) in strukturnimi (povečanje togosti arterijske stene) lastnostmi, ki pa so reverzibilne. Obe spremembi sta predstopnji in potekata sočasno z napredovanjem ateroskleroze. Namen raziskave je bil s pomočjo nekliničnih in kliničnih raziskav vsaj delno pojasniti mehanizem delovanja nizkih odmerkov zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov na procese v arterijski steni, ki so pomembni pri staranju arterijskega sistema in posledično tudi pri nastanku in napredovanju ateroskleroze. Spoznavanje teh mehanizmov dodatno pojasnjuje in podpira delovanje dokazano učinkovitega pristopa proti staranju arterijske stene, in sicer da ciklično (enomeščeno) zdravljenje z nižjimi odmerki od terapevtskimi (subterapevtskimi) predvsem pa kombinacije zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov pomembno izboljšajo funkcionalno-struktурne lastnosti arterijske stene; po prenehanju zdravljenja učinek postopoma izginja, vendar se ob ponovni uporabi učinkov ponovi. Pri tem uporabljeni zdravila ne dosegajo svojih osnovnih učinkov, to je znižanja arterijskega tlaka ali holesterola. Redno ponavljajoče se zdravljenje (enkrat do dvakrat na leto) v daljših časovnih obdobjih bi zato lahko vodilo v upočasnitev oz. zakasnitev arterijskega staranja (slika 1).

V dvojno slepe randomizirane klinične raziskave smo vključili navidezno zdrave preiskovance srednjih let, ki so 30 dni jemali nizke odmerke fluvastatina, valsartana ali njune kombinacije oz. placebo. Pri njih smo dokazali, da je kombinacija zmanjšala stopnjo vnetja v arterijski steni. Vplivala je tudi na porast parametrov protioksidativne zaščite. Posamezni zdravili sta bili pri tem manj učinkoviti. Spremembe so bile v korelaciji tako z izboljšanjem funkcionalnih kot strukturnih lastnosti arterijske stene. Ugotovili smo tudi, da so nizki odmerki fluvastatina in valsartana pri zdravih preiskovancih srednjih let povečali izražanje telomeraze, njuna kombinacija pa je bila pri tem najbolj učinkovita. Povečano izražanje telomeraze v skupini, ki je jemala kombinacijo, je pomembno korelirala s parametri delovanja arterij. Neklinične raziskave smo opravili na budrah in podghanah. Na budrah smo pokazali, da aterogena dieta pomembno okvari največjo od endotelija odvisno razširitev prsne aorte glede na živali z normalno dieto. Kombinacija nizkih odmerkov atorvastatina in valsartana je v primerjavi s posameznima zdraviloma popolnoma ohranila od endotelija odvisno razširitveno sposobnost torakalne aorte, ki je ostala na nivoju živali z normalno dieto. Ta pomembni učinek je bil v korelaciji s statistično pomembno ekspresijo genov za endoteljsko sintazo dušikovega oksida (NOS3) in interlevkina 1. Zdravljenje s kombinacijo nizkih odmerkov in s posameznimi zdravili je dodatno preprečilo nastanek aterosklerotičnih plakov. Pri podghanah smo ugotovili, da nizki odmerki atorvastatina, losartana in predvsem njune kombinacije kažejo značilno časovno odvisnost vseh merjenih parametrov (od endotelija odvisna razširitev sposobnost torakalne aorte, parametri izoliranih src, izpostavljenih ishemično-reperfuzijski poškodbi, C-reaktivnega proteina, ekspresije genov NOS3 ter gena za molekulo CD40). Vrh učinkovitosti je bil po 6 tednih zdravljenja; po tem času se je učinkovitost kljub nadaljnemu zdravljenju postopoma zmanjševala.

Zaključili smo, da kombinacija nizkih odmerkov zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov dosledno ugodno vpliva na izboljšanje lastnosti arterijske stene in na patofiziološke procese, ki so v ozadju njene okvare. Učinki so vsaj v določeni meri posredovani prek zmanjšanja vnetja in oksidativnega stresa pri človeku. Vpliv na arterijsko staranje je pri človeku posredovan tudi prek povečanega izražanja telomeraze.

Omenjeni pristop deluje tudi preventivno, saj zavira izražanje aterosklerotičnih sprememb pri budrah. Pokazalo se je tudi, da je strategija kratkotrajnega zdravljenja smiselna, saj se pri podghanah učinki kljub kontinuiranemu zdravljenju po določenem času začnejo zmanjševati.

Omenjeni pristop ne izpodriva do sedaj uveljavljenih ukrepov za preprečevanje ateroskleroze. Dolgoročno je lahko s temi ukrepi komplementaren, menimo pa tudi, da se lahko uveljavlja na stopnji prej, ko so okvare še klinično nezaznavne, a vendar že prisotne in začenjajo začarani krog že s staranjem pogojene okvare arterijske stene. Posledično ima lahko pomemben vpliv v klinični medicini, predvsem v kontekstu zmanjševanja bremena srčno-žilnih bolezni. Opisani pristop je poceni, učinkovit, specifičen – deluje na arterijsko steno in izboljša adherenco, saj ne povzroča neželenih učinkov.



Slika 1. Shematski prikaz novega pristopa proti staranju arterijske stene. (A) Pristop sestavlja dve obdobji, in sicer obdobje »zdravljenja« (z nizkimi subterapevtskimi odmerki kombinacije zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov, ki traja 1 mesec) in obdobje »brez zdravljenja« (ki traja 6 do 12 mesecev). Skupaj predstavlja terapevtski cikel, ki ga je treba ponavljati, lahko nekaj desetletij. (B) V obdobju »zdravljenja« se starost arterij zaradi velike občutljivosti arterijske stene za učinke zdravljenja hitro zmanjša. (C) V obdobju »brez zdravljenja« pa se starost arterij zaradi predhodno akumuliranih učinkov v obdobju »zdravljenja« počasi vrača proti izhodiščni starosti, kar nakazuje podaljšani učinek zdravljenja.

Pleiotropic Effects of Low Dose Renin-Angiotensin System Inhibitors and Statins on the Arterial Wall

MIODRAG JANIĆ, University Medical Centre Ljubljana
Supervisor: Mišo Šabovič, University Medical Centre Ljubljana
Co-supervisor: Gorazd Drevenšek, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Established methods for the treatment of cardiovascular diseases resulting from atherosclerosis, aim at influencing the relevant risk factors (smoking, hypercholesterolemia, arterial hypertension, diabetes mellitus) and to provide targeted treatment of the forms thereof (myocardial infarction, stroke, limb gangrene). Ageing, on the other hand, is a less established risk factor for the development of atherosclerosis. It leads to the impairment of the arterial wall independently of the above risk factors. It manifests itself through impaired functional (endothelial dysfunction) and structural (increased arterial stiffness) characteristics, which are, however, reversible. The purpose of the presented research was to, through nonclinical and clinical studies, at least partially explain the mechanism of action of low-dose renin-angiotensin system inhibitors and statins on processes in the arterial wall, which are relevant in the ageing of the arterial system and, consequently, in the formation and progression of atherosclerosis. Familiarity with the mechanisms involved further explains the functioning of the already proven effective approach to arterial wall ageing, namely that cyclic (one-month) treatment with low (sub-therapeutic) doses of individual and, in particular, a combination of renin-angiotensin system inhibitors and statins, significantly improves the functional and structural characteristics of the arterial wall; after cessation of treatment, the effect gradually subsides, but appears again upon repeated treatment. The medicines used do not achieve their underlying effects, which is reduction in arterial pressure or blood cholesterol levels. Periodically repeated treatment (once or twice a year) over long periods of time (several decades), would probably lead to a slowdown or delay in arterial ageing (Figure 1).

Apparently healthy middle-aged males, who received low doses of fluvastatin, valsartan, or combinations and placebo for 30 days, were included in double blind randomised clinical studies. In this group, we demonstrated that a combination lead to a decrease in inflammation and oxidative stress. Individual drugs were less effective than their combination. Such changes correlated with improvements in both functional and structural arterial wall characteristics. We also established that in healthy middle-aged males, low doses of valsartan and fluvastatin increased the expression of telomerase; a combination of these were the most effective in this respect. Increased telomerase expression in the group that received the combination significantly correlated with the arterial function parameters. On the other hand, nonclinical studies were carried out on guinea pigs and rats. We used guinea pigs to demonstrate that an atherogenic diet significantly impairs the thoracic aorta maximum endothelium-dependent relaxation compared to animals that received a normal diet. The combination of low-dose atorvastatin and valsartan compared to either drug alone, fully preserved the thoracic aorta endothelium-dependent relaxation, which remained at the level of the animals that received a normal diet. This significant effect was correlated with the statistically significant expression of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene and interleukin 1 gene. Further treatment with a combination of low doses and with individual drugs prevented the formation of atherosclerotic plaques. Finally, in rats, we found that low-dose atorvastatin, losartan and especially their combination, showed a significant time dependence of all measured parameters (thoracic aorta endothelium-dependent relaxation, parameters of isolated hearts exposed to ischaemia-reperfusion injury, C-reactive protein, NOS3 gene and CD40 gene expression). Peak effectiveness was seen after 6 weeks of treatment; after this time, the effectiveness gradually declined despite continued treatment.

We concluded that low-dose combinations of renin-angiotensin system inhibitors and statins have consistently shown a positive impact on improving the characteristics of the arterial wall and pathophysiological processes that lie behind its impairment. The effects are, at least to some extent, transmitted via the decrease of inflammation and oxidative stress in humans. Additionally, effects on

arterial ageing in humans are transmitted through the telomerase expression increase. This approach also works preventively as it inhibits the expression of atherosclerotic changes in guinea pigs. It was also shown that a short-term treatment strategy is feasible, since in rats, the effects begin to decline after a certain time, if rats were treated long-term.

The described approach does not in any way displace current established atherosclerosis associated preventive strategies. In the long term, it works complementary to them. We believe that it could be established even as before in atherosclerosis prevention, when arterial wall injury is present, but clinically silent and it nevertheless leads to arterial ageing-associated vicious cycle of arterial wall damage. Consequently, it could have an important influence in clinical medicine, particularly in the context of diminishing the cardiovascular disease burden. This particular approach is cost-effective, has been proven effective, specific – as it targets the arterial wall per se, and is side effect free, therefore not causing any side effects.

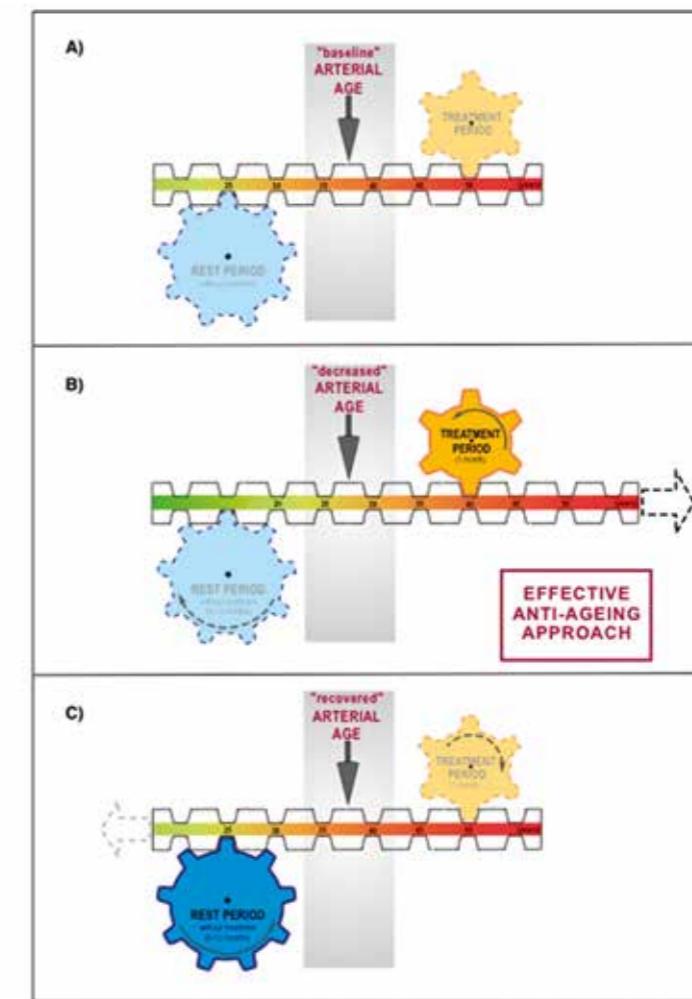
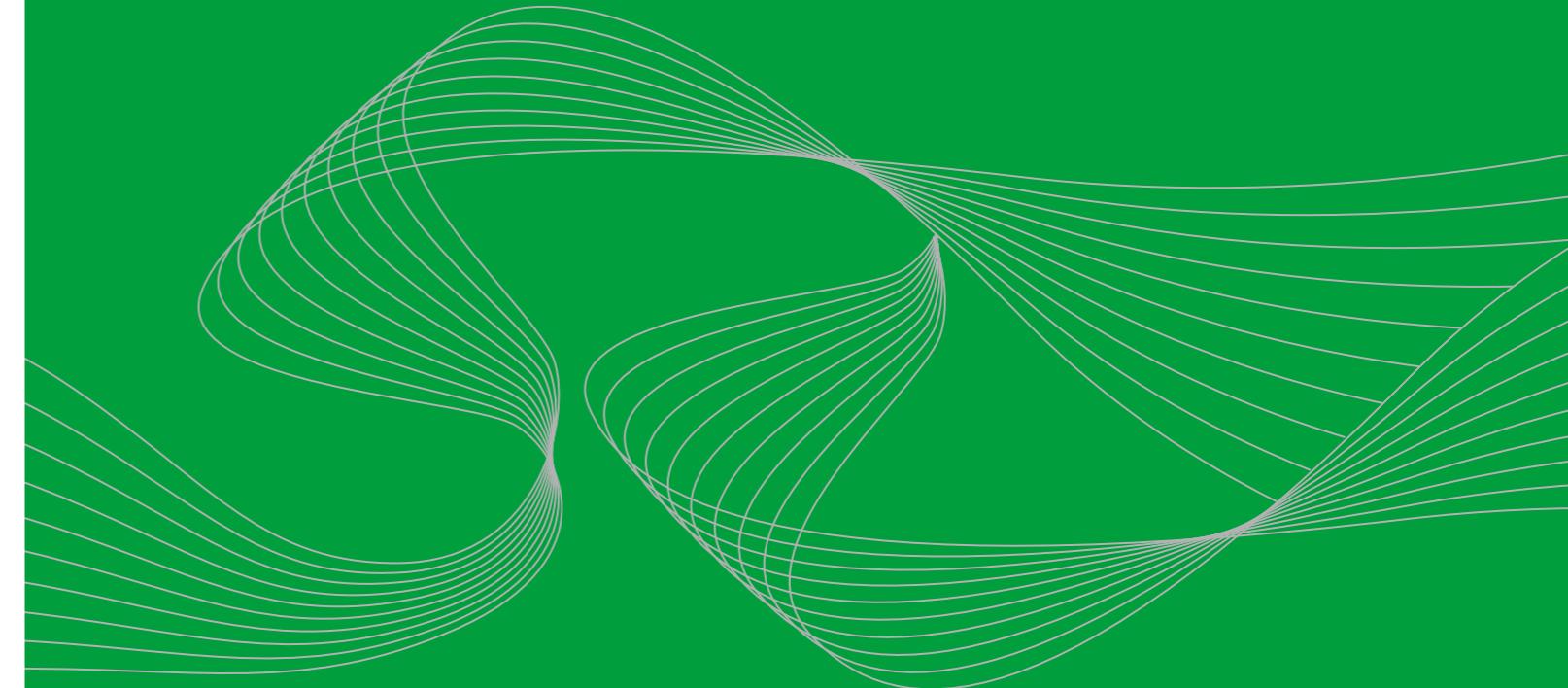


Figure 1. Schematic representation of the new arterial wall anti-ageing approach. (A) It consists of two periods: a "treatment" period (treatment with a sub-therapeutic low-dose renin-angiotensin system inhibitor and statin combination, lasting one month), followed by a "rest" period (no treatment, lasting 6–12 months). Treatment and rest period together represent one "therapeutic cycle", that should be repeated over a long period of several decades. (B) In the "treatment" period the arterial age quickly decreases due to the high susceptibility of the arterial wall to the benefits provided by treatment. (C) In the "rest" period the arterial age slowly declines due to the previously accumulated effect of the treatment period, thereby allowing prolonged effects.

47.



