



Dan za raziskovalce

Dan za raziskovalce 2019

8. november 2019

Ljubljana, Slovenija

Zlati znanstveni dosežki
institucij

Svetovni laboratorij - izziv za slovenske raziskovalce

Dr. Edvard Kobal
edvard.kobal@gmail.com

Pobuda za oblikovanje raziskovalcev, ki v svoje raziskovalne projekte vnašajo odzivanje na planetarne izzive se je že pred več desetletij oblikovala v okviru Svetovne federacije znanstvenikov s sedežem v Ženevi, še zlasti z vzpostavitvijo Svetovnega laboratorija kot učinkovite finančne sheme. Ta je bila in ostala namenjena mladim raziskovalcem v deželah v razvoju. Glede na dejstvo, da je bila Slovenija na začetku 21. stoletja obarvana v mednarodnem okolju kot dežela v razvoju, je imela tako priložnost vstopa v globalni aktualni projekt in je to tudi izkoristila. Leta 2002 sta Svetovna federacija znanstvenikov in Slovenska znanstvena fundacija sklenili dogovor o sodelovanju in vzpostavitvi finančne sheme.

Delovanje štipendijskega sistema Svetovnega laboratorija Svetovne federacije znanstvenikov je v slovenskem prostoru spodbudilo nastajanje in utrjevanje novega profesionalnega sloga za mlade in mlajše slovenske raziskovalce. Znano je, da se predstavniki najmlajše generacije slovenskih raziskovalcev v 21. stoletju soočajo z večjimi omejitvami v doseganju optimalnega razvoja, napredovanja in uveljavljanja v nacionalni in mednarodni znanstveni skupnosti v primerjavi s starejšimi, ki pripadajo generaciji x.

To zlasti velja za raziskovalce, ki se oblikujejo v t.i. akademskem okolju (univerze, raziskovalni inštituti).

Dejavniki novega profesionalnega sloga slovenskih raziskovalcev, oblikovanih v 21. stoletju so:

- odločno soočanje z omejitvami v razvoju, zato intenzivno iskanje preboja z lastnimi idejami, nadgradnjo dosežkov pri raziskovanju v smeri „advanced research“ in prenosom (obveznim) v nove proizvode ali storitve;
- usmerjenost k uporabi raziskovalnih dosežkov že od zasnove projektov dalje;
- doseganje protivrednosti vloženega denarja v raziskavo s samimi raziskovalnimi dosežki.

Dobro je, da je Slovenski znanstveni fundaciji uspelo usmeriti slovenske raziskovalce, ki starostno pripadajo generaciji y k novemu slogu raziskovanja. So bolj intelektualno dinamični in tudi zmožnejši v kapacitetah. Še intenzivnejše odzivanje pa pričakujemo od mladih in mlajših raziskovalcev, ki pripadajo generaciji z. Njihove tipične lastnosti in orientacije obetajo priložnost doseganja največje naravnosti k praktični vrednosti (koristi) raziskovalnih dosežkov do sedaj.

Krio-elektronska mikroskopija kot orodje za razumevanje biologije krompirjevega virusa Y in uporabe virusom-podobnih delcev

Dr. Marjetka Podobnik
marjetka.podobnik@ki.si

Krompirjev virus Y (PVY) sodi med ekonomsko najpomembnejše rastlinske viruse, saj lahko povzroči hudo škodo na pridelkih okuženih gojenih in tudi divjih rastlin. PVY virion je nitkaste in gibljive oblike. Sestavlja ga okoli 2000 kopij plaščnega proteina (CP), ki se navijajo okoli virusne RNK. Pri heterolognem izražanju CP v bakterijskih celicah se ti proteini samosestavijo v dolge nitke (VLP), ki ne vsebujejo virusne RNK.

