

A stylized, light gray graphic of a tree or branch structure. It features a vertical trunk on the left side that branches out into several horizontal and diagonal segments. At the end of each branch is a circular ring, resembling a leaf or a node. The overall shape is abstract and modern.

52. KRKINE NAGRADE

32. SIMPOZIJ

**ZBORNİK
POVZETKOV**

52. KRKINE NAGRADE
52nd KRKA PRIZES

32. SIMPOZIJ
32nd SYMPOSIUM

ZBORNİK POVZETKOV
BOOK OF ABSTRACTS

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.*

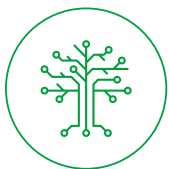
Mission

Encouraging the creativity, research and development of young researchers.

Vision

Encouraging the youthful spirit and excellence in research work. Paving the way for new discoveries that will result in new products of generations to come.





KRKINE NAGRADE
ZNANOST POVEZUJE

52. KRKINE NAGRADE | Zbornik povzetkov

Novo mesto, 21. oktober 2022

Izdajatelj

Krka, d. d., Novo mesto
Šmarješka cesta 6
8501 Novo mesto

Predstavitev nagrajencev

Maja Oberstar Falkner, Tanja Sluga Kobe, Simona Gorjup

Jezikovni pregled (slovenski jezik)

Ksenija Kosem, Marta Anžlovar

Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik)

Meta Hauptman, Katarina Tomc

Oblikovanje

Renata Burnik

Produkcija

Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije

Andrej Križ

Tisk

PEAKPRINT d.o.o., natisnjeno v nakladi 600 izvodov

www.krkinenagrade.si

Častni odbor 52. Krkinih nagrad

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke
akad. prof. dr. Peter Štih, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. Gregor Majdič, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. Zdravko Kačič, rektor Univerze v Mariboru
prof. dr. Marko Anderluh, predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
dr. Peter Venturini, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. Radko Komadina, predsednik Slovenskega zdravniškega društva

Svet Sklada Krkinih nagrad

dr. Aleš Rotar, predsednik
prof. dr. Mihael Japelj, častni predsednik

Znanstveni odbor

prof. dr. Franc Vrečer
dr. Jure Bezenšek
dr. Matjaž Deželak
dr. Klemen Korasa
dr. Eva Pušavec Kirar
doc. dr. Vida Škrabanja
dr. Joanna Anna Trykowska Konc
dr. Luka Žnideršič

Člani

dr. Žiga Hodnik
Jernej Hvala
Ina Kosmač
Elvira Medved
dr. Janja Mirtič
dr. Miha Plevnik
Tanja Sluga Kobe
mag. Simona Torkar Flajnik

Glavni in odgovorni urednik

dr. Miha Plevnik

mag. Sintija Antončič, Breda Barbič Žagar, Matej Barič, dr. Primož Benkič, Marko Benkovič, dr. Ana Bergant Simončič, dr. Jure Bezenšek, dr. Marko Bitenc, Tanja Blatnik, Irena Bobnar, dr. Jernej Bobnar, dr. Sergeja Bombek, Sabina Brcar, Sanja Brus, dr. Polona Bukovec, Ilija Buzar, mag. Lea Cvitkovič Maričič, dr. Irena Čarman, dr. Katarina Černelič, dr. Katja Čerpnjak, Matej Červek, Ines Dakskobler Savšek, dr. Matjaž Deželak, dr. Katarina Dobrovoljc, Vanja Erjavec Strmec, dr. Maja Florjanič, mag. Mihael Florjanič, Alen Gabrič, dr. Aleš Gasparič, Jaka Glavač, dr. Ivan Gobec, Aljoša Gradišek, mag. Anica Grandovec, Tadej Grobelšek, mag. Mateja Grošelj, Peter Hančič, Blaž Hodnik, dr. Žiga Hodnik, Bor Hodžič, Anka Hotko, Borut Hrastar, Žan Hribar, dr. Grega Hudovornik, Jernej Hvala, mag. Miran Hvalec, dr. Gregor Ilc, Helena Jakše, dr. Boštjan Jerman, Jernej Jerman, Sabina Junc, mag. Virginia Kelher Pava, Ksenija Kikelj, Monika Kinkela, dr. Dejan Klement, Alenka Kmecl, mag. Aleš Knoll, Marko Kočevar, Tanja Kohek, Filip Kolenc, Ivanka Kolenc, dr. Tanja Koleša, Nejc Koračin, dr. Klemen Korasa, Ronald Erwin Martijn Korthouwer, Jernej Kos, Ina Kosmač, Primož Košir, mag. Berta Kotar Jordan, mag. Helena Kotnik, dr. Borut Kovačič, Simon Kovačič, Tristan Kovačič, dr. Nevenka Kožuh Eržen, Irena Krajačič, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, dr. Ana Kroflič, dr. Vesna Krošelj, Andreja Kuhar, dr. Barbara Kunič Tešovič, dr. Jernej Kužner, dr. Brigita Lapornik, dr. Roman Lenaršič, mag. Denise Leskovar, dr. Gregor Lorbek, dr. Nina Lukač, dr. Mateja Lumpert, Matej Makše, mag. Bronja Manček, dr. Jelena Mandič, dr. Tatjana Mateović Rojnik, dr. Primož Meh, mag. Mateja Merslavič, Jasna Meško Obretan, Ciril Miklavčič, dr. Špela Miklič, Aleksander Miložič, dr. Janja Mirtič, dr. Anita Mlakar, Jože Mužerlin, Dušanka Oblak Božič, mag. Irena Orel, dr. Renata Osolnik, mag. Vesna Pahor, Matjaž Pajk, Gregor Parkelj, dr. Anica Pečavar, Mitja Pelko, dr. Lidija Pezdirc, Katja Pisanec, dr. Andreja Plaper, dr. Miha Plevnik, Špela Plut, dr. Gašper Poklukar, Aleš Polovič, Aleš Poznič, Tina Požun, dr. Maja Preskar, Teja Prijatelj, dr. Anja Pucer Janež, Irena Pucihar, Marjeta Pucihar, Urh Pucihar, mag. Aleša Punčuh Kolar, dr. Gašper Pustovrh, dr. Eva Pušavec Kirar, dr. Katarina Rade, dr. Andreja Radman Kastelic, Radivoje Rašković, Gregor Ratek, dr. Nataša Rebolj, Vojko Rebolj, dr. Tadej Recelj, Aleksander Rekič, dr. Urška Ribič, dr. Aleš Rotar, dr. Saša Rožman, Miloš Ružič, Robert Sekereš, Tanja Seničar, dr. Zvone Simončič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, Janika Slanc Vovk, dr. Urška Slapšak, Domen Smodiš, dr. Janez Smodiš, dr. Tina Smolič, dr. Matej Smrkolj, Matej Stergar, Tadej Stropnik, Sandi Svetič, Tina Šilc, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Katja Škrlec, mag. Katja Štajdohar, dr. Marko Štefanič, dr. Anton Štimac, dr. Staša Taferner, Mateja Tičar, dr. Jaroslav Tihi, Andreja Toplišek, dr. Elizabeta Tratar Pirc, dr. Joanna Anna Trykowska Konc, Aljaž Uhan, Matic Uhan, dr. Darko Uršič, Tilen Volčanšek, dr. Tomislav Vrbanec, dr. Miha Vrbinc, dr. Irena Vrečar, prof. dr. Franc Vrečer, dr. Mateja Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, dr. Luka Žnideršič, dr. Simon Žurga, Zala Žužek

VSEBINA

CONTENT

52. KRKINE NAGRADE

- 12 | **Aleš Rotar**, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad
- 14 | Krkini nagrajenci 2022

32. SIMPOZIJ

ZBORNİK POVZETKOV

- 24 | **Franc Vrečer**, Znanstveni odbor Sveta Sklada Krkinih nagrad

VELIKE KRKINE NAGRADE

PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 28 | **Maja Bjelošević Žiberna**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj in optimizacija procesa liofilizacije formulacij z biološkimi učinkovinami
- 34 | **Ana Dolšak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Strukturno podprto načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev indolamin 2,3-dioksigenaze in modulatorjev Toll-u podobnih receptorjev tipa 7 in 8
- 40 | **Anja Kristl**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporaba kromatografije z mešanimi režimi za separacijo biološko pomembnih molekul
- 46 | **Tina Vida Plavec**, Institut Jožef Stefan, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Površinska predstavitev vezalcev tumorskih antigenov na bakterijah *Lactococcus lactis* NZ9000 in vrednotenje njihove vezave na izbrane človeške tumorske celične linije
- 52 | **Nejc Petek**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Fotoredoks katalitske pretvorbe pirazolov

52. KRKINE NAGRADE

POVZETKI

- 60 | **Monika Horvat**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporabne spojine in materiali na osnovi lignina in barvil invazivnih tujerodnih rastlin
- 61 | **Kaja Bergant Loboda**, Kemijski inštitut Ljubljana
Načrtovanje in optimizacija katalitičnih zaviralcev človeške DNA-topoizomeraze IIa kot potencialnih protirakavih učinkovin
- 62 | **Andrej Šterman**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Novi pristopi k sintezi α -aminoborovih kislin kot ključnih gradnikov za zaviralce proteasoma
- 63 | **Veronika Furlan**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Proučevanje mehanizmov antikarcinogenega in nevroprotektivnega delovanja naravnih polifenolnih spojin
- 64 | **Mitja Pohlen**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj metod izdelave in sestave posušenih emulzij za dostavljanje zdravilnih učinkovin z izrazito lipofilnimi lastnostmi
- 65 | **Ana Kovačič**, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana
Ostanki bisfenolov v vodnem okolju: pojavnost in kroženje
- 66 | **Kity Požek**, Institut Jožef Stefan
Izolacija in karakterizacija proteina VaaMPIII-3 iz modrasovega strupa
- 67 | **Nika Marolt**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Vpliv ukinjenega izločanja laktata pri rakavih celicah na njihovo uničevanje z aktiviranimi limfociti T
- 68 | **Grega Bajc**, Krka, d. d., Novo mesto
Razvoj modela za izbor kombinacije barvil v filmskih oblogah za doseganje ciljne barve filmsko obloženih tablet
- 69 | **Nina Zupan**, Faculty of Pharmacy, University of Lille
Mehko tabletiranje *Bifidobacterium longum*: Presejalna študija vpliva različnih polnil in veziv
- 70 | **Teo Mlinšek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Analiza majhnih nekodirajočih RNA iz urinskih zunajceličnih veziklov pri Fabryjevi bolezni
- 71 | **Tanja Zupan**, Institut Jožef Stefan
Vpliv kokaprina in makrocipina na biofilm listerij
- 72 | **Nina Hrvatič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj in vrednotenje liotropnih tekočih kristalov na osnovi konopljinega ali lanenega olja

- 73 | **Uroš Vezonik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza novih fluorescentnih molekul na osnovi naftalena
- 74 | **Ana Medic**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv izbranih učinkovin na uravnavanje energijske presnove človeškega endotelija
- 75 | **Nina Ravbar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Univerzitetna klinika Golnik
Ocena možnosti zmanjšanja intenzivnosti zdravljenja z zaviralci protonske črpalke in ovrednotenje njihovih potencialnih interakcij pri bolnikih na Univerzitetni kliniki Golnik
- 76 | **Rok Herman**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Biokemične in klinične značilnosti bolnikov z akromegalijo ter njihov vpliv na z zdravjem povezano kakovost življenja
- 77 | **Špela Bizjak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Farmakokinetična in farmakodinamična optimizacija dezmuramilpeptidnih agonistov receptorja prirojene imunosti NOD2
- 78 | **Eva Rajh**, Kemijski inštitut Ljubljana
Optimizacija RT-LAMP za detekcijo SARS-CoV-2 v slini
- 79 | **Maja Mavri**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnih zaviralcev C-končne domene proteina toplotnega šoka 90
- 80 | **Ana Gorenc**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporaba pirolon vsebujočih substratov v organokataliziranih reakcijah
- 81 | **Mišel Hozjan**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporaba tetramskih kislin kot izhodnih substratov v organokataliziranih pretvorbah
- 82 | **Kristina Matić**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Izraba odpadne kisle sirotke za gojenje propionibakterij, ki proizvajajo vitamin B₁₂
- 83 | **Suzana Kralj**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Primerjava adhezinov med patogenimi bakterijami rodu *Salmonella*, *Escherichia* in *Campylobacter*
- 84 | **Martin Rihtaršič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Z natrijevim nitritom katalizirano aerobno oksidativno jodiranje aromatskih spojin
- 85 | **Kristina Žagar**, Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin, Jesenice
Pomen komunikacije v podjetju za občutek večje varnosti med zaposlenimi med epidemijo Covid-19 - študija primera ene organizacije
- 86 | **Barbara Makovec, Rok Sušnik**, Gimnazija Vič
Vpliv različnih načinov izpostavitve hladni kisikovi plazmi na dekontaminacijo in kalitev semen tatarske ajde
- 87 | **Tjaša Karas**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
***Artemisia annua* L. proti covidu-19 – efekti artemisinina in njegovih derivatov**

- 88 | **Lea Ažbe**, Gimnazija Kranj
Skupna vsebnost polifenolov in antioksidativna kapaciteta temnih čokolad z različno vsebnostjo kakava
- 89 | **Matija Derganc, Jakob Golubič**, Gimnazija Vič
Novi zaviralci proteina toplotnega šoka 90 za zdravljenje raka
- 90 | **Tim Šinko**, II. gimnazija Maribor
Količina in kakovost pridelka vrtnice solate (*Lactuca sativa* L.), pridelane na hidroponski in talni način v jesenskem času
- 91 | **Rea Doria Bergant, Tea Vovko**, Gimnazija Novo mesto
Veganstvo in vitamin B₁₂
- 92 | **Julija Skrt, Jaša Krevh**, Gimnazija Vič
Vpliv hidrolitičnih encimov na antioksidativno učinkovitost oljčnih listov
- 93 | **Vid Bauman**, II. gimnazija Maribor
Antioksidativni in antimikrobni učinek ekstraktov olupka granatnega jabolka
- 94 | **Ema Švarc, Zoja Gobec**, II. gimnazija Maribor
Vrstna pestrost oacetnokislinskih bakterij v kombučii
- 95 | **Nik Podkrajšek**, Gimnazija Bežigrad
Vpliv genetske variabilnosti na parametre vnetja med zdravljenjem hiperholesterolemije z zaviralci PCSK9
- 96 | **Kaja Bedernjak**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Polisaharidni kompoziti kot novi materiali za kostne implantate
- 97 | **Taja Natek, Lina Winkler**, II. gimnazija Maribor
Vpliv izbranih aditivov na človeške hepatocite
- 98 | **Ana Pibernik, Jakob Kecelj**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik
Vnetna naprava na osnovi molekule TRIF za potencialno imunoterapijo raka
- 99 | **Kaja Dragan, Lea Lisec, Pia Rak, Kristina Sinur**, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija
Razkužila z navdihom
- 100 | **Jan Špiclin**, Prva gimnazija Varaždin
Vpliv fenolov iz izvlečka prahu zelenega matcha na zmanjšanje poškodbe DNA-molekul iz sperme lososa zaradi izpostavljanja UVA-sevanju
- 101 | **Špela Polutnik**, II. gimnazija Maribor
Ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka v kozjih in ovčjih sirih s qPCR-metodo
- 102 | **Lana Mohorič**, Gimnazija Jurija Vege Idrija
Vsebnost živega srebra v vrtninah
- 103 | **Lara Kalin, Jakob Auersperger, Jan Kastelec**, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija Novo mesto
Izdelava lastnega sistema za proizvodnjo etanola

104 | **Živa Vilfan, Nina Malovrh**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana,
Gimnazija in veterinarska šola
Analiza prisotnosti odpornostnih genov pri križancih navadnega fižola



Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!

V času neprestanih sprememb v družbi in svetu okoli nas je malo stalnic. Ena od njih pa gotovo ostaja: znanje. Odgovore na vedno težja vprašanja, ki so pred nami, bomo lahko našli le skupaj, z dobronamernim prizadevanjem in energijo. Znanost nam je pri tem izvir spoznanj, zamisli in rešitev, ustvarjenih z navdihom in trdim delom.

Letošnje Krkine nagrade nas ponovno utrjujejo v prepričanju, da smo na pravi poti. Vse naloge, posebej pa nagrajene, dokazujejo, da je za uspešno raziskavo potrebna zakladnica znanja, a tudi enkratni preblisk, ki mu sledita pronicljivost in vztrajnost.

Neutrudno stremljenje za novim in boljšim se ne ustavi, tako v laboratorijih in predavalnicah kot tudi pri nas, v Krki. Zato nas veseli, da skupaj stopamo po tej poti.

Na vaši nadaljnji poti vam želimo veliko uspeha in vztrajnosti!

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

Dear Prize winners,

There are only few constants in the ever changing world we live in. One of them is knowledge. Only together, through positive effort and energy, can we find the answers to the increasingly difficult questions that lay ahead. In this quest of ours, science serves as the source of knowledge, ideas and solutions achieved through inspiration and hard work.

This year's Krka Prizes again give us confidence that we are on the right path. All the submitted papers and especially the awarded ones prove that successful research is not possible without extensive knowledge and a unique inspiring idea accompanied by insightful understanding and perseverance.

Relentless search for novelties and improvements never stops – not in laboratories, not in classrooms, and certainly not at Krka. We are happy we can pursue this path together.

We wish you every success and determination in your future endeavours!

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Council

KRKINI NAGRAJENCI 2022

KRKA PRIZE WINNERS 2022

VELIKE KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Maja Bjelošević Žiberna	doktorica znanosti s področja farmacije	Pegi Ahlin Grabnar	2982
Ana Dolšak	doktorica znanosti s področja farmacije	Matej Sova Urban Švajger	2983
Anja Kristl	doktorica znanosti s področja kemije	Matevž Pompe	2984
Tina Vida Plavec	doktorica znanosti s področja farmacije	Aleš Berlec Borut Štrukelj	2985
Nejc Petek	doktor znanosti s področja kemije	Bogdan Štefane	2986

KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Monika Horvat	doktorica znanosti s področja kemije	Jernej Iskra	2987
Kaja Bergant Loboda	doktorica znanosti s področja farmacije	Andrej Perdih Izidor Sosič	2988
Andrej Šterman	doktor znanosti s področja farmacije	Zdenko Časar Izidor Sosič	2989
Veronika Furlan	doktorica znanosti s področja kemije	Urban Bren	2990
Mitja Pohlen	doktor znanosti s področja farmacije	Rok Dreu	2991



Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Ana Kovačič	doktorica znanosti s področja kemije	Ester Heath Tina Kosjek	2992
Kity Požek	magistrica biokemije	Igor Križaj Vera Župunski Adrijana Leonardi	2993
Nika Marolt	magistrica biotehnologije	Matic Legiša	2994
Grega Bajc	magister farmacije	Franc Vrečer Klemen Korasa	2995
Nina Zupan	magistrica farmacije	Ilija German Ilić Susanne Muschert	2996
Teo Mlinšek	študent medicine	Katarina Trebušak Podkrajšek Marija Holcar	2997
Tanja Zupan	magistrica biokemije	Jerica Sabotič Gregor Gunčar	2998
Nina Hrvatič	magistrica farmacije	Mirjam Gosenca Matjaž Mercedes Vitek	2999
Uroš Vezonik	magister kemije	Janez Košmrlj	3000
Ana Medic	magistrica farmacije	Lovro Žiberna Irena Zajc	3001
Nina Ravbar	magistrica farmacije	Lea Knez	3002
Rok Herman	doktor medicine	Mojca Jensterle Sever	3003
Špela Bizjak	magistrica farmacije	Žiga Jakopin Samo Guzelj	3004
Eva Rajh	magistrica biokemije	Mojca Benčina Gregor Gunčar	3005
Maja Mavri	magistrica farmacije	Tihomir Tomašič Jaka Dernovšek	3006
Ana Gorenc	magistrica kemije	Uroš Grošelj	3007
Mišel Hozjan	magister kemije	Uroš Grošelj	3008
Kristina Matić	magistrica inženirka prehrane	Bojana Bogovič Matijašič Robert Roškar	3009
Suzana Kralj	univerzitetna diplomirana inženirka živilstva in prehrane	Anja Klančnik	3010

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Martin Rihtaršič	univerzitetni diplomirani kemik	Jernej Iskra	3011
Kristina Žagar	magistra promocije zdravja	Katja Pesjak Saša Kadivec	3012
Rok Sušnik	dijak	Eva Šajn	3013
Barbara Makovec	dijakinja	Jure Mravlje	3014
Tjaša Karas	dijakinja	Mateja Godec Darija Cör Andrejč Maša Knez Marevci	3015
Lea Ažbe	dijakinja	Rok Rudež	3016
Matija Derganc	dijak	Alenka Mozer	3017
Jakob Golubić	dijak	Tihomir Tomašič	3018
Tim Šinko	dijak	Nina Kacjan Maršič Vesna Hojnik Anita Mustač	3019
Rea Doria Bergant	dijakinja	Janja Pust	3020
Tea Vovko	dijakinja	Katarina Sluga Zupančič	3021
Julija Skrt	dijakinja	Alenka Mozer	3022
Jaša Krevh	dijak	Mihaela Skrt Ilja Gasan Osojnik Črnivec	3023
Vid Bauman	dijak	Katja Andrina Kravanja Darja Kravanja	3024
Zoja Gobec	dijakinja	Jure Škraban	3025
Ema Švarc	dijakinja	Tadeja Vajdič Janja Trček	3026
Nik Podkrajšek	dijak	Daniela Vlačič Miran Šebeštjen	3027
Kaja Bedernjak	dijakinja	Mateja Godec Gabrijela Horvat	3028
Taja Natek	dijakinja	Eneko Jose Madorran Esteiro	3029
Lina Winkler	dijakinja	Katja Holnhaner Zorec	3030
Jakob Kecelj	dijak	Cirila Jeras	3031
Ana Pibernik	dijakinja	Renata Capuder Mermal Elvira Boršič	3032

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Pia Rak	dijakinja	Irena Kurajić	3033
Kristina Sinur	dijakinja	Mitja Turk	3034
Kaja Dragan	dijakinja	Janez Gorenc	3035
Lea Lisec	dijakinja		3036
Jan Špiclin	dijak	Marko Šafran	3037
Špela Polutnik	dijakinja	Katja Holnthaner Zorec Nataša Toplak	3038
Lana Mohorič	dijakinja	Valerija Šemrl Kosmač Jože Kotnik Tatjana Dizdarević Karmen Slak Leoni Marjanca Poljanšek	3039
Jakob Auersperger	dijak	Goran Pešič	3040
Jan Kastelec	dijak	Kostja Makarović	3041
Lara Kalin	dijakinja	Simon Vovko	3042
Živa Vilfan	dijakinja	Barbara Pipan	3043
Nina Malovrh	dijakinja	Teja Krpan Gašper Jan Simon	3044

KRKINA PRIZNANJA S POSEBNO POHVALO PREJEMNIKI

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Isidora Čobanov Marinković	doktorica znanosti s področja kemije	Marija Bešter-Rogač Milan Vraneš
Sanja Nabergoj	doktorica znanosti s področja toksikologije	Žiga Jakopin Irena Mlinarič-Raščan
Katarina Bačnik	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Maja Ravnikar Denis Kutnjak
Tjaša Plaper	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Mojca Benčina
Daša Pavc	doktorica znanosti s področja kemije	Primož Šket
Marko Milojević	doktor znanosti s področja medicinskih ved	Uroš Maver Andraž Stožer



Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Jasna Grželj	doktorica znanosti s področja farmacije	Irena Mlinarič-Raščan Alenka Šmid
Edvin Purić	magister farmacije	Marko Anderluh Janez Mravljak
Nika Žnideršič	magistrica kemije	Martin Gazvoda
Vid Modic	magister biokemije	Anže Županič Marina Klemenčič
Maja Vodlan	študentka medicine	Peter Veranič Mojca Pavlin
Azra Ahmić	magistrica farmacije	Tihomir Tomašič Živa Zajec
Uroš Rapuš	magister kemije	Jakob Kljun
Špela Koren	magistrica biokemije	Toni Petan Marina Klemenčič
Anja Štangar	magistrica laboratorijske biomedicine	Katarina Trebušak Podkrajšek Maruša Debeljak
Nuša Japelj	magistrica farmacije	Lea Knez
Maja Badovinac	magistrica farmacije	Mirjam Gosenca Matjaž Robert Roškar
Laura Pavlin Gregorčič	magistrica farmacije	Matej Sova
Ida Brcar	magistrica kemije	Janez Košmrlj
Eva Majhenič	magistrica farmacije	Jurij Trontelj
Lucija Kočevar	magistrica farmacije	Martina Gobec Matjaž Weiss
Sara Petek	magistrica mikrobiologije	Andreja Nataša Kopitar
Matej Kolenc	magister industrijske farmacije	Alenka Zvonar Pobirk
Gloria Krapež	magistrica molekularne biologije	Barbara Breznik Metka Novak
Stefan Lukić	magister farmacije	Rok Dreu
Tilen Pilpah	magister inženir kemijskega inženirstva	Polona Žnidaršič Plazl

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Urška Virant	magistrica industrijske farmacije	Petra Kocbek Tanja Potrč
Manca Vertot	magistrica mikrobiologije	Anja Klančnik Jerica Sabotič
Anja Hrovat	magistrica farmacije	Robert Roškar Timeja Planinšek Parfant
Ana Milovanović Ema Ajda Gomezelj	študentka medicine študentka medicine	Gregor Poglajen
Veronika Bračič	univerzitetna diplomirana kemičarka	Franc Požgan Peter Rodič
Zala Serianz	univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije	Maja Leitgeb Mateja Primožič Nika Kučuk
Jan Gimpelj	univerzitetni diplomirani inženir kemijske tehnologije	Urban Bren Marko Jukić
Zala Stopar	univerzitetna diplomirana kemičarka	Jakob Kljun
Simon Kmet	inženir elektrotehnike	Matevž Čadonič Jani Zore

KRKINA PRIZNANJA PREJEMNIKI

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Jernej Repas	doktor znanosti s področja medicinskih ved	Mojca Pavlin Armin Gerger
Barbara Starešinič	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Maja Čemažar
Janja Murn	magistrica industrijske farmacije	Stane Pajk
Eva Pogorelc	magistrica kemije	Marija Bešter Rogač Slobodan Gadžurić
Jan Kopecky	magister biologije in ekologije z naravovarstvom	Jurij Dolenšek Andraž Stožer
Klara Kočevar	magistrica kemije	Drago Kočar



Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Petra Prebanda	magistrica farmacije	Julijana Kristl Anže Zidar
Lea Lamovšek	magistrica farmacije	Jurij Trontelj Tina Kosjek
Anja Vehar	magistrica kemijskega inženirstva	Andreja Žgajnar Gotvajn Ester Heath
Neža Kugonič	magistrica farmacije	Eva Tavčar
Samantha Roudi	magistrica laboratorijske biomedicine	Katarina Trebušak Podkrajšek Samir El Andaloussi
Matej Božič	magister farmacije	Ilija German Ilić Alenka Zvonar Pobirk
Blažka Šturm Janja Smola	študentka medicine študentka medicine	Metka Lenassi Aleš Tomažič
Nastja Cerjak	magistrica molekulske in funkcionalne biologije	Kristina Sepčič Anastasija Panevska
Monika Prašnikar	magistrica farmacije	Špela Zupančič
Simon Bercko	magister industrijske farmacije	Jurij Trontelj Romana Cerc Korošec
Mina Nikolić	magistrica kemije	Drago Kočar Martin Šala
Meta Božič	magistrica farmacije	Sergej Pirkmajer Katarina Miš
Andraž Oštir	magister farmacije	Nina Kočevar Glavač Matjaž Ravnikar
Danijel Lavrič	magister Inženir kemijskega inženirstva	Petra Kotnik Maša Knez Marevci
Mihaela Klasić	doktorica veterinarske medicine	Alenka Seliškar Katerina Tomsič
Jurij Oblak	magister industrijske farmacije	Stane Pajk Damijan Knez
Šejla Trožič	magistrica inženirka radiološke tehnologije	Nejc Mekiš Andrew England
Laura Šubej	magistrica inženirka radiološke tehnologije	Nejc Mekiš Andrej Breznik

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Dorotea Gašpar	doktorica medicine	Jure Knez
Eva Gričar	magistrica farmacije	Saša Čučnik
Anja Srpčič	magistrica laboratorijske biomedicine	Urša Pečar Fonović Marija Nika Lovšin
Sofija Gicheva Volk	magistrica farmacije	Janez Mravljak
Neža Praček Natalija Pavlinjek Katja Stanovšek Samuel Žvanu	študentka biologije študentka biologije študentka biologije študent biologije	Katarina Vogel Mikuš
Patricija Tomše	doktorica medicine	Nataša Marčun Varda Dušanka Mičetić Turk Uroš Maver
Luka Vučkič Laura Volk	študent medicine študentka medicine	Zalika Klemenc Ketiš
Urša Dimnik Barbara Dežman	študentka medicine študentka medicine	Iztok Takač
Kaja Podvratnik	magistrica industrijske farmacije	Nina Kočevar Glavač Katja Schoss
Lara Plohl	univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije	Petra Kotnik
Martin Ciringer	univerzitetni diplomirani inženir kemijskega inženirstva	Miran Gaberšček
Eva Pesrl Rok Hošpel	dijakinja dijak	Mateja Godec Sara Drvarič Talian
Nela Copot Rene Zorman Rene Žizek	dijakinja dijak dijak	Mateja Godec Nina Žuman
Aleksander Kalacun	dijak	Mitja Osojnik Marko Jagodič
Viva Kokalj	dijakinja	Anita Mustač Julija Valh Volmajer
Iva Kuhar Julija Vajs	dijakinja dijakinja	Nina Žuman
Niko Mlinarič	dijak	Katja Holnthaner Zorec Boštjan Vihar

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Megi Jerina Anamarija Japelj	dijakinja dijakinja	Tomaž Žigon Brigita Tomšič Barbara Simončič
Brina Homšak Anja Paar	dijakinja dijakinja	Vesna Hojnik Barbara Janžič
Nejc Horvat	dijak	Petra Košir
Žiga Vaupotič Tian Vesel	dijak dijak	Grega Celcar
Kristina Genc	dijakinja	Mateja Godec Monika Horvat
Matej Novak Iza Šiftar	dijak dijakinja	Marija Meznarič
Daniil Gainullov	dijak	Helena Kregar Ambrož Kregar
Miha Jozelj Tobija Košir	dijak dijak	Marko Jeran Veronika Kralj Igljič Lidija Gnidovec
Eva Vajs Aja Jureš	dijakinja dijakinja	Nina Žuman
Ana Šmid	dijakinja	Rok Rudež Edita Jasiukaitytė Grojzdek Jernej Trojar
Oskar Bohinc Tristan Baš	dijak dijak	Urša Metelko Jerica Sabotič Tanja Zupan
Gaja Jerebic	dijakinja	Mateja Godec Štefan Pintarič Dušan Cvetko
Nika Maučec Daša Smodiš	dijakinja dijakinja	Mateja Godec Matjaž Dlouhy
Neja Štampar	dijakinja	Marija Meznarič Martina Štampar
Barbara Dragovan Viktorija Zupančič	dijakinja dijakinja	Ema Novinec Janja Marković

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Kaja Baler	dijakinja	Marija Meznarič Polona Zalar Sara Baš
Nika Rajzman Anja Kozel	dijakinja dijakinja	Uroš Mikolič





Razpis Sveta Sklada Krkinih nagrad za letošnje, že 52. Krkine nagrade je tako po kvantitativnih kot po kvalitativnih kazalnikih naletel na zelo dober odziv dijakov in študentov. Kakovost in znanstvena vrednost prijavljenih nalog je na visoki ravni. Posamezne naloge, posebej nekatere srednješolske in tudi magistrske študentske naloge, daleč presegajo pričakovano kakovost in znanstveno relevantnost na omenjenih izobraževalnih stopnjah. To kaže, da lahko mladi raziskovalci z dobro izbiro raziskovalnega izziva, predanostjo reševanju in raziskovanju ter podporo in usmerjanjem mentorjev in raziskovalnega okolja dosežejo izjemne rezultate.

Uspešni mladi raziskovalci, med katere zagotovo spadajo tudi prejemniki letošnjih Krkinih nagrad, so odlični ambasadorji znanosti in znanstvenoraziskovalnega dela med mladimi. S svojim zgledom med njimi širijo »kulturo« znanosti in raziskovalnega dela ter tako pripomorejo k njihovem osebnemu razvoju ter boljši pripravljenosti za reševanje današnjih in jutrišnjih izzivov v družbi, gospodarstvu in znanosti.

Mentorjem in somentorjem se iskreno zahvaljujem za vodenje in usmerjanje mladih raziskovalcev. Zahvaljujem se tudi raziskovalnim oziroma pedagoškim inštitucijam, ki so jim omogočile raziskovalno delo in s tem uresničenje njihovih raziskovalnih stremljenj in potencialov.

Vsem prejemnicam in prejemnikom letošnjih Krkinih nagrad in priznanj iskreno čestitam tako v svojem imenu kot tudi v imenu Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad. Hvala, da ste sprejeli izziv in se prijavili na razpis. Na vaši življenjski poti vam želim obilo raziskovalnih, študijskih in osebnih uspehov.

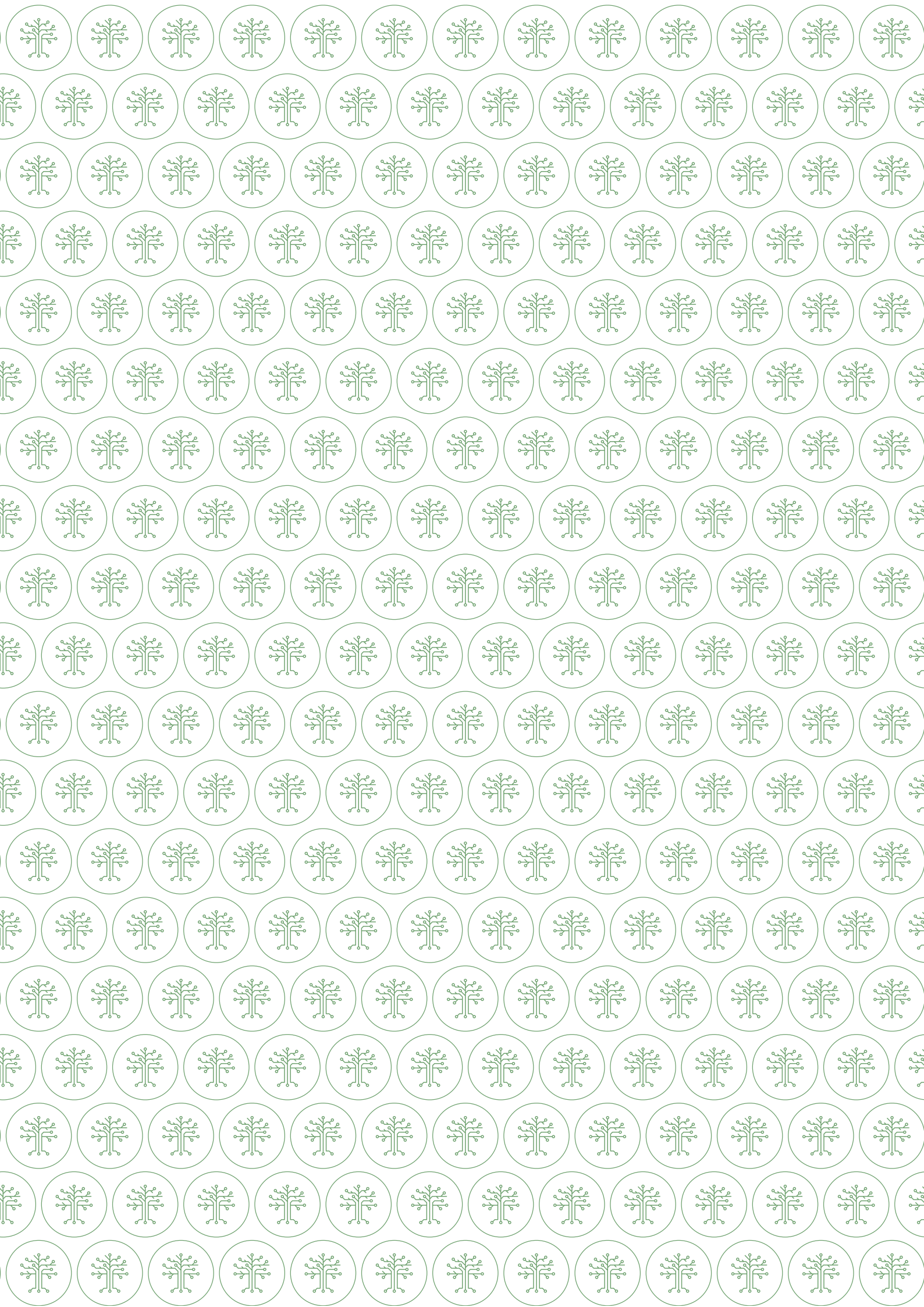
Prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.
Znanstveni odbor Sveta Sklada Krkinih nagrad

This year's call of the Krka Prizes Council for the 52nd Krka Prizes was followed by a very good response by pupils and students both in terms of quantitative and qualitative indicators. The quality and scientific value of this year's research papers were again at a very high level. Some of them, in particular secondary school and master's papers, far exceeded the quality and scientific relevance expected of their respective levels of education. This shows that young researchers can achieve impressive results by carefully choosing research challenges and overcoming them with dedication under the guidance and support of their supervisors and research environment. Successful young researchers, a group that most certainly includes this year's recipients of Krka Prizes, are outstanding science ambassadors and promoters of scientific research among young people. Through example, they promote the 'culture' of science and research work among young people, contributing to their personal development and their capacities to solve present and future challenges in society, industry, and academia.

I would like to sincerely thank all supervisors and co-supervisors for the guidance and support extended to young researchers. I would also like to express my sincere thanks to the educational and research institutions that facilitated the work of young researchers and allowed them to realise their research aspirations and potentials.

On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf, I would like to congratulate all recipients of this year's Krka Prizes. I thank you all for accepting the challenge of Krka Prizes and submitting your research papers. At the same time, I wish you every success in all aspects of your lives – research, academic, and personal.

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



52. KRKINE NAGRADE

52nd KRKA PRIZES

VELIKE KRKINE NAGRADE

KRKA GRAND PRIZES

PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

PRIZE WINNERS

DR. MAJA BJELOŠEVIĆ ŽIBERNA

Izobraževalna pot Maje Bjelošević Žiberna se je začela v Postojni, kjer je prvič sedla v šolsko klop. Šolanje je nadaljevala na splošni gimnaziji v Šolskem centru Postojna, nato pa na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, smer laboratorijska medicina. V visokošolskih klopeh je spoznavala nove ljudi in novo okolje. Znanost jo je tako pritegnila, da je nadaljevala z magistrskim študijem na temo industrijska farmacija. Po dobrem letu dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, kjer je tudi zaposlena, se je vpisala v doktorski študijski program Biomedicina, smer farmacija, in ga leta 2021 uspešno končala. Že kot otroka so jo navduševali ljudje v belih haljah in naravoslovni izzivi, predvsem pa je vedno želela opravljati poklic, katerega vodilo bo skrb za sočloveka.



Moje vodilo je skrb za sočloveka

Moje raziskovanje je usmerjeno v farmacevtsko tehnologijo, natančneje v razvoj in vrednotenje formulacij z biološkimi zdravilnimi učinkovinami. Že med študijem me je pritegnila njihova raznolikost, izziv pa sta mi predstavljala formuliranje in razvijanje tehnoloških postopkov za njihovo proizvodnjo. Tako ni bilo dileme, ali se odzvati povabilu prof. dr. Mirjane Gašperlin in izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar k sodelovanju pri raziskovalnem delu na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, usmerjenem na področje bioloških zdravilnih učinkovin. Osnovno sporočilo moje raziskovalne naloge je, da je liofilizacija, ki poteka pod ustrezno optimiranimi pogoji, kljub kompleksnosti postopka primerna metoda za razvoj kakovostnih bioloških zdravil. Kako s formulacijskega in procesnega vidika te pogoje doseči, je stvar izkušenj in pridobljenega znanja. Rešitve so bile in bodo še neposredno implementirane v prakso, obenem pa predstavljajo trdne temelje za nadaljnji razvoj bioloških ali biološko podobnih zdravil na nacionalni ravni in širše.

ODKRIVANJE NOVEGA

Pri raziskovanju me navdihuje, da s svojim delom in izkušnjami sčasoma odkrijem nekaj novega, pomembnega. Veseli me, da številnim poskusom pa tudi neuspehom sledi svetel kamenček, ki prispeva v mozaik slovenske znanosti in nosi delček mene. Najboljše ideje se mi navadno porajajo v prostem času, ko so misli le posredno usmerjene na raziskovalna vprašanja, ali pa med diskusijo s sodelavkami in sodelavci in po njej, najbolje ob kavi.

MENTOR TE VODI IN PODPIRA

Vloga mentorja je za mlade raziskovalce ključna. To je oseba, ki te vodi, ti svetuje in te podpira. Ponosna je na tvoje uspehe in je trdna opora, ko je težko. Mentorica izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar mi je bila v veliko oporo tako po strokovni kot človeški plati. Vedno je bila pripravljena pomagati in navdihovati s pozitivnimi mislimi in, kar je zame bistveno, verjela je vame in v moje ideje ter spoštovala moj pogled na svet in ustvarjanje lastnega mnenja.

RAZISKOVANJE ZAHTEVA CELEGA ČLOVEKA

Raziskovalno delo zahteva celega človeka. Pomembne so jasne misli. Zasebnega in profesionalnega življenja ni mogoče popolnoma ločiti. Raziskovalni izzivi včasih človeku onemogočajo popolno predanost družini, zasebni pa vplivajo na

učinkovitost raziskovalnega dela. Dobre delovne razmere in dobri odnosi v kolektivu na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, kjer sem zaposlena kot asistentka, nedvomno vplivajo na razvoj mojih potencialov in na doseganje ciljev. Obenem sem neizmerno hvaležna, da imam doma že od otroštva močno podporo staršev in brata, zdaj pa tudi moža. Ljubljana, kjer živim, mi predstavlja prostor, kjer sem lahko prava jaz, Postojna pa mi vselej ponudi varen pristan. Obožujem potovanja, sprehode v naravi in druženje s prijatelji. Tako si nabereš novo energijo in zbistriš glavo za nadaljnje delo.

Fakulteta za farmacijo mi je dala veliko. Skupaj z raziskovalno skupino se trudim prispevati k še večji kakovosti in prepoznavnosti fakultete tako z raziskovalnega kot pedagoškega vidika. Ostajam zvesta slovenski znanosti, ki je za razvoj družbe zelo pomembna.

POTRDITEV, DA SEM NA PRAVI POTI

Krka že vrsto let prispeva k razvoju naše države. Podeljevanje nagrad za raziskovalno delo spodbuja, motivira, vpliva na prepoznavnost raziskovalcev in nam odpira marsikatera vrata. Krkina nagrada mi pomeni potrditev, da sem na pravi poti ter da je moje delo opaženo in cenjeno. Biti Krkina nagrajenka mi je v veliko čast, obenem pa čutim odgovornost do nadaljnjega dela in prispevka k farmacevtski znanosti.

SPOROČILO MLADIM

Sledite svojim sanjam. Delujte v dobro človeka in nikoli ne pozabite na slovensko znanost. Bodite vztrajni. »Ko hodiš, pojdi zmeraj do konca ... A če ne prideš ne prvič, ne drugič do krova in pravega kova, poskusi: vnovič in zopet in znova.« (Tone Pavček)

NAJBOLJŠI NASVET

Nikoli ne obupajte in naj vam kompleksnost raziskovalnega dela ne vzame zagona. Ne ozirajte se na to, kakšno vrednost pripisuje vašemu delu okolica, cenite in negujte lastno vrednost.

ŽIVLJENJSKO VODILO

»Kdor hoče videti, mora gledati s srcem. Bistvo je očem nevidno.« (Mali princ)

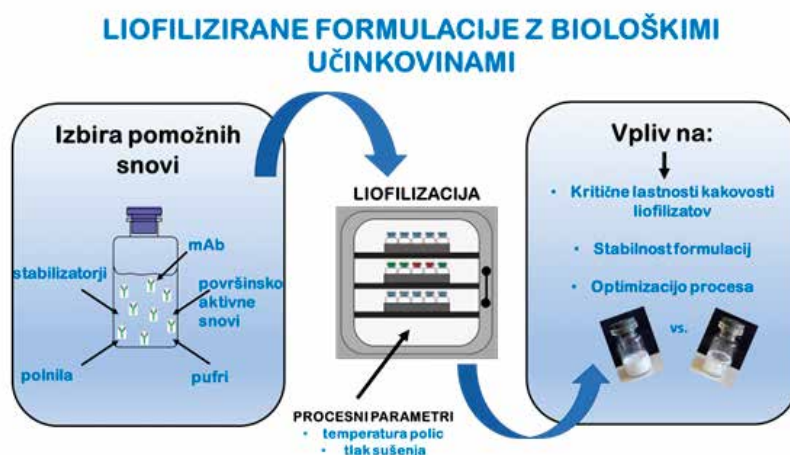


Razvoj in optimizacija procesa liofilizacije formulacij z biološkimi učinkovinami

V zadnjih letih so biološka in biološko podobna zdravila na farmacevtskem področju doživela velik razcvet. Gre za skupino zdravil, ki kot aktivno zdravilno učinkovino vsebujejo različne proteinske molekule. Kot eno najpomembnejših in najbolj zastopanih skupin velja omeniti monoklonska protitelesa (mAb).

Biološke molekule so kot nosilke zdravilnega učinka prispevale k napredku v zdravljenju številnih bolezni. Biološka zdravila imajo številne prednosti pred sintezni zdravili, vendar pa je njihova proizvodnja veliko bolj kompleksna in dolgotrajna. Zagotavljanje stabilnosti proteinskih molekul je bistvenega pomena, saj neposredno vpliva na varnost, kakovost in učinkovitost zdravila. Posledično med biološkimi zdravili prevladujejo parenteralne farmacevtske oblike, kot so raztopine, suspenzije ali liofilizati. Liofilizacija oziroma sušenje z zamrzovanjem je tehnološki postopek, ki temelji na fizikalnem pojavu sublimacije, kjer začetnemu zamrzovanju sledita primarno in sekundarno sušenje. Znano je, da je liofilizacija dolgotrajen in energetsko zelo potraten proces, zato je za upravičenost stroškov nujno potrebna njena optimizacija. Ta temelji predvsem na uporabi agresivnih pogojev primarnega sušenja kot najbolj dolgotrajne faze procesa. Pomožne snovi, kot so stabilizatorji, polnila, površinsko aktivne snovi in pufne soli, predstavljajo osnovo formulacij s proteini, z vidika optimizacije procesa pa igrajo bistveno vlogo polnila (slika 1). Vključitev kristaliničnih polnil, kot sta manitol in glicin, v proteinske formulacije omogoča izvedbo primarnega sušenja pri temperaturah, ki so višje od kritičnih temperatur formulacij.