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

*Povzetki
Abstracts*

Vloga cisteinskih katepsinov B in X in njunih inhibitorjev pri epitelno-mezenhimskem prehodu tumorskih celic

ANA MITROVIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Janko Kos, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Povečano izražanje in povečana aktivnost lizosomskih cisteinskih karboksipeptidaz katepsinov B in X v telesu sta povezana s številnimi patološkimi procesi, tudi z nastankom in napredovanjem raka. Pri slednjem katepsinu B in X sodelujeta v razgradnji zunajceličnega matriksa, migraciji, invaziji, metastaziranju in angiogenezi. V okviru našega dela smo pokazali, da večje koncentracije katepsinov B in X spodbujajo epitelno-mezenhimski prehod (EMT) in so povezane z invazivnim mezenhimskim celičnim fenotipom. Tako smo identificirali EMT, ki ima kot dodatni mehanizem, prek katerega katepsina B in X prispevata k napredovanju tumorjev, pomembno vlogo tudi pri napredovanju tumorjev. Zaradi pomembne vloge v številnih rakavih procesih sta katepsina B in X primerni tarči za razvoj novih protitumorskih učinkovin. Uspešno smo identificirali in ovrednotili nove nizkomolekulske inhibitorje katepsinov B in X, ki bi bili primerni za nadaljnje testiranje. Pri tem smo potrdili, da nitroxolin, ki je bil v predhodni študiji identificiran kot učinkovit in selektiven inhibitor katepsina B, protitumorsko deluje na različnih tumorskih modelih *in vitro* in *in vivo*, kar odpira možnosti njegove uporabe za novo indikacijo. Pokazali smo, da lahko protitumorsko delovanje še izboljšamo z dodatkom 2-(ethylamino)acetonitrilne skupine na mesto 7. Poleg nizkomolekulskih sinteznih inhibitorjev smo kot inhibitor katepsina B identificirali tudi kompleks klioquinola z rutenijem [Ru(η₆-p-cimen)(Cq)Cl]. Z rešetanjem interne knjižnice spojin pa smo kot prvi identificirali reverzibilne in selektivne nizkomolekulske inhibitorje katepsina X.

Role of Cysteine Cathepsins B and X and Their Inhibitors in Epithelial-mesenchymal Transition of Tumor Cells

Ana Mitrović, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Janko Kos, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Increased expression and activity of lysosomal cysteine carboxypeptidases cathepsins B and X are associated with a variety of pathological processes, including development and progression of cancer. In cancer, they have an important role in the degradation of extracellular matrix, tumor invasion, migration, metastasis and angiogenesis. We show that higher levels of cathepsins B and X promote epithelial-mesenchymal transition (EMT), and are associated with mesenchymal-like cell phenotype and thus our data define EMT, process that has been recognized as an important step during tumor progression, as additional mechanism linking cathepsins B and X with tumor progression. Cathepsins B and X are, because of their important role in cancer, validated as targets for anti-tumor therapy and are as such interesting in drug development. We have successfully identified and characterized new small synthetic inhibitors of cathepsins B and X that are suitable for further clinical evaluation. For nitroxoline, previously reported as potent selective inhibitor of cathepsin B, we demonstrated anti-tumor properties in various *in vitro* and *in vivo* tumor models. This is opening possibilities for its repurposing and novel use. Further we have improved nitroxoline anti-tumor activity both *in vitro* and *in vivo* with addition of the 2-(ethylamino)acetonitrile group at position 7. Additionally, clioquinol-ruthenium complex [Ru(η₆-p-cymene)(Cq)Cl] was also identified as cathepsin B inhibitor. Finally, using in-house compound library, we report on reversible and selective small synthetic inhibitors of cathepsin X for the first time.

Optimizacija genskega elektroprenosa v kožo za nadzorovan vnos plazmidne DNA

ŠPELA KOS, Onkološki inštitut Ljubljana
Mentor: Gregor Serša, Onkološki inštitut Ljubljana

Genska terapija s ciljanim vnosom plazmidne DNA v kožo postaja vse bolj zanimiv pristop k zdravljenju tumorjev. Za vnos terapevtskih genov v tarčna tkiva so v uporabi različni pristopi, med drugim tudi genski elektroprenos. Učinek genskega elektroprenosa je odvisen od številnih parametrov, kot so vrsta elektrode, napetost električnih pulzov in sestava plazmidne DNA. V sklopu doktorske naloge smo optimizirali glavne parametre kožnega genskega elektroprenosa ter določali protitumorsko učinkovitost optimizirane metode. Z optimizacijo glavnih parametrov metode smo dokazali, da iz izbiro ustreznih parametrov genskega elektroprenosa vplivamo na transfekcijo različnih plasti kože, s čimer lahko prilagajamo trajanje izražanja genskega produkta ter uravnavamo lokalno ali sistemsko delovanje genskega vnosa. Dokazali smo, da lahko z ustreznim načrtovanjem protokolov in z uporabo optimiziranih parametrov zagotovimo učinkovit in varen način vnosa plazmidne DNA za peritumorsko zdravljenje tumorjev. S peritumorskim vnosom plazmidne DNA z zapisom za citokin interleukin 12 lahko dosežemo zaostanek v rasti primarnih tumorjev in tudi sistemski učinek na oddaljene metastaze. Natančno optimizirana in nadzorovana metoda z dokazanim protitumorskim delovanjem omogoča varen, učinkovit, nadzorovan in ciljan vnos plazmidne DNA v kožo ter predstavlja pomemben korak k nadaljnemu razvoju metode in prenosu kožnega genskega elektroprenosa v klinično prakso.

Optimization of Skin Gene Electrotransfer for Controlled Delivery of Plasmid DNA

ŠPELA KOS, Institute of Oncology Ljubljana
Supervisor: Gregor Serša, Institute of Oncology Ljubljana

Gene therapy with targeted delivery of plasmid DNA into skin is a promising approach for cancer treatment. Several approaches have been used to deliver therapeutic genes into target tissues, among them also gene electrotransfer. The effectiveness of gene electrotransfer relies on different parameters, such as the type of the electrodes, amplitude and duration of electric pulses and the design of the plasmid DNA. In the scope of our study, the main parameters of skin gene electrotransfer were optimized and the antitumor effect of optimized method was evaluated. The results indicated that with optimized parameters of gene electrotransfer, the depth of transfection into skin and the level and the duration of gene expression could be controlled, as well as the local or systemic distribution of the protein. Further on, the feasibility of the optimized method for the purposes of cancer therapy was proven on different mouse tumour models. Peritumoral skin gene electrotransfer with plasmid DNA coding for the IL12 resulted in efficient growth delay of primary tumours and promoted the systemic effect on distant, untreated metastases. Well-characterized and optimized method of skin gene electrotransfer, for safe, efficient and controlled delivery with anticancer action could facilitate the translation of the method into the clinics.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje zaviralcev DNA giraze B z benzotiazolskim skeletom

MARINA GJORGJIEVA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Danijel Kikelj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: Lucija Peterlin Mašič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

DNA-giraza in topoizomeraza IV sta ATP-azna encima, ki imata pomembno vlogo pri replikaciji DNA-molekule v bakterijski celici in podobno strukturo. To ponuja dobro priložnost za načrtovanje protibakterijskih učinkovin, ki bi hkrati zavirale oba encima in bi zato imele manjše možnosti za razvoj bakterijske rezistence. V okviru raziskav smo razvili nove dualne nanomolarne inhibitorje DNA-giraze in topoizomeraze IV z benzotiazolskim skeletom. Razrešena kristalna struktura ene od benzotiazolnih spojin v kompleksu z ATP-vezavnim mestom DNA-giraze odkriva mehanizem delovanja naših spojin, ki v iskanju novih protibakterijskih učinkovin do sedaj ni bil dovolj izkorisčen. Gre za vezavo na ATP-vezavno mesto ter s tem za inhibicijo DNA-giraze in topoizomeraze IV. Odkrili smo tudi, da naše spojine delujejo tudi na virusu influenza A/H1N1 in A/H3N2 ter influenza B ter se pri tem vežejo na šaperon Hsp90, ki je udeležen pri procesiranju virusnih proteinov. Šaperon Hsp90 je skupaj z DNA-girazo del skupine GHKL-proteinov, ki imajo podobno ATP-vezavno mesto. Ugotovitev, da naše benzotiazolne spojine inhibitorno delujejo na DNA-girazo in topoizomerazo IV in tudi proti virusu influenza, daje dobro izhodišče za nadaljnje načrtovanje in razvoj učinkovin, ki bi delovale protibakterijsko in protivirusno.

Design, Synthesis and Evaluation of DNA Gyrase B Inhibitors Based on the Benzothiazole Scaffold

MARINA GJORGJIEVA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Danijel Kikelj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: Lucija Peterlin Mašič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

DNA gyrase and topoisomerase IV are ATPase enzymes with an important role in the process of DNA replication in bacterial cell and similar structure, which gives an exceptional opportunity for design of dual target antibacterial compounds with lower probability for developing bacterial resistance. Within the framework of our research we have developed novel nanomolar dual inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV with benzothiazole scaffold. The crystal structure of one of our benzothiazole compounds in complex with the ATP-binding site of DNA gyrase reveals the mechanism of action of our compounds, which is binding to the ATP binding site of DNA gyrase and topoisomerase IV, a mechanism that has not been exploited enough in the search for new antibacterial compounds. Furthermore, we have discovered that our benzothiazole compounds possess antiviral activity against the virus influenza A/H1N1, A/H3N2 and influenza B with inhibition of chaperon Hsp90 which plays a very important role in the replication of virus influenza. Hsp90 chaperone and DNA gyrase belong to the GHKL group of proteins which resembles in the structure to ATP binding sites. The finding that our compounds have inhibitory activity against DNA gyrase and topoisomerase IV and also antiviral activity against virus influenza gives a good starting point for designing and developing compounds with dual action that will combine both antibacterial and antiviral activity in the same molecule.

Novi pristopi k sintezi predzdravil fosfatov in fosforilirani derivati pantotenske kisline

JERCA PAHOR, Institut Jožef Stefan

Mentorica: Ajda Podgoršek Berke, Institut Jožef Stefan, Lek, d. d.

Somentor: Stojan Stavber, Institut Jožef Stefan

Priprava in vrednotenje biološke aktivnosti fosforiliranih derivatov pantotenske kisline sta pred kratkim ponovno pritegnila veliko zanimanja. Iskanje ustreznih sinteznih poti je nedvomno ključni korak, ki lahko omogoči popolno izkoriščenje farmacevtskega potenciala teh spojin. Zato je bil namen našega raziskovalnega dela pripraviti nove derivate fosfopantotenata in fosfopanteteina z uporabo inovativnih in učinkovitih metod. Najprej smo proučevali možnosti učinkovite priprave različnih aciloksalkilnih predzdravil fosfatov. Uspešni smo bili pri sintezi novega reagenta, primerenega za uvedbo izobutirilosimetilnih skupin na predzdravilo, poiskali pa smo tudi ekonomične reakcijske pogoje za fosforiliranje biološko aktivnih molekul. V nadaljevanju raziskav smo študirali možnost učinkovite in selektivne sinteze novih derivatov pantotenske kisline z maskirano fosfatno skupino. Posebno pozornost smo namenili pripravi derivatov, maskiranih z aciloksalkilnimi skupinami, ki so zelo razširjene pri pripravi predzdravil fosfatov. Uspešno smo sintetizirali več novih derivatov s potencialno biološko aktivnostjo ter s tem dopolnili še vedno pomanjkljivo znanje o pripravi derivatov pantotenske kisline in aciloksalkilnih predzdravil fosfatov.

New Approaches to the Synthesis of Prodrugs of Phosphates and Phosphorylated Derivatives of Pantothenic Acid

JERCA PAHOR, Jožef Stefan Institute

Supervisor: Ajda Podgoršek Berke, Jožef Stefan Institute, Lek d. d.

Co-supervisor: Stojan Stavber, Jožef Stefan Institute

The preparation and evaluation of phosphorylated derivatives of pantothenic acid have recently gained a renewed interest. The quest for appropriate synthetic methods is a key step towards unlocking the full pharmaceutical potential of these compounds. Therefore, the aim of our study was to prepare novel derivatives of phosphopantethenate and phosphopantetheine while applying innovative approaches in the synthesis. The methods for efficient preparation of different acyloxyalkyl prodrugs of phosphates were firstly studied. We were efficient in the synthesis of a new chlorophosphate reagent, suitable for the introduction of isobutyryloxymethyl functionality into the prodrug. Our search toward optimal reaction conditions resulted in economical reaction conditions, suitable for the use on biologically active molecules. In the second part, we studied the possibility of efficient and selective synthesis of new phosphorylated derivatives of pantothenic acid with masked phosphate group. Special attention was given to the preparation of derivatives masked with acyloxyalkyl groups as the most prominent representatives used among prodrugs of phosphates. In order to complement the list of available compounds suitable for testing regarding their biological activity, we have successfully synthesized several new derivatives. Their preparation has notably contributed to the knowledge gap in the field of the synthesis of phosphorylated derivatives of pantothenic acid and acyloxyalkyl prodrugs of phosphates.

Modeliranje večivalentnih interakcij

TINE CURK, Univerza v Cambridge

Mentor: Daan Frenkel, Univerza v Cambridge

Somentor: Jure Dobnikar, Univerza v Cambridge

Večivalentna entiteta, npr. beljakovina, nanodelec, virus ali polimer, s substratom običajno tvori več hkratnih vezi. Skupna interakcija je lahko močna, čeprav posamezne supramolekularne vezi niso. Vendar je pri biomolekularnih interakcijah specifičnost vsaj tako pomembna kot moč vezave, večivalentnost namreč lahko omogoči oblikovanje specifičnih interakcij tudi na osnovi kombinacij individualno nespecifičnih vezi. Z uporabo fizikalnih modelov in numeričnih metod poskušamo racionalizirati večvalente učinke. Naš cilj je predvideti skupno interakcijo, če poznamo kemijske lastnosti posameznih vezi. Osredotočimo se na ciljanje celic glede na številčno gostoto različnih transmembranskih receptorjev. Na primeru večivalentnih nanodelcev in polimerov pokažemo specifičnost za dani gostotni profil transmembranskih receptorjev. Tako dokažemo, da je specifično ciljanje celic možno tudi brez selektivnih označevalcev, za optimalno ciljanje pa je ključno, da so posamezne vezi relativno šibke. Oblikujemo tudi niz preprostih pravil za načrtovanje večivalentnih interakcij, ki omogočajo optimalno ciljanje celic. Naša teoretična doganjana so potrjena na dveh eksperimentalnih sistemih, na vezavi med DNK-beljakovinskimi kompleksi in TLR9-transmembranskimi receptorji ter adsorpciji polimerov hialuronske kisline.

Modelling Multivalent Interactions

TINE CURK, University of Cambridge

Supervisor: Daan Frenkel, University of Cambridge

Co-supervisor: Jure Dobnikar, University of Cambridge

A multivalent entity, which could represent a protein, nanoparticle, polymer or a virus, has the ability to form multiple bonds to a substrate. Hence, a multivalent interaction can be strong, even if the individual bonds are weak. However, much more interestingly, multivalency enables the design of highly specific interactions using non-specific individual bonds. We attempt to rationalize multivalent effects using simple physical models complemented with numerical simulations. Based on physicochemical characteristics of multivalent binders, we aim to predict the overall strength of interaction and its sensitivity to variation in parameters. Specifically, we consider targeting of cells based on a density profile of different membrane receptors types and demonstrate, that specificity towards a desired receptor density profile can be obtained. Hence, cells can be reliably targeted in the absence of specific markers. It is of great significance that we show that for optimal selectivity, individual bonds must be weak. Moreover, we formulate a set of simple design rules for multivalent interactions that yield optimal targeting specificity. Our design rules are verified on two experimental systems: DNA-peptide complexes binding to TLR9 trans-membrane receptors, and hyaluronic acid polymer adsorption.

Vpliv dodane soli na stabilnost raztopin globularnih proteinov v vodi

MIHA KASTELIC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Vojeslav Vlachy**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Predstavili smo model proteina z usmerjenimi silami v vodnih raztopinah ter ga ovrednotili z Wertheimovo teorijo motenj. Z modelom smo opisali koeksistenčni krivulji za raztopini lizocima in kristalina γ lla ter predlagali mero za ionospecifičnost pri opisu vpliva dodane soli na jakost interakcij med proteini. Pristop smo pospolili za opis globularnih proteinov z nesferično obliko. Ugotovili smo, da stabilnost raztopin nesferičnih proteinov narašča s stopnjo odmika od sferične oblike. V naslednjem sklopu smo obravnavali binarno mešanico nesferičnih proteinov. Fazno ravnovesje smo predstavili s koeksistenčno ploskvijo, ki glede na stopnjo simetrije interakcij med proteini kaže netrivialne izoterme. Fazi v ravnovesju se razlikujeta tako po gostoti kot sestavi: večja stopnja asimetrije povzroči večje razlike, v skrajnem primeru vodi do ravnovesja treh kapljevinastih faz. Model binarne mešanice smo uporabili za analizo meritev temperatur zmotnitez za mešanico kristalinov β in γ . V skladu z razliko v kvadrupolnih momentih proteinov smo uvedli različno število aktivnih mest na proteinih ter opisali stabilnost njihovih raztopin. Kot ekstremni primer proteinov z nesferično obliko smo obravnavali protitelesa. Molekulo protitelesa smo sestavili iz sedmih togih kroglic in jo opremili s tremi aktivnimi mesti, ki omogočajo tvorbo agregatov. Model smo uporabili za opis interakcij med regijami FAB-FAB in FAB-FC ter tudi za protitelesa z dvojno funkcijo. Za obravnavane primere smo pridobili porazdelitev agregatov in fenomenološko ovrednotili njihov prispevek k viskoznosti raztopin.