Z uporabo krio-elektronske mikroskopije smo določili tridimenzionalni strukturi obeh tipov nitk pri ločljivostih blizu atomskim. Ugotovili smo, da se v primeru PVY njegove CP enote ovijajo v obliki levo-sučne vijačnice okoli virusne RNK, z 8.8 CP enotami na zavoje in premerom nitke 13 nm. Pri VLP pa se CP enote zlagajo v osemčlenske obroče, ki zloženi en na drugega tvorijo nitke debeline 12.5 nm, kar je edinstvena lastnost teh delcev. Vsaka CP enota je razdeljena na tri regije: strukturno iztegnjeni N- in C-končni regiji ter globularno osrednjo regijo z definiranimi elementi sekundarne strukture. Razlike v sestavljanju med virionom in VLP omogoča strukturna plastičnost N- in C-končnih regij CP. Na osnovi poznavanja obeh struktur smo izvedli mutacijsko analizo in pokazali, da je N-končna regija CP nujna za sestavljanje VLP nitk, C-končna regija pa ne, saj tudi po deleciji celotne C-končne regije še vedno nastanejo stabilne dolge VLP nitke. V primeru viriona PVY pa smo pokazali, da sta obe končni regiji pomembni za infektivnost virusa v rastlinah. Poznavanje struktur PVY in VLP je pomembno za razumevanje kompleksnega procesa sestavljanja virusa in mehanizma infekcije. Poleg tega pa to znanje predstavlja pomemben prispevek pri razvoju bionanotehnoloških aplikacij na osnovi PVY/VLP sistemov, kot npr. razvoj vakcin, molekularnih ogrodij, dostavnih sistemov, nanožičk, nanocevk, biosenzorjev itd.

Uporaba proteomske analize v biomedicinskih raziskavah

**Dr. Marko Fonovič, dr. Robert Vidmar in
ddr. Boris Turk**

marko.fonovic@ijs.si; robert.vidmar@ijs.si;
boris.turk@ijs.si

Proteomska analiza z uporabo masne spektrometrije je v zadnjem desetletju postala ena izmed osnovnih tehnik za analizo kompleksnih proteinskih vzorcev. Trenutno je masna spektrometrija tudi edina metoda, ki omogoča spremljanje proteinske sestave na nivoju biološkega sistema kot je organizem, tkivo ali celice. Na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo inštituta Jožef Stefan smo pred skoraj desetletjem vzpostavili proteomski laboratorij z dvema masnima spektrometroma visoke resolucije. V sklopu svojega raziskovalnega dela opravljamo kvalitativne in kvantitativne proteomske analize s katerimi lahko karakteriziramo strukturo in lastnosti posameznih proteinov ali pa preko analize večje populacije proteinov v kompleksnih bioloških vzorcih določamo molekularne mehanizme specifičnih fizioloških procesov. V predavanju bodo predstavljeni osnovni principi proteomske analize in nekateri naše glavni dosežki pri uporabi te tehnologije v biomedicinskih raziskavah.

Reference:

text



Metoda za spremljanje **111 zdravilnih učinkovin** v okoljskih vzorcih

Dr. Jurij Trontelj, dr. Robert Roškar
jurij.trontelj@ffa.uni-lj.si;
robert.roškar@ffa.uni-lj.si

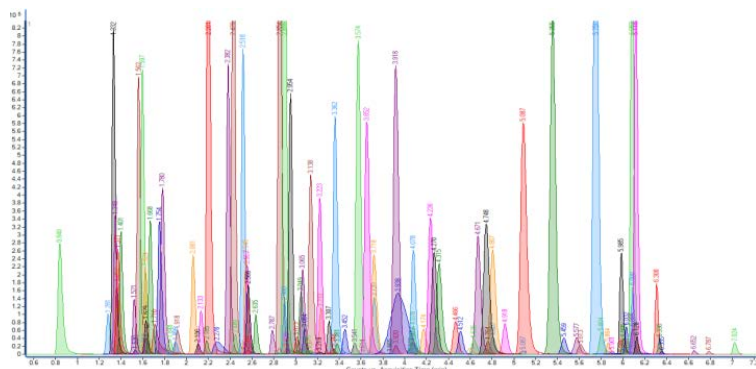
Uvod

Stresno in nezdravo življenje ter starajoče se prebivalstvo razvitega sveta in pogosta uporaba protimikrobnih učinkovin v živinoreji predstavlja naraščajoče breme za okolje in ljudi. Izločena ali neprimerno zavržena zdravila ter njihovi metaboliti in transformacijski produkti vstopijo prek iztokov čistilnih naprav ali pretočnih greznic v površinske vode, od koder pridejo tudi v podtalnico in prek črpališč in zajetji v pitno vodo. V okolju lahko močno škodujejo vodnim organizmom. Obstajajo pa tudi vse bolj podprti dokazi o negativnih vplivih na zdravje ljudi: endokrine motnje, neplodnost, rakava obolenja in vse večja odpornost na protimikrobne učinkovine. Za farmacevtsko stroko je torej nujno skrbno spremljanje usode izločenih učinkovin in njihovih metabolitov ter transformacijskih produktov ob vstopu v okolje.