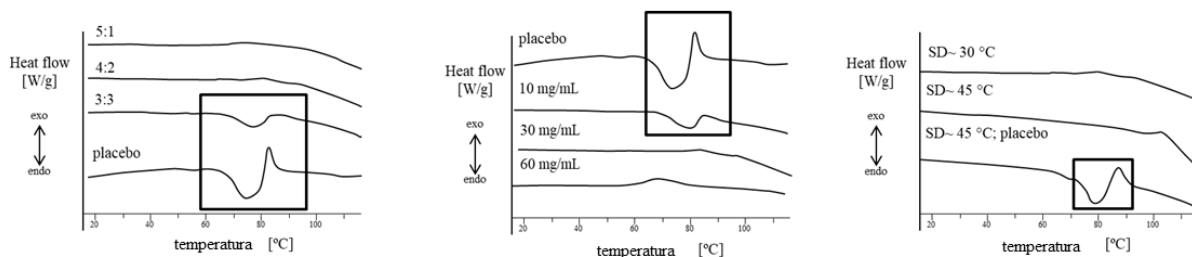
Kristalinična polnila zagotavljajo ustrezno strukturo liofilizata in ohranitev kritičnih atributov kakovosti produkta, tudi če je med primarnim sušenjem presežena temperatura steklastega prehoda kritično koncentrirane zamrznjene raztopine (T_g') in v nekaterih najnovejših sistemih tudi temperatura kolapsa (T_c). Kljub temu da je intravenska aplikacija najpogostejši način dajanja zdravil z mAb, se v zadnjem času srečujemo s porastom formulacij za subkutano aplikacijo, ki imajo številne prednosti, med katerimi je najpomembnejša zmanjšanje stroškov oskrbe zaradi manj pogoste aplikacije, ki jo v določenih primerih izvedejo kar bolniki sami, posledično pa se z uporabo tovrstnih zdravil povečuje komplanca bolnikov. S tehnološkega vidika gre za pripravo formulacij, pri katerih se srečamo s številnimi izzivi, predvsem zaradi majhnih volumnov, ki so posledica vrste aplikacije, zato pri zdravilih za subkutano uporabo govorimo o visokokonzentriranih oblikah formulacij. Izpostaviti velja tudi povečano viskoznost raztopin za subkutano injiciranje, ki nemalokrat omejuje injektabilnost formulacij.



Slika 1. Vpliv pomožnih snovi na proces in na lastnosti kakovosti liofilizatov.

V prvem delu doktorske naloge smo se osredotočili na načrtovanje in optimizacijo liofilizacijskih ciklov. Pripravili smo dve formulaciji, ena je vsebovala samo saharozo, druga pa poleg saharoze tudi glicin (polnilo), ter ju liofilizirali v agresivnih in konzervativnih pogojih. Z agresivnimi pogoji sušenja smo dokazali, da lahko primarno sušenje izvajamo pri višjih temperaturah in tlakih ter s tem čas sušenja skrajšamo za do 54 % brez vpliva na kritične lastnosti produkta, kot so videz liofilizata, rekonstitucijski čas in delež rezidualne vlage, ter na stabilnost mAb. V drugem delu smo proučili vpliv razmerja med mAb in stabilizatorjem (saharozo) ter vpliv koncentracij mAb na stabilnost modelnega mAb. Osredotočili smo se na določanje fizikalne in kemijske stabilnosti testiranega mAb pred liofilizacijo in po njej ter v okviru stresne stabilnostne študije. Najpogostejši pojav nestabilnosti proteinov se kaže v okviru fizikalne nestabilnosti, najpogostejša oblika je agregacija. Na začetku smo pripravili formulacije s štirimi molarimi razmerji mAb/saharozo (1 : 140, 1 : 280, 1 : 420, 1 : 850) ter tremi koncentracijami mAb (10, 20 in 30 mg/mL). Pridobljeni rezultati kažejo, da večji deleži saharoze vodijo k boljši fizikalni in kemijski stabilnosti, in sicer takoj po procesu liofilizacije kot tudi po 1 in 3 mesecih stresne stabilnostne študije. Nasprotno pa z zviševanjem koncentracije mAb narašča delež agregatov, pri čemer višja koncentracija mAb pomeni manj molekul saharoze na molekulo proteina. Enak trend smo opazili pri vrednotenju kemijske stabilnosti, ki se z zmanjševanjem molarne razmerja med saharozo in mAb ter zviševanjem koncentracije mAb slabša. V študijo smo vključili tudi višje koncentracije mAb (60, 90, 120, 150 mg/mL) in ugotovili, da ob primernem razmerju s saharozo med liofilizacijo in po njej ohranijo ustrezno stabilnost. Kot nadgradnjo proučevanja vpliva pomožnih snovi smo podrobneje ovrednotili vpliv manitola in njegovih polimorfov na stabilnost mAb in kritične lastnosti kakovosti liofilizatov ter s spreminjanjem sestave formulacije in procesnih spremenljivk ugotavljali, kakšni pogoji vodijo v nastanek polimorfne oblike manitol hemihidrata (MHH, slika 2). Dokazali smo, da MHH nastaja, ko je razmerje med saharozo in manitolom nizko, ter da višja koncentracija mAb inhibira kristalizacijo v MHH. Dokazali smo tudi, da z zvišanjem temperature sekundarnega sušenja in temperiranja omogočimo popolno dehidracijo MHH ter da primarno sušenje ne vpliva na nastanek MHH. Zaključili smo z ugotovitvijo, da MHH ne vpliva na stabilnost mAb, da pa nanjo vpliva manitol.

Zadnji del doktorske naloge smo namenili formulacijam za subkutano uporabo. Ovrednotiti smo želeli vpliv visokih koncentracij mAb na viskoznost raztopin ter rekonstitucijski čas liofilizatov. Podrobneje smo proučili vpliv agresivnih pogojev sušenja na formulacije z različnimi koncentracijami mAb (30, 60, 90 in 120 mg/mL), ki smo jih najprej ovrednotili z vidika termičnih lastnosti in viskoznosti. Zvišanje koncentracije mAb je nakazovalo trend zvišanja T_g' ter eksponentno naraščanje viskoznosti. Na podlagi analiz smo dokazali, da višanje koncentracije mAb ne vpliva na stabilnost mAb zaradi dovolj velikega deleža saharoze. Primerjava med agresivnimi in konzervativnim ciklom je pokazala, da lahko cikel z agresivnimi pogoji skrajšamo za do 80 % in s tem ne vplivamo na kritične lastnosti produkta. V raziskovalno študijo smo vključili tudi različne aminokisliline (polnila) in ugotovili, da je potencialna alternativa manitola za nizkokoncentrirane formulacije izolevcin, medtem ko njegova uporaba v formulacijah z visokimi koncentracijami mAb še vedno ostaja vprašljiva.



Slika 2. DSC-termogrami z dehidracijskimi vrhovi manitol hemihidrata (MHH) v odvisnosti od (z leve proti desni): razmerja M/S, koncentracije modelnega mAb in temperature police pri sekundarnem sušenju (SD).

Development and Optimisation of Lyophilisation Process of Biopharmaceuticals

In recent years, biopharmaceuticals in the pharmaceutical field have experienced a great expansion. They are a group of drugs that contain various protein molecules as an active pharmaceutical ingredient, with monoclonal antibodies (mAbs) as one of the most important and most represented groups. Biological molecules have changed the current methods of treatment and thus contributed to its progress. Biopharmaceuticals have many advantages over conventional synthetic drugs, but their production is much more complex and time-consuming. Ensuring the stability of protein molecules is essential as it directly affects the safety, quality, and efficacy of a drug, thus parenteral pharmaceutical forms in the form of solutions, suspensions or lyophilisates predominate among biological drugs. Lyophilisation or freeze-drying is a technological process based on the physical phenomenon of sublimation, where the initial freezing is followed by primary and secondary drying. Lyophilisation is known to be a long-term and energy-intensive process, so in order to ensure cost eligibility, its optimisation is essential. The latter is mainly based on the use of aggressive primary drying conditions, as primary drying is the most intensive stage of the process. Excipients such as stabilisers, bulking agents, surfactants, and buffers form the basis of protein formulations, and from the point of view of process optimisation, bulking agents play an essential role (Figure 1). Incorporation of crystalline bulking agents, such as mannitol and glycine, into protein formulations allows primary drying to be performed at temperatures above the critical temperature of the formulations. Crystalline bulking agents ensure proper structure of lyophilisates and preservation of critical quality attributes of the product, even if the glass transition temperature of maximally freeze-concentrated solutions (T_g') is exceeded during primary drying and, in some cases, also the collapse temperature (T_c). Despite the fact that the intravenous route of administration is the most common way of administering drugs with mAb, we have recently encountered an increase in formulations for subcutaneous application. The latter shows a number of advantages, the most important of which is reduction of costs due to less frequent application, which in some cases is performed by patients themselves, and consequently the use of such drugs increases patient compliance. From a technological point of view, it is the preparation of formulations that faces many challenges, especially in terms of low volumes due to the type of application; therefore, drugs for subcutaneous use involve highly concentrated formulations. At this point, the increased viscosity of solutions for subcutaneous injection should be mentioned, which often limits the injectability of such formulations.

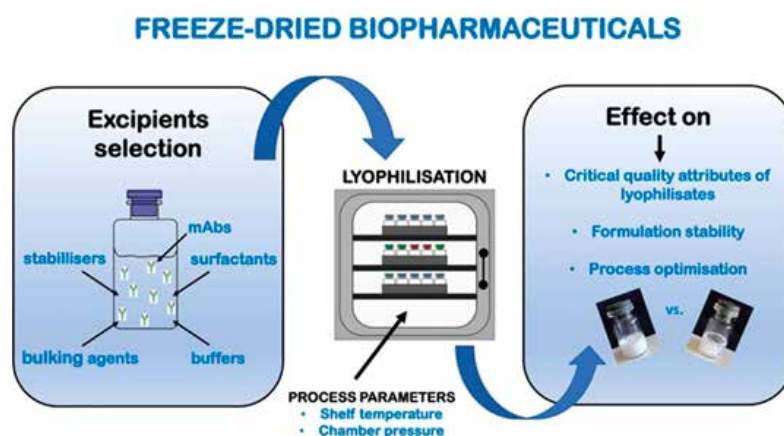


Figure 1. Effect of excipients on the process and quality attributes of lyophilisates.

In the first part of the doctoral thesis, we focused on the planning and optimisation of lyophilisation cycles. We prepared two different formulations, namely a formulation containing only sucrose and a formulation containing glycine (bulking agent) in addition to sucrose. We lyophilised them under aggressive and conventional conditions. By introducing aggressive drying conditions, we proved that primary drying can be performed at higher temperatures and pressures, which shortens drying for up to 54%, without affecting critical properties of the product such as lyophilisate appearance, reconstitution time and residual moisture content. The stability of the mAb remained unaffected as well. In the second part, we examined the influence of different mAb to stabiliser ratio (sucrose) and the influence of mAb concentrations on the stability of model mAb. We focused on determining the physical and chemical stability of the tested mAb before lyophilisation, after lyophilisation, and as part of a stress stability study. The most common phenomenon of protein instability is manifested in the context of physical instability, the most common form being aggregation. Initially, formulations were prepared with four different mAb/sucrose molar ratios (1:140, 1:280, 1:420 and 1:850) and three different mAb concentrations (10, 20 and 30 mg/mL). The obtained results show that higher sucrose proportions lead to better physical and chemical stability, immediately after the lyophilisation process, as well as after 1 and 3 months of stability study. In contrast, as the mAb concentration increases, the proportion of aggregates increases, since a higher mAb concentration means less sucrose molecules per protein molecule. The same trend was observed in the evaluation of chemical stability, which becomes lower as the molar ratio between sucrose and mAb decreases and the concentration of mAb increases. Furthermore, higher concentrations of mAb (60, 90, 120, 150 mg/mL) were also included in the study. It was found that with the appropriate ratio of sucrose, mAb maintains adequate stability during and after the lyophilisation process. As an upgrade of the study, we evaluated in more detail the influence of mannitol and its polymorphism on mAb stability and critical quality properties of lyophilisates, and determined the conditions leading to the formation of polymorphic form of mannitol hemihydrate (MHH; Figure 2) by changing the composition and process variables. We have shown that the MHH occurs when the ratio of sucrose to mannitol is low and that a higher concentration of mAb inhibits crystallisation in MHH. We further proved that by raising the temperature of the secondary drying and annealing, a complete dehydration of MHH is enabled and that the formation of MHH is not affected by primary drying. We concluded that MHH does not affect the stability of mAb, whereas stability is affected by the presence of mannitol. The last part of the doctoral thesis was dedicated to formulations for subcutaneous use. The aim was to evaluate the effect of high mAb concentrations on the viscosity of solutions and the reconstitution time of lyophilisates. The effect of aggressive drying conditions on formulations with different mAb concentrations, i.e. 30, 60, 90 and 120 mg/mL, was studied in more detail. The latter were first evaluated in terms of thermal properties and viscosity, namely the increase in mAb concentration indicated an upward trend in T_g' and an exponential increase in viscosity. As regards stability, we demonstrated that the increase in mAb concentration does not affect the stability of mAb due to the sufficiently large proportion of sucrose. A comparison between the aggressive and conventional cycles showed that by using aggressive conditions a shortening of the cycle by up to 80% is achieved with no effect on the critical properties of the product. We further included various amino acids (bulking agents) in the research study and found that isoleucine is a potential alternative to the use of mannitol for low-concentration formulations, while its use for highly concentrated mAb formulations remains questionable.

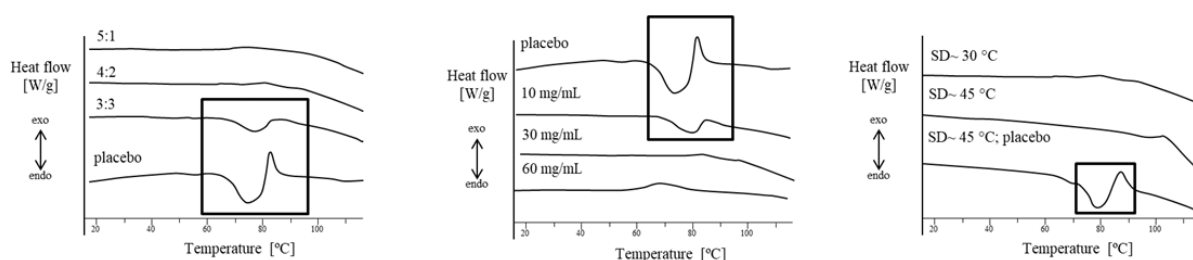


Figure 2. DSC thermograms representing intensity of MHH dehydration peaks as a function of (from left to right): M/S ratio, model mAb concentration, and secondary drying (SD) shelf temperatures.

DR. ANA DOLŠAK

Ana Dolšak je bila že kot otrok radovedna, in čeprav jo je zanimalo veliko stvari, od naravoslovja do zgodovine in glasbe, je že v rani mladosti želela postati farmacevtka. Prevladala je preprosta želja pomagati ljudem in temu poslanstvu se posveča še danes. Izbira fakultete po končani Gimnaziji Želimlje nikoli ni bila vprašljiva. Že med študijem farmacije na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani se je vključila v raziskovalno delo na Katedri za farmacevtsko kemijo. Tu je kot mlada raziskovalka nadaljevala doktorski študij na področju biomedicine, smer farmacija, in tu je zdaj zaposlena kot raziskovalka. Poudari, da bo pri delu vedno stremela k zagotavljanju kakovostnejšega življenja ljudi, ne gleda na to, kam jo bo zanesla poklicna pot.



Za uspeh je treba trdo delati

Primarno področje mojega raziskovanja je farmacevtska kemija, ukvarjam pa se z razvojem imunomodulatorjev, spojin, ki so sposobne uravnati delovanje imunskega sistema. Moje delo je osredotočeno na tri tarče imunskega sistema – na encim indolamin 2,3-dioksigenazo 1 ter na Tollu podobna receptorja tipov 7 in 8. Na izbranih tarčah sem se po začetnem računalniškem načrtovanju spojin zadetkov lotila sinteze knjižnice analogov teh spojin. Njihove aktivnosti sem ovrednotila z encimskimi in celičnimi testi, pri najaktivnejših pa sem s funkcijskimi testi preverila še sposobnost imunomodulatornega delovanja. Razvili smo nizkomolekularne zaviralce indolamin 2,3-dioksigenaze 1 ter agoniste Tollu podobnega receptorja 7, ki bodo pripomogli k razvoju učinkovin za terapijo rakavih obolenj. Tako razviti negativni modulatorji Tollu podobnega receptorja tipa 8 predstavljajo pomembne kemijske proge za optimizacijo do spojin vodnic, uporabnih za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Sočasno smo optimizirali tudi postopek tvorbe vezi C–C, ki bi zaradi kratkega reakcijskega časa in majhne porabe katalizatorja lahko bil zanimiv tudi za industrijsko uporabo.

POVEZOVANJE ZNANJA IN IZKUŠENJ

Vsakdanji navdih črpam iz rešitev majhnih problemov. Pozdravljam sodelovanje več različnih strokovnjakov, saj ima vsak svoj pogled na določeno vprašanje, kar se odraža v optimalnih rešitvah. Interdisciplinarnost je na našem področju izjemnega pomena, saj lahko le s komplementarnim znanjem z različnih področij dosežemo prebojne rezultate. Najboljše ideje se mi pogosto porodijo zvečer, ko si zbistrim misli ter ovrednotim nasvete in konstruktivne kritike sodelavk in sodelavcev.

POMEMBNA VLOGA MENTORJA

Vloga mentorja je nenadomestljiva zlasti na začetku raziskovalne poti, ko so njegove usmeritve in nasveti za uspešno zasnovo raziskovalnega dela neprecenljivi. V kasnejšem procesu raziskovanja se njegova vloga kaže predvsem v koordinaciji zagotavljanja razpoložljivih virov, da bi lahko cilje dosegli v določenem časovnem okviru. Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Mateju Sovi in somentorju izr. prof. dr. Urbanu Švajgerju, ki sta mi vedno pomagala z nasveti in izkušnjami ter omogočila, da je moje raziskovalno delo potekalo brez večjih zapletov.

RAZISKOVALNO DELO JE NAČIN ŽIVLJENJA

Znanstvenoraziskovalno delo zahteva celega človeka, zelo težko je ločiti poklicno življenje od zasebnega. Ob večerih pogosto razmišljam o delu in načrtujem nove eksperimente. Kljub vsemu si poskušam vzeti čas tudi zase. Proste trenutke rada preživljam z bližnjimi, sprosti me dobra knjiga, baterije pa si napolnim zlasti s sprehodi v naravi. Pri delu sta moja zaveznika vztrajnost in trma, ki gresta pogosto z roko v roki. Skupaj z optimizmom mi pomagata, da ne obupam zlahka. Zanima me veliko različnih področij, široko znanje pa je pomembna naložba pri soočanju z izzivi v poklicnem in zasebnem življenju. Vedno sem pripravljena pomagati in svoje izkušnje z veseljem delim s študenti, ki zaidejo v naš laboratorij.

KRKINA NAGRADA ME MOTIVIRA

Krkine nagrade že več kot pol stoletja spodbujajo sodelovanje in povezovanje akademskega okolja z gospodarstvom, hkrati pa so pomemben kazalec znanstvene odličnosti v našem okolju. Prejeti Krkino nagrado je izjemna čast in potrditev kakovostnega dela ter velika motivacija za prihodnost.

SPOROČILO MLADIM

Raziskovanje se začne z dobrim poznavanjem tematike, kar je ključno za usmerjeno raziskovalno delo. Izberite sistematičen pristop, korak za korakom, saj tako med dobljenimi rezultati ne bo zmede. Predvsem pa naj vas ne bo strah poiskati drugega mnenja oziroma ostanite dovezetni za strokovne nasvete in kritike. Prava moč raziskovanja je v povezovanju strokovnjakov in znanja z različnih področij, v mešanici mladostne zaletavosti in preudarnosti bolj izkušenih.

NAJBOLJŠI NASVET

Na poti do zmage nas majhni porazi krepijo.

MISEL, KI VAS VODI SKOZI ŽIVLJENJE

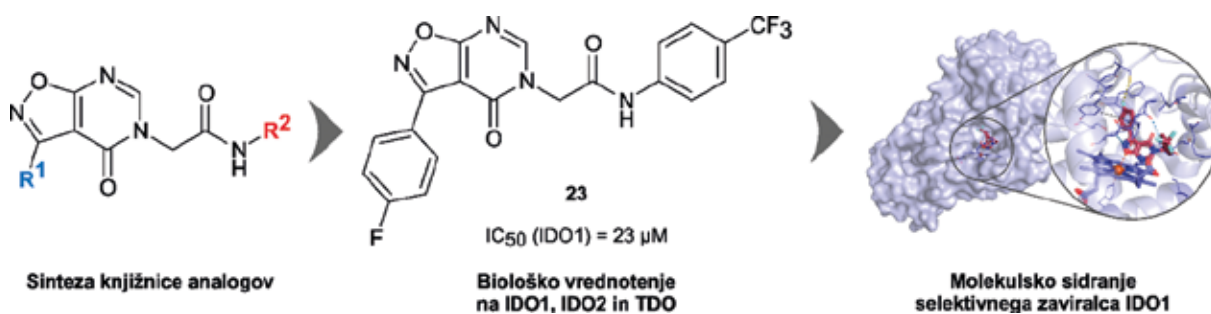
Uspeh je rezultat trdega dela.



Strukturno podprto načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev indolamin 2,3-dioksigenaze in modulatorjev Toll-u podobnih receptorjev tipa 7 in 8

Imunski sistem ima ključno vlogo pri vzdrževanju integritete organizma. Poleg obrambe pred patogeni in vpletenosti v avtoimunska obolenja je pomembna tudi njegova vloga pri preprečevanju in razvoju rakavih obolenj. Cilj številnih novih pristopov k zdravljenju raka je izkoristiti in okrepiti vlogo imunskega sistema pri odstranjevanju rakavih celic iz organizma. V okviru doktorske disertacije smo razvijali nove nizkomolekularne imunomodulatorje, ki delujejo na indolamin 2,3-dioksigenazo 1 (IDO1) ter Toll-u podobne receptorje tipa 7 in 8 (TLR7 in TLR8), ki so vpleteni v patologijo rakavih obolenj.

V okviru raziskovalnega dela na IDO1 smo razvili večstopenjski sintezni postopek za pripravo analogov spojine zadetka z osnovnim izoksazolo[5,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-onskim skeletom. Za pripravljene spojine smo s fluorescenčnim testom ovrednotili zaviralno aktivnost na izoliranem IDO1 ter preverili selektivnost v primerjavi s preostalima izoformama – indolamin 2,3dioksigenazo 2 in triptofan 2,3-dioksigenazo. Spojine so selektivno zavirale IDO1 v nizkem mikromolarnem območju, najmočnejše med njimi so imele v svoji strukturi anilinski fragment, na para mestu substituiran s trifluorometilno, cikloheksilno ali metoksikarbonilno skupino. Aktivnim spojinam smo določili citotoksični profil, spojinu 2-(3-(4-fluorofenil)-4-oksoizoksazolo[5,4-*d*]pirimidin-5(4*H*)-il)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)acetamidu (**23**) kot najmočnejšemu zaviralcu IDO1 z IC_{50} 23 μ M pa smo aktivnost ovrednotili še v celičnem zaviralnem testu (slika 1).



Slika 1. Potek razvoja nizkih mikromolarnih zaviralcev IDO1.

Na podlagi treh spojin zadetkov smo pripravili dve seriji nizkomolekularnih selektivnih agonistov TLR7 s kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-onskim in 2-(trifluorometil)kinolin/kinazolin-4-aminskim skeletom. Z uvedbo različnih substitucij na osnovni kromenoimidazolonskega skeleta smo dosegli premik iz antagonističnega delovanja v agonistično, 8-hidroksi-1-izobutylkromeno[4,3-*b*]pirol-4(1*H*)-on (**26**) pa predstavlja najmočnejšega agonista (EC_{50} = 1,8 μ M) prve serije. Druga serija agonistov je imela na mestu 4 osnovnega skeleta sekundarni ali terciarni amin z vezano krajšo alifatsko verigo ali z večjim in rigidnejšim alifatskim obročem. Najboljši predstavnik te serije *N*-ciklopropil-2-(trifluorometil)kinazolin-4-amin (**46**) je signifikantno inducirala sproščanje provnetnega citokina IL8 iz enojedrnih celic periferne krvi (slika 2).