Influence of Added Salt on Solution Stability of Globular Proteins in Water

MIHA KASTELIC, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **dr. Vojeslav Vlachy**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

We presented the model of protein with directional forces in water solutions within a framework of the Wertheim perturbation theory. With the model we described the co-existence curves for solutions of lysozyme and γ lla crystallin and proposed a measure of ion specificity to describe the effect of added salt on interaction strength among proteins. Further, we generalized the approach to describe globular proteins with nonspherical shape. For the latter we found out that deviation from spherical shape increased the stability of corresponding protein solutions. Next we studied binary mixture of nonspherical proteins. In this case, we presented the phase equilibrium by a coexistence surface, showing nontrivial isotherms when high degree of asymmetry among interactions was present. The equilibrium phases were different not only in density, but also in protein composition: larger degree of asymmetry led to enhanced difference, in the extreme case to three coexisting liquid phases. We used the model of binary mixture to analyse measurements of cloud temperatures on mixtures of β and γ crystallins. Due to difference in quadrupole moment of proteins, we used different number of active sites on proteins to describe their stability in solutions. As a limiting case of proteins with nonspherical shape, we studied antibodies. We constructed antibody from seven hard spheres, decorated with three active sites to allow formation of aggregates. We used the model to describe interactions between FAB-FAB and FAB-FC regions as well as the antibodies with dual function. For these cases we obtained corresponding distribution of aggregates and phenomenologically evaluated their contributions to viscosity of solutions.

Raziskave endokrinih učinkov fenolnih analogov bisfenola A in njihovih mešanic *in silico* in *in vitro*

IVANA KLOPČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorka: **Marija Sollner Dolenc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Janez Mavri**, Kemijski inštitut, Ljubljana

Med hormonske motilce (EDC) uvrščamo vse spojine in njihove mešanice, ki lahko vplivajo na sintezo, sekrecijo, transport, vezavo na receptorje ter eliminacijo endogenih hormonov. Ljudje smo EDC vsak dan izpostavljeni transdermalno, inhalacijsko in peroralno. Mehanizem motnje delovanja endokrinega sistema je kompleksen in poleg neposredne vezave na receptor vključuje tudi interakcije z ostalimi biološkimi makromolekulami in spremembijo njihove funkcije. Modulatorji jedrnih receptorjev imajo v svoji strukturi aromatski skelet, na katerega je vezana hidroksilna skupina. Dodatni strukturni elementi v strukturi modulatorjev, kot so alkilne ali alkilfenilne skupine, pripomorejo, da se njihova sposobnost vezave na jedrne receptorje poveča. Zato jih lahko uvrstimo med fenolne analoge bisfenola A, ki so predmet nadaljnje oksidativne pretvorbe v reaktivne benzokinone in kinonimine, ki praviloma generirajo reaktivne kisikove zvrsti ali pa kot elektrofilni reagirajo z nukleofilnimi komponentami v celici, tudi z genetskim materialom. Kljub obsežnemu raziskovanju pa mehanizem motnje endokrinega sistema za veliko spojin in medsebojni učinki še niso dovolj poznani. Zato je treba izboljšati poznavanje in metodologije ter razviti celostne pristope za ocenjevanje tveganj spojin v realnih razmerah. To bo pomoglo k varovanju zdravja in okolja ter spodbujanju konkurenčnosti industrije za pripravo izdelkov iz snovi, ki so bolj varne.

Studies of Endocrine Effects of Phenolic Analogs of Bisphenol A and Their Mixtures *in silico* and *in vitro*

IVANA KLOPČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Marija Sollner Dolenc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-mentor: **Janez Mavri**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

All compounds and mixtures impacting synthesis, secretion, transport, binding to receptors and elimination of hormones are classified as endocrine disrupting chemicals (EDC). The mechanism of endocrine system disruption is complex, which in addition to direct binding to the receptor, also involves interactions with other biological macromolecules and changes in their function. The EDC in their structure have an aromatic skeleton, to which a hydroxyl group is attached. Additional structural elements such as alkyl or alkylphenyl groups, contribute to their greater binding ability to nuclear receptors. Therefore, they can be classified as phenolic analogs of bisphenol A, which are subject to further oxidative conversion into reactive benzoquinones and quinonimines that can generate reactive oxygen species or react as electrophiles with nucleophilic components in the cell, including genetic material. Despite extensive research, there is a lack of knowledge about the exact mechanism of the endocrine system disruption for many compounds. It is therefore necessary to improve the current knowledge and methodologies and to develop integrated approaches to assess the risks of compounds in real-life situations. This will help protect health and the environment and promote the competitiveness of the industry for the preparation of products from safer substances.

Interakcije rakavih in normalnih urotelijskih celic in vzpostavitev urotelijskega vezivnega nadomestka na amnijski membrani

URŠKA DRAGIN JERMAN, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Mateja Erdani Kreft, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Rak sečnega mehurja se pogosto pojavlja v obliki več genetsko enakih tumorjev, razpršenih po celotnem epiteliju organa, tj. uroteliju. Domneva se, da se rakave urotelijske (RU) celice s primarnega tumorja razširajo z odcepljanjem v lumen sečnega mehurja in s pritrjevanjem na urotelij na drugem mestu. Naš namen je bil vzpostaviti model raka sečnega mehurja *in vitro* in proučiti mehanizem pritrjevanja invazivnih RU-celic na urotelij različnih stopenj diferenciacije ter njihovo vraščanje v urotelij. Naše ugotovitve prispevajo k razumevanju širjenja raka sečnega mehurja. Dokazali smo, da se invazivne RU-celice na nizko in delno diferencirani urotelij pritrjajo z dezmosomi ter da tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami upočasnijo vraščanje RU-celic v urotelij. Ponovljivost raka sečnega mehurja je zelo velika, zato je iskanje primerne pooperativne terapije ključnega pomena. V ta namen smo uporabili amnijsko membrano (AM). AM je notranja plodova ovojnica, ki ima številne biološke lastnosti, primerne za uporabo v regenerativni medicini. Naš cilj je bil z različnimi modeli *in vitro* ovrednotiti ustreznost AM za regeneracijo urotelija. Dokazali smo, da AM omogoča vzpostavitev urotelijskega vezivnega nadomestka. Na modelu *in vitro*, ki posnema steno sečnega mehurja po globoki poškodbi urotelija (npr. po biopsiji ali resekciji dela urotelija), smo potrdili, da AM pospešuje regeneracijo urotelija.

Interactions between Cancer and Normal Urothelial Cells and Establishment of Urothelial Connective Tissue Equivalent on Amniotic Membrane Scaffold

URŠKA DRAGIN JERMAN, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: Mateja Erdani Kreft, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Bladder cancer often occurs in the form of multiple genetically identical tumors scattered throughout the bladder epithelium, i.e. urothelium. It is hypothesized that cancer urothelial (CU) cells spread from the primary tumor by release from the primary tumor into the bladder lumen and implantation at a different site of the urothelium. Our aim was to establish an *in vitro* model of bladder cancer, which would allow us to investigate the mechanism of invasive CU cell attachment onto the urothelium and their invasion into the urothelium. Our findings contribute to the understanding of the bladder cancer spread. We demonstrated that invasive CU cells attach onto poorly and partially differentiated urothelium via desmosomes. Additionally, we showed that tight junctions between superficial urothelial cells slow down the invasion of CU cells into the urothelium. Bladder cancer is highly recurrent, therefore the search for suitable postoperative therapy is crucial. For this purpose, we used amniotic membrane (AM). AM is the innermost fetal membrane, which has desired properties for use in regenerative medicine. Our goal was to evaluate the adequacy of the AM for urothelial regeneration in various *in vitro* models. We demonstrated that AM enables establishment of urothelial connective tissue equivalent. By using an *in vitro* model that mimics bladder wall after deep urothelial injury (e.g. after biopsy or resection of the urothelium), we additionally confirmed that AM promotes urothelial regeneration.

Razvoj pilotne naprave za enkapsulacijo aromatičnih substanc v talino ogljikovih hidratov z uporabo visokotlačnega homogenizatorja

URBAN FEGUŠ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Mentor: Željko Knez, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Cilj raziskovalnega projekta je bil razviti enkapsulirane aromatične substance, primerne za uporabo v živilih, kot so žvečilni gumiji, instantni čaji in slaščice. Razviti je bilo treba vodotopne delce z velikostno porazdelitvijo delcev med 400 µm in do 1500 µm in z do 30-odstotno vsebnostjo aktivne komponente. Da bi proizvedli enkapsulate z zelenimi fizikalnimi lastnostmi, smo raziskovalno delo razdelili na tri faze. Namen prve faze je bil izbrati primerne nosilne snovi in izvesti preliminarne poskuse z uporabo laboratorijske opreme. Na podlagi ugotovitev so bili definirani procesni parametri za projektiranje in izdelavo pilotne naprave. Druga faza raziskovalne naloge je zajemala oblikovanje in razvoj pilotne naprave za enkapsulacijo aromatičnih substanc, v tretji fazi pa so bili testirani različni procesni parametri.

Process Design for Flavour Encapsulation into Carbohydrate Melts Using High Pressure Homogenizer

URBAN FEGUŠ, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor
Supervisor: Željko Knez, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

The aim of the research project was to develop encapsulated flavourings suitable for the final food applications such as chewing gums, instant teas and confectionary products. For this purpose water soluble particles with particle size distribution from 400 µm to 1500 µm and flavour loading up to 30% should be developed. In order to produce encapsulates with desired physical properties research work was divided into three project phases. The scope of Phase 1 was to select suitable carrier materials and to perform preliminary experiments using laboratory scale process set-up. Observations were used for defining process parameters for the design and construction of the pilot plant. Phase 2 covered design and development of the pilot plant for flavour encapsulation while in Phase 3 different process parameters were tested.

Spremljanje procesa oblaganja farmacevtskih pelet s strojnim vidom

NIKA OMAN KADUNC, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani
Mentor: Dejan Tomaževič, Sensum, d. o. o.

Farmacevtske pelete se pri proizvodnji zdravil vse pogosteje uporabljajo, saj omogočajo natančen nanos obloge in dobro sproščanje zdravilnih učinkovin. Za doseganje njihove ustreznosti je ključnega pomena kakovost nanesene obloge. Medprocesni nadzor kakovosti v farmacevtski proizvodnji prispeva k poglobljenemu razumevanju proizvodnih procesov in izboljšani kakovosti zdravil. V doktorski disertaciji smo zasnovali in izdelali sistem strojnega vida kot orodje PAT, ki omogoča brezkontaktno in časovno učinkovito vrednotenje parametrov kakovosti obloge pelet med procesom oblaganja. Razvili smo hitre algoritme računalniškega vida, s katerimi lahko medprocesno in z veliko statistično natančnostjo spremljamo rast debeline obloge pelet v realnem času. Pri kompleksnejših zdravilih s prirejenim sproščanjem je poleg povprečne debeline obloge pomembna tudi enakomernost nanesene obloge. V doktorski disertaciji predlagamo novi metodi analize izmerjenih podatkov, ki omogočata medprocesno oceno enakomernosti obloge med peletami in morfološke enakomernosti obloge pelet v šarži. V poskusih v laboratorijski Wursterjevi oblagalni komori smo prikazali celovito analizo procesa oblaganja s sistemom strojnega vida, primerjava rezultatov z referenčno metodo pa kaže na veliko medsebojno ujemanje. Izdelani sistem bi lahko omogočil znatne izboljšave pri nadzoru kakovosti obloženih pelet in poglobljeno razumevanje značilnosti procesa oblaganja.

Monitoring the Coating Process of Pharmaceutical Pellets by Machine Vision

NIKA OMAN KADUNC, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana
Supervisor: Dejan Tomaževič, Sensum, d. o. o.

Pharmaceutical pellets are increasingly used in the production of solid dosage forms as they allow for high precision in coating application and favourable release profiles of active ingredients. The quality of applied coating is key in ensuring their proper functionality. In-line quality control leads to a deeper understanding of the pharmaceutical production processes and improves the quality of end products. In the dissertation, we propose a machine vision system as a PAT tool for monitoring the coating process allowing for automatic contactless in-line assessment of critical quality attributes of coated pellets. We developed fast computer vision algorithms that allow real-time monitoring of coating thickness growth with high statistical precision. With drug formulations for controlled release systems, coating uniformity is becoming an important quality attribute of coated pellets. We propose novel methods of data analysis that enable in-line assessment of inter-pellet and intra-pellet coating uniformity. In the conducted experiments in a laboratory-size Wurster coating apparatus, we present a comprehensive analysis of coating processes with the machine vision system. Comparison with a reference method shows excellent agreement of the obtained results. The designed machine vision system could contribute to improvements in quality control of pellets in the coating process as well as to a deeper understanding of its underlying characteristics.

Analiza odločanja skrbnikov hišnih ljubljencev pri nakupu zdravil za zdravljenje boljavosti in klopavosti

MIRIJAM ČERNE PRELOVŠEK, Ekonomski fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorka: Mateja Kos Koklič, Ekonomski fakulteta, Univerza v Ljubljani

Hišni ljubljenci, zlasti psi in mačke, so v zahodni kulturi postali pomemben del vsakdana sodobnega človeka, za marsikoga so enakovredni družinski člani. Številni avtorji raziskujejo, kako vplivajo na razširjeni jaz, ki se kaže v povezovanju lastne osebnosti z živaljo ter v močni čustveni navezanosti nanjo. Ti odnosi vplivajo tudi na nakupno odločanje skrbnikov, kar je predmet teoretičnega dela magistrske naloge. O procesu odločanja pri nakupu veterinarskih izdelkov je razmeroma malo literature, zato sem v empiričnem delu izvedla raziskavo na fokusnih skupinah. Ugotovljala sem, kako odnos skrbnikov do hišnih ljubljencev vpliva na proces odločanja pri nakupu zdravil za zdravljenje boljavosti in klopavosti. Raziskava je bila usmerjena v vseh pet faz nakupnega odločanja: prepoznavo problema, iskanje informacij, ocenjevanje alternativ, odločitev za nakup in ponakupno vedenje. Rezultati kažejo, da se skrbniki zavedajo problema klopavosti in boljavosti ter posledic, zato zdravljenje ocenjujejo kot zelo pomembno. Najpomembnejši vir informacij o zdravilih so veterinarji, prijatelji in drugi skrbniki psov. Pri odločitvi za nakup je najpomembnejše merilo učinkovitost, ki vpliva tudi na zadovoljstvo in ponovni nakup istega zdravila. Raziskava prinaša nova spoznanja o nakupnem odločanju skrbnikov hišnih ljubljencev za veterinarske izdelke.

Analysis of Decisions Taken by Owners of Companion Animals When Buying Medicines for the Treatment of Flea and Tick Infestations

MIRIJAM ČERNE PRELOVŠEK, Faculty of Economics, University of Ljubljana
Supervisor: Mateja Kos Koklič, Faculty of Economics, University of Ljubljana

Companion animals, especially dogs and cats, have become an important part of modern everyday life in western cultures. People frequently regard them as equal members of their families. Many authors have investigated the impact of companion animals on their owners' extended self, reflected in personal and emotional bonds between humans and animals. Relationships impact purchasing decisions and represent the basis for the theoretical part of this thesis. Resources on the decision-making processes when purchasing animal health products are relatively scant, so I studied focus groups. I investigated how the owners' attitude towards their companion animals impacted the decision-making process when considering the purchase of flea and tick control products. The study focused on all the five stages of buying decision-making process: problem recognition, information search, evaluation of alternatives, purchase decision, post-purchase behaviour. The study results showed that companion animal owners were aware of the problems and consequences related to tick and flea infestations, so they thought the treatment was very important. The most important sources of information were vets, friends and other dog owners. When deciding what product to buy, the most important criterion was effectiveness, which was also related to satisfaction and the decision to buy the same medicine again. The study brought into focus new insights about the decision-making process of companion animal owners when making purchases of animal health products.