Metode

Za ekstrakcijo in koncentriranje analitov iz odpadnih vod smo uporabili polavtomatsko ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE-DEX Horizon 4790), pri čemer smo dosegli 100-kratno koncentriranje. Za ekstrakcijo iz površinskih in pitnih vod pa smo uporabili klasično ekstrakcijo s kartušami in dosegli faktor koncentriranja več kot 1000.

Ekstrakte smo analizirali s tekočinskim kromatografom Infinity 1290 (Agilent), sklopljenim z masnim detektorjem vrste trojni kvadrupol 6460 (Agilent), slika 1.



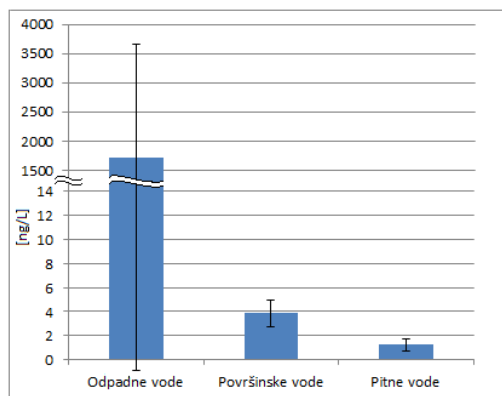
Slika 1. LC-MS/MS kromatogram, ki prikazuje 111 analitov kvantificiranih v eni analizi in v manj kot 8 minutah.

Rezultati

V odpadnih vodah v iztokih čistilnih naprav smo v najvišjih koncentracijah (1-10 $\mu\text{g/L}$) izmerili tramadol, hidroklorotiazid, diklofenak, metformin, atorvastatin, salicilno kislino, rosuvastatin, kar se z izjemo tramadola zelo dobro pokriva s podatki pogostnosti predpisovanja in stabilnosti teh učinkovin.

V površinskih vodah smo izmerili za 2-3 rede velikosti nižje koncentracije analitov, in sicer v najvišjih koncentracijah (1-20 ng/L): gabapentin, valsartan, sulfametoksazol, tramadol, karbamazepin, irbesartan, kofein in druge.

V pitnih vodah smo izmerili še nižje koncentracije (slika 2), in sicer največ analitov v območju 1-2 ng/L , kjer smo našli paracetamol, sulfametoksazol, tramadol in irbesartan, izjemi sta bili azitromicin in kofein, ki pa sta se v dveh vzorcih pojavljala tudi nad 10 ng/L .



Slika 2. Primerjava povprečnih koncentracij istih učinkovin ($n=16$) v vzorcih slovenskih odpadnih, površinskih in pitnih vod. Intervalne ocene na stolpcih so standardne napake vzorca in predstavljajo variabilnost med učinkovinami.

Zaključek

Razvita metoda je v samem svetovnem vrhu po številu zastopanih analitov in v doseženi občutljivosti relevantnih analitov v območju 1-100 pg/L oz. ppq . Predstavlja temelj za nadaljnje raziskave, ki vključujejo še več spojin, med drugim tudi pesticide, hormone in hormonske motilce.

Reference:

Klančar, A., Trontelj, J. & Roškar, R. Water Air Soil Pollut (2018) 229: 192. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3845-7>

Opis stabilnostnega in regulatornega faznega prostora proteinov in nukleinskih kislin

Dr. Jurij Lah
jurij.lah@fkkt.uni-lj.si

Leta 1953 sta Watson in Crick predstavila strukturo dvojne vijačnice DNA, leta 1957 je Kendrew določil prvo strukturo globularnega proteina, leta 1961 je Anfinsen pokazal, da so informacije, ki jih potrebuje protein za zvitje v globularno strukturo, zapisane v njegovem aminokislinskem zaporedju. Odkritja so močno vplivala na razvoj znanosti. Kasneje je bilo ugotovljeno, da DNA in proteini zavzamejo tudi drugačne strukture (e.g. nakanonične DNA, neglobularni proteini), ki igrajo pomembno vlogo pri regulaciji običajnih in z boleznijo povezanih celičnih procesov.