Lotili smo se tudi sistematične študije značilnosti med strukturo in delovanjem negativnih modulatorjev TLR8. Osnovni pirimidinski skelet spojine zadetka smo strukturno modificirali na treh mestih, za kar smo razvili dve sintezni poti. Potrdili smo, da so trifluorometilna skupina na mestu 6 in dva substituenta na mestih 2 in 4 osnovnega 4-(furan-2-il)-6-(trifluorometil)pirimidinskega skeleta pomembni strukturni

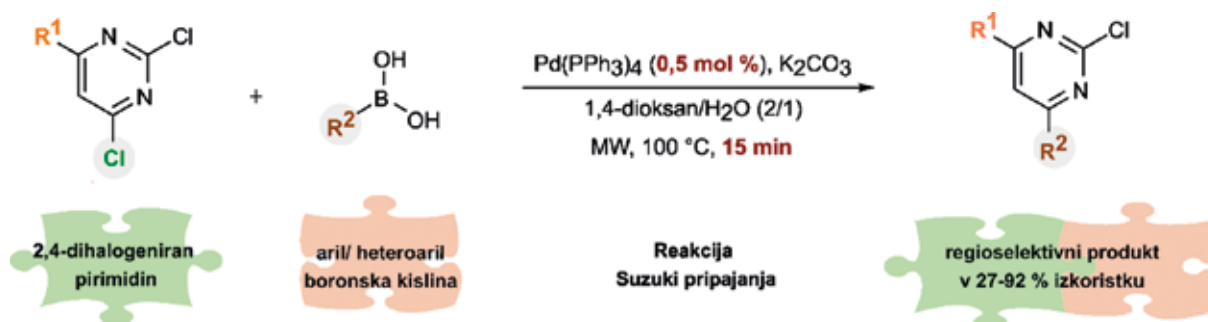
elementi pripravljene serije modulatorjev. Na mestu 2 je bila za modulacijo TLR8 ključna prisotnost benzilaminskega substituenta s parahidroksi ali hidroksimetilno skupino (slika 2). Večje število sintetiziranih spojin je v nizkem mikromolarnem območju izkazovalo selektivno in koncentracijsko odvisno zaviranje TLR8-signalne poti na celični liniji HEK293. Najperspektivnejši spojini 4-(furan-2-il)-2-(metilsulfonyl)-6-(trifluorometil)pirimidin (**15a**) in 4-(((4-(furan-2-il)-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il)amino)metil)fenil)metanol (**53**) sta pomembni za nadaljnjo optimizacijo do spojine vodnice z močnim imunomodulatornim delovanjem.



Slika 2. Oris raziskovalnega dela na TLR7 in TLR8.

V okviru raziskovalnega dela na TLR8 smo se lotili tudi računalniško podprtega načrtovanja novih modulatorjev. Več kupljenim zadetkom iz virtualnega rešanja smo ovrednotili jakost delovanja na TLR8 in preverili selektivnost glede na TLR7. Pri tem smo prišli do nove spojine zadetka 3-(1-hidroksiheksan-2-il)-5-metilkinazolin-4(3*H*)-ona (**T91**), dualnega agonista TLR7 in TLR8, ki smo mu na enojedrnih celicah periferne krvi preverili sposobnost indukcije ekspresije pro-vnetnih citokinov. Spojina **T91** je signifikantno inducirala ekspresijo IL8, s čimer smo potrdili njeno imunomodulatorno delovanje.

Raziskovalno delo smo zaključili z optimizacijo pogojev Suzukijeve reakcije (slika 3), ene od najpogosteje uporabljenih reakcij za tvorbo vezi C-C, ki smo jo uporabili za pripravo nekaterih negativnih modulatorjev TLR8. Osredotočili smo se na reakcijo med 2,4-dikloropirimidini in različnimi aril- ali heteroaril boronskimi kislinami. Med poglobljenim študijem reakcijskih pogojev smo preverili vpliv topila, katalizatorja, temperature in časa na potek reakcije, z uporabo mikrovalovnega sevanja pa smo razvili hiter in zelo učinkovit sintezni postopek za pripravo C4-substituiranih pirimidinov. Zaradi kratkega reakcijskega časa (15 minut) in predvsem majhne porabe (0,5 mol %) katalizatorja tetrakis(trifenilfosfino)paladija (0) je postopek primeren za hitro in poceni regioselektivno pripravo substituiranih pirimidinov.



Slika 3. Prikaz optimiziranih pogojev Suzukijeve reakcije.

Structure-Based Design, Synthesis and Evaluation of Novel Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitors and Toll-Like Receptors 7 and 8 Modulators

The immune system plays an essential part in the maintenance of the integrity of organism. In addition to its defence against pathogens and involvement in the development of autoimmune diseases, the immune system also possesses a crucial role in the prevention and development of cancers. Several new approaches to the treatment of cancers aim to strengthen the ability of the immune system to eliminate malignant cells. In the research we focused on the development of novel small-molecule immunomodulators acting on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and Toll-like receptors 7 and 8 (TLR7 and TLR8), all involved in the pathology of cancer.

As part of our research work on IDO1 we developed a multistep synthesis procedure for the preparation of analogues of hit compound with isoxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-4(5*H*)-one scaffold. Inhibitory IDO1 activity of all synthesised compounds was evaluated in a fluorescence-based assay, with selectivity over two isoforms, i.e. indoleamine 2,3-dioxygenase 2 and tryptophan 2,3-dioxygenase, being further assessed. Prepared compounds selectively inhibited IDO1 in low micromolar range, with the most potent among them possessing aniline fragment, which was substituted with the trifluoromethyl, cyclohexyl or methoxycarbonyl group on the para position. The cytotoxicity profile of inhibitors was further determined and for the most potent compound 2-(3-(4-fluorophenyl)-4-oxoisoxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-5(4*H*)-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide (**23**, IC₅₀ of 23 μM) we also evaluated its cellular activity (Figure 1).

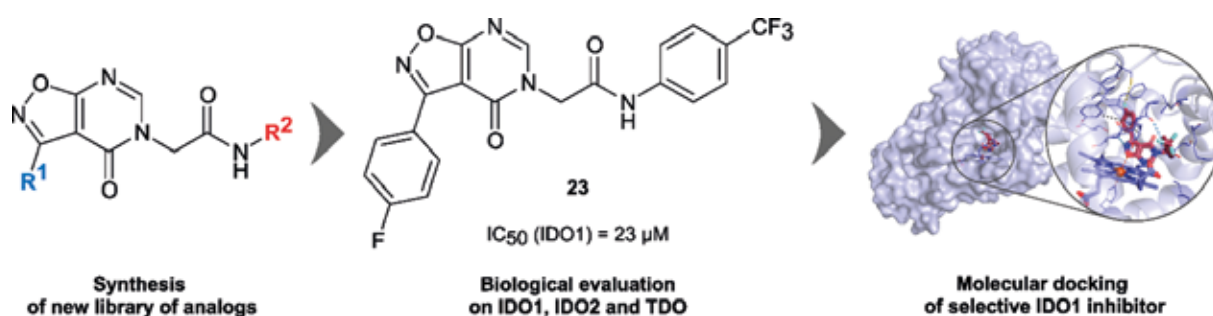


Figure 1. Development of novel low micromolar IDO1 inhibitors.

Two series of low micromolar and selective TLR7 agonists were prepared based on three hit compounds with chromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-one and 2-(trifluoromethyl)quinoline/quinazoline-4-amine scaffolds. Substitutions on the chromenoimidazolone scaffold led to the shift from antagonist to agonist activity, with 8-hydroxy-1-isobutylchromeno[4,3-*b*]pyrrol-4(1*H*)-one (**26**) representing the best-in-class agonist with EC₅₀ value of 1.8 μM. The agonists from the second series possessed secondary or tertiary amines with smaller alkyl substituents or bulkier rigid aliphatic ring on the position 4 of the main scaffold. Furthermore, *N*-cyclopropyl-2-(trifluoromethyl)quinazolin-4-amine (**46**) as the most potent compound from this series significantly induced the expression of proinflammatory cytokine IL8 from peripheral blood mononuclear cells (Figure 2).

A systematic structure–activity relationship study of TLR8 negative modulators was further performed. Two synthetic pathways were developed for the preparation of a focused library of analogues based on the

hit compound with pyrimidine scaffold, which were modified in three different positions. We confirmed the imperative presence of 6-trifluoromethyl group and other two substituents on positions 2 and 4 of the main 4-(furan-2-yl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidine scaffold of our TLR8 modulators. Furthermore, para hydroxy or hydroxymethyl groups on benzylamine substituent at position 2 were found to be essential for potent modulation of TLR8 (Figure 2). Several of the prepared compounds exhibited concentration-dependent inhibition of TLR8-mediated signalling in HEK293 cells in low micromolar range. The most perspective compounds 4-(furan-2-yl)-2-(methylsulfonyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidine (**15a**) and 4-(((4-(furan-2-yl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)amino)methyl)phenyl)methanol (**53**) represent promising chemical probes for further optimisation to a lead compound with potent immunomodulatory properties.

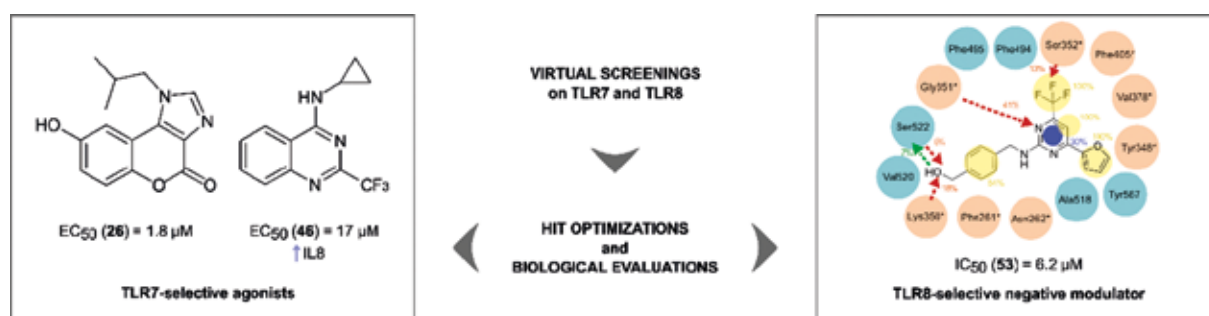


Figure 2. Outline of the research work on TLR7 and TLR8.

In our research work on TLR8 we also performed computer-aided design of novel modulators. The potency of purchased hit compounds was evaluated on TLR8, with selectivity over TLR7 also being determined. A dual TLR7 and TLR8 agonist 3-(1-hydroxyhexan-2-yl)-5-methylquinazolin-4(3*H*)-one (**T91**) was discovered and its ability to induce the expression of proinflammatory cytokines on peripheral blood mononuclear cells was also assessed. The compound **T91** significantly induced the expression of IL8, thus confirming its immunomodulatory activity.

Research work was concluded with the optimisation of conditions for Suzuki coupling (Figure 3), which is one of the most common reactions for the formation of C–C bonds and was used for the synthesis of some TLR8 negative modulators. We focused on the coupling between different 2,4-dichloropyrimidines and aryl- or heteroaryl boronic acids. A thorough screening of reaction conditions (e.g. solvent, catalyst, temperature, and time) and microwave irradiation led to a very efficient and straightforward synthesis procedure for the preparation of C4-substituted pyrimidines. Due to short reaction time (15 min) and extremely low catalyst loading (0.5 mol %) of tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0), the established procedure could be used for quick and low-cost regioselective preparation of substituted pyrimidine rings.

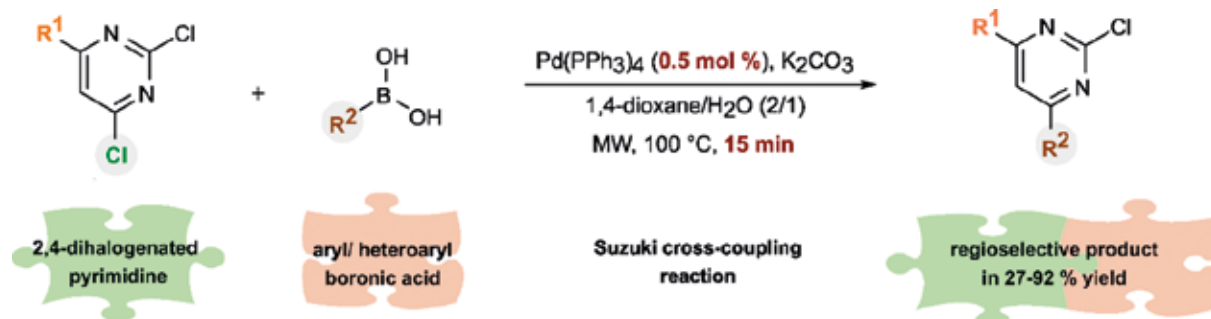


Figure 3. Suzuki coupling with optimised reaction conditions.

DR. ANJA KRISTL

Anja Kristl je od drugega razreda z družino živala v Dobu pri Domžalah, kjer ji je babica privzgojila ljubezen do rož. Že kot mlado dekle je poskušala iz cvetov ustvariti parfüm. V višjih razredih osnovne šole pa tudi pozneje na Gimnaziji Bežigrad je vzljubila naravoslovne predmete, še zlasti kemijo. Za zlato maturantko je bila tako edina prava pot študij kemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Po končanem magistrskem študiju se je na Katedri za analizo kemijo zaposlila kot asistentka in hkrati vpisala doktorski študij kemijskih znanosti. Ker vedno znova išče nove izzive, se je po zaključku doktorskega študija zaposlila na Inštitutu za sodno medicino na Medicinski fakulteti in v manj kot letu dni postala vodja toksikološkega laboratorija.



Raziskovanje vedno znova preseneti

Med študijem sta mi bili najbolj všeč fizikalna in analizna kemija. Odločitev za analizo kemijo mi je olajšal mentor prof. dr. Matevž Pompe, ki mi je ponudil pravo kombinacijo obeh področij. Moje diplomsko delo je temeljilo na osnovnem razumevanju tekočinske kromatografije s pomočjo fizikalnih zakonov. Z vključevanjem v projekte, v okviru katerih smo sodelovali z industrijo, sem svoje znanje še poglobila. Na področju proteomike sem se izobraževala tudi v tujini.

Ko poskušaš nekaj dobro razumeti, vedno najdeš več vprašanj kot odgovorov. In to je tisto, kar me pri raziskovanju privlači. Glavna ugotovitev mojega raziskovanja je, da nas kljub dobremu poznavanju osnovnih principov kromatografije malih molekul lahko kromatografija makromolekul preseneti. Zaradi kompleksnejše strukture in omejene stabilnosti namreč lahko nekateri osnovni parametri, kot so delež organskega topila v sistemu, temperatura in tlak ločevanja, povsem spremenijo njihovo obnašanje, kar je pri malih molekulah redko. Predstavila sem tudi nov način zadrževanja makromolekul na različnih kolonah/sorbentih s pomočjo spremembe tlaka. Razvito metodo lahko uporabimo tako za nadzor kakovosti surovin kot končnih formulacij.

Z VZTRAJNOSTJO DO REŠITVE

Največji navdih je zame izziv. Ko začnem razmišljati o potencialnih rešitvah, ne odneham, dokler jih ne najdem. Ideje pogosto pridejo v zavest tudi v trenutkih, ko se ukvarjam z drugimi stvarmi. V glavi ves čas razvijam strategije. Zato zagovarjam dinamično in uravnoteženo delovno okolje, ki ponuja med seboj neodvisne izzive.

MENTOR TE USMERJA

Mentor te v začetnih korakih usmerja, nato ti prepusti delo, na koncu pa ti pomaga rezultate predstaviti v najboljši luči. Mentorji imajo ogromno izkušenj, mi pa se v izbrano temo poglobimo, tako da jo včasih poznamo celo bolje kot oni. Manjka pa nam tisti uvid, kaj in kako izpostaviti ter kako se česa lotiti. K prof. dr. Matevžu Pompeju nisem hodila z vprašanji, ampak z idejami, ki sva jih nato skupaj oblikovala. Če sem naletela na ovire, sva izmenjala ideje in predebatirala možnosti.

ODMIK OD RAZISKOVANJA

Včasih je usklajevanje profesionalnega in zasebnega življenja težko. Pogosto ves dan razmišljam o problemu, s katerim se ukvarjam. Zato poskušam prosti

čas preživeti čim bolj pestro. Rada kolesarim, poleti se pogosto vozim z motorjem, pozimi pa smučam. Uživam v druženju z družino in prijatelji, s katerimi pogosto igramo strateške družabne igre. Sprostim se tudi ob hišnem ljubljencu, igranju kitare, ustvarjanju in urejanju video posnetkov ter sestavljanju puzzlov.

MOTIVIRA ME RAZISKOVALNI PROBLEM

Trenutno sodelujem pri razvoju metod za določanje prepovedanih drog in psihoaktivnih snovi v telesnih tekočinah in tkivih. V službi se srečujem tudi z raznovrstnimi primeri zastupitev, ki obsegajo identifikacijo tako malih kot večjih molekul. Koncentracija teh molekul v bioloških vzorcih je pogosto nižja od koncentracije ostalih endogenih snovi. Tako je moje delo polno najrazličnejših izzivov. V meni je kombinacija vztrajnosti, potrpežljivosti in iznajdljivosti. Motivirajo me raziskovalni problemi ali reševanje težav pri kromatografskih metodah. Dobro se znajdem v raziskovalnih timih, kjer imam pogosto vlogo vodje ali organizatorice. Zelo mi je pomembno, da je končni izdelek bodisi individualnega bodisi skupinskega dela kar najboljši oziroma najboljši približek tega.

DOKAZ, DA GREM V PRAVO SMER

Krkinge nagrade potrjujejo, da je slovensko raziskovalno delo izjemno in pomembno tudi za industrijo. Na razpis sem se prijavila, potem ko so me k temu spodbujali mentor, družinski člani in prijatelji. Osvojitve velike Krkinge nagrade mi veliko pomeni, saj sem iz raziskovalnega okolja prišla na delovno mesto, kjer je uporaba pridobljenega znanja v praksi zelo pomembna. Obenem je tudi dokaz, da sta moje delo in razmišljanje usmerjena v pravo smer.

SPOROČILO MLADIM

Želite si, delajte, vztrajajte in upajte. Najdite svojo motivacijo za delo, potrudite se, postavite si ambiciozne, vendar dosegljive cilje in ne obupajte, ko so stvari težke. Vzemite si čas za razmislek in poiščite nov pogled na rešitev problema. Ko pa cilj dosežete, ga prepoznajte, cenite in se ga veselite.

NAJBOLJŠI NASVET

Velikokrat se ne zavedamo, da krožimo okoli lokalnega ekstrema. Zamenjaj perspektivo, da odkriješ globalno rešitev.

ŽIVLJENJSKO VODILO

Kjer je volja, tam je pot.



Uporaba kromatografije z mešanimi režimi za separacijo biološko pomembnih molekul

Pri razvoju novih ali izboljšanju obstoječih kromatografskih metod za iskanje optimalnih pogojev zaradi prihranka časa in materiala pogosto uporabljamo različne matematične modele. Ti omogočajo, da na osnovi lastnosti izbranih analitov (aktivna učinkovina, razkrojni produkti) in uporabljene stacionarne faze kromatografske kolone (reverzna, ionsko izmenjevalna faza ipd.) predvidimo način zadrževanja in vpliv spremembe posameznih parametrov na ločbo. Poleg tega nam v nekaterih primerih omogočajo napoved sprememb, ki se zgodijo pri prenosu kromatografske metode iz sistema HPLC v sistem UHPLC, kjer uporabimo kolono z manjšimi delci, zato je med separacijo prisoten višji tlak. Takšni modeli so zasnovani na predpostavkah, opaženih na zadrževanju majhnih molekul, zato so lahko neustrezni/nepopolni za opis ločbe makromolekul, kot so peptidi, beljakovine, molekule DNK ali RNK. Pri delu smo se osredotočili na razjasnitev dodatnih učinkov, ki vplivajo na ločevanje takšnih biomolekul na reverzni in anionsko izmenjevalni stacionarni fazi, ter ugotovitve uporabili za optimizacijo ločbe pogosto uporabljenih terapevtskih inzulinov na koloni z mešanimi režimi (mixed mode column, MMC). To so kromatografske kolone, katerih stacionarna faza vsebuje več različnih funkcionalnih skupin, zaradi česar zadrževanje molekul lahko poteka prek več različnih (najbolje neodvisnih) separacijskih mehanizmov. Takšne stacionarne faze so zelo uporabne pri separacijah vzorcev z raznovrstnimi analiti, saj za doseganje zadrževanja in ločbe potrebujemo zgolj eno kolono ali celo eno metodo.

Za kar najboljše razumevanje zadrževanja makromolekul na tovrstnih mešanih kolonah smo sprva proučevali vpliv temperature in tlaka na posamezni reverznofazni ali anionsko izmenjevalni koloni s sistemom HPLC-UV. Ugotovili smo, da se zadrževanje humanega inzulina povečuje s povečevanjem temperature do 55 °C na obeh kolonah, kar je obratno od obnašanja majhnih molekul. Z nadaljnjim povečevanjem temperature se je zadrževanje nekoliko povečalo na anionski izmenjevalni koloni, na reverznofazni pa se je zmanjšalo. Po drugi strani se je z zviševanjem tlaka zadrževanje na obeh kolonah le povečalo. Zvišanje tlaka smo dosegli tako, da smo izhod kromatografske kolone povezali z večpotnim ventilom, ki je imel na različnih izhodih restriksijske kapilare izbranih dolžin. Z ustreznim zasukom ventila smo na koloni ustvarili izbrani nadtlak. Če smo tlak separacije tako zvišali samo za 100 barov (pri enaki sestavi mobilne faze, pretoku in temperaturi), se je zadrževanje inzulina na reverznofazni koloni povečalo približno za 1,2 min, medtem ko je retencijski čas male molekule (*m*-krezol) ostal skoraj nespremenjen (povečal se je za 0,07 min). Tlak torej selektivno vpliva na zadrževanje molekul, kar so za separacije na reverznofaznih kolonah opisali tudi mnogi drugi znanstveniki. Za razumevanje adsorpcije na koloni z mešanimi režimi smo najprej izvedli še študijo zadrževanja makromolekul pri višjih tlakih na anionsko izmenjevalni stacionarni fazi.