Sinteza potencialnih nečistot pri zdravilni učinkovini

ALEŠ POLOVIČ, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentorica: Sergeja Bombek, Krka, d. d., Novo mesto

V magistrskem delu smo se ukvarjali s sintezo vseh štirih stereoizomerov farmacevtske učinkovine tadalafil, (*6R,12aR*)-6-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-il)-2-metil-2,3,6,7,12,12a-tetrahidropirazino[1';2':1,6] pirido[3,4-*b*] indol-1,4-dion, ter vseh stereoizomerov, ki se lahko tvorijo med sintezo tadalafila. Vse pripravljene spojine se lahko uporabijo kot standardi za razvoj analiznih metod. Izhodni spojini za sintezo stereoizomerov sta D- in L-triptofan. Oba enantiomera triptofana smo pretvorili v metilne estre s tionil kloridom in metanolom. Ključna stopnja sinteze tadalafila je Pictet-Spenglerjeva reakcija, pri kateri v molekulo uvedemo drugi kiralni center. Če izhodni material za sintezo tadalafila ni dovolj čist, lahko na tej stopnji poleg intermediata nastanejo še tri dodatne stereoizomerne nečistote. Sledi reakcija intermediarov s kloroacetyl kloridom ter še zadnja stopnja, na kateri pride do tvorbe 2,5-diketopiperazinskega obroča. Poleg stereoizomernih nečistot smo pripravili tudi morebitne nečistote, ki so posledica nečistot v izhodnem materialu oz. v reagentih. Evropska farmakopeja navaja devet nečistot, na katere je treba biti pozoren v končnem API-ju. Od teh so tri stereoizomerne, ki smo jih sintetizirali. Za preostale smo napisali možen mehanizem nastanka in svoje trditve preverili s stresnimi testi. Nečistote, ki so nastale med stresnimi testi, smo okarakterizirali s pomočjo LC-MS in literature.

Synthesis of Potential Impurities in the Active Substance

ALEŠ POLOVIČ, Krka d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Sergeja Bombek, Krka d. d., Novo mesto

In this work we have dealt with the synthesis of all four stereoisomers pharmaceutical ingredient tadalafil, (*6R,12aR*)-6-(1,3-Benzo[*d*]dioxol-5-yl)-2-methyl-2,3,6,7,12,12a-tetrahydropyrazino [1';2':1,6] pyrido[3,4-*b*] indole-1,4-dione) and all stereoisomers at each stage of the synthesis. All prepared compounds can be used as standards for the development of analytical methods. The starting compounds for the synthesis of the stereoisomers are D- and L-tryptophan. Both enantiomers of tryptophan were converted to methyl esters with thionyl chloride and methanol. The key step in the synthesis of tadalafil is the Pictet-Spengler reaction, wherein the molecule is introduced into the second chiral center. In the case that the starting material is not pure enough, three stereoisomeric impurities in addition to the intermediate are also produced at this stage. All four intermediates then react with chloroacetyl chloride. The last step is the synthesis of 2,5-diketopiperazine ring. In addition to stereoisomeric impurities, we also prepared possible impurities resulting from the impurities in the starting material or from impurities in the reagents. The European Pharmacopoeia lists nine impurities that must be attentive to the final API. Three from nine impurities are stereoisomers and were synthesized. With regards to the rest, we wrote a possible mechanism of formation. In order to verify our claims, we performed stress tests. Impurities that accrued during the stress test have been characterized by means of LC-MS and the literature.

Določevanje izbranih ogljikovih hidratov z uporabo anionsko izmenjevalne kromatografije s pulzno amperometrično detekcijo

MATJAŽ GRČMAN, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Matevž Pompe, Fakulteta za kemijo, Univerza v Ljubljani

V farmacevtski industriji se na področju analitike ogljikovih hidratov vse bolj uveljavlja ionska kromatografija, na principu anionske izmenjave povezana s pulzno amperometrično detekcijo. Namenski naloge je bil razviti kromatografsko metodo za določevanje vsebnosti enostavnih in sestavljenih ogljikovih hidratov v pomožni snovi, glukoznem sirupu. Glukozni sirup je produkt hidrolize škroba, pri čemer nastane kompleksna mešanica ogljikovih hidratov različnih polimerizacijskih stopenj. Poznavanje njihovih koncentracijskih profilov je zato s stališča farmakoloških lastnosti pogosto ključnega pomena. Raziskovalno delo obsegajo optimizacijo parametrov pulzne amperometrične detekcije. Na podlagi podobnih raziskav smo v začetku predvideli poenostavitev standardne tri- oz. štiripulzne napetostne sekvence v dvopulzno. Poenostavljen obliko pulzne sekvence poleg detekcijske napetosti sestavlja le še kratek korak, namenjen reaktivaciji Au-elektrodne površine. V nadaljevanju sem se osredotočil na iskanje optimalnih pogojev kromatografske ločitve, v katerih bi lahko analizirali glukozni sirup in tudi druge podobne škrobne sirupe. Določil sem osnovne validacijske parametre: ponovljivost, linearnost, točnost in obnovljivost.

Determination of Selected Carbohydrates with Anion Exchange Chromatography Coupled with the Pulsed Amperometric Detection

MATJAŽ GRČMAN, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Matevž Pompe, Faculty of Chemistry, University of Ljubljana

In the pharmaceutical industry, ion chromatography based on anion exchange and coupled with pulsed amperometric detection has been gaining ground, especially in the field of carbohydrates analytics. The purpose of this work was to develop a chromatographic method determining simple and complex carbohydrates in the excipient – glucose syrup. Glucose syrup is a product of starch hydrolysis, which yields a complex mixture of carbohydrates of different degrees of polymerisation. From the perspective of pharmacological properties of pharmaceutical formulations, such knowledge of their concentration profiles is often crucial. Research work comprises optimization of parameters for pulsed amperometric detection. Based on similar studies, we initially foresaw a simplification of the standard three- or four-pulsed voltage sequence into a double-pulsed. A simplified form of pulse sequence, in addition to the detection voltage, consists only of a short step, intended to reactivate the Au electrode surface. Following that, I focused on finding the optimal conditions of chromatographic separation with which we could analyze the glucose and other similar starch syrups. I determined the basic validation parameters: repeatability, linearity, accuracy and reproducibility.

Aerobno oksidativno halogeniranje tiolov s HCl/HBr v prisotnosti NH_4NO_3

LUKA HRIBERNIK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Marjan Jereb**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Zmanjšanje uporabe nevarnih reaktantov in topil, preprečitev nastanka nevarnega odpadka, varnejši procesi, večja atomska ekonomija, zmanjšanje stroškov, enostavnost procesa in uporaba obnovljivih virov so danes glavni cilji organske sintezne kemije. V svojem magistrskem delu sem razvil za okolje neškodljivo metodo za sintezo sulfonil halidov iz tiolov s HCl in HBr v prisotnosti amonijevega nitrata in kisika, ki pri reakciji nastopa kot terminalni oksidant. Amonijev nitrat je pri reakciji uporabljen kot vir dušikovih oksidov (NO/NO_2), ki so ključni v redoks katalitskem ciklu. Različno substituirane tiofenole, alifatske tirole in heteroaromatske tirole sem pretvoril v sulfonil kloride in bromide. Izvedel sem tudi reakcije nekaterih benzil tiolov s HBr v prisotnosti NH_4NO_3 in O_2 . Vse sintetizirane produkte sem izoliral in jih karakteriziral. Pri izolaciji produktov sem se izognil klasični ekstrakciji in kolonski kromatografiji in s tem zmanjšal porabo topil, ki običajno predstavljajo največji del odpadka. Na primeru dveh tiolov sem razvil sintezo sulfonamidov v eni posodi. Izvedel sem tudi eksperimenta aerobnega oksidativnega kloriranja in bromiranja s HCl in HBr v prisotnosti NH_4NO_3 v večjem merilu. Z dokazom nekaterih intermediarov, ki potencialno nastajajo v procesu, sem predpostavil mehanizem reakcije.

Aerobic Oxidative Halogenation of Thiols with HCl/HBr in the Presence of NH_4NO_3

LUKA HRIBERNIK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Marjan Jereb**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Reducing the use of hazardous reactants and solvents, prevention of generation of dangerous waste, safer processes, greater atom economy, cost reduction, simplicity of processes and the use of renewable resources are now the main targets in synthetic organic chemistry. In my thesis, I developed an environmentally friendly method for the synthesis of sulfonyl halides from thiols with HCl and HBr in the presence of ammonium nitrate and oxygen, which acts as a terminal oxidant in the reaction. Ammonium nitrate is used in the reaction as a source of nitrogen oxides (NO/NO_2), which are crucial in the redox catalytic cycle. Various substituted thiophenols, aliphatic thiols, and heteroaromatic thiols were converted to sulfonyl chlorides and bromides. The reaction of some benzyl thiols with HBr in the presence of NH_4NO_3 and O_2 was attempted. All synthesized products were isolated and characterized. Isolation of the products was performed by avoiding classical extraction and column chromatography, thereby reducing the use of solvents, which constitute a major part of the waste. I demonstrated a one-pot conversion of thiols into sulfonamides. I developed scale-up experiments for the preparation of sulphonyl chlorides and bromides. The proposed reaction mechanisms were also discussed with confirmation of some potential intermediates in the process.

Proučevanje funkcionalnega oblaganja zrnčic z vrtinčnoslojno tehnologijo

GAŠPER PISANEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Odon Planinšek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Matej Pavli**, Krka, d. d., Novo mesto

Kadar želimo acidobilno učinkovino zaščititi pred razpadom v želodcu, hkrati pa omogočiti ustrezeno sproščanje in absorpcijo v prebavnem traktu, lahko delce učinkovine ali končnih farmacevtskih oblik oblagamo z gastrorezistentnimi polimeri. V nalogi smo proučevali lastnosti in vpliv različnih gastrorezistentnih polimerov na sproščanje modelne učinkovine iz zrnc. Izdelanim filmom smo izmerili gostoto, pod optičnim mikroskopom vrednotili njihov videz in jim z diferenčno dinamično kalorimetrijo določili temperaturo steklastega prehoda. Pri filmih z večjim deležem mehčala smo vedno izmerili nižjo temperaturo steklastega prehoda kot pri filmih z manj mehčala. Pri tem sta bila polietilenglikol in trietylcitrat primerljiva, obenem pa sta bila veliko bolj učinkoviti mehčali kot ricinusovo in hidrogenirano ricinusovo olje. Z izbranimi polimeri smo izhodna zrna obložili z razprševanjem od zgoraj. Za preprečevanje granuliranja delcev in zmanjševanje izgub med oblaganjem je bistveno počasno razprševanje raztopine za oblaganje iz ustrezone bližine, na kar vpliva položaj šobe. Obloženim zrncem smo določili izgubo mase pri sušenju ter porazdelitev velikosti delcev, gostoto in videz oblog pod optičnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom. Po oblaganju smo opravili test gastrorezistence in vrednotenje sproščanja, pri čemer je bila gastrorezistenza ustrezena pri vseh zrcnih, sproščanje pa samo pri 100-odstotni debelini oblog iz obeh uporabljenih ftalatnih polimerov.

Studying Functional Coating of Granules with Fluid Bed Technology

GAŠPER PISANEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Odon Planinšek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Matej Pavli**, Krka, d. d., Novo mesto

When acid labile drugs must be protected from acidic conditions in the stomach in the dissolution and absorption, enteric polymer coating can be used. This work presents the study of various gastro-resistant polymers on the release of a model drug from coated granules. We evaluated polymer films by measuring the film's density, appearance and glass transition temperature. Higher concentration of plasticizer always resulted in lower glass transition temperature. Effects of polyethylene glycol and triethyl citrate on lowering glass transition temperature were comparable with one another and much bigger compared to castor oil and hydrogenated castor oil. We coated our granules with some of the studied polymers using top spray method. To avoid granulation and material loss during coating we had to ensure slow spraying with appropriate distance from particles, which can be modified by changes in nozzle position. We studied loss on drying, size distribution, density and optical and electron microscope images of coated granules and used these results to determine optimal coating parameters. After coating, we performed gastroresistance and drug release tests. All coated granules showed sufficient gastroresistance while only 100% thickness of both phthalate polymers provided required drug release profile.

Sinteza trimetilsililnih estrov karboksilnih kislin pod reakcijskimi pogoji brez topil

JANJA LAKNER, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Marjan Jereb**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Zaščita funkcionalnih skupin v molekulah je v sintezi kompleksnih organskih molekul še vedno nerešen problem. Uvedba trimetilsililne skupine v različno substituirane alifatske, aromatske in heterociklične karboksilne kisline ter aminokisline pod pogoji brez topil je pomemben postopek derivatiziranja, saj se sililna skupina v sistem enostavno in selektivno uvede z izbiro primerenega trimetilsililnega reagenta, v našem primeru heksametildisilazana. Reakcije so potekale v za okolje neškodljivih pogojih pri sobni temperaturi in brez uporabe organskih topil. Za lažji potek reakcij se je v nekaterih primerih kot katalizator uporabil jod. Pretvorbe so potekale z visoko stopnjo atomske ekonomije, saj sta v številnih primerih reagirali obe trimetilsililni skupini, tako da je bil odpadni produkt samo amonijak. Celoten postopek, vključno s čiščenjem produktov, je potekal brez topil, produkti so bili očiščeni z vakuumsko destilacijo brez predhodne uporabe kromatografije in karakterizirani z različnimi tehnikami. Izkoristki reakcij so bili dobrí do veliki. Estri TMS so v organski sintezi in kemiji antibiotikov pomembni intermediati, saj se skupina TMS zlahka odstrani že v zelo blagih pogojih. Uvedba skupine TMS v molekule kislin poveča njihovo hlapnost, tako da prej zelo polarne in nehlapne spojine po funkcionalizaciji postanejo hlapne ter primerne za analizo s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo.

Synthesis of Trimethylsilyl Esters of Carboxylic Acids under the Solvent-Free Reaction Conditions

JANJA LAKNER, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Marjan Jereb**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

The protection of functional groups has presented an issue in the synthesis of complex organic molecules. The introduction of the trimethylsilyl group into differently substituted aliphatic, aromatic and heterocyclic carboxylic acids and amino acids under solvent-free conditions is an important process of derivatization because the trimethylsilyl group is easily and selectively introduced into the system with the use of a suitable trimethylsilyl reagent – hexamethyldisilazane in our case. The reactions were carried out under environment-friendly conditions at room temperature without the use of organic solvents. To facilitate reactions, iodine was used in some cases as a catalyst. Reactions were carried out with a high degree of atom economy because both trimethylsilyl groups reacted in numerous cases, making ammonia the only waste product. The entire procedure including purification of the products was carried out without solvents, and products were purified by vacuum distillation without the use of chromatography and were characterized by different techniques. The yields in most reactions were good to high. TMS esters are important intermediates in organic synthesis and chemistry of antibiotics as the TMS group can be easily removed under very mild conditions. The introduction of the TMS group into the acidic molecules increases their volatility and the previously highly polar and non-volatile compounds become volatile after functionalization and suitable for analysis by gas chromatography and mass spectrometry.

Vgradnja magnetnih nanodelcev v modelne medicinske obloge za kombinirano zdravljenje kožnih oblik raka

KRISTJAN ORTHABER, MATEVŽ PRISTOVNIK, KRISTIJAN SKOK, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Mentor: **Uroš Maver**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Irena Ban**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Janja Stergar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Kožni rak je eno od najpogosteješih malignih obolenj. V svoji raziskavi smo žeeli pripraviti večslojne medicinske obloge za topikalno uporabo kot potencialno možnost zdravljenja kožnega raka. Ob tem smo žeeli zagotoviti varnost pripravljenih obloge in tudi pokazati, da material zdravilno učinkovino sprosti skladno z želeno aplikacijo na kožo. Za substrat smo pripravili 30 silicijevih nosilcev. Nato smo pripravili štiri raztopine, in sicer dve s polimeroma (PHEMA in PHPMA), eno z NaDOC in eno z DCF. Iz prvih treh smo naredili mešanico in v 2,5 ml dodali še 1 ml raztopine magnetnih nanodelcev (FePt). Z raztopinami in nosilci smo optimizirali način priprave tankih filmov v oblagalniku. Karakterizirali smo jih z IR-spektroskopijo in meritvijo stičnih kotov. S celično kulturo človeških fibroblastov smo izvedli preizkus biokompatibilnosti, z redukcijsko reakcijo tetrazolijeve soli MTT pa smo določili citotoksične učinke na celično kulturo. Sproščanje zdravilnih učinkov in meritev načina priprave tankih filmov v oblagalniku smo dokazali varnost in sposobnosti pripravljenih materialov za nadzorovan sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine.

Incorporation of Magnetic Nanoparticles in Medical Patches for Combined Pharmacotherapeutic Skin Cancer Treatment

KRISTJAN ORTHABER, MATEVŽ PRISTOVNIK, KRISTIJAN SKOK, Faculty of Medicine, University of Maribor

Supervisor: **Uroš Maver**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Co-supervisor: **Irena Ban**, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor,

Co-supervisor: **Janja Stergar**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Skin cancer is one of the most common cancers. In our research, we wanted to produce multi-layered wound dressings for topical use in advanced skin cancer treatment and confirm their safety as well as prove a consistent topical drug release. Firstly, the test substrates were 30 processed silica plates. Secondly, four solutions were prepared, two with polymers (PHEMA and PHPMA), one with NaDOC, and one with DCF. The first three were combined into a mixture, 2.5 mL of which was mixed with 1 mL of magnetic nanoparticle solution (FePt). Thirdly, these carriers and solutions were used in the optimisation of thin film preparation process in the spin coater. Lastly, these thin films were measured and analysed with the help of IR spectroscopy and contact angle measurements. Human fibroblast cell culture was used in the biocompatibility testing, while tetrazolium MTT salt reduction was used to determine the cytotoxic effects on the cell culture. *In vitro* release of the drug was measured, using an automated system of Franz's diffusion cells, and quantification using UV spectrophotometry. The performed functional tests have proven the material's safety and capability for controlled drug release.