Na predavanju bomo pokazali, kako uporabimo zakone termodinamike in kinetike za opis strukturnih sprememb DNA in proteinov, njihovega prepoznavanja, agregacije in fiziološko pomembnih regulacijskih mehanizmov, za določitev gonilnih sil teh procesov ter za napoved obnašanja DNA in proteinov pri različnih pogojih in vitro in vivo [1-6]. Napovedi so bile s pridom uporabljene pri reševanju problematike v farmacevtski industriji [7,8].

Reference:

1. Hadži, S., Kocman, V., Oblak, D., Plavec, J., and Lah, J. (2019) *Angewandte Chem.* 58, 2387.
2. Hadži, S., Mernik, A., Podlipnik, Č., Loris, R., and Lah, J. (2017) *Angewandte Chem.* 56, 14494.
3. Vandervelde, A., Drobnak, I., Hadži, S., ... and Lah, J. (2017) *Nucleic Acids Res.* 45, 2937.
4. Bončina, M., Vesnaver, G., Chaires, J. B., and Lah, J. (2016) *Angewandte Chem.* 55, 10340.
5. Bončina, M., Podlipnik, Č., ..., Vesnaver, G., and Lah, J. (2017) *Nucleic Acids Res.* 43, 10376.
6. Drobnak, I., De Jonge, Haesaerts, Vesnaver, Loris, R., and Lah, J. (2013) *J. Am. Chem.Soc.* 135, 1288.
7. Marušič, J., Podlipnik, Jevševar, S., Kuzman, D., Vesnaver, and Lah, J. (2012) *J.Biol.Chem.*, 287,8613.
8. Lah, J., Prislán, I., Kržan, B., Salobir, M., Francky, A., and Vesnaver, G. (2005) *Biochem.* 44, 13883.

Racionalno **načrtovanje** novih sulfonatnih inhibitorjev neuraminidaze N1 **virusa ptičje gripe A**

Dr. Urban Bren
urban.bren@um.si

Izbruh virusa H5N1 ptičje gripe A je povzročil globalno skrb za zdravje ljudi in domačih živali. Inhibicija encima neuraminidaze N1 predstavlja osrednji način nadzora te bolezni. Zaradi zaskrbljujočega pojava rezistentnih sevov virusa na vsa obstoječa zdravila je racionalni razvoj novih inhibitorjev neuraminidaze N1 osrednjega pomena.

Tako smo izvedli simulacije molekulske dinamike devetih inhibitorjev neuraminidaze N1 (ozeltamivir, zanamivir, in peramivir -karboksilat, -fosfonat, in -sulfonat) v njihovem prostem in dveh vezanih stanjih – odprti in zaprti konformaciji neuraminidaze N1 – ter izračunali njihove vezavne proste energije s pomočjo metode Linearne interakcijske energije. Dobljeni rezultati so uspešno reproducirali eksperimentalne vezavne afinitete tedaj že poznanih inhibitorjev neuraminidaze N1 – peramivir je močnejši inhibitor od zanamivirja, ki je močnejši od ozeltamivirja, ter fosfonatni inhibitorji, ki so močnejši od karboksilatnih. Dodatno pa smo eksplicitno ovrednotili še prispevke posameznih funkcionalnih skupin k celokupni vezavni afiniteti ter izpostavili novo predlagane sulfonatne inhibitorje kot najmočnejše vezalce neuraminidaze N1.[1, 2] Po večletnem trudu so predlagane sulfonatne inhibitorje uspešno sintetizirali ter jim eksperimentalno na osnovi kinetičnih poskusov določili več kot 900-krat nižjo inhibicijsko konstanto neuraminidaze N1 v primerjavi z zdravilom oseltamivir s tržnim imenom Tamiflu [3] ter več kot 40-krat nižjo inhibicijsko konstanto neuraminidaze N1 v primerjavi s fosfonatnimi analogi [4]. Ugotovili so še več kot 12-kratno povečanje in vivo antiinflunčne aktivnosti v primerjavi s Tamiflujem ter učinkovitost sulfonatnih inhibitorjev tudi na do sedaj rezistentnih virusnih sevih.[5] Predavanje tako nudi vpogled v vlogo in pomen molekularnega modeliranja pri modernem racionalnem načrtovanju novih zdravilnih učinkovin.