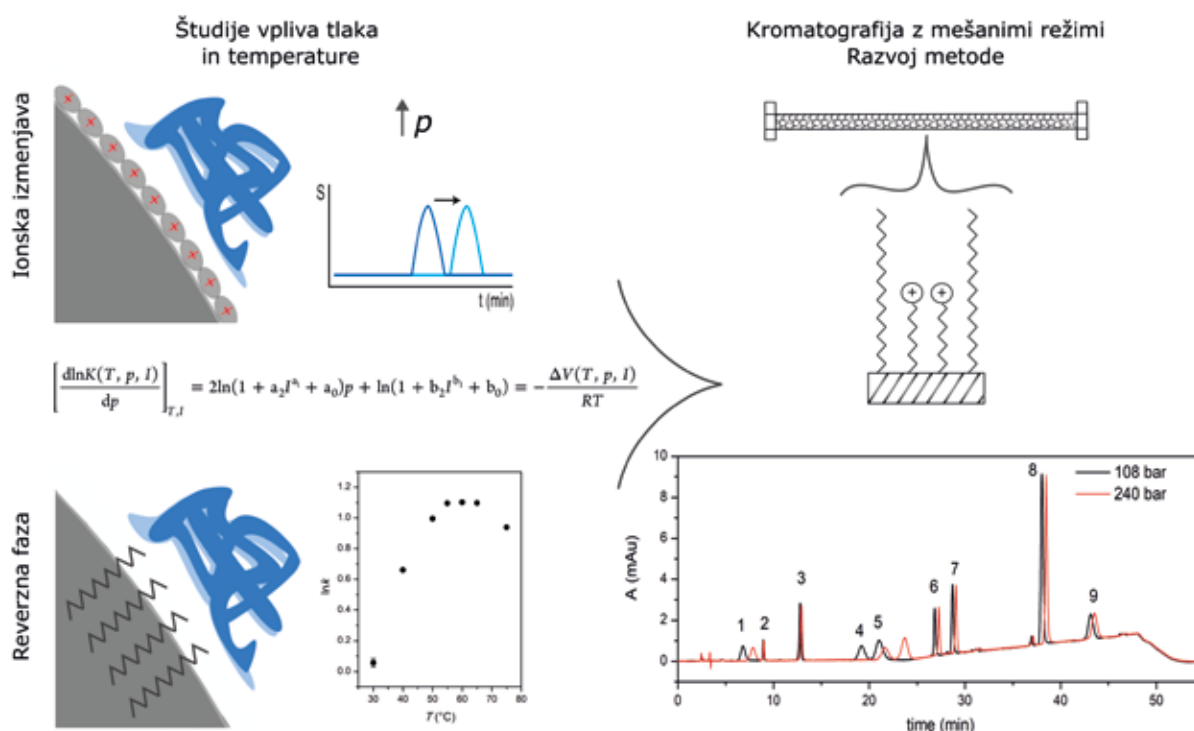
Za celosten pregled vpliva tlaka na zadrževanje makromolekul smo sprva proučevali zadrževanje serije sintetiziranih oligonukleotidov z definiranim zaporedjem in dolžino: gradniki (GACT)_n, kjer je *n* zavzemal sode vrednosti od 2 do 14. Njihovo retencijo pri tlakih od 50 barov (običajni padec tlaka na koloni) do 550 barov smo opazovali pri izokratski in gradientni eluciji z 20 mM Tris-HCl-pufrom (pH 8,1), ki je vseboval različno koncentracijo NaCl. Iz sprememb retencijskega časa in faktorja (*k*) pri različnih tlakih in izokratskih pogojih sta bila razvidna dva principa, ki določata učinek tlaka: 1) učinek se povečuje z velikostjo makromolekule, 2) čas zadrževanja s povečevanjem tlaka je bolj izrazit pri počasnejših ločbah (pogoji z nizko elucijsko močjo). Zadrževanje največjega oligonukleotida v naši študiji se je ob povečanju tlaka za 500 barov in uporabi najšibkejšega eluenta povečalo za 80 %. Pri gradientni eluciji smo opazili podobne odvisnosti zamika od velikosti oligonukleotida, vendar so bili zamiki v retenciji manj izraziti.

Odvisnost tlačnega učinka od velikosti molekul smo proučevali tudi pri gradientni eluciji dveh proteinov (goveji serumski albumin, BSA; Tg-tiroglobulin) in molekule plazmidne DNK. Izrazito daljši retencijski čas

pri višjem tlaku v primerjavi z oligonukleotidi smo izmerili za plazmidno DNK. Podobno je bilo zadrževanje večjega Tg bolj občutljivo na tlačne spremembe kot zadrževanje BSA.

Poglobljeno študijo adsorpcijskega mehanizma pri opisanih ločbah smo izvedli z uporabo enačb SDM (stoichiometric displacement model) in enačb LGE (linear gradient elution) ter tako pridobili odvisnost $\ln k$ od koncentracije soli (l). S pomočjo te zveze smo lahko za vsako molekulo ovrednotili število veznih mest (B) in konstanto interakcije (A). Pri večjih oligonukleotidih smo opazili odvisnost parametra B od tlaka, iz odmika te vrednosti od teoretičnega naboja oligonukleotida pa smo ugotovili, da so večji oligonukleotidi delno zviti ob interakciji s stacionarno fazo. Parcialni molski volumen takšne strukture se lahko spremeni pri višjem tlaku, kar pojasni odvisnost izrazitosti tlačnega učinka od velikosti oligonukleotida. Iz pridobljenih vrednosti smo s kombinacijo matematičnih zvez razvili funkcijo $\ln(k(l, p))$ pri konstantni temperaturi, ki nam je omogočala izračun spremembe parcialnih molskih volumnov makromolekul ob prehodu iz mobilne faze v stacionarno fazo. Po pričakovanju so bile vrednosti ΔV negativne in so bile večje pri večjih oligonukleotidih in separacijah s šibkejšim eluentom. Pri proteinih pa so bile vrednosti odvisne tudi od drugih lastnosti, kot so količina praznin, fleksibilnost in narava pakiranja, saj je bila vrednost ΔV za BSA pri maksimalnem nadtlaku skoraj enaka kot za Tg (BSA – 32,1 cm³/mol in Tg – 36,0 cm³/mol).

Pridobljeno znanje iz študija učinka temperature in tlaka na obeh enofaznih kolonah smo uporabili pri razvoju metode za ločevanje analogov inzulina na izbrani koloni z mešanimi režimi. Najprej smo se osredotočili na optimizacijo ekstrakcije inzulinov na trdno fazo (solid phase extraction, SPE), nato pa nadaljevali optimizacijo kritičnih parametrov sestave mobilne faze, pretoka in temperature. Pri razvoju protokola SPE smo zaradi različne topnosti analogov razvili dva protokola SPE (drugi samo za levemir), katerih izkoristek ekstrakcij inzulinov je bil večji od 80 %. Pri optimizaciji metode ločevanja sedmih variant inzulina in dveh pomožnih snovi iz formulacij (fenol in *m*-krezol) je bila najzahtevnejša ločba med najbolj podobnim humanim inzulinom in inzulinom lispro. Najti smo morali ravno pravo kombinacijo gradienta acetonitrila, koncentracije in pH-pufra ter temperature. Razvili smo dve metodi: trikanalno za sisteme HPLC z mešanjem eluentov pri nizkem tlaku in dvokanalno za binarne sisteme z mešanjem pri visokem tlaku. Nato smo s pomočjo razumevanja retencije makromolekul pri višjem tlaku ločbo med humanim inzulinom in inzulinom lispro še izboljšali. S pravo kombinacijo gradienta in povečanjem tlaka separacije samo za 132 barov smo dosegli popolno ločbo ($R > 1,5$) med vsemi devetimi analiti.



Slika 1. Povzetek ključnih izsledkov raziskovalnega dela

Application of Mixed Mode Chromatography for Separation of Biologically Important Molecules

When developing new or improving existing chromatographic methods, various mathematical models are often used to find optimal conditions in order to save time and material. Based on the properties of selected analytes (active substance, decomposition products) and the stationary phase of the chromatographic column (reversed, ion exchange phase, etc.), these models enable us to predict the retention and the effect of individual parameters on the separation. In addition, they may allow us to predict changes that occur when transferring a chromatographic method from HPLC to UHPLC system, where a column with smaller particles and thus higher pressure is used.

Such models are mainly based on assumptions observed in the retention of small molecules and may therefore be inadequate to describe the separation of macromolecules such as peptides, proteins, DNA or RNA. In our work, we focused on elucidating additional parameters affecting the separation of such biomolecules on reversed-phase and anion exchange stationary phase, and used these findings to optimise the separation of commonly used therapeutic insulins on a mixed mode column (MMC). Stationary phases of these chromatographic columns contain different functional groups, due to which the retention of molecules is governed by several different (preferably independent) separation mechanisms. Such stationary phases are very useful in the separation of samples with various analytes, since only one column or even one method is needed to achieve retention and separation.

To understand the retention of macromolecules on such MMC, we initially studied the influence of temperature and pressure on individual reversed-phase or anion exchange columns with an HPLC-UV system. We found that the retention of human insulin increases with increasing temperature up to 55 °C on both columns, which is the opposite of the behaviour of small molecules. With further increase in temperature, the retention increased slightly on the anion exchange column and decreased on the reversed-phase column. On the other hand, as the pressure increased, the retention on both columns only increased. The increase in pressure was achieved by connecting the chromatographic column outlet to a multi-port valve, which had restriction capillaries of selected lengths at different outputs. By turning the valve accordingly, the selected overpressure was created on the column. Thus, when we increased the separation pressure by only 100 bar (at the same mobile phase composition, flow rate and temperature), the retention of insulin on the reversed-phase column increased by about 1.2 min, while the retention time of the small molecule (*m*-cresol) remained almost unchanged (increased by 0.07 min). Pressure therefore selectively affects the retention of molecules, which has also been described by many other scientists with regard to separations on reversed-phase columns. In order to understand the adsorption on a MMC, we first conducted a study of the retention of macromolecules at higher pressures on an anion exchange stationary phase.

We began our study by observing the retention at higher pressures of a series of synthesised oligonucleotides with a defined sequence and length: building blocks (GACT)_{*n*}, where *n* equalled even values from 2 to 14. Their retention at pressures of 50 bar (the usual column pressure drop) up to 550 bar was observed in isocratic and gradient elution with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.1) containing different concentrations of NaCl. From the trend of the change of retention time and factor (*k*) at different pressures and isocratic conditions, two principles that determine the effect of pressure were evident: 1) the effect increases with the size of the macromolecule, 2) the retention time with increasing pressure is more pronounced for slower separations (conditions with low elution power). Retention of the largest oligonucleotide in our study increased by 80% when increasing the pressure by 500 bar and using the weakest eluent. In gradient elution, similar dependence of the retention increase on the size of the oligonucleotide was observed, but the retention changes were less pronounced.

Dependence of the pressure effect on the size of molecules was also studied in the gradient elution of two proteins (BSA-bovine serum albumin, Tg-thyroglobulin) and a plasmid DNA molecule. A significantly longer retention time at higher pressure compared to oligonucleotides was measured for plasmid DNA. Similarly, the retention of the larger Tg was already affected by small pressure rises compared to the retention of BSA.

An in-depth study of the adsorption mechanism in these separations was carried out using SDM (stoichiometric displacement model) and LGE (linear gradient elution) equations, with which we obtained the salt concentration (l) dependence of $\ln k$. This enabled us to determine the number of binding sites (B) and the interaction constant (A) for each molecule. In the case of larger oligonucleotides, we observed a pressure dependence of B , and from the deviation of this value from the theoretical charge of the oligonucleotide, we concluded that the larger oligonucleotides were partially folded upon interaction with the stationary phase. The partial molar volume of such a structure can change at higher pressure, which explains the dependence of the pressure effect on the size of the oligonucleotide. From the obtained values and a combination of selected mathematical formulas, we developed the function $\ln(K(l,p))$ at a constant temperature, which allowed us to calculate the change in partial molar volumes of macromolecules during the transition from the mobile to the stationary phase. As expected, ΔV values were negative and had larger values for larger oligonucleotides and separations with a weaker eluent. In the case of proteins, the values also depended on other properties, such as the amount of voids, flexibility and nature of packing, as the ΔV value for BSA at maximum overpressure was almost the same as for Tg (BSA – 32.1 cm³/mol and Tg – 36.0 cm³/mol).

The obtained knowledge from the temperature and pressure studies on both single-phase columns was used in the development of a method for the separation of insulin analogues on a selected MMC. We first focused on the optimisation of the solid phase extraction (SPE) of insulins. During the development of the SPE protocol, due to different solubilities of analogues, we developed two SPE protocols (one only for levemir). The yield of insulin extractions was greater than 80%. We continued with the separation optimisation, of which the greatest challenge was to achieve a separation between the most similar human insulin and insulin lispro. We had to find just the right combination of acetonitrile gradient, buffer concentration, pH value, and temperature. We developed two methods: three-channel for HPLC systems with low-pressure eluent mixing and two-channel for binary systems with high-pressure mixing. Finally, with the understanding of the retention of macromolecules at higher pressure, we further improved the separation between human insulin and insulin lispro. With the right gradient combination and increasing the separation pressure by only 132 bar, we achieved complete separation ($R > 1.5$) between all nine analytes.

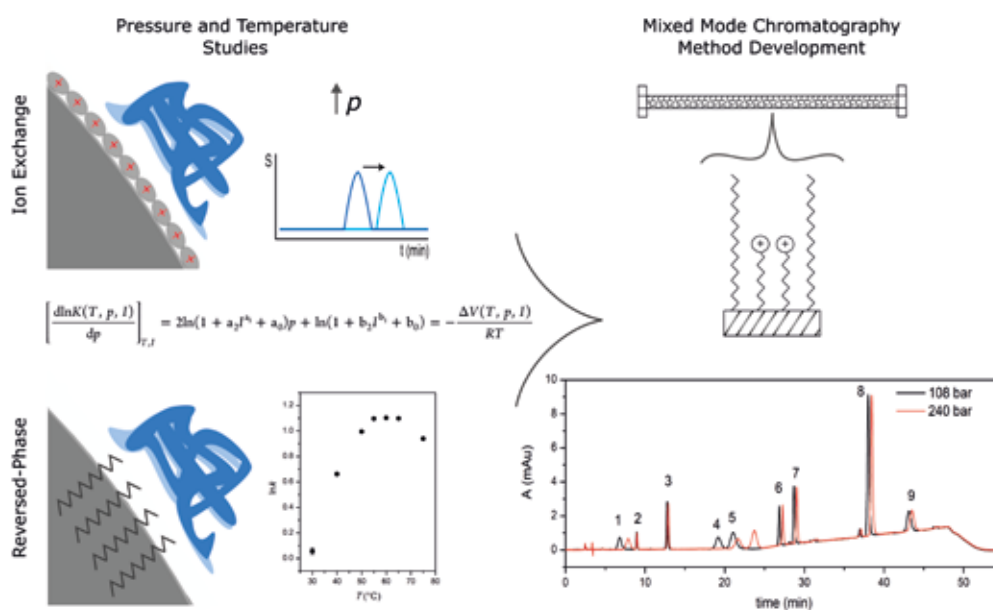


Figure 1: Overview of the key findings of our research

DR. TINA VIDA PLAVEC

Tini Vidi Plavec so bile od nekdaj blizu naravoslovne vede, še zlasti kemija in biologija. Po končani bežigrasjski gimnaziji se je odločila za študij na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, saj združuje obe vedi, hkrati pa omogoča vpogled v delovanje človeškega telesa in vanj vnesenih zdravilnih učinkovin. V zadnjem letniku študija jo je navdušilo hitro razvijajoče se področje biotehnologije, ki ji je odprlo nov pogled na farmacevtske učinkovine. Magistrski študij je nadgradila z doktorskim študijem biomedicine, smer farmacija, na Odseku za biotehnologijo v okviru Instituta Jožef Stefan, kjer je danes zaposlena kot raziskovalka. Ob raziskovalnem delu se kot asistentka na Fakulteti za farmacijo posveča tudi pedagoškemu delu.



Raziskovalne izzive rešujem korak za korakom

Že od nekdaj verjamem, da lahko s spreminjanjem človeške mikrobiote pomembno vplivamo na splošno počutje in razvoj bolezni. V naših telesih je več mikroorganizmov kot človeških celic, raziskovanje vpliva spremenjenih mikroorganizmov in njihovih metabolitov na različna bolezenska stanja pa se mi zdi še posebej zanimivo. Osnovno področje mojega raziskovanja je farmacevtska biotehnologija in vključitev orodij, ki jih ponuja, v pripravo biotehnološko spremenjenih mlečnokislinskih bakterij (MKB). Področje me je pritegnilo zaradi hitrega razvoja in možnosti odkrivanja izboljšav pri zdravljenju bolezni, za katere še ne poznamo učinkovitih terapevtskih pristopov, hkrati pa bodo prispevale k večji učinkovitosti znanih načinov zdravljenja. V doktorskem delu sem se posvetila biotehnologiji MKB za zdravljenje vnetnih črevesnih bolezni in kolorektalnega raka. Glavni namen je bil razvoj MKB s tarčnimi proteini na površini, ki se ciljano vežejo na tumorske antigene, značilne za celice kolorektalnega raka. V raziskovalni nalogi smo dokazali ciljano vezavo tarčnih proteinov na več izbranih tumorskih celičnih linij. To odpira nove možnosti zdravljenja raka, pri katerih se terapevtski protein dostavi na mesto delovanja brez vpliva na zdrave celice. Hkrati smo pripravili MKB s terapevtskim delovanjem na vnetno pot prek IL-23, ki bi lahko bile uporabne za lajšanje vnetja.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu stremim k iskanju rešitev za nove, na videz nerešljive izzive z uporabo novih metod. Navdihuje me novo znanje, ki ni neposredno povezano z mojim temeljnim področjem raziskovanja. Prepričana sem, da lahko na takšen način stopimo iz ustaljenih okvirjev in pospešimo pot do rešitve. Pomembno se mi zdi sodelovanje z raziskovalci z drugih področij, saj povezovanje znanja omogoča hitrejšo in bolj uspešno reševanje izzivov.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor raziskovalca vodi, usmerja in motivira. Svojemu mentorju izr. prof. Alešu Berlecu sem še posebej hvaležna, ker me podpira pri samostojnem raziskovanju in mi pomaga.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Znanstvenoraziskovalno življenje rada uravnotežim s preživljanjem prostega časa na prostem. Oddihi v naravi me sproščajo, pogosto mi pomagajo tudi pri razmisleku o znanstvenem problemu in pristopu

k njegovi rešitvi. Kot navdušeno plesalko salse me z energijo napolnijo plesni večeri. Seveda pa je sprostitev vedno lepša, če mi družbo delajo prijatelji in družina, ki sem jim hvaležna za vso podporo in dobro voljo.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Z velikim veseljem se lotim predvsem izzivov, za katere ni enostavne rešitve. Pri takšnih izzivih mi pomagajo vztrajnost, potrpežljivost in natančnost ter komunikativnost. Pogovor s sodelavci večkrat ponudi nepričakovane ideje, ki postopoma pripeljejo do rešitve.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade izredno spoštujem, za mladega raziskovalca pomenijo veliko podporo in motivacijo že na začetku poti, hkrati so priznanje za opravljeno delo. V veliko čast mi je, da sem se kot Krkina nagrajenka pridružila številnim odličnim raziskovalcem, predvsem pa me veseli, da lahko svoje raziskovalno delo predstavim tudi zunaj akademskega sveta in s tem prispevam k širjenju znanja in porajanju novih idej.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Biti raziskovalec pomeni, da v delo vlagaš veliko truda, energije in razmišljanja. Na svoje delo pogosto gledamo zelo osebno, saj se ne konča, ko greš iz laboratorija. Zamisli in ideje se porajajo tudi med sprostitvijo, celo med spanjem. Pa vendar je vredno truda. Neuspešni poskusi so vaja, vodijo k novim idejam in krepijo iznajdljivost, uspešni pa prinesejo občutek veselja in nagrade.

NAJBOLJŠI NASVET

Slona se poje po majhnih koščkih. To si razlagam kot napotek za potrpežljivo reševanje problema korak za korakom.

MISEL, KI VAS VODI SKOZI ŽIVLJENJE

Navdihnila me je misel univerze mojega rodnega mesta, ki ima po mojem mnenju v znanosti posebno vrednost:

»Svobodno razmišljanje je odlično, vendar je pravilno razmišljanje še boljše.«



Površinska predstavitev vezalcev tumorskih antigenov na bakterijah *Lactococcus lactis* NZ9000 in vrednotenje njihove vezave na izbrane človeške tumorske celične linije

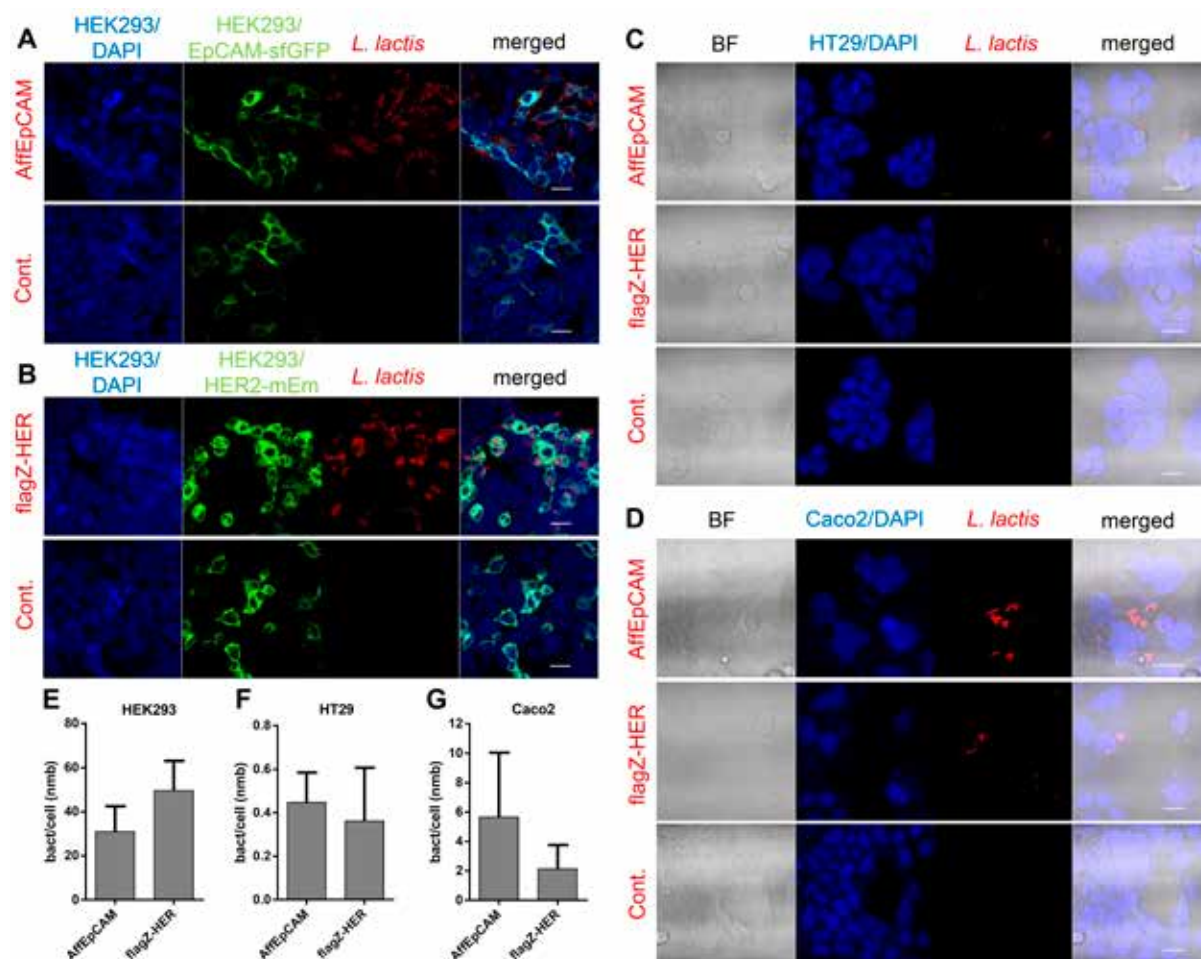
Kolorektalni rak (KRR) je zelo razširjen (tretji najpogostejši rak pri moških in drugi pri ženskah), prognoza zdravljenja je slaba, smrtnih žrtev pa veliko. Zdravljenje je drago in zahtevno, poleg tega povzroča hude neželene učinke, zato je razvoj novih načinov zdravljenja ključnega pomena. Na progresijo KRR vpliva porušitev ravnovesja črevesne mikrobiote, katere del so koristne simbiotske bakterije in oportunistični patogeni. Medtem ko patogeni spodbujajo vnetje, simbiotske bakterije pripomorejo k vzdrževanju nepoškodovane bariere črevesne sluznice. Med simbiotske bakterije spadajo tudi mlečnokislinske bakterije (MKB), ki so zaradi dolgoletne zgodovine uporabe v prehrani splošno priznane kot varne. Poleg blagodejnega delovanja MKB v črevesju so rekombinantno spremenjene MKB uporabne tudi kot dostavni sistemi za terapevtske molekule.