Izdelava in vrednotenje delcev z dvojnim pH-odvisnim sproščanjem modelne spojine za enteralno aplikacijo suspenzije

ALJA RAČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Rok Dreu**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Namen naloge je bil razviti dostavni sistem, ki bi omogočal enteralno aplikacijo *ex tempore* pripravljene peroralne suspenzije z neutralnim pH prek hranilne sonde. Zagotoviti smo žeeli zakasnjeno sproščanje za kislo hidrolizo občutljivih učinkovin (npr. zaviralcev protonsko črpalk), hkrati pa ustrezno stabilnost farmacevtske oblike pred aplikacijo. Osnovna ideja je bila izdelava delcev z dvema oblogama s komplementarno pH-odvisno topnostjo. Zrnca smo izdelali s postopkom visokostržnega granuliranja, mikropelete in pelete pa z oblaganjem s tartrazinom, ki je nadomeščal učinkovino. Delce s tartrazinom smo potem v treh zaporednih stopnjah filmsko obložili v Wursterjevi komori z generatorjem vrtinčenja. Namen notranje oblage je bil zagotoviti gastrorezistenco, namen zunanje pa preprečiti raztopljanje v neutralnem mediju. Nekompatibilnost notranje in zunanje polimerne oblage smo preprečili z nanosom vmesne HPMC-oblage. Debelino nanesenih oblog smo ocenili z vrednotenjem porazdelitve velikosti delcev pred oblaganjem in po njem, funkcionalnost oblog pa s preizkusi sproščanja. Obložene delce smo nato oblikovali v peroralne suspenzije, ki smo jih kinetično stabilizirali s polimeri oziroma namenskimi mešanicami pomožnih snovi. Pri tem smo si pomagali z reološkimi meritvami in oceno hitrosti sedimentacije delcev. Za končno potrditev ustreznosti dostavnega sistema smo izbrane sestave suspenzij z obloženimi delci ocenili še z vidika enakomernosti odmerjanja in primernosti za aplikacijo z entralnimi hranilnimi sondami različnih dimenzij.

Preparation and evaluation of particles with double pH-dependant release of model compound for enteral application of suspension

ALJA RAČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Rok Dreu**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The research objective was to develop a delivery system which would allow enteral application of 'ex tempore' prepared oral suspension with neutral pH by using a nutritive probe. The idea was to prepare particles with two coatings with complementary pH dependent solubility. In this way, a delayed release of active substances sensitive to acidic hydrolysis (e.g. proton pump inhibitors) together with adequate pharmaceutical dosage form stability prior to application would be achieved. Granules were prepared via high shear granulation, micro pellets and pellets by coating with the model substance – tartrazine. Particles with tartrazine were then coated in three successive stages using a fluid bed – Wurster process chamber with a swirl generator. Interior coating provided gastro-resistance, while the exterior coating prevented dissolution in a neutral medium. Intermediate HPMC coating was applied as well. The thickness of the applied coatings was assessed by means of evaluating particle size distributions before and after coating, and the functionality of applied coatings by dissolution testing. Coated particles were then formulated into oral suspensions, which were kinetically stabilised with polymers or with dedicated mixtures of excipients. Rheological measurements and estimation of particles sedimentation rates were performed to select the suitable concentration of stabilisers. As a final confirmation of system suitability, suspensions were evaluated in terms of the uniformity of metered dosage units and in terms of suitability for application through the enteral nutritive probes of different sizes.

Določanje vsebnosti meglumina z derivatizacijo z natrijevim naftokinonsulfonatom in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

MATIC BERGANT, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Stane Pajk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Co-supervisor: **Jožko Cesar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Meglumin je aminosladkor, ki se v farmaciji uporablja za tvorbo soli s kislimi učinkovinami in kot pomočna snov. Pomemben je zlasti zato, ker lahko močno poveča vodotopnost nekaterih učinkovin in s tem vpliva na njihovo sproščanje in biološko uporabnost. Čeprav ima monografijo v vseh pomembnejših farmakopejah, v literaturi srečamo malo metod za določanje njegove vsebnosti v farmacevtskih formulacijah. V okviru magistrskega dela smo zato razvili novo metodo, ki temelji na avtomatski predkolonski derivatizaciji meglumina z natrijevim 1,2-naftokinon-4-sulfonatom ter nadaljnji ločitvi in detekciji nastalega derivata s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Kromatografsko metodo smo razvili na reverznofazni koloni. Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,05-odstotne vodne raztopine trifluoroacetne kisline in acetonitrila v razmerju 94 : 6, v/v. Pretok mobilne faze je bil 1,0 ml/min, voden je bil z gradientnim programom elucije. Čas izvedbe celotne metode, vključno z avtomatsko derivatizacijo in ekvilibracijo kolone, je bil 22 minut. Med optimizacijo pogojev derivatizacije smo proučevali vpliv vrste in pH pufrja ter temperaturo in čas reakcije na njeno hitrost, izkoristek in ponovljivost. Derivatizacijo smo izvajali v igli injektorja po programu, ki ga določi uporabnik, pri sobni temperaturi, s čakalnim časom 120 sekund, v fosfatnem pufru s pH 12,0. Z validacijo smo pokazali, da je metoda selektivna, linearna v območju 25–200 µg/ml ($R^2 = 0,996$), natančna (RSD = 3,4 %) in točna (93,7–98,4 %). Uspešno smo jo uporabili za določitev vsebnosti meglumina v treh registriranih zdravilih.

Determination of Meglumine by Derivatization with Sodium Naphthoquinone Sulfonate and High Performance Liquid Chromatography

MATIC BERGANT, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Stane Pajk**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Jožko Cesar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Meglumin is an amino sugar that is used as a counterion and excipient in pharmaceutical formulations. It increases solubility, dissolution and bioavailability of some active ingredients. Despite the presence of its monograph in all major pharmacopoeias there is a lack of analytical methods for determination of meglumine in pharmaceutical formulations. In the master thesis we have developed a new method based on automatic pre-column derivatization of meglumine with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate which is followed by separation and detection of derivatization product with high performance liquid chromatography. The separation was achieved on reversed phase column using a mobile phase with 0.05 % aqueous solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile in 94:6 (v/v) ratio. The flow rate was set to 1.0ml/min with gradient elution. The run time, including pre-column derivatization and column equilibration was 22 minutes. During the optimization of derivatization we studied the influence of temperature, buffer, pH and time on reaction speed, yield and repeatability. Automated in needle derivatization was applied using user defined program at room temperature in phosphate buffer with pH = 12.0. Wait time was set to 120 seconds. Validation has shown that the method is selective, linear in concentration range 25–200 µg/ml ($R^2 = 0.996$), precise (RSD = 3.4 %) and accurate (93.7 – 98.4 %). The method was successfully used for determination of meglumine in three commercially available pharmaceutical formulations.

Optimizacija procesa pretvorbe samomikroemulgirajočega sistema s karvedilolom v trdno obliko z metodo vrtinčnoslojnega granuliranja

VESNA PIRNAT, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Alenka Zvonar Pobirk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Matevž Luštrik**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Med raziskovalnim delom smo v predhodno razviti samomikroemulgirajoči sistem vključili slabo vodotopno zdravilno učinkovino karvedilol in jo z vrtinčnoslojnim granuliranjem pretvorili v trdno obliko. Najprimernejši trdni nosilec je bil Neusilin® US2, ki je omogočal doseganje velikih izkoristkov pri granuliraju in izdelavo granulatov z veliko vsebnostjo karvedilola. Vezivi PVP K90 in Pharmacoat® 606 sta omogočali dober nadzor nad granuliranjem, medtem ko je PVP K30 učinkovito inhibiral obarjanje karvedilola. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo potrdili odsotnost kristalinične oblike karvedilola v testiranih granulatih, s fotonsko korelačijsko spektroskopijo pa smo potrdili, da po redispersiranju iz izbranih granulatov spontano nastanejo (mikro)emulzije. S preizkusi sproščanja karvedilola iz izbranih granulatov smo tudi dokazali, da njegova vgradnja v samomikroemulgirajoči granulat omogoča bistveno izboljšanje raztopljanja karvedilola v primerjavi z njegovo kristalinično obliko.

Optimization of the Fluid Bed Granulation Process for Solidification of the Carvedilol-Loaded Self-Microemulsifying System

VESNA PIRNAT, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Alenka Zvonar Pobirk**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Matevž Luštrik**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

During the research work the carvedilol as an active pharmaceutical ingredient with low solubility was incorporated into a previously developed self-microemulsifying system and transformed into a solid form by the fluid bed granulation process. Neusilin® US2 was selected as the most appropriate solid carrier, which enabled the production of granulates with high carvedilol content at a high yield of the granulation process. PVP K90 and Pharmacoat® 606 binders enabled good control over the granulation process, while PVP K30 effectively inhibited carvedilol crystallization. Differential scanning calorimetry confirmed the absence of crystalline form of carvedilol in tested granulates, and photon correlation spectroscopy confirmed spontaneous formation of (micro)emulsions after re-dispersion of selected granulates. With dissolution tests it was confirmed that the formulation of self-microemulsifying granulate enables considerable improvement of carvedilol dissolution rate (and extent) in comparison with its crystalline form.

Razvoj in evalvacija predformulacijskih metod za napovedovanje stabilnosti trdnih disperzij, izdelanih s tehnologijo iztiskanja talin

MITJA POHLEN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Karl G. Wagner**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Bonnu

Vedno več novoodkritih zdravilnih učinkovin (ZU) ima slabe biofarmacevtske lastnosti, še posebej slabo topnost. Med metode za izboljšanje topnosti slabo topnih ZU spada tvorjenje trdnih disperzij, pri čemer je iztiskanje talin, poleg sušenja razprševanjem, izbirna metoda za farmacevtsko industrijo. Za razvoj formulacije z metodo iztiskanja talin, spremljanje sproščanja in stabilnosti so potrebne velike količine materiala. Da bi se temu izognili, smo se odločili razviti metodo, ki bi za napoved profilja sproščanja in stabilnosti trdnih disperzij uporabila miligramske količine materiala namesto gramov. Za izhodišče smo kot preparativno in analizno metodo izbrali diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), kot preparativno metodo pa metodo taljenja na steklenih nosilcih. Za vrednotenje fazne ločitve in rekristalizacije vzorca s časom shranjevanja smo izbrali DSC in polarizacijsko mikroskopijo. Preizkus sproščanja za izdelane vzorce smo izvedli z miniaturizirano napravo USP 2, pri čemer smo morali za vzorce DSC izdelati posebna držala, ki so preprečevala gibanje vzorca v posodi za sproščanje. Ugotovili smo, da se predformulacijska metoda taljenja na steklenih nosilcih najbolj približa metodi taljenja z iztiskanjem, tako po profilu sproščanja kot po napovedovanju stabilnosti. Z novo metodo je mogoče že z majhnimi količinami materiala predvideti dva parametra, stabilnost in profil sproščanja trdnih disperzij, proizvedenih z iztiskanjem talin, pri čemer je prihranek tako ekonomski kot časovni.

Development and Evaluation of Pre-formulation Studies for Predicting the Stability of Solid Dispersions Produced by Hot-Melt Extrusion

MITJA POHLEN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Karl G. Wagner**, Faculty of Pharmacy, University of Bonn

More and more newly discovered APIs have poor biopharmaceutical characteristics, especially poor solubility. To improve the solubility of the APIs, solid dispersions constitute a possible approach. For the pharmaceutical industry, hot-melt extrusion (HME) is, together with spray drying, the method of choice for producing solid dispersions. To develop a formulation with HME, assess the dissolution and stability, large quantities of materials are needed. To avoid that, we tried to develop a mini scale model for predicting the dissolution and stability behaviour of products produced with HME which would use milligrams instead of grams quantities. For the development of methods we used melting on glass as a preparative method and dynamic scanning calorimetry (DSC) as a preparative and analytical method. For assessing recrystallization and phase separation with storage we used polarized light microscopy and DSC. A miniaturized USP 2 apparatus was used for the dissolution testing. The DSC samples needed glass holders which were able to keep the DSC pan in a steady position in the dissolution vessel. The experiments have demonstrated that the preformulation method 'melting on glass' resembles the most the stability and dissolution behaviour of the products prepared with the HME method. With the newly developed method it is possible to predict the stability and dissolution behaviour of products made with HME with lower quantities of materials, which is beneficial both from the economic and time-saving perspective.

Karakterizacija polimernih pomožnih snovi z velikostno izključitveno kromatografijo in detekcijo na osnovi sisanja svetlobe

SANDRA JANČAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentorica: Simona Peterlin, Lek. d. d., Ljubljana

Velikostna izključitvena kromatografija z detekcijo na osnovi sisanja svetlobe (SEC-MALS) je ena izmed redkih absolutnih metod za karakterizacijo polimerov v raztopini. V kombinaciji s koncentracijskim detektorjem lomnega količnika med drugim omogoča določitev masnega povprečja molske mase, polidisperznosti in porazdelitve molske mase. V ogrodni tablet s funkcijo podaljšanega sproščanja učinkovine smo z metodo SEC-MALS, ki smo jo predhodno validirali, analizirali hidroksipropilmethyl celulozo (HPMC) in polivinilpirolidon (PVP). Potrdili smo, da je v tablet PVP tipa K25 ali K30. Ker je razlika med njunima povprečnima molskima masama majhna, bi morali za določitev točnega tipa PVP v tablet izboljšati metodo ločevanja in optimizirati metodo SEC-MALS. HPMC, ki smo ga izolirali iz ogrodne tablete, se glede na določeno masno povprečje molske mase in porazdelitev molske mase najbolj ujema s HPMC K15M.

Characterization of Polymer Excipients by Size Exclusion Chromatography and Light Scattering Based Detection

SANDRA JANČAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Simona Peterlin, Lek. d. d., Ljubljana

Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering (SEC-MALS) is one of the few absolute methods for characterization of polymers in solution. In combination with concentration refractive index detector, the method also allows us to determine the weight average of molecular weight, polydispersity and distribution of molecular weight. Polyvinylpyrrolidone (PVP) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in matrix tablets, whose property is extended release of the active ingredient, were analysed by using SEC-MALS method. The method was previously validated. We confirmed that the tablets contained PVP K25 or K30. In order to determine the exact type of PVP in the tablet, the method of separation and SEC-MALS method would have to be improved since the difference between their average molecular weight is small. HPMC, which was isolated from the matrix tablets, most closely matched the HPMC K15M in terms of the weight average of molecular weight and molecular weight distribution.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje zaviralcev monoaminooksidaz A in B na osnovi 1-(prop-2-in-1-il)piperidina

ANA DOLŠAK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Matej Sova, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Monoaminooksidaze (MAO) so encimi, ki katalizirajo oksidativno deaminacijo monoaminov. Poznani sta dve iziformi, MAO-A in MAO-B, ki imata pomembno vlogo pri različnih nevrodegenerativnih stanjih (npr. pri Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni). Načrtovali in sintetizirali smo 1-(prop-2-in-1-il)piperidinske analoge na osnovi že znanega zaviralca MAO-B 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina. Uporabili smo večstopenjsko sintezno pot in sintetizirali *cis*, *trans* ter reducirane analoge, pri čemer smo 4-fluorofenilni fragment zamenjali z različno substituiranimi fenilnimi in heteroaromaticskimi obroči. Sintetiziranim končnim spojinam smo z biokemijskim testiranjem na izoliranih rekombinantnih humanih MAO-A in MAO-B določili zaviralno aktivnost. Najmočnejša zaviralca na MAO-B sta bila (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin (31) in 1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)fenetyl)piperidin (32) z IC_{50} -vrednostma 18,6 nM in 10,9 nM. Ugotovili smo, da imajo *trans* in reducirani derivati na MAO-B primerljivo zaviralno aktivnost, ki je za 1 do 2 velikostna razreda močnejša od *cis* derivatov. Za najugodnejšo se je pokazala *para* substitucija na benzenu s halogenom, na podlagi česar lahko sklepamo, da tvori pomembne interakcije na aktivnem mestu encima. Zaključimo lahko, da sta spojini 31 in 32 pomembno izhodišče za nadaljnje raziskovanje novih močnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkov za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni.