Reference:

- [1] Journal of Chemical Information and Modeling 49 (2009), 2323-2332.
- [2] Current Pharmaceutical Design, 20 (2014) 3478-3487.
- [3] Organic and Biomolecular Chemistry 15 (2017) 5249-5253.
- [4] Scientific Reports 7 (2017) 8239.
- [5] European Journal of Medicinal Chemistry 163 (2019) 710-721.

Postopek **dinamičnega** globokega jedkanja in ekstrahiranja delcev iz aluminijevih zlitin

**Dr. Tonica Bončina, Dr. Franc Zupančič in
dr. Boštjan Markoli**

franc.zupanic@um.si

Razvoj aluminijevih kvazikristalnih zlitin
European patent EP2458033

V Laboratoriju za materiale, Fakultete za strojništvo UM se že od leta 2003 ukvarjamo z razvojem novih kvazikristalnih aluminijevih zlitin. To so zlitine, ki vsebujejo faze s kvazikristalno strukturo in ki imajo vpliv na lastnosti zlitin.

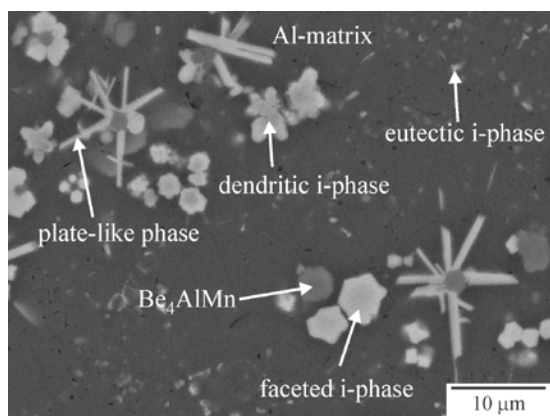
Naše raziskovalno delo zajema sintezo in toplotno obdelavo zlitin, karakterizacijo z razvojem novih metalografskih metod ter ugotavljanje mehanskih lastnosti.

Na srečanju raziskovalcev bomo predstavili novo metalografsko metodo, ki je bila razvita za identifikacijo kvazikristalnih faz in smo jo tudi patentirali.

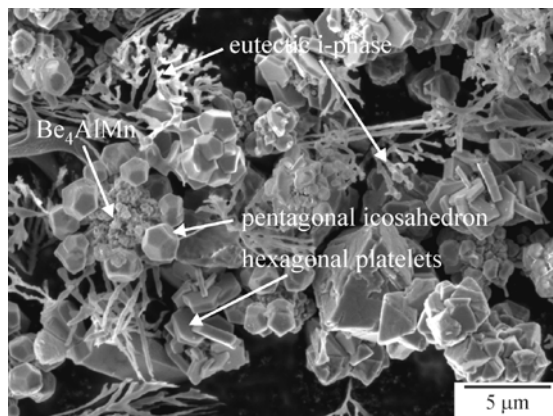
Klasična metalografska priprava zajema postopke, kot so brušenje, poliranje in jedkanje ter analizo z mikroskopijo. Na ta način dobimo 2D-prerez skozi material. Za identifikacijo kvazikristalnih faz, ki imajo specifično obliko skladno z njihovo kvazikristalno strukturo, pa smo želeli dobiti 3D-morfologijo.

Pri „Postopku dinamičnega globokega jedkanja in ekstrahiranja delcev iz aluminijevih zlitin“ raztopimo aluminijevo osnovo na način, da ostanejo ostale faze nespremenjene in nepoškodovane. Uporabimo raztopino metanola, joda in vinske kisline. Raztapljanje poteka po celotni prostornini vzorca. Nastanek luknjic v oksidni plasti na površini aluminija ter gibanje raztopine povzročimo z ultrazvokom. Postopek traja več dni, lahko tudi več tednov.