Za modelno MKB *Lactococcus lactis* je na voljo več sistemov za površinsko predstavitev rekombinantnih proteinov. Fuzijski protein na bakterijsko površino pritrjujejo sidrne domene, med katerimi se najpogosteje uporablja C-končni del proteina AcmA (cAcmA), ki omogoči nekovalentno sidranje na peptidoglikan bakterijske celične stene. V prvem delu doktorske disertacije smo se osredotočili na oblikovanje alternative sidrnemu proteinu cAcmA. Pripravili smo 15 sidrnih proteinov, ki se na površino bakterije *L. lactis* sidrajo kovalentno ali nekovalentno, in jih po obsegu površinske predstavitve primerjali s cAcmA. Pokazalo se je, da je sidrno zaporedje cAM12 iz genoma laktokoknih fagov enakovredno sidrnemu proteinu cAcmA. Poleg tega smo ugotovili, da se cAM12 na bakterijski površini pritrjuje na drugo mesto kot cAcmA, zato bi ga lahko uporabili kot njegovo alternativo.

V drugem delu doktorske disertacije smo se osredotočili na razvoj MKB *L. lactis* s površinsko predstavljenimi proteinskimi vezalci za ciljanje tumorskih celičnih linij. Rakave celice namreč na svoji površini čezmerno izražajo tumorske antigene, kar se v terapiji izkorišča za ciljano zdravljenje. Za kolorektalni rak je značilno izražanje več različnih tumorskih antigenov. Osredotočili smo se na tri – EpCAM, HER2 in Gb3. EpCAM in HER2 preizkušajo za uporabo pri diagnostiki in terapiji. Izražanje Gb3 pa je zanimivo, ker korelira s progresijo KRR. Za ciljanje EpCAM in HER2 smo uporabili neimunoglobulinska vezalca, za vezavo na Gb3 pa lektin, B-podenoto toksina Shiga. Pri tem smo uporabljali plazmid pNZDual, ki omogoča hkratno izražanje dveh proteinov, poleg vezalca tumorskih antigenov še reporterski infrardeči fluorescentni protein za detekcijo, ter potrdili njuno izražanje in funkcionalnost. Za vrednotenje ciljane vezave tarčnih bakterij *L. lactis* smo uporabili več tumorskih celičnih linij, in sicer HeLa, HEK293, pri kateri smo s transfekcijo vnesli plazmid za čezmerno izražanje proučevanih tumorskih antigenov, ter kolorektalni celični liniji HT-29 in Caco-2. S konfokalno mikroskopijo smo na celični liniji HEK293 potrdili vezavo 39 % tarčnih *L. lactis* za ciljanje tumorskega antigena EpCAM in 67 % tarčnih *L. lactis* za ciljanje tumorskega antigena HER2. Vezava na kolorektalne celice je bila nekoliko slabša, vendar statistično značilna v primerjavi s kontrolo (slika 1). Uspešno in specifično usmerjeno vezavo tarčnih bakterij *L. lactis* na izbrane tumorske celične linije smo potrdili tudi s pretočno citometrijo in pretočnim sistemom za spremljanje vezave bakterij na človeške celice v realnem času.

V nadaljevanju smo delo razširili s pripravo bakterij *L. lactis* s terapevtskim delovanjem. Osredotočili smo se na citokinsko signaliziranje, ki ima ključno vlogo pri spodbujanju vnetja in tako pripomore k progresiji

KRR. Na površini bakterij *L. lactis* smo predstavili proteine REX, ki delujejo kot zaviralci receptorja IL-23 in ustavijo vnetno pot.



Slika 1. Slike ciljane vezave EpCAM- in HER2-tarčnih celic *L. lactis* na celice HEK293 s čezmerno izraženima tumorskima antigenoma EpCAM in HER2 (A, B) ter na nespremenjene rakave celice HT 29 (C) in Caco-2 (D) in kvantitativno vrednotenje ciljane vezave (E-G). AffEpCAM, *L. lactis*, ki sočasno izraža AffEpCAM, in IRFP; flagZ-HER, *L. lactis*, ki sočasno izraža Z-HER, označen z oznako FLAG, in IRFP; Cont., *L. lactis*, ki izraža IRFP; DAPI, kanal DAPI; HEK293/EpCAM-sfGFP, zeleni fluorescenčni kanal, ki prikazuje celice HEK293, ki čezmerno izražajo s sfGFP označen EpCAM; HEK293/HER2-mEm, zeleni fluorescenčni kanal, ki prikazuje celice HEK293, ki čezmerno izražajo z mEmerald označen HER2; *L. lactis*/IRFP, rdeči fluorescenčni kanal, ki predstavlja *L. lactis*; BF, kanal za svetlo polje.

Surface Display of Tumour Antigen Binders on *Lactococcus Lactis* NZ9000 and Evaluation of Their Binding to Selected Human Tumour Cell Lines

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common types of cancer (the third most common cancer in men and the second in women) with a high death rate and poor prognosis. Current treatment is expensive and demanding, and can result in severe side effects. Therefore, development of new treatment approaches is of great importance. The role of microbiota in CRC development has already been confirmed through maintaining intact barrier of intestinal mucosa. In contrast to pathogens, which cause inflammation, dysbiosis and concomitant CRC development, commensal bacteria prevent intestinal damage. Lactic acid bacteria (LAB) are also part of beneficial commensal bacteria, and are recognised as safe due to their long history of use. In addition, they are interesting as delivery vectors for therapeutic molecules.

Several different systems are available for protein surface display on model LAB *Lactococcus lactis*. The fusion protein is attached to the bacterial surface through an anchoring domain. The most commonly applied domain is the C-terminal region of the AcmA protein (cAcmA), which anchors to the peptidoglycan through a non-covalent bond. In the first part of the doctoral thesis, we screened 15 anchoring domains, which can provide non-covalent or covalent binding to the bacterial cell wall, and compared them to cAcmA. cAM12 anchor of lactococcal phage origin was determined to be equivalent to cAcmA, and to attach to a different cell surface moiety than cAcmA. Thus, it could be used as its alternative.

In the second part of the doctoral thesis, we developed LAB *L. lactis* with surface-displayed tumour antigen-targeting proteins. Cancer cells over-express tumour antigens on their surface, which can be used to achieve targeted therapy. Colorectal cancer is characterised by the expression of various tumour antigens. We focused on EpCAM, HER2 and Gb3. EpCAM and HER2 have been recently exploited as diagnostic markers, as well as in preparation of CRC-targeted therapy, while expression of Gb3, on the other hand, strongly correlates with CRC progression, which makes it a relevant target. We designed two non-immunoglobulin targeting proteins against EpCAM and HER2, and a lectin against Gb3, the B subunit of Shiga toxin. We used pNZDual plasmid, which allows the expression of two proteins simultaneously; apart from antigen-targeting protein also a reporter infrared fluorescent protein for detection, and confirmed the simultaneous expression of both. Different types of tumour cell lines were used to evaluate adhesion of targeting *L. lactis* bacteria; HeLa, HEK293, in which transfection plasmid was used to achieve overexpression of tumour antigens, and the colorectal cell lines HT-29 and Caco-2. The highest *L. lactis* adhesion was seen for the HEK293 cells, where adhesion to their tumour antigens amounted to 39% and 67% of EpCAM-targeting and HER2-targeting bacteria, respectively. Adhesion to colorectal cells was slightly lower, but significant in comparison to control (Figure 1). Specific and targeted binding of developed *L. lactis* to selected tumour cell lines was further demonstrated by flow cytometry and a real-time system for bacteria-to-cell adhesion monitoring.

Afterward, a therapeutic function was added to *L. lactis*. We focused on cytokine signalling, which plays a key role in promoting inflammation and thus contributes to the progression of CRC. On the surface of *L. lactis*, we presented REX proteins, which act as inhibitors of the IL-23 receptor and consequently stop the inflammatory pathway.

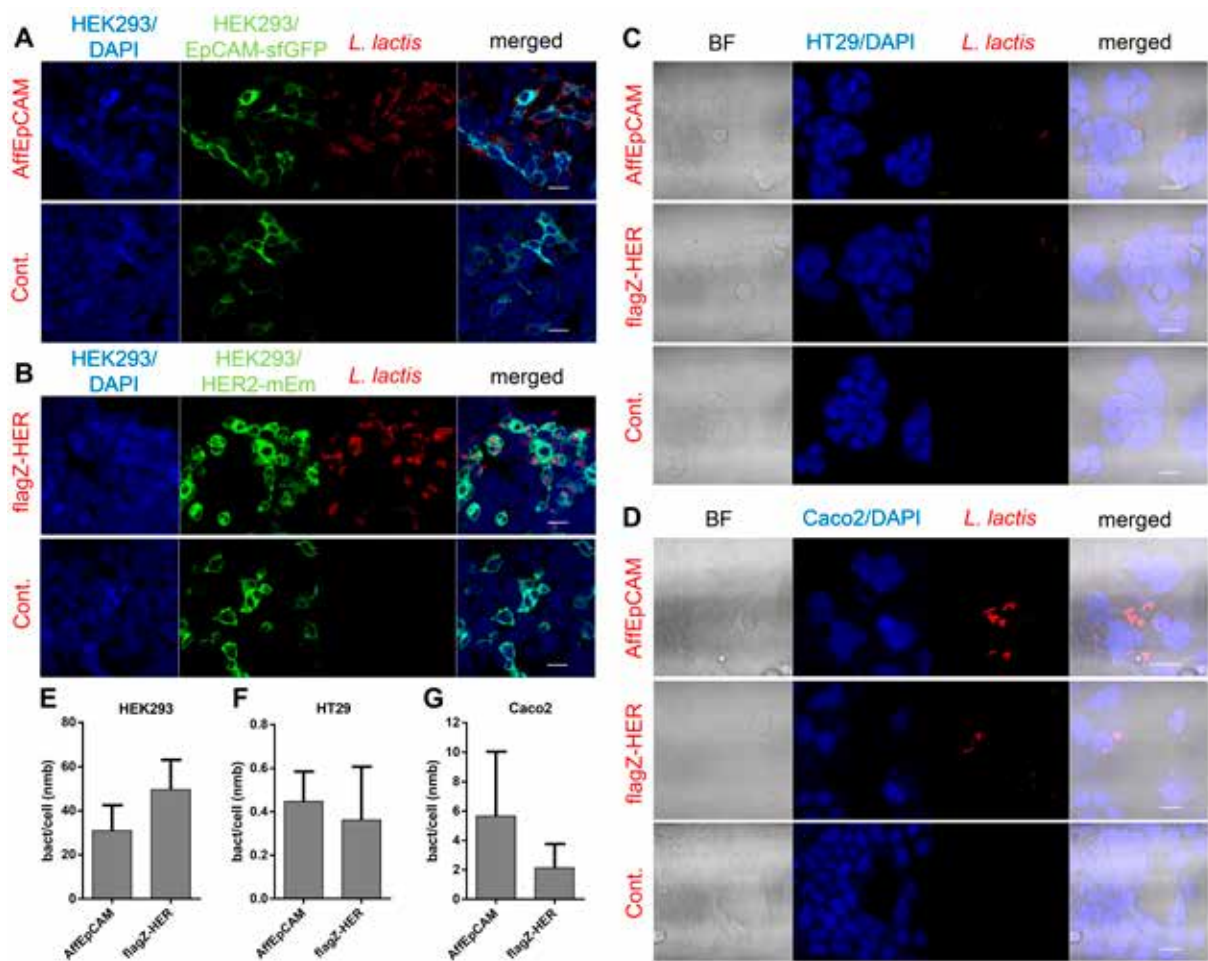


Figure 1. Confocal microscopy images of adhesion of EpCAM-targeting and HER2-targeting *L. lactis* cells to HEK293 cells transfected for EpCAM and HER2 overexpression (A, B), and to nontransfected HT-29 (C) and Caco-2 (D) cancer cells, with quantitative analysis of this adhesion (E-G). AffEpCAM, *L. lactis* displaying AffEpCAM and expressing IRFP; flagZ-HER, *L. lactis* displaying FLAG-labelled Z-HER and expressing IRFP; Cont., *L. lactis* expressing IRFP; DAPI, DAPI channel; HEK293/EpCAM-sfGFP, green fluorescence channel showing HEK293 cells overexpressing sfGFP-labelled EpCAM; HEK293/HER2-mEm, green fluorescence channel showing HEK293 cells overexpressing mEmerald-labelled HER2; *L. lactis*/IRFP, red fluorescence channel showing *L. lactis*; BF, bright-field channel.

DR. NEJC PETEK

Nejc Petek prihaja iz majhne vasi Tirna na skrajnem zahodu Zasavja. Narava v vsej njeni celosti, od mineralov do rastlin, ga zanima že od otroštva. V osnovni šoli se je navdušil nad pretvarjanjem snovi iz ene v drugo in kmalu spoznal, da za to potrebuje znanje kemije. Izobraževalno pot je nadaljeval na Gimnaziji Litija, kjer pa je njegovo pozornost pritegnila organska kemija, predvsem zaradi njene sintetske raznovrstnosti. Temu področju se je poglobljeno posvetil na študiju na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, kjer je na katedri za organsko kemijo zaključil diplomsko, magistrsko in doktorsko delo. Mladi raziskovalec bo svoj znanstveni potencial še naprej usmerjal v organsko kemijo in fotokemijo, vendar v prihodnje ne izključuje koraka proti kakšni drugi veji kemije.



Interdisciplinarno sodelovanje

Moje raziskovalno delo mi omogoča sodelovanje z drugimi vejami kemije. Na skupnih raziskavah na katepsinih tako še vedno sodelujem s sodelavci s katedre za biokemijo. Na področju organske kemije se po vzoru raziskovalne skupine večinoma osredotočam na heterociklične spojine, v okviru doktorskega dela pa sem se prvič podal na področje fotokemije. V doktorskem delu smo se posvetili fotokemijskim pretvorbam pirazolov, pomembnim heterocikličnim spojinam v znanih in potencialnih biološko aktivnih spojinah. Fotokemijski procesi temeljijo na absorpciji svetlobe, ki predstavlja vir energije. Prednost tega je, da se običajno lahko izognemo visokim temperaturam in nevarnim reagentom. Razvili smo več metod za pripravo pirazolov ter sintetizirali nabor strukturno zanimivih produktov. Proučili smo tudi fotokemijske lastnosti bicikličnih pirazolov ter jih po doktoratu že testirali kot fluorescentne označevalce proteinov.

V NARAVI DO NAJBOLJŠIH IDEJ

Pri raziskovalnem delu je izredno pomembno poznavanje dela trenutno najbolj priznanih znanstvenikov na svojem področju in sorodnih področjih. Rad prebiram tudi prispevke, ki so jih moji predhodniki objavili že pred desetletji. Zaradi sodobnejše tehnologije in takrat še neznanih metod so lahko izvrsten navdih za danes še vedno zelo zanimivo delo. Seveda pa se najboljše ideje porodijo po dobrem miselnem počitku, med tekom, v hribih ali na plaži.

DOBRONAMERNI PREDLOGI

Kljub veliko truda in časa, ki ju raziskovalci vložimo v raziskovanje, se naše delo običajno začne in konča z mentorjem. Od oblikovanja prvih idej in teme doktorskega dela pa do pisanja in objavljanja člankov mi ne bi uspelo brez pomoči prof. dr. Bogdana Štefaneta. Z njegovimi izkušnjami in znanjem sva včasih raziskave že po nekajminutnem pogovoru speljala v pravo smer – vsako mnenje je vedno izrazil kot dobronameren predlog. V ključnih trenutkih, predvsem v zadnjem letu raziskovanja, mi je pomagal pravočasno izpolniti zadane cilje, za kar sem mu še posebej hvaležen.

NOVO ZNANJE IN DOBRI ODNOSI

Vedno sem odprt za novo znanje, ki ga z veseljem predajam naprej, saj rad pomagam drugim. Pri delu sem vztrajen. Energijo vedno namenim tudi druženju z bližnjimi in prijatelji, saj me ti

odnosi navsezadnje oblikujejo. Tudi med študijem v Ljubljani sem si prizadeval ohranjati redne stike s svojimi bližnjimi, vendar jih je moje raziskovalno delo včasih omejilo. Med doktorskim študijem so najbolj trpeli moji hobiji, zato sem moral nekatere opustiti. Razmišljanje o naslednji kemijski reakciji pa mi je pogosto ukradlo del počitka.

DODATNA PREPOZNAVOST

Kljub temu da mi je že pridobitev doktorskega naziva v veliko čast, sem Krki hvaležen za dodatno prepoznavnost in priznanje vrednosti mojega raziskovalnega dela. Krkina nagrada odločno prispeva k njegovi odmevnosti, na kar sem še posebej ponosen. Krka si zaradi podpore mladim raziskovalcem, ki traja že 52 let, vsekakor zasluži pohvalo, saj tako še dodatno utrjuje pomembnost temeljnih raziskav tudi z vidika industrije.

SPOROČILO MLADIM

Če veste, da ste se za svoje delo potrudili, bodite nanj tudi ponosni. Vedno se spomnite preteklih uspehov, saj boste lahko tako brez dvomov sprejeli nove izzive in pridobivali nove izkušnje.

NAJBOLJŠI NASVET

Vse se bo uredilo, a ne samo od sebe.

ŽIVLJENJSKO VODILO

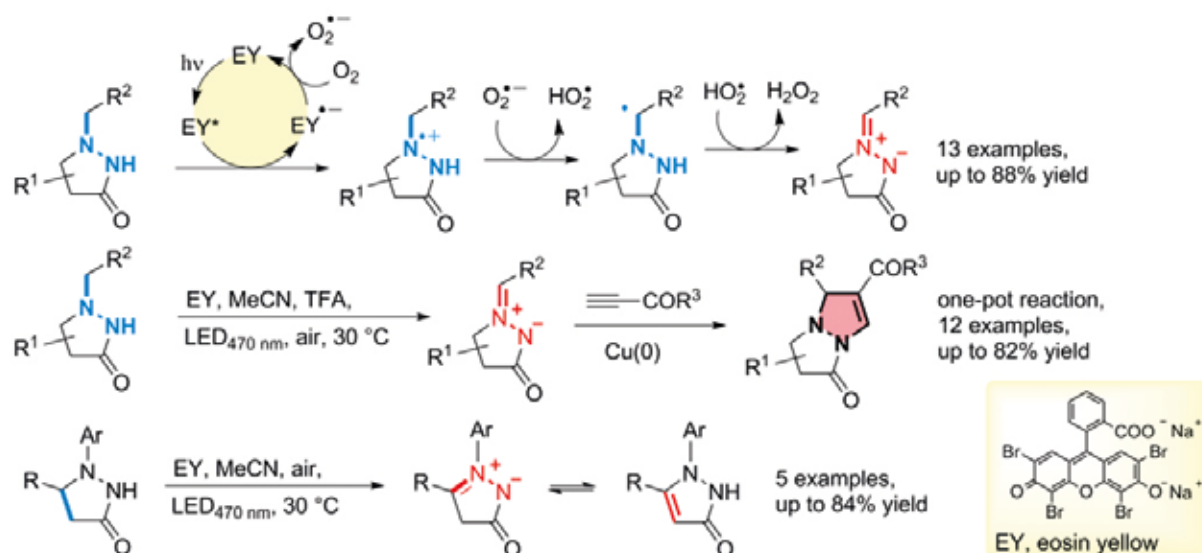
Razmisli, naredi, ponovi.



Fotoredoks katalitske pretvorbe pirazolov

Fotokemijski redoks procesi temeljijo na absorpciji svetlobe kot vira energije, pri čemer molekule preidejo v vzbujeno stanje. Pri tem pride do spremembe redoks potencialov molekul, tako oksidanti kot reducenti postanejo močnejši, kar omogoči enoelektronske prenose. Nastali reaktivni intermedii vodijo do reakcijskih poti prek radikalnih mehanizmov. Kljub visoki reaktivnosti nekaterih radikalnih zvrsti so lahko fotoredoks pretvorbe zelo selektivne. Poleg tega potekajo pri sobni temperaturi in v odsotnosti visokoreaktivnih reagentov, kar prinaša dodatne prednosti. V doktorskem delu smo se osredotočili na še neraziskane fotokemijske pretvorbe derivatov pirazolov, petčlenskih heterocikličnih sistemov s sosednjima dušikovima atomoma. Pirazoli so pomemben strukturni gradnik v protivnetnih učinkovinah in učinkovinah za zdravljenje rakavih obolenj. Pirazol-3-oni so tudi eno od najstarejših sintetskih protibolečinskih sredstev.

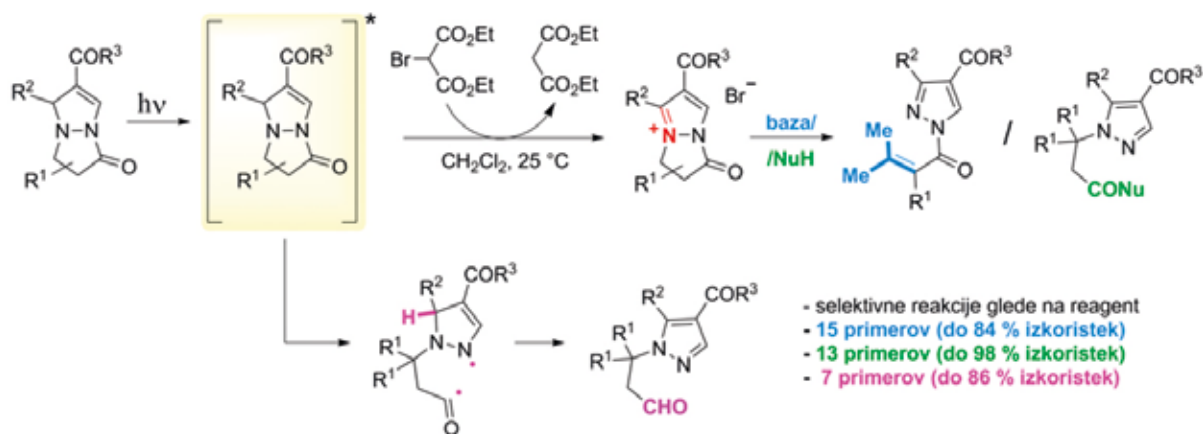
V prvem delu smo se osredotočili na fotooksidativne pretvorbe substituiranih pirazolidin-3-onov. Ker ne absorbirajo vidne svetlobe, smo pretvorbe raziskali v prisotnosti fotokatalizatorjev, ki absorbirajo vidno svetlobo in izmenjajo elektron s substratom, kar sproži nadaljnje reakcije do končnih produktov pirazol-3-onov in cikličnih azometin iminov (slika 1). S ciklično voltametrijjo smo preverili oksidacijske potenciale izhodnih spojin in na njihovi podlagi kot najprimernejši katalizator izbrali eozinsko rumeno. Najbolj znani fotoredoks katalizatorji so sicer polipiridilni kompleksi rutenija(II) in iridija(III), a je uporaba organskih spojin, kakršna je eozinska rumena, v večini primerov bolj ekonomična in za okolje manj škodljiva. Eozinska rumena dobro absorbira modro svetlobo, zato smo reakcijsko zmes osvetljevali z modro LED-svetlobo. Katalizator se regenerira s kisikom iz zraka. Po optimizaciji reakcijskih pogojev, kot so izbira topila, koncentracije reaktantov, reakcijski čas ter izbira dodatka – trifluoroocetne kisline, smo uspešno pripravili vrsto azometin iminov s pirazolidinonskim skeletom ter analogne pirazol-3-one. Z optimizirano metodo so azometin imini v enolončni pretvorbi reagirali z dipolarofili s [3+2] cikloadicijsko reakcijo, katalizirano z bakrom, v ustrezne pirazolo[1,2-*a*]pirazolone.