Design, Synthesis and Evaluation of Inhibitors of Monoamine Oxidases A and B with 1-(prop-2-yn-1-yl) Piperidine Scaffold

ANA DOLŠAK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Matej Sova, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Monoamine oxidases (MAO) are enzymes, which catalyse oxidative deamination of monoamines. Two isoforms are known; MAO-A and MAO-B and play an important role in different neurodegenerative disorders (e.g. Alzheimer's and Parkinson's disease). We designed and synthesized 1-(prop-2-yn-1-yl) piperidine analogues on the basis of a known MAO-B inhibitor 4-(4-fluorostyryl)-1-propargylpiperidine. We used multi-step synthetic route and synthesized diverse set of *cis*, *trans* and reduced analogues, where 4-fluorophenyl fragment was replaced by differently substituted phenyl and heteroaromatic rings. We evaluated an inhibitory activity of synthesized final compounds biochemically on isolated recombinant human MAO-A and MAO-B. The most potent inhibitors were (*E*)-1-(prop-2-yn-1-yl)-4-(4-(trifluoromethyl)styryl)piperidine (31) and 1-(prop-2-yn-1-yl)-4-(4-(trifluoromethyl)phenetyl)piperidine (32) with IC_{50} values of 18.6 nM and 10.9 nM, respectively. We found that *trans* and reduced derivates show similar inhibitory activity on MAO-B, which is 1-2 fold higher compared to *cis* derivates. According to our assays *para* substitution with halogen on a benzene ring is preferred, probably due to important interactions with the enzyme's active site. To conclude, compounds 31 and 32 represent an important starting point for further research of novel potent MAO-B inhibitors as potential drugs for the therapy of neurodegenerative diseases.

Uporaba tekočinske kalorimetrije in kromatografije za analizo proteoma človeške krvne plazme

SANDI BRUDAR, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Iztok Prislan**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

V tem delu smo se osredotočili na proučevanje človeške krvne plazme, ki konstantno prezema vsa tkiva in je zato pomemben vir informacij o človekovem zdravju. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in imunoafinitetno kromatografijo (IAC) smo analizirali vzorce plazme bolnih posameznikov. S kolono anti-HSA smo iz vzorcev plazme uspešno odstranili človeški serumski albumin (HSA) in povečali prispevek manj pogostih proteinov v plazmi. S CD-spektroskopijo smo spremajali spremembe v sekundarni strukturi proteinov ob segrevanju vzorcev plazme. Učinkovitost imunoekstrakcije HSA smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE). Pokazali smo, da se termogrami plazme bolnih posameznikov signifikantno razlikujejo od termograma plazme zdravih posameznikov. Z uporabo DSC smo nedvoumno pokazali, da je topotna denaturacija HSA kinetično voden proces. Topotno inducirane strukturne prehode HSA smo potrdili tudi s CD-spektroskopijo. Za opis kinetično vodene denaturacije HSA smo modifirali predhodno razvit model, na podlagi katerega smo pri različnih hitrostih segrevanja z enim setom parametrov modelno funkcijo zadovoljivo prilegali eksperimentalno pridobljenim termogramom.

Application of Liquid Calorimetry and Chromatography in Analysis of Human Blood Serum Proteome

SANDI BRUDAR, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: **Iztok Prislan**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

In this work we have focused on the investigation of human blood plasma, which constantly perfuses all tissues, and thus serves as an important source of information about human health. We have used differential scanning calorimetry (DSC) and immunoaffinity chromatography (IAC) to analyze plasma samples of diseased individuals. With the application of an anti-HSA column, we have successfully depleted human serum albumin (HSA) from plasma samples and enhanced the contribution of less abundant proteins in plasma. CD-spectroscopy was used for monitoring protein secondary structure changes during heating of plasma samples. The efficiency of HSA immunoextraction was verified by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). We have shown that plasma thermograms of diseased individuals differ significantly from a thermogram of healthy individuals. With the use of DSC we have demonstrated that heat denaturation of HSA is a kinetically guided process. Heat induced structural transitions of HSA were also proven with CD-spectroscopy. In order to describe the kinetically driven denaturation of HSA, we modified a previously developed model according to which we managed to fit our model function to experimentally obtained thermograms at different heating rates.

Vpliv natrijevega lavrilsufata in polisorbata 20 na sproščanje natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet

MONIKA TONEJC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorka: **Marija Bogataj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorka: **Tjaša Felicijan**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

V nalogi smo raziskovali vpliv natrijevega lavrilsulfata (SDS) in polisorbata 20 (Tween® 20) na sproščanje natrijevega diklofenakata (Na-DF) iz ogrodnih tablet s hipromelozo (HPMC) v medijih pri majhnih pH-vrednostih (3, 4 in 5). Delež Na-DF, sproščenega iz tablet pri koncentracijah površinsko aktivnih snovi (PAS) nad kritično micelarno koncentracijo, je naraščal s povečanjem koncentracije PAS (SDS ali Tween® 20). V medijih z dodanim SDS-om se je pri enakih koncentracijah PAS sprostilo več Na-DF kakor v medijih z dodanim Tweenom® 20. Pri zviševanju pH medija se je topnost Na-DF zaradi večjega deleža ionizirane oblike povečevala, posledično se je povečeval tudi delež sproščenega Na-DF iz tablet. Obe testirani PAS sta bili pri sproščanju najbolj učinkoviti v mediju pri pH 3, kjer je diklofenak zelo slabo topen, prek vključitve v micle PAS pa se njegova topnost poveča, kar posredno vpliva tudi na povečanje deleža Na-DF, sproščenega iz tablet. Pri povečevanju topnosti Na-DF je bil Tween® 20 boljši kakor SDS, sproščanje Na-DF pa je SDS bolj pospešil kakor Tween® 20. SDS prek interakcije s HPMC-jem pospešuje erozijo in zavira nabrekanje ogroda, kar je lahko vzrok, da se iz tablet v medijih z SDS-om sprosti večji delež Na-DF kot v medijih z Tweenom® 20.

The Effect of Sodium Lauryl Sulfate and Polysorbate 20 on the Release of Diclofenac Sodium from Matrices

MONIKA TONEJC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Tjaša Felicijan**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The objective of this study was to evaluate the effect of sodium lauryl sulfate (SDS) and polysorbate 20 (Tween® 20) on the release of diclofenac sodium (Na-DF) from matrices with hyromellose (HPMC) in media with low pH values (3, 4 and 5). The percentage of released Na-DF from the tablets at surfactant concentrations above critical micellar concentration increased with increased surfactant concentrations (SDS or Tween® 20). At the same surfactant concentrations in the media with SDS, more Na-DF was released than in those with Tween® 20. With increased pH of media, the solubility of Na-DF increased as there was more ionized form of Na-DF, hence the amount of Na-DF released from the tablet also increased. Both surfactants (SDS and Tween® 20) were most efficient in media with pH value 3 as the diclofenac was poorly soluble and thus through incorporation in micelles its solubility increased, which resulted in increased Na-DF release from the tablets. In presence of Tween® 20, the solubility of Na-DF was much higher compared to the solubility in media with SDS, while the percentage of Na-DF released from tablets was higher in media with SDS. SDS might have interacted with HPMC which increases HPMC matrix erosion and slows the swelling, which could account for an increased amount of Na-DF released from the tablet in media with SDS compared to media with Tween® 20.

Uporaba hidrokinonskih nanodelcev pri razvoju fluorescentnega nanosenzorja za detekcijo nizkih koncentracij Pb²⁺ ionov

NIKA ŽURGA, EVA KERČMAR, II. gimnazija Maribor
Mentorka: Zdenka Keuc, II. gimnazija Maribor

Namen najine raziskovalne naloge je bil proučiti, ali so nanodelci, sintetizirani iz difenolnih spojin, primeren indikatorski sistem za merjenje koncentracije svinčevih (Pb²⁺) ionov v vodnih raztopinah. Zanimala sta naju učinkovitost sinteze nanodelcev s pomočjo mikrovalovne pečice in vpliv različnih pogojev na uspešnost sinteze (razmerja reaktantov, čas in moč segrevanja, vrsta organskega prekurzorja, vpliv thioureje), z namenom, da bi v prihodnje razvili nanosenzor za detekcijo ionov težkih kovin v nizkih koncentracijah. Rezultati so pokazali, da so fluorescentni hidrokinonski nanodelci obetaven senzorski sistem, ki pa ga je treba še optimizirati in preveriti njegovo okoljsko sprejemljivost.

Usage of Hydroquinone Nanoparticles in the Development of a Fluorescent Nanosensor for Detecting Low Concentrations of Pb²⁺ Ions

NIKA ŽURGA, EVA KERČMAR, II. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: Zdenka Keuc, II. Gimnazija Maribor Grammar School

The purpose of our research work was to find out whether nanoparticles synthesised from diphenolic compounds are an appropriate indicator system for measuring the concentration of lead (Pb²⁺) ions in water solutions. We were interested in the efficiency of the synthesis of nanoparticles with the help of a microwave oven, and in the influence of different conditions on success of the synthesis (ratios of reactants, time and power of heating, the type of organic precursor, the influence of thiourea), with the purpose of developing a nanosensor for detection of low concentrations of heavy metal ions. The results have shown that the fluorescent hydroquinone nanoparticles are a promising indicator system, however it still needs to be optimised and its environmental impact has to be tested.

Načrtovanje nevrološko relevantnih inhibitorjev vnetnih procesov, vpletenih v nevodegenerativne bolezni

KAJA KLEMENC, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana
Mentorka: Petra Sušjan, Kemijski inštitut, Ljubljana
Somentorka: Darja Silan, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Za nevodegenerativne bolezni sta značilna degeneracija in odmiranje živčnih celic. Zaradi kronične izpostavljenosti proteinskim agregatom, ki se nalagajo v centralnem živčevju, se namreč v celicah mikroglia v možganih aktivira vnetni proteinski kompleks inflamasom NLRP3, kar se odraži v sproščanju citokinov in drugih nevrotoksičnih snovi. V raziskovalni nalogi smo načrtovali nevrološko relevantne inhibitorje inflamasoma NLRP3 ter testirali učinkovitost njihove inhibicije, zmožnost njihove internalizacije v celice in njihovo prehajanje krvno-možganske pregrado. Načrtovali smo dva peptidna inhibitorja s sekvcencama za prehod krvno-možganske pregrade Angiopep in Antennapedia. Celicam mikroglia smo aktivirali inflamasom NLRP3 ob prisotnosti peptidnih inhibitorjev, nato pa spremljali koncentracijo izloženega citokina IL-1β. Določali smo tudi viabilnost nevronov v kokulturi s celicami mikroglia, ki smo jim v prisotnosti peptidnih inhibitorjev stimulirali inflamasom NLRP3. S pomočjo konfokalnega mikroskopa in barvila, konjugiranega na peptidne inhibitorje, smo ugotavljali, ali inhibitorji preidejo membrano celice, s pomočjo poskusa na miših pa, ali prehajajo krvno-možgansko pregrado. Načrtovani peptidni inhibitorji so imeli inhibitorni učinek na izločanje IL-1β. Povečali so viabilnost nevronov v kokulturi s celicami mikroglia z aktiviranim inflamasom NLRP3. Celice mikroglia peptidne inhibitorje učinkovito internalizirajo, prav tako pa so inhibitorji sposobni prečkatи krvno-možgansko pregrado. Raziskava predstavlja podlago za razvijanje strategij inhibicije inflamasoma NLRP3 v centralnem živčevju in mehanizmov njegove dostave v možgane.

Design of Neurologically Relevant Inhibitors of the Inflammatory Processes Involved in Neurodegenerative Diseases

KAJA KLEMENC, Gimnazija Jože Plečnik Grammar School
Supervisor: Petra Sušjan, National Institute of Chemistry Ljubljana
Co-supervisor: Darja Silan, Gimnazija Jože Plečnik Grammar School

Neurodegenerative diseases are characterized by the degeneration and death of neurons. An important role in the development of these diseases is played by the excessive activation of the immune system. Due to the chronic exposure to protein aggregates which accumulate in the central nervous system, a multiprotein complex NLRP3 inflamasome is activated which results in the release of cytokines and other neurotoxic species. Here we aimed to design neurologically relevant inflamasome NLRP3 inhibitors and test their inhibitory capacity. We also investigated the efficiency of their internalization into microglia cells as well as their penetration through the blood-brain barrier. For this purpose we designed two inhibitory peptides with Angiopep and Antennapedia domains for crossing the blood-brain barrier. The NLRP3 inflamasome was activated in the microglial cells in the presence of the designed inhibitory peptides, followed by the measurement of the IL-1β cytokine produced by the cells. We analysed the viability of neurons in the coculture with microglia cells with the peptide-mediated inhibition of the NLRP3 inflamasome. Using a microscope and fluorophore conjugated to peptides we determined whether the peptide is able to cross the cell membrane and the blood-brain barrier. The designed peptides decreased the concentration of IL-1β. Through the inhibition of the NLRP3 inflamasome they increased the viability of neurons in coculture with microglia cells. They effectively crossed the cell membrane and the blood-brain barrier. The results of our research provide the basis for developing new strategies for the inhibition of the NLRP3 inflamasome in the central nervous system, as well as for developing mechanisms of delivery to the brain.

Možnosti prenosa MRSA z rejnih živali na ljudi

BENJAMIN BOŽIČ, TJAŠA ŠENTJURC, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorice: Majda Golob, Mateja Pate, Irena Zdovc, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorji: Gašper Jan Simon, Nada Udovč Kneževič, Irena Štrumbelj Drusany, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Bakterija *Staphylococcus aureus* je del normalne mikrobiote, ki naseljuje kožo ter sluznice ljudi in živali, povzroča pa lahko tudi različne okužbe, vključno s sepsom. Posebej problematični so proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* (MRSA, angl. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), ki so odporni proti betalaktamskim antibiotikom. Pri ljudeh lahko glede na način okužbe seve MRSA razvrščamo v tri skupine. Najprej so bili sevi MRSA poznani le kot povzročitelji bolnišničnih okužb (HA-MRSA, angl. Hospital Associated), kasneje pa so se pojavili tudi v okolju izven bolnišnic (CA-MRSA, angl. Community Associated, in LA-MRSA, angl. Livestock Associated). Sevi LA-MRSA lahko kolonizirajo tudi domače živali, namenjene za prehrano, predvsem prašiče, kar lahko predstavlja potencialni vir okužbe za ljudi. V projektnem delu smo iskali možne poti prenosa bakterij MRSA med rejnimi živalmi in njihovimi lastniki. Ljudi in živali smo vzorčili na različnih kmetijah, predvsem tistih, kjer je bil vsaj eden izmed članov koloniziran ali hospitaliziran zaradi okužbe z LA-MRSA. Vsem izolatom MRSA smo določili njihov vzorec odpornosti proti antibiotikom ter z molekularnimi metodami določili tip spa. Predvidevamo, da so prašiči verjeten vir okužbe, vendar pa lahko tudi sklepamo, da se sevi LA-MRSA že širijo med ljudmi.

Possible Transmissions of MRSA from Livestock to Humans

BENJAMIN BOŽIČ, TJAŠA ŠENTJURC, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisors: Majda Golob, Mateja Pate, Irena Zdovc, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisors: Gašper Jan Simon, Nada Udovč Kneževič, Irena Štrumbelj Drusany, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Staphylococcus aureus is a widespread bacterium, which represents a part of the natural microflora and colonizes the nasal mucosa of humans and animals, but can also cause different ulcerated infections or even sepsis. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in humans poses a greater health issue, mostly as the cause of hospital infections. MRSA strains are divided into several groups. Until recently, MRSA was only known as the cause of hospital infections (HA-MRSA – Hospital Associated), but for the past few years, these bacteria have been increasingly spreading into the environment outside hospitals (CA-MRSA – Community Associated and LA-MRSA – Livestock Associated). LA-MRSA strains are commonly present in domestic animals, where they represent a possible threat to human infections. The problem is also their presence in animals reared for food, such as pigs. The aim of our project was to search for possible ways of transmission of MRSA from animals to their owners. We collected the samples from various farms in Slovenia, whose owners were recently hospitalized and positive for LA-MRSA. Using microdilution tests, we determined bacteria's resistance to antibiotics and with molecular tests determined their spa-types. We assume that pigs are the possible source of infection; however, we can also conclude that the strains of LA-MRSA may spread among people as well.