Rezultat so globoko jedkani vzorci in ekstrahirane faze iz aluminijevih zlitin, ki jih lahko brez dodatne priprave analiziramo z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in rentgensko difrakcijo prašnih delcev (XRD). Metoda je uporabna tudi za karakterizacijo komercialnih aluminijevih zlitin.



a)



b)

Sliki

a) 2D-prerez skozi mikrostrukturo zlitine Al-Mn-Be (vzorec pripravljen po klasični metalografski metodi).

b) Ekstrahirani delci iz aluminijeve zlitine Al-Mn-Be (postopek dinamičnega jedkanja in ekstrahiranja)

Reference:

European patent EP2458033

Uporaba ultrazvoka pri procesu kristalizacije zdravilne učinkovine

Lucija Majal Belca

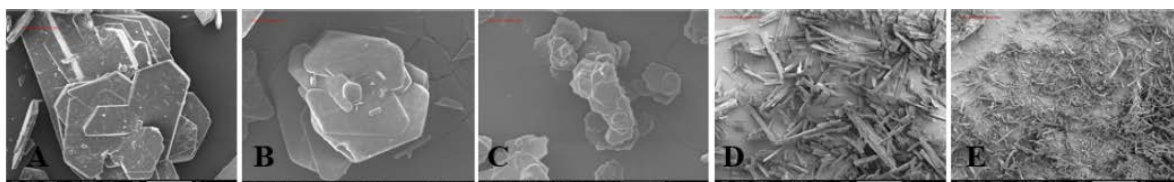
lucija.majal-belca@sandoz.com

Poznavanje, razvoj in načrtovanje procesa kristalizacije zdravilne učinkovine je ključnega pomena z vidika zagotavljanja kemijskih in fizikalnih lastnosti produkta, med katere štejemo kristalno obliko (polimorfizem), morfologijo in velikost delcev. Hkrati pa izzive predstavljajo tudi filtracija suspenzije, sušenje produkta, procesibilnost, ponovljivost in robustnost procesa ter konsistentnost produkta.

Cilj in namen dela je bil povezati teoretične osnove kristalizacije z eksperimentalnim delom, konstruiranjem faznega diagrama polimorfnih oblik in topnostne krivulje ter primerjati fizikalne lastnosti produkta in ekonomičnost procesa pridobljenega s spontano kristalizacijo, kristalizacijo s cepljenjem in deaglomeracijo ter kristalizacijo z uvedbo ultrazvoka (sonokristalizacijo).

Z manipulacijo in kontroliranim vodenjem sonokristalizacije, ki s pomočjo kavitacije vpliva na prenasičenje, nastanek nukleacije, rast kristalov, aglomeracijo ter na downstream procese, smo pridobili različne, a ponovljive fizikalne lastnosti zdravilne učinkovine z izboljšano ekonomičnostjo procesa:

- polimorfne oblike I, II in III, ki so v enantiotropnem razmerju in imajo različno stabilnost,
- ožjo porazdelitev velikosti delcev,
- uniformnejšo obliko delcev,
- zmanjšano aglomeracijo in eliminacijo dodatne potrebe po mletju produkta.



Slika 1. Morfologija polimorfne oblike I pridobljene s kristalizacijo s pomočjo ultrazvoka z močjo 5 W - A (aglomerirane kocke), 20 W – B (manj aglomerirane kocke), 40 W – C (enotnejše kocke), polimorfne oblike II pridobljene s kristalizacijo s pomočjo ultrazvoka in dodatne sonifikacije v metastabilnem območju, ko že poteče nukleacija - D (paličice) in polimorfne oblike III pridobljene s kristalizacijo s pomočjo ultrazvoka z močjo 80 W od začetka procesa ohlajanja – E (iglice).



Slika 2. Vizualna prezentacija polimorfne oblike III pridobljene z različnimi kristalizacijskimi tehnikami: A – spontana kristalizacija, B – kristalizacija s cepljenjem, C – dodatna deaglomeracija, D – uporaba ultrazvoka med procesom kristalizacije.

Možnost variranja fizikalnih lastnosti produkta s pomočjo kristalizacije ponuja izbiro in možnost optimalne formulacije končnega zdravila, s tem pa zagotavlja boljšo konkurenčnost na trgu in omogoča bolniku varno, učinkovito, kakovostno ter cenovno ugodnejšo zdravilo.

Reference:

L. Majal Belca, A. Ručigaj, D. Teslić, M. Krajnc, The use of ultrasound in the crystallization process of an active pharmaceutical ingredient, *Ultrasonic Sonochemistry* 2019, 58, 104642, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417719306820>.