Slika 1. Fotooksidativne pretvorbe substituiranih pirazolidin-3-onov.

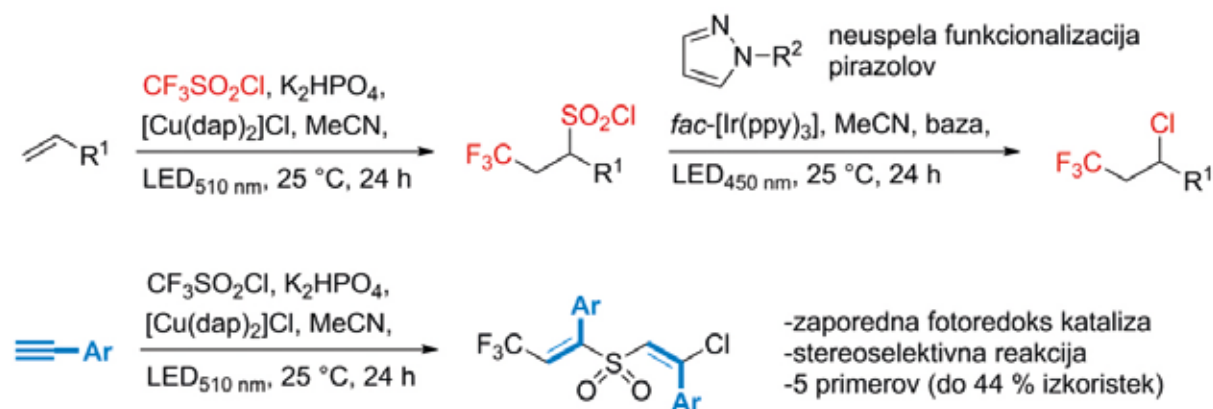
Pirazolo[1,2-*a*]pirazoloni so biciklične spojine, ki so pomembne pri razvoju peptidomimetikov, delujejo pa tudi protimikrobno. Pirazolo[1,2-*a*]pirazoloni so pogosto fluorescentne spojine, ki absorbirajo vidno svetlobo ter s tem preidejo v vzbujeno stanje. Predpostavili smo, da je vzbujeno stanje dovolj

dolgoživo, da lahko do fotoredoks reakcij pride tudi v odsotnosti katalizatorja. Tako smo pokazali, da se pirazolo[1,2-*a*]pirazononi v prisotnosti akceptorja elektronov, kot je dietil malonat, ter svetlobe oksidirajo ob naslednjem odpiranju pirazolnega obroča (slika 2). Nadaljnja pretvorba poteka z deprotonacijo v prisotnosti baze ali reakcije z nukleofilnimi reagenti. Z razvito metodo smo pripravili več pirazolov s karboksilno, estrsko, amidno ali akrilolilno funkcionalno skupino. Pirazole smo uspešno sintetizirali tudi z aldehydno funkcionalno skupino, ki nastane s homolitsko cepitvijo vezi ter z intramolekularnim prenosom vodikovega atoma. Med proučevanjem fotokemijskih lastnosti pirazolo[1,2-*a*]pirazononov nam je z njimi uspelo tudi fluorescentno označiti goveji serumski albumin.



Slika 2. Pretvorbe fluorescentnih pirazolo[1,2-*a*]pirazononov pod vidno svetlobo.

Pirazole smo poskusili sulfonirati tudi v fotokatalitskih pogojih. Uporabili smo sulfonil kloride, pridobljene s fotoredoks katalizirano radikalno adicijo v prisotnosti bakrovega kompleksa kot fotoredoks katalizatorja. Raziskati smo namreč želeli možnost dveh zaporednih fotoredoks kataliziranih reakcij znotraj ene reakcijske zmesi. Ugotovili smo, da je v pogojih, ki so potrebni za potek reakcije, odcepitev žveplovega dioksida prehitra reakcijska stopnja za uspešno sulfoniranje pirazolskega jedra. Pri raziskovanju sinteze nenasičenih sulfonil kloridov kot reagentov pa smo odkrili novo dvostopenjsko fotokatalizirano pretvorbo arilacetenov v dialkenil sulfone v prisotnosti trifil klorda (slika 3).



Slika 3. Sinteza dialkenil sulfonov iz arilacetenov.

Photoredox Catalytic Transformations of Pyrazoles

Photochemical redox processes are based on the absorption of light as a source of energy, whereby molecules enter an excited state. This results in a change in the redox potential of the molecules, making them both stronger oxidants and reductants, which enables one-electron transfers. The resulting reactive intermediates lead to reaction pathways via radical mechanisms. Despite the high reactivity of some radical species, photoredox transformations can be highly selective. In addition, they take place at room temperature and in the absence of highly reactive reagents, which brings additional advantages. The research in this doctoral dissertation is focused on still poorly researched photochemical transformations of pyrazole derivatives, five-membered heterocyclic systems with adjacent nitrogen atoms. Pyrazoles are an important structural building block in anti-inflammatory agents and agents for the treatment of cancer. Pyrazol-3-ones are also one of the oldest synthetic pain relievers.

In the first part, we focused on photooxidative transformations of substituted pyrazolidin-3-ones. As they do not absorb visible light, we investigated conversions in the presence of photocatalysts that absorb visible light and exchange electrons with the substrate, triggering further reactions leading to final products, pyrazol-3-ones and cyclic azomethine imines (Figure 1). Cyclic voltammetry was used to determine the oxidation potentials of the starting compounds and based on the results, eosin yellow was chosen as the most suitable catalyst. The most well-known photoredox catalysts are polypyridyl complexes of ruthenium(II) and iridium(III), but the use of organic compounds such as eosin yellow is in most cases more economical and environmentally friendly. As eosin yellow absorbs blue light, the reaction mixture was illuminated with blue LEDs. The catalyst is regenerated with oxygen present in the air. After optimising the reaction conditions, such as the solvent, concentrations of reactants, reaction time and the choice of additive – trifluoroacetic acid, we successfully prepared a series of azomethine imines with a pyrazolidinone skeleton and analogous pyrazol-3-ones. Using the optimised method, azomethine imines were reacted in a one-pot transformation with dipolarophiles by a copper-catalysed [3+2] cycloaddition reaction to the corresponding pyrazolo[1,2-a]pyrazolones.

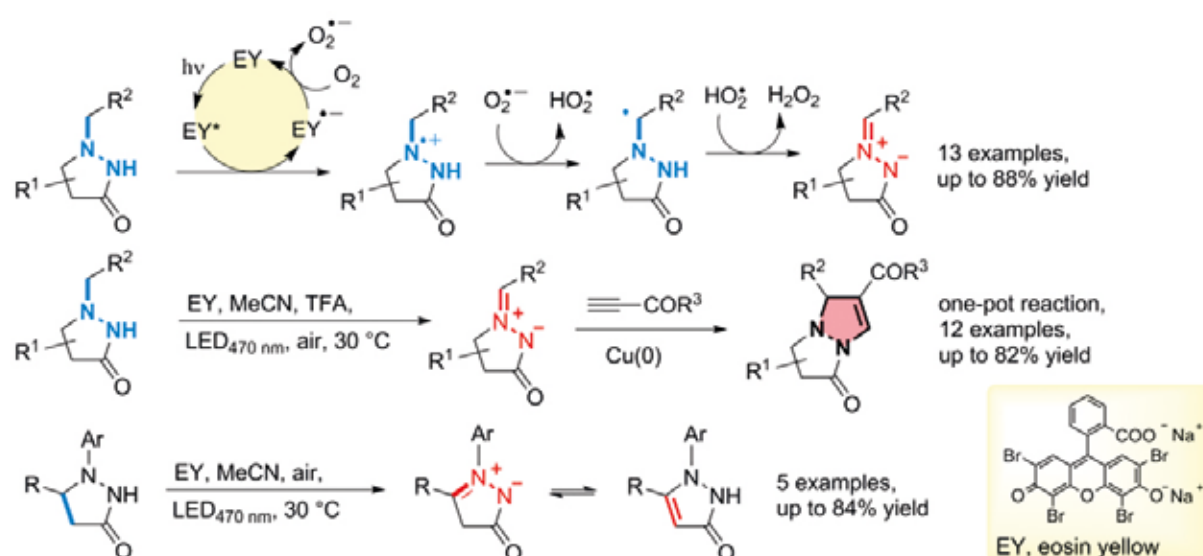


Figure 1. Photooxidative transformations of substituted pyrazolidin-3-ones.

Pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones are bicyclic compounds, important in the development of peptidomimetics, and they also have antimicrobial activity. Pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones are often fluorescent compounds that absorb visible light and thereby enter an excited state. We assumed that the excited state is long-lived enough for photoredox reactions to occur even in the absence of a catalyst. Thus, we showed that pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones are oxidised in the presence of an electron acceptor, such as diethyl malonate, and light, with subsequent opening of the pyrazole ring (Figure 2). Further transformation occurs by deprotonation in the presence of a base or by reacting with nucleophilic reagents. Several pyrazoles with a carboxyl, ester, amide or acryloyl functional group were prepared using the developed method. We also successfully synthesised pyrazoles with an aldehyde functional group, which are formed by homolytic bond cleavage and intramolecular hydrogen atom transfer. While studying the photochemical properties of pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones, we also managed to apply them in fluorescent labelling of bovine serum albumin.

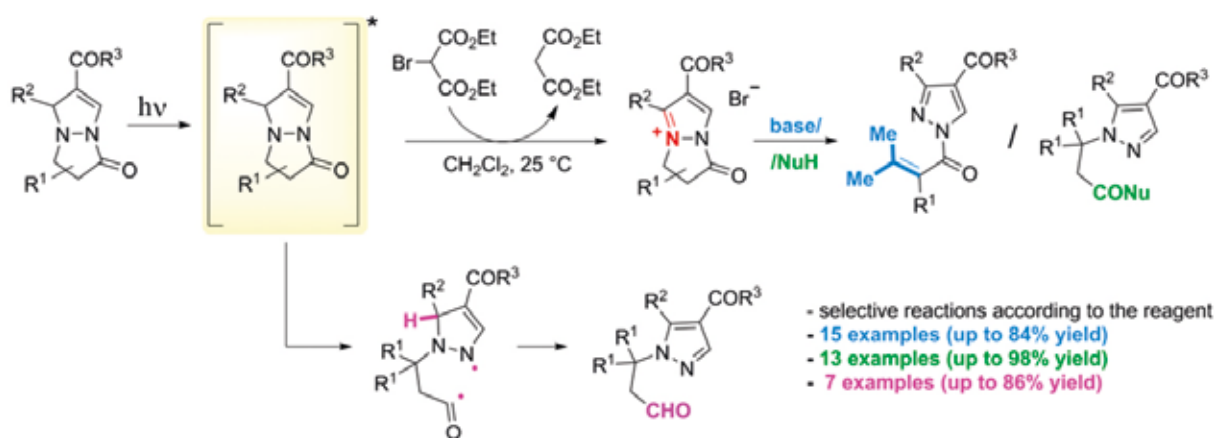


Figure 2. Transformations of fluorescent pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones under visible light.

We also tried to sulfonate pyrazoles under photocatalytic conditions. We used sulfonyl chlorides obtained by photoredox-catalysed radical addition in the presence of a copper complex as a photoredox catalyst. Namely, we wanted to investigate the possibility of two consecutive photoredox-catalysed reactions within one reaction mixture. We found that under the conditions necessary for the reaction to take place, the evolution of sulphur dioxide was too fast a reaction step for successful sulfonation of the pyrazole scaffold. While trying to prepare unsaturated sulfonyl chlorides as reagents, we discovered a novel two-step photocatalysed transformation of arylacetylenes to dialkenyl sulfones in the presence of triflyl chloride (Figure 3).

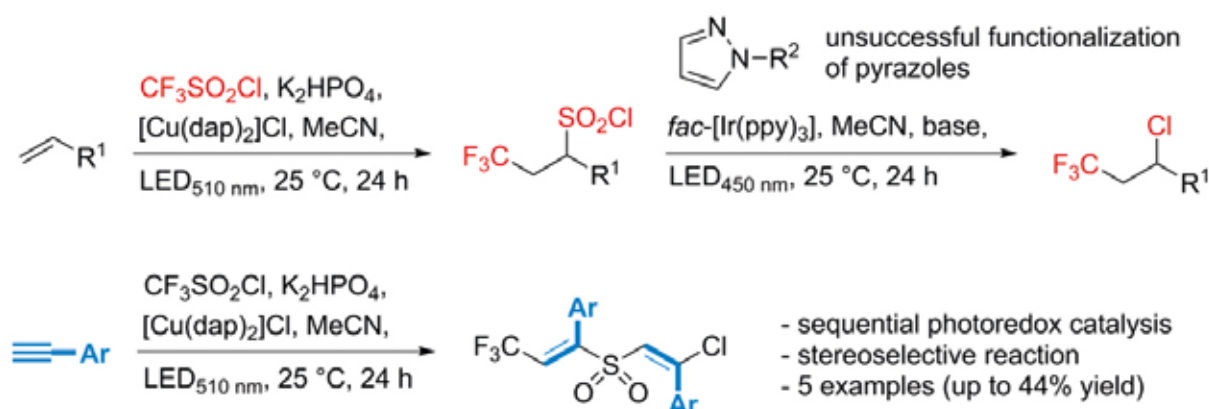


Figure 3. Synthesis of dialkenyl sulfones from arylacetylenes.

52. KRKINE NAGRADE
52nd KRKA PRIZES

KRKINE NAGRADE

KRKA PRIZES

POVZETKI
ABSTRACTS

Monika Horvat, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jernej Iskra**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Uporabne spojine in materiali na osnovi lignina in barvil invazivnih tujerodnih rastlin

Vedno večja okoljska ozaveščenost usmerja veliko pozornosti v pridobivanje snovi iz naravnih obnovljivih virov. Lignocelulozna biomasa je glavni obnovljivi vir organskega ogljika na Zemlji. Raziskali smo možnosti valorizacije in nadgradnje najmanj izkoriščenih komponent lignocelulozne biomase (lignin, ferulna kislina, sekundarni metaboliti). Proučili smo oksidativno cepitev vezi C–C, ki je s sintetičnega vidika izredno pomembna reakcija za razgradnjo molekul iz biomase. Z uporabo H_2O_2 in V_2O_5 smo razvili metodo za selektivno oksidativno cepitev dvojne vezi C–C, ki omogoča selektivno pretvorbo derivatov cimetove kisline v benzaldehide, benzokinone ali benzojske kisline. Metoda je primerna tudi za selektivno pretvorbo ferulne kisline v vanilin. Oksidativna cepitev enojne vezi C–C igra pomembno vlogo tudi pri pretvorbi lignina v platformne kemikalije. Predhodno razvito metodo (H_2O_2 ter V_2O_5) smo razširili na različne vrste lignina. Komerčni lignin smo uspešno pretvorili v DME, kraft lignin smreke pa v vanilin. V invazivnih tujerodnih rastlinah je tudi veliko različnih strukturnih tipov naravnih barvil. Emodin, izoliran iz korenin japonskega dresnika, smo kemijsko modificirali z uvedbo različnih funkcionalnih skupin. S kemijsko spremembo strukture smo vplivali na njegove barvne, vezavne, protivirusne in protibakterijske lastnosti. Na knjižnici spojin emodina smo izvedli tudi študijo vpliva strukture na protivirusno aktivnost proti HCoV-NL63. Protivirusna aktivnost jodiranega in bromiranega emodina je bila primerljiva z remdesivirjem, ki je v nujnih primerih že odobren za uporabo proti covidu-19. Derivate emodina smo uspešno vezali na tekstilni material, kjer se je prav tako pokazala aktivnost proti bakterijam *S. aureus*.

Monika Horvat, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Jernej Iskra**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Useful Compounds and Materials Based on Lignin and Dyes of Invasive Alien Plants

The growing awareness of environmental issues and sustainable development is focused on obtaining materials from renewable sources. Lignocellulosic biomass represents the most important renewable source of organic carbon on earth, making it a natural source to produce chemicals. In the doctoral dissertation, we focused on the utilisation of less utilised components of plant biomass from IAPS. We investigated the oxidative cleavage of C–C bonds, which is an important reaction in the decomposition of complex molecules from biomass from a synthetic point of view. Using H_2O_2 and V_2O_5 , we developed a method for selective oxidative cleavage of C–C double bonds. The method allows for a selective conversion of cinnamic acid derivatives into benzaldehydes, benzoquinones or benzoic acids. The method allows selective conversion of ferulic acid to vanillin. Oxidative cleavage of single C–C bonds plays an important role in the conversion of lignin to platform chemicals. A previously developed method was extended to various types of lignin. In DME, commercial lignin and spruce kraft lignin were successfully converted to vanillin. IAPS are rich in various structural types of natural dyes that have been isolated by extraction. Emodin isolated from Japanese knotweed was chemically modified by introducing various functional groups. Chemical modification of the emodin structure affected its colour, binding, and its antiviral and antibacterial properties. A Structure-Activity Relationship was performed with the emodin derivatives for antiviral activity against HCoV-NL63. Iodinated and brominated emodin showed comparable antiviral activity as Remdesivir, which has been approved for use in emergency COVID-19 cases. Emodin derivatives were successfully bound to textile material. The functionalised textile material also showed antibacterial activity against *S. aureus*.

Kaja Bergant Loboda, Kemijski inštitut, Ljubljana
Mentor: **Andrej Perdih**, Kemijski inštitut, Ljubljana
Sommentor: **Izidor Sosič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Načrtovanje in optimizacija katalitičnih zaviralcev človeške DNA-topoizomeraze IIa kot potencialnih protirakavih učinkovin

DNA-topoizomeraze so raznolika družina encimov, ki delujejo kot učinkoviti molekularni motorji in v molekuli DNA omogočajo topološke spremembe. Klinično uporabljeni zaviralci DNA-topoizomeraz tipa II, tako imenovani strupi topo II, delujejo tako, da stabilizirajo kratkotrajni kovalentni kompleks med DNA in encimom, kar vodi do smrti hitro delečih se rakavih celic. Ta sicer učinkovita protirakava zdravila molekulo DNA hkrati tudi poškodujejo, kar povzroči resne neželene učinke, npr. kardiotoksičnost ter nastanek sekundarnih oblik raka. Zato se raziskave osredotočajo na razvoj katalitičnih zaviralcev topoizomeraz tipa II, ki encim zavrejo tako, da ne povzročajo poškodb DNA. Ta izziv je bil pri razvoju varnejših kemoterapij izhodišče za načrtovanje, optimizacijo in ovrednotenje treh razredov katalitičnih zaviralcev človeške topoizomeraze IIa, ki ciljajo na njeno ATP-vezavno mesto. Najprej smo odkrili substituirane 4,5'-bitazole, ki delujejo kot katalitični ATP-kompetitivni zaviralci tarčnega encima. Najobetavnejše spojine so bile na celičnih linijah raka jeter in dojke primerljivo učinkovite kot strup topo II, ki se uporablja v kemoterapiji. Za to skupino zaviralcev smo vložili tudi evropsko patentno prijavo. Nato smo z uporabo strukturno podprtega načrtovanja optimizirali aktivnost katalitičnih zaviralcev iz razreda 4,6-disubstituiranih 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov. Tarčni sintetizirani analogi niso povzročili poškodb DNA in so uspešno zavirali rast celic raka jeter. V tretji raziskavi smo kot katalitične zaviralce topoizomeraze IIa načrtovali, sintetizirali in ovrednotili še rigidne 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazolne. Dokazali smo njihovo vezavo na tarčno ATPazno domeno ter pokazali citotoksičnost na celični liniji raka dojke brez sočasnega induciranja poškodb DNA. Odkrite spojine so dobro izhodišče za razvoj predkliničnih kandidatov, ki bi delovali kot varnejši kemoterapevtiki.

Kaja Bergant Loboda, National Institute of Chemistry, Ljubljana
Supervisor: **Andrej Perdih**, National Institute of Chemistry, Ljubljana
Co-supervisor: **Izidor Sosič**, University of Ljubljana

Design and Optimisation of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase IIa as Potential Anticancer Agents

DNA topoisomerases are a diverse family of enzymes that act as efficient molecular motors, catalysing topological changes in the DNA molecule. Clinically used inhibitors of type II DNA topoisomerases, known as topo II poisons, act by stabilising the short-lived covalent complex between the DNA and the enzyme, leading to the death of rapidly dividing cancer cells. These otherwise effective anticancer drugs also damage the DNA molecule, causing serious side effects such as cardiotoxicity and the onset of secondary tumours. Therefore, research is now focused on the development of catalytic inhibitors of type II topoisomerases that inhibit the enzyme without damaging the DNA. This challenge in developing safer chemotherapies served as the starting point for the design, optimisation, and evaluation of three classes of catalytic inhibitors of the human DNA topoisomerase IIa that target its ATP-binding site. We first discovered substituted 4,5'-bitazoles that act as catalytic ATP-competitive inhibitors of the target enzyme. The most promising compounds were comparably effective in liver and breast cancer cell lines as the topo II poison used in chemotherapy. We also filed a European patent application for this promising group of compounds. Next, the activity of the 4,6-disubstituted 1,3,5-triazin-2(1*H*)-one class of catalytic inhibitors was optimised by structure-based design. The synthesised analogues did not cause DNA damage and successfully inhibited the growth of liver cancer cells. In the third study, rigid 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles were designed, synthesised and evaluated as catalytic inhibitors of topoisomerase IIa. We demonstrated their binding to the ATPase domain and showed cytotoxicity in the breast cancer cell line without concomitant induction of DNA damage. The discovered compounds represent good starting points for the development of preclinical candidates that would act as safer chemotherapeutic agents.



Andrej Šterman, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Zdenko Časar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Izidor Sosič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Novi pristopi k sintezi α -aminoborovih kislin kot ključnih gradnikov za zaviralce proteasoma

α -aminoborove kisline so bioizosteri aminokislin, ki imajo na stereogeni center namesto karboksilne kisline vezano boronsko kislino. Med drugim jih lahko vgradimo v bor vsebujoče peptidomimetike, ki so uporabni kot reverzibilni kovalentni zaviralci različnih encimov. Na tržišču so sicer že tri učinkovine s tem strukturnim motivom, vendar potencial α -aminoborovih kislin zaradi zahtevne sinteze ostaja neizkoriščen. V okviru tega dela smo razvili novo, preprosto in zeleno sintezno pot do optično čistih α -aminoborovih kislin z odličnimi izkoristki. Kalijeve aciltrifluoroborate smo z amonijevim kloridom pretvorili do njihovih stabilnih primarnih iminskih analogov, ki so nove, zwitterionske spojine. Te pa smo z visoko enantioselektivnostjo katalitsko hidrogenirali do trifluoroborato-amonijevih ionov, dvojčkov z rutenijevim katalizatorjem (*R,R*)-TethTsDpen brez aditivov. Odkrili smo še preprost način za hidrolizo teh spojin do α -aminoborovih kislin. Vse reakcije smo izvedli v metanolu ali zmesi metanola z vodo, za izolacijo nismo nikjer uporabili kromatografskih metod, izkoristki pa so bili blizu kvantitativnim. Uporabnost metode smo pokazali z enostopenjsko sintezo bortezomiba, ixazomiba in knjižnice njunih novih analogov kot zaviralcev (imuno)proteasoma, ki so selektivneje zavirali različne podenote tega encima.