Primerjava klasičnih kemijskih pristopov in pristopov z uporabo biokatalizatorjev na izbranih modelih spojin pri kemijskih pretvorbah

NIKA ZUPANČIČ, ZALA KINK, NIKA BRULC, Gimnazija Novo mesto
Mentorja: Silvo Zupančič, Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto
Somentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

V nalogi smo proučevale derivate aminokislín, in sicer N-substituirane estre aminokislín L-valina in L-norvalina. Ti derivati so zelo pomembni v kemijski sintezi in tudi v sintezi zdravilnih učinkovin. Cilj naloge je bil izvesti hidrolizo estrskie skupine navedenih aminokislinskih derivatov z uporabo klasične kemijske metode hidrolize pod bazičnimi pogoji in z uporabo encimov. Pri klasični metodi smo hidrolizo izvajali z raztopino natrijevega hidroksida in proučevali pretvorbo ter nato izolirali produkte. Reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC), produkte pa smo ovrednotili z različnimi analiznimi metodami, kot so infrardeča spektroskopija (IR), optični zasuk, temperatura talisa in HPLC. Iste izhodne spojine smo uporabili tudi pri encimskih pretvorbah. Uporabili smo encime hidriolaze, pretvorbe pa tako kot pri kemijskih pretvorbah spremljali s TLC. Najbolj nas je zanimala stereoselektivnost obeh metod, saj smo kot izhodne spojine vzeli optično čiste spojine in tudi racemate derivatov aminokislín. Pri kemijskih pretvorbah nismo zaznali stereoselektivnosti, medtem ko smo s pomočjo encimov dosegli določeno stopnjo stereoselektivnosti. To je ključna prednost encimskih postopkov pred kemijskimi postopki. Na ta način namreč lahko izvajamo ločevanje enantiomer iz racemne zmesi izhodne spojine. S kemijskimi metodami je to zelo težaven in drag postopek.

Comparison of Classical Chemical Approaches and Approaches with Use of Biocatalysts on Selected Models of Compounds During Chemical Conversions

NIKA ZUPANČIČ, ZALA KINK, NIKA BRULC, Gimnazija Novo mesto Grammar School
Supervisors: Silvo Zupančič, Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto
Co-supervisor: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto Grammar School

In our paper we have examined derivatives of amino acids such as S-substituted esters of amino acids L-valine and L-norvaline. These derivatives of amino acids are very important in chemical synthesis and in active substances. Our goal was to perform the hydrolysis of ester groups on derivatives of amino acids mentioned before by applying classical chemical methods of hydrolysis under basic conditions and with the help of enzymes. In classical methods of hydrolysis, we performed hydrolysis with a solution of NaOH and we studied its conversion and afterwards we isolated the products. We followed the reactions with thin-layer chromatography (TLC) and evaluated the products with different analytical methods such as: infrared spectroscopy (IR), optical switch, melting temperature and HPLC. We used the same starting compounds in the enzyme conversion. We used enzyme hydrolysis. We followed the conversion with thin-layer chromatography. We were most interested in the stereoselectivity of both methods because the starting compounds were optically clean and racemats of derivatives of amino acids. We did not detect any stereoselectivity when using the classical chemical methods, but we did reach a certain level of stereoselectivity with enzymes. This is a key advantage of enzymes because in this way we can separate the compounds from racemats of derivatives of amino acids. With classical chemical methods this procedure is very complex and expensive.

Optimizacija in uporabnost metode za identifikacijo cianobakterij v okoljskih vzorcih na osnovi DNA

LUKA PETRAVIĆ, EVGENIJA BURGER, LUCIJA MARZEL DJURANOVIČ, Gimnazija Novo mesto
Mentorja: Marko Dolinar, Mojca Juteršek, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: Tanja Gačnik, Gimnazija Novo mesto

Cvetenje cianobakterij je pogosto povezano z izločanjem toksinov, zato je pomembno, da pravočasno identificiramo morebitne strupene vrste cianobakterij. Cilja našega raziskovanja sta bila priprava hitrega, zdravju neškodljivega in učinkovitega protokola za izolacijo DNA iz cianobakterijskih celic ter postavitev smernic za identifikacijo posameznih cianobakterijskih vrst na osnovi analize DNA. Optimizirali smo protokol za hrambo vzorcev, izolacijo DNA in pomnoževanje regij rRNA 16 S in ITS-1 na kromosomu. Večjo natančnost kot z določitvijo velikosti pomnoženih regij smo pri določanju heterogenosti cianobakterijskih vzorcev dosegli z restriktivno analizo PCR-prodiktov in določitvijo nukleotidnega zaporedja. Kot najbolj uporabne restriktivne nukleaze smo identificirali EcoRI, Ncol, EcoRV, KpnI in BclI. Ugotovili smo, da so začetni oligonukleotidi, namenjeni za rabo pri pomnoževanju nukleotidnih zaporedij cianobakterij, pomnožili tudi nekatera evkarionska zaporedja. Pripravili smo zgledne primere restriktivne analize pomnoženih genomskeh regij za identifikacijo dveh cianobakterij. Za vzorec z Blejskega jezera smo ugotovili, da je bila regija ITS-1 identična kot pri sevu *Planktothrix rubescens* NIVA_CYA18.

Optimisation and Applicability of a DNA-Based Method for Identification of Cyanobacteria in Environmental Samples

LUKA PETRAVIĆ, EVGENIJA BURGER, LUCIJA MARZEL DJURANOVIČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School
Supervisors: Marko Dolinar, Mojca Juteršek, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Co-supervisor: Tanja Gačnik, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Cyanobacterial blooms are often linked to the secretion of harmful cyanotoxins, which makes the identification of toxic cyanobacterial species very important. The goal of our research was to develop a fast, harmless and efficient protocol for DNA isolation from cyanobacterial cells and to set up general guidelines for identification of individual cyanobacterial species based on the DNA analysis. In an extensive optimization procedure, we have prepared an improved protocol for sample storage, DNA isolation and amplification of 16S rRNA and ITS-1 chromosomal regions. To improve the assessment of sample heterogeneity, we performed the restriction analysis of PCR products and DNA sequencing of amplified genomic regions. We identified EcoRI, Ncol, EcoRV, KpnI and BclI as the most useful restriction endonucleases. In addition, we observed that primers that were supposed to be cyanobacteria-specific could amplify genomic regions of some eukaryotic organisms. We have shown two exemplary cases of restriction analysis of amplified cyanobacterial genomic regions. We have established for the sample taken from the Lake Bled that the ITS-1 region was identical to the one in the strain *Planktothrix rubescens* NIVA_CYA18.

Biokompatibilnost kovinskih materialov kot ortopedskih vsadkov in njihov vpliv na človeško telo

ANA MILOŠEV, Gimnazija Jurija Vege Idrija
Mentor: Andrej Cör, Ortopedska bolnišnica Valdoltra
Somentorica: Magdalena Klasinc, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Prvi in poglaviti pogoj za vstavljanje določenega materiala v človeško telo je njegova biokompatibilnost. V raziskovalni nalogi sem biokompatibilnost določila s korozionsko odpornostjo in citotoksičnostjo materiala. Izbrana materiala, ki se najpogosteje uporablja za izdelavo stegnenične glavice, sta kobalt-kromova zlitina in nerjavno jeklo. Kot pozitivno kontrolo sem pri preizkusu biokompatibilnosti uporabila še baker, za katerega je znano, da je citotoksičen in nezadostno korozionsko odporen. Pri testiranju biokompatibilnosti sem uporabila Ringerjevo raztopino, ki je mešanica anorganskih soli. Korozionsko odpornost materialov sem preverila z elektrokemijskimi metodami, njihovo citotoksičnost pa s testom v celični kulturi celic podobnim osteoblastov. Preverila sem tudi, ali lahko kovinske ione v fiziološki raztopini zaznam z enostavno metodo, tj. z dodatkom indikatorjev in ob uporabi spektroskopske metode. Zanimalo me je tudi realno obnašanje materiala v telesu, zato sem analizirala določeno skupino odstranjenih kolčnih vsadkov skupaj z biološkim materialom. Izbrana materiala sta bila ponovno nerjavno jeklo in kobalt-kromova zlitina. Poškodbe na kovinskih komponentah sem analizirala s konfokalnim mikroskopom. Histološka analiza vzorcev tkiva pokaže prisotnost kovinskih delcev, ki dokazujejo, da se kolčne proteze v našem telesu obrablajo. Zanimal me je odziv celic glede na vrsto materiala. Z metodami za detekcijo kovinskih ionov sem lahko potrdila, da kovinske glave umetnega sklepa v svojo okolico res oddajajo ione.

Biocompatibility of Metal Materials as Orthopaedic Implants and Their Effect on the Human Body

ANA MILOŠEV, Gimnazija Jurij Vega Idrija Grammar School
Supervisor: Andrej Cör, Valdoltra Orthopaedic Hospital
Co-supervisor: Magdalena Klasinc, Gimnazija Jurij Vega Idrija Grammar School

Biocompatibility is the first requirement for the implantation of a metallic material in the human body. Biocompatibility was determined by corrosion resistance and cytotoxicity of the material. The selected materials – cobalt alloy (CoCrMo) and stainless steel – are one of most frequently used materials for artificial hip joints. Copper was used as a positive control as it is known to be cytotoxic and insufficient when it comes to corrosion resistance. The testing of biocompatibility was carried out in Ringer's solution, which is a mixture of inorganic substances. Corrosion resistance was tested using electrochemical methods, whilst cytotoxicity was tested using an extract method in a cell culture of osteoblast-like cells. A simple method, i.e. addition of indicators and UV/vis spectroscopy, was explored for the detection of metal in a solution. We were also interested in the behaviour of a material in the human body. The specific group of retrieved artificial hip joints was analysed together with the biological material. The chosen materials were again CoCrMo and stainless steel. A confocal microscope was used to analyse the damage on the retrieved metal components. A histological analysis of periprosthetic tissue has identified metal particles due to joint wear. We were interested in whether the response of cells is affected by the type of metal cells were exposed to. By using methods for detection of metal ions, we were able to confirm that iron and cobalt ions are released during immersion in the physiological solution.

Preučevanje nastajanja biofilma v vodovodni vodi Gimnazije Novo mesto v odvisnosti od časa, hrane in materialov

TJAŠA GRABNAR, LARISA GRUBIČ, LUKA KUNEJ, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Maja Florjanič, Krka, d. d., Novo mesto

Somentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

V zadnjem času se veliko govorji o nevarnosti mikrobioloških kontaminacij, ki jih povzroča biofilm. Med drugim se ta nalaga tudi na medicinskih pripomočkih in v vodovodnih cevih, zaradi zaščitne zunanje plasti pa ga je zelo težko odstraniti. Z običajnimi mikrobiološkimi testi za pitno vodo zaznavamo le mikroorganizme v planktonski obliki. Tako je lahko voda po običajnih merilih čista, vendar obstaja možnost, da se na vodovodnih cevih nabira biofilm, ki pa ga ne zaznamo. Nevaren postane takrat, ko se začnejo bakterije odcepljati z njega v vodo, zato je ključnega pomena poznavanje strukture in delovanja biofilma ter odkrivanje novih in učinkovitejših metod za njegovo odstranjevanje. V nalogi smo v mikrobiološkem laboratoriju vzgojili biofilm na kupončkih, nato pa smo ugotavljali hitrost njegovega nastajanja v vodi in na kupončkih in vpliv vodi dodane saharoze na njegovo rast ter primerjali hitrost nastajanja na različnih materialih. Z nekaterimi analizami smo preverili tudi mikrobiološko in kemijsko kakovost vodovodne vode iz Gimnazije Novo mesto, ki smo jo uporabili pri vseh eksperimentih s kupončki. Pri poskusih, povezanih z nastajanjem biofilma, smo z membransko filtracijo mikroorganizme ločili iz vode, da smo jih kasneje lahko presteli. Pri prvi seriji smo ugotovili, da biofilm nastane šele po treh dneh. Pri poskusu s saharozo smo prišli do spoznanja, da ta močno vpliva na hitrost nastajanja biofilma. V zadnjih serijah z različnimi materiali je največ klic nastalo na PVC-ju, ki je zaradi sproščanja organskih molekul hrana za mikroorganizme, najmanj pa na pocinkanem litoželezu.

Study of Biofilm Growth in Water from Gimnazija Novo mesto Grammar School Dependent on Time, Food and Materials

TJAŠA GRABNAR, LARISA GRUBIČ, LUKA KUNEJ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Maja Florjanič, Krka, d. d., Novo mesto

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

Recently there is a lot of talk about the danger of microbiological contamination caused by biofilm. It can also pile up in medical devices and water pipes, and because of the protective outer layer it is very hard to remove. We can detect only microorganisms in a planktonic form with typical microbiological tests for drinking water. So the water can be clean according to normal criteria, but there is a possibility that biofilm is piling up in water pipes that we do not detect. It becomes dangerous when the bacteria start to migrate from the biofilm into the water; therefore, it is crucial to know the structure and functioning of a biofilm and also to discover new and more efficient methods for its removal. During our research we grew the biofilm on coupons in a microbiological laboratory; afterwards we determined the speed of its formation in water and on coupons, established the effect of added sucrose in water on its growth, and compared the speed of its formation on various materials. With some analyses we also checked microbiological and chemical quality of the water from the Gimnazija Novo mesto Grammar School, which was used in all experiments involving coupons. With experiments related to the formation of the biofilm, we separated microorganisms from the water with membrane filtration, so we could later count them. In the first series we have found that the biofilm is formed after three days. In the experiment with sucrose, we came to the realization that it strongly influences the speed of its formation. In the last series with different materials we counted the highest number of bacteria on PVC, because it represents food for microorganisms due to release of organic molecules, and the least on galvanized cast iron.

Uporaba *CalB* pri kiralni ločbi R/S-1-(1-naftil)etanola

NASTJA MEDLE, LAURA MEDVED, BARBARA JAKLIČ, Gimnazija Novo mesto

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

Somentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

Na področju sinteze optično čistih aktivnih farmacevtskih učinkovin so se z rastočim področjem encimske katalize v kombinaciji s kemijo odprle nove možnosti. Encimi so izrazito regio- in enantioselektivni, reakcije z njimi pa cenovno konkurenčne in za okolje neškodljive. V raziskovalni nalogi smo izvedli kiralno ločbo sekundarnega alkohola. Iz racemne zmesi R/S-1-(1-naftil)etanola smo z uporabo encima *CalB* in donorja acilne skupine vinil acetata v šaržnem reaktorju proizvedli S-1-(1-naftil)etanol ter (R)-ester. Encim *CalB* je zaradi svojih lastnosti svojevrsten fenomen med tehnološkimi encimi. V vodnih medijih deluje v smeri hidrolize, v nevodnih pa v obratni smeri, med drugim katalizira preestritvene reakcije, kar smo uspešno pokazali tudi v nalogi. Primerjali smo kinetiko reakcije z immobiliziranim in neimmobiliziranim encimom *CalB*, preverili možnost večkratne uporabe immobiliziranega encima ter pripravili izhodišča za izvedbo istega procesa tudi v pretočnem reaktorju. Z analizo rezultatov smo ugotovili, da je bila najučinkovitejša pretvorba z immobiliziranim *CalB*, in sicer tudi pri njegovi ponovni uporabi. Reakcijska mešanica je homogena, sprememb reoloških lastnosti nismo zaznali, zato sklepamo, da lahko s pretočnim reaktorjem pripravimo proces, ki bo učinkovitejši od šaržnega sistema.

Use of *CalB* in Chiral Resolution of R/S-1-(1-naphthyl) Ethanol

NASTJA MEDLE, LAURA MEDVED, BARBARA JAKLIČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

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

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

A growing field of enzymatic catalysis combined with chemistry are provided with a large variety of new options for the synthesis of optically pure active pharmaceutical ingredients. Enzymes are highly regio- and enantioselective, their reactions are price competitive and also environmentally friendly. In our research we performed the catalysed kinetic resolution of the secondary alcohol, in which we have produced S-1-(1-naphthyl)ethanol and (R)-ester from a racemic mixture of the R/S-1-(1-naftil)ethanol by using the enzyme *CalB* and the acyl group of vinyl acetate donor in a batch reactor. The *CalB* enzyme is a unique phenomenon among the technological enzymes due to its characteristics. In water solvents it works in the direction of hydrolysis, while in non-aqueous mediums it works in the opposite direction; it, inter alia, catalyses transesterification reactions which was successfully demonstrated in our experimental work. We made a comparison between the reaction kinetics with the immobilized and non-immobilized *CalB* enzyme; furthermore, we analysed the possibility of multiple usage of the enzyme and designed a basis for the performance of these process in the flow reactor. The analytical results confirmed that the immobilized *CalB* was more effective also when reused. The reaction mixture was homogenous; we could observe no rheological changes; therefore, we assume that we could prepare a potentially more effective process in the flow reactor.

Vpogled v učinek točkovne mutacije monoamino oksidaze B; ali lahko multiskalne simulacije razložijo nevropsihiatricne motnje?

DOMEN PREGELJC, Gimnazija Vič

Mentorji: Urška Jug, Jernej Stare, Janez Mavri, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: Alenka Mozer, Gimnazija Vič

Predstavljam računsko študijo vpliva točkovne mutacije Y326I na hitrost delovanja encima monoaminooksidaze B (MAO B) pri razgradnji fenilethylamina (PEA). Encim MAO B katalizira razgradnjo biogenih monoaminov, nevrotransmiterjev in nevromodulatorjev, pa tudi sintetičnih amfetaminov in sorodnih psihohaktivnih molekul. Neuravnoveženo delovanje encimov MAO se odraža v obliki nevropsihiatricnih in nevrodegenerativnih bolezni. Pri regeneraciji encima se sprošča vodikov peroksid, ki povzroča nepopravljive poškodbe nevronov. Razumevanje teh procesov na molekularni ravni je ključno za razvoj zdravil in diagnostike. Za napoved aktivnosti mutiranega encima smo uporabili najsodobnejše tehnike molekularne simulacije, tudi metodo empirične valenčne vezi (EVB), in izračunali profile proste energije. Ugotovili smo, da se ob mutaciji Y326I aktivnost encima v primerjavi z nativnim encimom zmanjša približno za 6-krat. Izračun se zelo dobro ujema z eksperimentalnimi ugotovitvami. Naša študija potrjuje, da se lahko simulacije uporabijo za napoved delovanja večjega števila encimov. Informacije o učinkih mutacije, ki jih dobimo iz simulacij, so uporabne za oceno tveganja, da bo posameznik zbolel za nevrodegenerativno oz. nevropsihiatricno boleznijo. Kot take pripomorejo k izboljšani personalizirani medicini in bodo v bodoči lahko del presejalnih testov, kakršen je nedavno predstavljeni program Adam.

Insight into Monoamine Oxidase B Point Mutation; can Multiscale Simulation Explain Neuropsychiatric Disorders?

DOMEN PREGELJC, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisors: Urška Jug, Jernej Stare, Janez Mavri, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Alenka Mozer, Gimnazija Vič Grammar School

We present a computational study of the effect of Y326I point mutation on the activity of enzyme monoamine oxidase B (MAO B) in the decomposition of phenylethylamine (PEA). The enzyme MAO B catalyses the decomposition of biogenic amines, neurotransmitters and neuromodulators, as well as synthetic amphetamines and similar psychoactive molecules. An unbalanced activity of MAO enzymes results in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. During enzyme regeneration, hydrogen peroxide is formed. It causes irreparable damage to neurons. Understanding these processes at a molecular level is a key for the development of drugs and diagnosis. We used the most modern technique of a molecular simulation, including Empirical Valence Bond theory (EVB), to predict the activity of the mutated enzyme and calculate the free energy profiles. We have established that the enzyme activity decreases approximately 6 times with mutation. This agrees with the experimental findings. Our study testifies that the molecular simulation can be used as a predicting tool for a wide range of different enzymes. Information about the effects of a certain mutation provided by the molecular simulation is useful for the evaluation of the risk that an individual will develop a neurodegenerative or neuropsychiatric disease. As such, the molecular simulation contributes to improving the precision medicine and could be part of screening tests, e.g. Adam.

Antimikrobne in antioksidativne lastnosti nabranih in gojenih gob mešanega gozda

GABRIELA ŠTUMBERGER, II. gimnazija Maribor

Mentor: Boštjan Vihar, Inštitut za razvoj naprednih aplikativnih sistemov Rače

Somentorica: Katja Holnhaner Zorec, II. gimnazija Maribor

Gobe se že od nekdaj uporabljajo v tradicionalni medicini, zaradi antimikrobnih, antitumorskih, antioksidativnih ter drugih učinkov pa jih ljudje tudi množično nabirajo. Cilj naloge je bil ugotoviti, ali zdravilne gobe iz lokalnega gozda lahko gojimo tudi doma in kakšni so njihovi antimikrobeni ter antioksidativni učinki v primerjavi z učinki nabranih gob. Gobe, nabrane v Stražunskem gozdu, smo identificirali ter jih nato poskušali gojiti na različnih substratih. Iz nabranih in gojenih gob smo nato pripravili ekstrakte ter z difuzijsko metodo na trdnem gojišču z diskami ter razredčevanjem na mikrotitrski plošči ugotavljali antimikrobeni učinek, z metodo DPPH pa antioksidativnega. Tako po antimikrobnih kot antioksidativnih lastnostih so izstopale brezova odpadljivka, borov glivec ter bukova kresilka, pri čemer so imele statistično pomembne lastnosti tako nabrane gobe kot gojeni miceliji. Rezultati so vzpodbudni za nadaljnje raziskave medicinskih lastnosti gob, vendar so pri gojenju in pridobivanju učinkovin potrebne izboljšave.

Antimicrobial and Antioxidative Properties of Wild and Grown Mushrooms Found in Mixed Forests

GABRIELA ŠTUMBERGER, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: Boštjan Vihar, Institute for Development of Advanced Applied Systems Rače

Co-supervisor: Katja Holnhaner Zorec, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Mushrooms have always had a place in traditional medicine; moreover, their antimicrobial, antitumor, antioxidative and other properties make them a very attractive target for collecting. The aim of our research was to find out whether local medicinal mushrooms can be grown at home and how these grown mushrooms compare with the wild ones in terms of antimicrobial and antioxidative effects. The mushrooms were collected in the Stražun forest and identified. An attempt at growing these mushrooms on different substrates, depending on the type of mushroom, was made. Extracts from both grown and wild mushrooms were prepared and then used in determining the antimicrobial effect with the help of the disk diffusion method and the microtiter plate dilution method. The antioxidative properties were determined with the DPPH method. Piptoporus betulinus, Sparassis crispa and Fomes fomentarius all had significant antimicrobial and antioxidative effects, both in wild mushroom and grown mycelium form. The results are promising; however, further investigation of medicinal mushroom properties will be required. Also, significant improvements in the growing process as well as the process of extraction are yet to be made.

Matični mleček in trans-10-hidroksi-2-deconojska kislina

TAJA SKUBE, LARSEN CUNDRIČ, MATIC RAJNAR, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

Matični mleček v zadnjem času pridobiva vedno večjo veljavo, saj se ljudje ponovno zatekajo k naravnim in dobro preverjenim učinkovinam. V domači medicini ima tako vedno bolj pomembno vlogo. Matični mleček ali gelee royale je t.i. super hrana, ki ne učinkuje dobrote na čebeljo vrsto, ampak izjemno dobro tudi na človeka. Ker vsebuje trans-10-hidroksi-2-deconojsko kislino (10-HDA), je eno izmed najbolj čudežnih zdravil, ki jih premore narava. Prav njen najpomembnejša substanco 10-HDA je še premalo raziskana in zaradi tega smo se odločili za bolj poglobljeno raziskavo, iz katere je nato nastala raziskovalna naloga. Pred analiziranjem vsebnosti 10-HDA v posameznih vzorcih smo morali validirati metodo za določanje 10-HDA, ki še ni bila povsem potrjena. Dokazati smo morali, da je metoda selektivna, ponovljiva, linearna in točna. Šele nato smo lahko začeli analizirati različne vzorce in določati stabilnost matičnih mlečkov, pri čemer smo matični mleček izpostavili različnim zunanjim pogojem. Pri vseh analizah smo hoteli določiti vsebnost 10-HDA za posamezni vzorec. Vse analize matičnega mlečka smo opravili z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

Royal Jelly and Trans-10-hydroxy-decanoic Acid

TAJA SKUBE, LARSEN CUNDRIČ, MATIC RAJNAR, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Lately, royal jelly is becoming more and more appreciated as people again reach for natural, well-tested ingredients. Royal jelly plays an increasingly important role in domestic medicine. Royal jelly is the so-called super food which does not only work well on bee species, but also has an extremely positive effect on humans. Due to the content of trans-10-hydroxy-2-decanoic acid, also called 10-HDA, it is one of the most miraculous drugs that nature has to offer. The 10-HDA substance is still insufficiently studied; therefore, we have decided to carry out a more detailed study from which our research work has emerged. Before analysing the content of 10-HDA in individual samples, we still had to validate the method for determining 10-HDA because this method has not yet been fully confirmed. We had to prove the method to be selective, repeatable, linear, and exact. We were only then able to analyse various samples and determine the stability of royal jellies by exposing the samples to various external conditions. By analysing, we wanted to determine the content of 10-HDA for each sample. All analyses of royal jellies were done with High Pressure Liquid Chromatography – HPLC.

Ocena primernosti monolitnih nosilcev za ločevanje krvnih celic

MARJETA MAVRI, CITA JENKO, MAŠA SKOČIR, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija

Mentorica: Nasta Zupančič, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija

Somentorica: Helena Podgornik, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Raziskovale smo, ali je ločevanje levkocitov s protitelesi, vezanimi na monolitne nosilce, mogoče. Protitelesa smo vezale na monolitne nosilce in jih namočile v raztopino s celicami, nato pa smo jih poskušale sprati z nosilcev. Za vir celic smo uporabile venko kri, ki smo jo redčile z izotoničnim fosfatnim puferom (PBS) in fetalnim govejim serumom (FBS), za spiranje pa smo uporabljale PBS. Koncentracije celic v začetnih in končnih raztopinah smo določale s hematološkim analizatorjem in nato izračunale število vezanih celic. Vezavo celic smo preverjale s svetlobnim in fluorescenčnim mikroskopom. Uporabile smo kemijsko in velikostno različne monolitne nosilce. Dokazale smo, da nespecifičnih interakcij med celicami in nosilci ni, kot tudi ne toksičnih učinkov nosilcev na celice. Našle smo način in najprimernejši časovni interval za vezavo specifičnih vrst levkocitov na protitelesa, vezana na nosilce. Načina za spiranje celic z nosilcev nismo našle, zato so potrebne še nadaljnje raziskave.

Evaluation of Adequacy of Monolith Layers for Blood Cells Separation

MARJETA MAVRI, CITA JENKO, MAŠA SKOČIR, St. Stanislav's Institution, Diocesan Classical Gymnasium

Supervisor: Nasta Zupančič, St. Stanislav's Institution, Diocesan Classical Gymnasium

Co-supervisor: Helena Podgornik, University Medical Centre Ljubljana

The object of our research was to determine whether the separation of leukocytes with antibodies is possible. The antibodies were bound to the monolith layers, which were immersed into a cell solution and cells were later attempted to be washed out of the layers. The source of the cells was peripheral blood, which was diluted with isotonic phosphate buffer (PBS) and fetal bovine serum (FBS). PBS was used for washing out. The concentration of cells in starting and finishing solutions was detected with haematological analyser and the number of bound cells was calculated. The binding of the cells was checked with a bright-field and fluorescence microscopy. The monolith layers used differ in size and chemically. We excluded unspecific interactions between layers and cells as well as toxic effect of layers on cells. We found the way and the best time interval for the binding of the specific sorts of leukocytes. However, we did not find the way to wash out the cells from the layers. For this, further research is needed.

Prehransko dopolnilo s sokom granatnega jabolka

SARA JAMNIK, HELENA PERIĆ, Gimnazija Vič

Mentorica: Alenka Mozer, Gimnazija Vič

Somentorici: Nataša Poklar Ulrih, Mihaela Skrt, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Zdravilni učinki granatnega jabolka so znani že stoletja. Ta sadež je bil v mnogih krajih simbol zdravja in bogastva, zaradi vedno večje ozaveščenosti o pomembnosti zdravega življenja in ustrezne prehrane pa je bilo opravljenih že precej raziskav, ki so njegov sloves še potrdile in utrdile. Cilj raziskovalne naloge je bil pripraviti prehransko dopolnilo s sokom granatnega jabolka. Želeli smo kapsulirati antocianine, ki so v soku in imajo antioksidativne učinkovine, ter s tem tudi preprečiti razgradnjo teh komponent. Uporabili smo metodi lyofilizacije in mikrokapsulacije. Z lyofilizacijo smo pridobili suh koncentrat soka granatnega jabolka in ohranjene nespremenjene antioksidante. Z mikrokapsulacijo smo koncentrat soka ovili v polisaharidno mešanico alginata, pektina in inulina. Med mnogimi različnimi polisaharidi je bil izbran prav inulin, in sicer zaradi prebotočnih lastnosti, ki so naredile naše prehransko dopolnilo še bolj zdravo. Rezultati so pokazali, da velika koncentracija lyophilizata soka granatnega jabolka in s tem tudi koncentracija antocianinov v koncentratu soka granatnega jabolka negativno vplivata na učinkovitost mikrokapsulacije antocianinov.

A Food Supplement with Pomegranate Juice

SARA JAMNIK, HELENA PERIĆ, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: Alenka Mozer, Gimnazija Vič Grammar School

Co-supervisors: Nataša Poklar Ulrih, Mihaela Skrt, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

The health benefits of pomegranate have been known for centuries – the fruit itself has been a symbol of health and prosperity in many cultures. Nowadays more and more people are aware of the importance of leading a healthy lifestyle and adequate nutrition, so several studies have been conducted to justify the reputation of pomegranate. The goal of our research was to prepare a food supplement from pomegranate juice. We focused on successful encapsulation of anthocyanins with antioxidant properties found in pomegranate juice to prevent the decomposition of these compounds. We used two methods: lyophilization and micro-encapsulation. With lyophilization, we have received a dry concentrate of pomegranate juice in which the anthocyanins and antioxidants remained preserved. We micro-capsulated this dry extract into a polysaccharide shell which contained alginate, pectin and inulin. Among all polysaccharides we chose inulin because of its prebiotic properties, so the food supplement would have additional positive health effects. Results of our research suggest that a high concentration of lyophilized pomegranate juice (which consequentially means a high concentration of anthocyanins) actually has a negative effect on effectiveness of micro-encapsulation of anthocyanins.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

69	Matic Bergant	36	Jernej Luzar
78	Benjamin Božič	30	Maja Marušič
74	Sandi Brudar	80	Lucija Marzel Djuranovič
79	Nika Brulc	87	Marjeta Mavri
80	Evgenija Burger	83	Nastja Medle
86	Larsen Cundrič	83	Laura Medved
55	Tine Curk	81	Ana Milošev
61	Mirijam Černe Prelovšek	51	Ana Mitrović
73	Ana Dolšak	60	Nika Oman Kadunc
58	Urška Dragin Jerman	67	Kristjan Orthaber
59	Urban Feguš	54	Jerca Pahor
53	Marina Gjorgjieva	88	Helena Perić
82	Tjaša Grabnar	80	Luka Petravić
63	Matjaž Grčman	70	Vesna Pirnat
82	Larisa Grubič	65	Gašper Pisanec
64	Luka Hribernik	71	Mitja Pohlen
83	Barbara Jaklič	62	Aleš Polovič
88	Sara Jamnik	84	Domen Pregelj
72	Sandra Jančar	67	Matevž Pristovnik
46	Miodrag Janić	24	Eva Pušavec Kirar
87	Cita Jenko	68	Alja Račič
56	Miha Kastelic	86	Matic Rajnar
76	Eva Kerčmar	87	Maša Skočir
79	Zala Kink	67	Kristijan Skok
77	Kaja Klemenc	86	Taja Skube
57	Ivana Klopčič	78	Tjaša Šentjurc
18	Damijan Knez	85	Gabriela Štumberger
52	Špela Kos	75	Monika Tonejc
82	Luka Kunej	79	Nika Zupančič
66	Janja Lakner	76	Nika Žurga

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

67	Irena Ban	59	Željko Knez	57	Marija Sollner Dolenc
75	Marija Bogataj	38	Peter Korošec	73	Matej Sova
62	Sergeja Bombek	51	Janko Kos	72	Stane Srčič
81	Andrej Cör	61	Mateja Kos Koklič	84	Jernej Stare
69	Jožko Cesar	38	Mojca Lunder	54	Stojan Stavber
55	Jure Dobnikar	70	Matevž Luštrik	67	Janja Stergar
81	Marko Dolinar	67	Uroš Maver	77	Petra Sušjan
68, 71	Rok Dreu	57, 84	Janez Mavri	26	Jurij Svete
44	Gorazd Drevenski	84, 88	Alenka Mozer	44	Mišo Šabovič
58	Mateja Erdani Kreft	69	Stane Pajk	78	Irena Štrumbelj Drusany
75	Tjaša Felicijan	65	Matej Pavli	60	Dejan Tomaževič
82	Maja Florjanič	78	Mateja Pate	78	Nada Udovč Knežević
55	Daan Frenkel	72	Simona Peterlin	85	Boštjan Vihar
80	Tanja Gačnik	53	Lucija Peterlin Mašič	56	Vojeslav Vlachy
79, 83	Aleš Gasparič	65	Odon Planinšek	71	Karl G. Wagner
20	Stanislav Gobec	32	Janez Plavec	78	Irena Zdovc
78	Majda Golob	63	Matevž Pompe	87	Nasta Zupančič
85	Katja Holnhaner Zorec	87	Helena Podgornik	79	Silvo Zupančič
78	Gašper Jan Simon	54	Ajda Podgoršek Berke	70	Alenka Zvonar Pobirk
64, 66	Marjan Jereb	88	Nataša Poklar Ulrich		
84	Urška Jug	62	Franc Požgan		
80	Mojca Juteršek	74	Iztok Prislan		
76	Zdenka Keuc	82, 86	Janja Pust		
55	Danijel Kikelj	52	Gregor Serša		
81	Magdalena Klasinc	77	Darja Silan		
79, 83	Branka Klemenčič	88	Mihaela Skrt		

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Maja Oberstar Falkner

Jezikovni pregled (slovenski jezik) Ksenija Kosem, Marta Anžlovar

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

Produkcija Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk Peakprint, grafično središče, d. o. o.

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

www.krkinenagrade.si