Andrej Šterman, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Zdenko Časar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Izidor Sosič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Novel Approaches for Synthesis of α -Aminoboronic Acids as Key Building Blocks for Proteasome Inhibitors

α -Aminoboronic acids are amino-acid bioisosteres, whose stereogenic centre bears the boronic acid moiety instead of carboxylic acid. They can be integrated into boron-containing peptidomimetics, which can covalently, but reversibly, inhibit various enzymes. Three APIs bearing this structural motive are already on the market, but the potential of α -aminoboronic acids remains largely unexploited due to challenging synthesis. In this work, we developed a new, facile and green synthetic route towards optically pure α -aminoboronic acids in excellent yields. Potassium acyltrifluoroborates were reacted with ammonium chloride to afford their stable, primary imine analogues, which are new, zwitterionic compounds. These were catalytically hydrogenated to trifluoroborate-ammoniums using a ruthenium catalyst (*R,R*)-Teth-TsDpen, giving excellent yields and enantioselectivities. Additionally, a simple hydrolysis of these compounds to α -aminoboronic acids was discovered. All reactions were performed in neat or aqueous methanol, no chromatography was used for isolation and yields were near-quantitative. The general utility of the method was showcased by a one-step synthesis of (immuno)proteasome inhibitors bortezomib, ixazomib, and a series of their novel analogues, which exhibited a highly selective inhibitory activity towards different proteasome subunits.

Veronika Furlan, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Mentor: **Urban Bren**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Proučevanje mehanizmov antikarcinogenega in nevroprotektivnega delovanja naravnih polifenolnih spojin

Namen doktorske disertacije je z inovativnimi računalniškimi pristopi proučiti in pojasniti slabo raziskane molekularne mehanizme antikarcinogenega in nevroprotektivnega delovanja naravnih polifenolov ter njihovo vlogo pri preprečevanju nastanka raka in zaviranju napredovanja karcinogeneze in Alzheimerjeve bolezni. S kvantnomehanskimi simulacijami ter *in vitro* eksperimenti smo določili potencial izbranih polifenolnih spojin kot naravnih lovilcev genotoksičnih kemijskih karcinogenov, ki smo jim v vsakdanjem življenju pogosto izpostavljeni, ter razkrili molekularne mehanizme polifenolnih spojin, ki sodelujejo pri preprečevanju nastanka raka. Razvili smo popolnoma nov protokol za inverzno molekularno sidranje, ki predstavlja univerzalen pristop, s pomočjo katerega lahko predvidimo zožen nabor najbolj verjetnih proteinskih tarč promiskuitetnih naravnih polifenolov ter razkrijemo njihove molekularne mehanizme. Ta protokol pa ima velik potencial tudi pri napovedovanju možnih navzkrižnih interakcij pri racionalnem načrtovanju zdravilnih učinkovin. S kombiniranim računalniškim pristopom, ki združuje molekularno sidranje, simulacije molekulske dinamike in prostoenergijske izračune, smo prvič dobili mehanistični vpogled v povezavo med strukturo in nevroprotektivnim delovanjem štirih proučevanih polifenolov v vlogi inhibitorjev encima PDE4D, ki je eksperimentu nedosegljiv. Postavili pa smo tudi temelje za uspešne aplikacije ekstraktov, eteričnih olj ter številnih polifenolnih spojin iz rožmarina v farmacevtski in prehranski industriji. Trdno verjamemo, da so v doktorski disertaciji predstavljeni *in silico* pristopi in razkriti inhibitorni mehanizmi odlično izhodišče za hitrejši in cenejši razvoj novih funkcionalnih prehranskih dopolnil in zdravil za preprečevanje in zdravljenje raka in Alzheimerjeve bolezni s potencialno širšim terapevtskim oknom in manjšimi neželenimi učinki.

Veronika Furlan, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor
Supervisor: **Urban Bren**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Mechanistic Insights into Anticarcinogenic and Neuroprotective Activity of Natural Polyphenolic Compounds

The aim of the doctoral dissertation is to examine and elucidate the poorly understood molecular mechanisms of anticarcinogenic and neuroprotective effects of natural polyphenols as chemopreventive agents and as suppressors of carcinogenesis and Alzheimer's disease using innovative computational approaches. Applying quantum mechanical simulations and *in vitro* experiments, we determined the potential of selected polyphenolic compounds as natural scavengers of genotoxic chemical carcinogens, to which we are frequently exposed, and revealed the molecular mechanisms of their cancer prevention. Moreover, we developed a novel inverse molecular docking protocol, which represents a universal approach to identifying a narrow set of prioritised human protein targets of promiscuous natural polyphenols and to elucidating their molecular mechanisms. Furthermore, the presented protocol also possesses great potential in predicting possible cross-interactions, potentially leading to adverse side effects, in the rational drug design. With a combined computational approach consisting of molecular docking, molecular dynamics simulations, and free-energy calculations, we for the first time obtained a mechanistic insight into the connection between the structure and the neuroprotective activities of the four studied polyphenols as inhibitors of the PDE4D enzyme, which is unattainable using laboratory experiments. We have also laid the foundation for successful applications of extracts, essential oils, and numerous bioactive polyphenolic compounds from rosemary in the pharmaceutical and food industries. We firmly believe that the presented *in silico* approaches as well as inhibitory mechanisms form a solid basis for faster and cheaper development of novel functional dietary supplements and drugs for the prevention and treatment of cancer and Alzheimer's disease with a potentially wider therapeutic window and fewer side effects.

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

Razvoj metod izdelave in sestave posušenih emulzij za dostavljanje zdravilnih učinkovin z izrazito lipofilnimi lastnostmi

Veliko novoodkritih zdravilnih učinkovin ima slabo vodotopnost. Da bi jo izboljšali in zagotovili večjo biološko uporabnost, lahko za učinkovine z izrazito lipofilnostjo uporabimo na lipidih zasnovane sisteme. Posušene emulzije (PE), eden od tipov na lipidih zasnovanih sistemov, so v/o emulzije, pri katerih zunanjo, vodno fazo nadomestijo trdni nosilci. V nalogi smo poskušali dokazati, da lahko hibe PE odpravimo in izdelamo dostavne sisteme, ki bodo omogočali vgradnjo dovolj velikih količin modelne učinkovine, simvastatina, in bodo imeli zadovoljive pretočne lastnosti. V prvem delu raziskav smo prvi pokazali, da je metoda oblaganja s tehnologijo vrtnčenja primerna za izdelavo sistemov PE, vendar le ob uporabi Wursterjeve komore z dodatnim generatorjem vrtnčenja zraka. Z načrtovanjem eksperimentov smo izboljšali stabilnost in rekonstitucijske sposobnosti pelet, obloženih s posušeni emulzijami. Tako obložene pelete so imele dobre pretočne lastnosti, izboljšal se je tudi profil sproščanja simvastatina. V drugem delu smo optimizirali proces in formulacijo PE v kombinaciji s tehnologijo sušenja z razprševanjem, ki se običajno uporablja pri izdelavi PE. Da bi dodatno izboljšali pretočne lastnosti in sposobnost rekonstitucije posušenih emulzij, smo v formulacijo uvedli makroporozni SiO₂ in nanokristalno celulozo. Z metodo odzivnih površin smo izdelali produkte z zadovoljivimi izbranimi kritičnimi atributi kakovosti. Zaključni del študije je predstavljala primerjava obeh tehnologij za izdelavo PE. Tehnologija oblaganja se je pokazala kot prednost pri vseh proučevanih odzivih razen pri vsebnosti učinkovine. V končni študiji biološke uporabnosti na podganah so s posušeni emulzijami obložene pelete omogočale 115-odstotno povečanje biološke uporabnosti v primerjavi z referenčno fizikalno zmesjo z učinkovino.

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

Development of Dry Emulsion Production Methods and Compositions Intended for Delivery of Highly Lipophilic Drugs

Many newly discovered drugs exhibit poor water solubility. For highly lipophilic drugs, lipid-based systems provide one of the possible routes to achieve better solubility, and hence, bioavailability. Dry emulsions (DE) are lipid-based systems, where in an o/w emulsion the outer, aqueous phase is replaced with solid matrix formers. In this study, we tried to resolve challenges of utilising DE for the delivery of highly lipophilic drugs by producing DE with high drug loading of the model drug simvastatin and suitable flow properties. We were the first to prove that fluid bed coating is a viable method for the production of DE, but only if a modified Wurster chamber equipped with a swirl flow generator is used. With the use of Design of Experiments methods, we were able to achieve improved stability and reconstitution properties of DE coated pellets. DE coated pellets provided good flow properties and increased dissolution performance of the model drug simvastatin. In the second part, process and DE formulation optimisation was attempted in combination with spray drying method, a commonly used method for DE preparation. To further optimise flowability and reconstitution ability of spray dried dry emulsions, nanocrystalline cellulose and macroporous silica were introduced in the formulation as insoluble matrix formers. By utilising response surface methodology, we were able to make products which exhibited suitable chosen critical quality attributes. The final part of the study focused on the comparison of fluid bed layering and spray drying as technologies for the production of DE. Fluid bed layering excelled in all studied responses, except for the maximum drug loading. In the final bioavailability study in rats, DE layered pellets provided a remarkable 115% increase in relative bioavailability compared with the reference physical mixture with simvastatin.

Ana Kovačič, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana
Mentorica: **Ester Heath**, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana
Somentorica: **Tina Kosjek**, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana

Ostanki bisfenolov v vodnem okolju: pojavnost in kroženje

Bisfenoli so skupina industrijskih spojin, ki so zaradi prisotnosti v okolju in endokrinih učinkov prepoznane kot prioritarna organska onesnaževala. Najbolj razširjen in proučevan je bisfenol A. Razpoložljive študije pomanjkljivo opisujejo pojavnost, kroženje in strupenost ostalih bisfenolov. V okviru raziskave smo razvili zanesljive, občutljive in natančne analize metode na osnovi plinske in tekočinske kromatografije, povezane z masno spektrometrijo, za izvajanje tarčnih analiz izbranih bisfenolov in netačnih postopkov za njihove presnovne in transformacijske produkte. Rezultati kažejo prisotnost analiziranih bisfenolov v odpadni vodi na ravni ng L^{-1} . Učinkovitost njihovega odstranjevanja in vrsta kinetike sta odvisni od tehnologije čiščenja, ki v večini primerov nakazuje reakcijo psevdoprvega reda. Z biološkimi postopki, UV-fotolizo in naprednimi oksidacijskimi postopki čiščenja vod smo dosegli visoko stopnjo učinkovitosti odstranjevanja proučevanih bisfenolov. Uporaba samostojnega postopka čiščenja običajno ne vodi v mineralizacijo, saj smo potrdili nastanek transformacijskih produktov: 3 nove produkte presnove bisfenola S, 11 novih fototransformacijskih produktov bisfenolov F, S in Z ter 11 novih biotransformacijskih produktov bisfenolov F in S. Bisfenoli se iz materialov, ki pridejo v stik z živili, prav tako sproščajo v simulantne različnih pijač (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$), pri čemer je kinetika sproščanja odvisna od migracijskih pogojev. Premazi pločevink za pijače in steklenic iz jekla za večkratno uporabo so glavni vir bisfenola A in izomerov bisfenola F. Modeli strupenosti bisfenola A in F za alge in bakterije so razkrili podcenjevanje strupenosti mešanic. Predstavljeno doktorsko delo potrjuje prisotnost bisfenolov v vodnem okolju in poudarja potrebo po novih tehnologijah čiščenja ali kombinacijah že poznanih. Ponuja nov vpogled v kroženje bisfenolov med čiščenjem vode, pri čemer obravnava tako izhodne spojine kot presnovne in transformacijske produkte. Poleg tega ponuja novo znanje o sproščanju snovi iz materialov, ki prihajajo v stik z živili, kot pomembnim virom človekove izpostavljenosti.

Ana Kovačič, Jožef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana
Supervisor: **Ester Heath**, Jožef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana
Co-supervisor: **Tina Kosjek**, Jožef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana

Bisphenol Residues in Aqueous Environment: Occurrence and Fate

Bisphenols are a group of industrial chemicals increasingly recognised as contaminants of emerging concern because of their presence in the environment and endocrine disrupting effects. Bisphenol A is the most abundant and well-studied of the group, whereas for other bisphenols available studies do not adequately reflect their occurrence, fate and potential toxicity. In this work, sensitive and accurate gas and liquid chromatography MS-based analytical methods for target analysis of 18 bisphenols and non-target analysis of their metabolites/transformation products were developed. The results showed the presence of all tested bisphenols in wastewaters at ng L^{-1} levels. Their removal efficiency and kinetics depended on the type of treatment and mostly followed pseudo-first-order kinetics. Biological, UV photolysis and advanced oxidation processes yielded high removal efficiencies. However, a single treatment did not lead to complete mineralisation, and transformation products were confirmed: three new bisphenol S metabolites, 11 novel phototransformation products of bisphenol F, S and Z, and 11 newly identified bisphenol F and S biotransformation products. Depending on the leaching conditions, bisphenols were also shown to leach from food contact materials into food simulants for different beverages (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$). Linings of beverage cans and reusable steel bottles were identified as the source of bisphenol A and F isomers. Moreover, toxicity models of bisphenol A and F towards algae and bacteria revealed an underestimation of mixture toxicity towards experimental data. In summary, the confirmed presence of bisphenols in the aqueous environment emphasises the need for new treatment technologies or combinations of the existing ones. The thesis delivers new insights into the fate of bisphenols during water treatment, addressing parent compounds and also their metabolites/transformation products. It provides new knowledge about the migration of bisphenols from food contact materials as a significant source of human exposure.

Kity Požek, Institut Jožef Stefan

Mentor: **Igor Križaj**, Institut Jožef Stefan

Somentorici: **Vera Župunski**, **Adrijana Leonardi**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani in Institut Jožef Stefan

Izolacija in karakterizacija proteina VaaMPIII-3 iz modrasovega strupa

Strup modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*), najnevarnejše evropske kače, je bogat vir farmakološko aktivnih molekul. V njem smo odkrili proteinski toksin, VaaMPIII-3, ki zavira strjevanje krvi. Razvili smo postopek za njegovo izolacijo iz surovega strupa. Očiščenemu proteinu smo določili biokemijske, biofizikalne in strukturne lastnosti. Zelo pomembna je bila ugotovitev, da VaaMPIII-3 določa nov podrazred metaloproteinaz. V človeški krvni plazmi, bogati s trombociti, je VaaMPIII-3 zaviral agregacijo trombocitov, sproženo z ADP, kolagenom ali arahidonsko kislino. V normalni človeški plazmi kačji protein ni vplival na koagulacijo krvi. VaaMPIII-3 je tako zelo primeren kandidat za načrtovanje novih antitrombotikov s tarčnim delovanjem in minimalnimi neželenimi učinki. Za študij strukturno-funkcijskih povezav v molekuli smo razvili bakterijski sistem za pripravo rekombinantnega VaaMPIII-3, za racionalno načrtovanje mutacij pa izdelali homologni model tridimenzionalne strukture proteina. Naši rezultati so bili objavljeni v priznani reviji *Toxins* s faktorjem vpliva 4,546.

Kity Požek, Jožef Stefan Institute

Supervisor: **Igor Križaj**, Jožef Stefan Institute

Co-supervisors: **Vera Župunski** and **Adrijana Leonardi**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Jožef Stefan Institute

Isolation and Characterisation of VaaMPIII-3 Protein from Venom of Nose-Horned Viper

The venom of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*), the most dangerous European snake, is a rich source of pharmacologically active molecules. In it, we discovered a protein toxin, VaaMPIII-3, that inhibits the blood clotting process. We developed a procedure for its isolation from raw venom. The purified protein was characterised biochemically, biophysically and structurally. A very important discovery was that VaaMPIII-3 defines a new subclass of metalloproteinases. In human platelet-rich blood plasma, VaaMPIII-3 inhibited platelet aggregation induced by ADP, collagen, or arachidonic acid. In the normal human plasma, however, the snake protein did not affect blood coagulation. VaaMPIII-3 is thus a very suitable candidate to design new antithrombotics with specific action and minimal side effects. For structure-function study of the molecule, we developed a bacterial system for the preparation of the recombinant VaaMPIII-3, and for the rational design of mutations, we constructed a homology three-dimensional model of the protein. We published our results in the renowned journal *Toxins* with an impact factor of 4.546.

Nika Marolt, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Matic Legiša**, Kemijski inštitut, Ljubljana

Vpliv ukinjenega izločanja laktata pri rakavih celicah na njihovo uničevanje z aktiviranimi limfociti T

Visokoaktivni modificirani encim 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1) povzroči deregulacijo glikolize in je glavni metabolični motor hitre rasti rakavih celic. Zaradi prevelikega pretoka metabolitov nastane v citosolu presežek nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), kar prispeva k povečani tvorbi kisikovih zvrsti, ki so izredno reaktivne ter povzročajo mutacije in tako spremenijo celično signalizacijo rakavih celic. Testirali smo učinkovitost 33 specifičnih inhibitorjev PFK1 za zmanjšanje tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti pri tumorigenih celičnih linijah Caco-2, Colo 289, MDA-MB-231 in Jurkat ter pokazali njihovo različno učinkovitost. Povečana tvorba NADH, ki se kot posledica povečanega pretoka skozi glikolizo reoksidira ob redukciji piruvata v laktat, poveča sekrecijo laktata iz rakavih celic. Zunajcelični laktat povzroča acidifikacijo v tumorjih in je glavni zaviralec učinkovitosti imunskih celic proti rakavim. S testom ko-kulture tumorigenih celic Jurkat in aktiviranih T-limfocitov smo na pretočnem citometru izmerili višji odstotek apoptoze pri tumorigenih celicah Jurkat, ki so bile tretirane s specifičnim inhibitorjem PFK1, v primerjavi s kontrolo. Rezultati nakazujejo, da je tretiranje rakavih celic z izbranimi inhibitorji PFK1 aktiviranim T-limfocitom omogočilo bolj učinkovito uničevanje rakavih celic v primerjavi z netretiranimi rakavimi celicami.

Nika Marolt, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: **Matic Legiša**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Impact of Aborted Lactate Secretion in Cancer Cells on Their Destruction by Activated T-Lymphocytes

Highly active modified enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK1) causes deregulation of glycolysis and represents the main metabolic engine of rapid growth of cancer cells. Excessive metabolite flow also results in abundant NADH formation in the cytosol that can contribute to an increased formation of reactive oxygen species, which cause mutations and altered cell signalling of cancer cells. We tested the effectiveness of thirty-three specific PFK1 inhibitors for reducing the formation of reactive oxygen species in tumorigenic cell lines Caco-2, Colo 289, MDA-MB-231 and Jurkat. Inhibitors showed different effectiveness. Increased NADH formation in cancer cells is reoxidised upon reduction of pyruvate to lactate that is secreted from cancer cells. Extracellular lactate causes acidification in tumours and is a major inhibitor of the effectiveness of immune cells against cancer. By co-culture of Jurkat tumorigenic cells and activated T lymphocytes, a higher percentage of apoptosis was measured on a flow cytometer in Jurkat tumorigenic cells treated with a specific PFK1 inhibitor compared to the control. The results suggest that treatment of cancer cells with selected PFK1 inhibitors allowed activated T lymphocytes to kill cancer cells more efficiently compared to untreated cancer cells.



Grega Bajc, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: **Klemen Korasa**, Krka, d. d., Novo mesto

Razvoj modela za izbor kombinacije barvil v filmskih oblogah za doseganje ciljne barve filmsko obloženih tablet

Barva je pri filmsko obloženih tabletah (FOT) zelo pomembna. Olajša prepoznavanje zdravila, otežuje poneverbo in pogosto zagotavlja boljšo sprejemljivost zdravila za bolnika. Ustrezno obarvanost FOT dosegamo z uporabo najrazličnejših barvil. V magistrski nalogi smo filmske obloge različnih barv pripravili z različnimi barvili – rdečim, rumenim, črnim železovim oksidom in indigo karminom. Z metodo načrtovanja eksperimentov smo postavili dva modela za napovedovanje parametrov barve v barvnem prostoru CIEL*a*b*. Dokazali smo, da uporaba metode načrtovanja eksperimentov ob zadostnem številu poskusov omogoča postavitev modela, ki dobro predvidi parametre barve. Preverili smo, ali sta modela uporabna tudi v obratni smeri, torej za napovedovanje sestave barvil iz podatkov o ciljni barvi. Izmerili smo barvo referenčnih tablet, postavljeni model pa je na podlagi rezultata meritve napovedal optimalno sestavo barvil za doseganje ciljne barve FOT. Poleg postavitve in ovrednotenja modelov smo preverili tudi hipoteze, ki se navezujejo na uporabnost modelov. Med drugim smo preverili ponovljivost filmskega oblaganja z vidika barve FOT, vplive spremenjenega reliefa površine tabletnih jeder in različne obarvanosti tabletnega jedra na barvo FOT. Ugotavljali smo vpliv zamenjave polimera v sestavi filmske obloge na njeno obarvanost. Da bi zagotovili časovno učinkovit proces oblaganja, smo preverili, kako se barva FOT spreminja in kakšna je enakomernost barve serije tablet med procesom filmskega oblaganja.

Grega Bajc, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: **Klemen Korasa**, Krka, d. d., Novo mesto

Development of Colourants Selection Model in Film Coating for Achieving Targeted Colour of Film-Coated Tablets

Colour is a very important characteristic of film-coated tablets. It ensures easier recognition, harder forgery and often leads to better patient compliance. The desired colouring of a film-coated tablet is achieved by using an abundance of pigments. In our master's thesis, we studied the preparation of film coatings of different colours using various pigments, i.e. red, yellow and black iron oxide, and indigo carmine. By using the design of experiments methodology, two models were set up for colour parameter prediction in the CIEL*a*b* colour space. By building these models, it was successfully shown that the design of experiments methodology can be used to predict colour parameters, providing the number of experiments is large enough. Additionally, the models were tested for their use in reverse fashion as well, meaning for predicting pigment composition from data of a certain targeted colour. The colour of reference tablets was measured and the designed model was then used to predict the optimal composition of pigments to achieve the desired colour of film-coated tablets. Further, additional hypotheses that relate to the usefulness of these models were tested. For example, the reproducibility of film coating in terms of colour, the impact of changes in the surface of tablet cores, and various colouring of the tablet core on the colour of film-coated tablets. The impact on the colour of film-coated tablets when switching the polymer was also checked. To optimise the process of film coating time-wise, it was additionally tested how the colour of the tablets and the evenness of colouring changes during the process of film coating.

Nina Zupan, Faculty of Pharmacy, University of Lille
Mentor: **Ilija German Ilić**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Susanne Muschert**, Faculty of Pharmacy, University of Lille

Mehko tabletiranje *Bifidobacterium longum*: Presejalna študija vpliva različnih polnil in veziv

Zanimanje za proizvodnjo peroralnih farmacevtskih oblik s probiotičnimi kulturami se v farmacevtski industriji povečuje. Tablete so farmacevtska oblika prve izbire, saj bolniki pri zdravljenju najbolj sodelujejo. V naši raziskavi smo tablete izdelali s procesom direktnega stiskanja polnil, veziv, drsil in 10 % bakterije *Bifidobacterium longum*. Tablete smo stiskali na tabletirki Styl One Nano. Za dobro procesibilnost mora imeti zmes predvsem dobre pretočne lastnosti in dobro stisljivost. Zaradi občutljivosti bakterij za inaktivacijo med procesom stiskanja smo uporabili t. i. mehko tabletiranje. Manjša mehanska obremenitev vodi do višje stopnje preživetja oziroma živosti bakterij. Izziv je bil ugotoviti najustreznejšo kombinacijo polnil in veziv za direktno stiskanje probiotikov. Ovrednotili smo njihove pretočne lastnosti, stisljivost (tabletabilnost oz. natezno trdnost od tlaka stiskanja in kompresibilnost oz. poroznost od tlaka stiskanja, oboje znotrajmatrično) in lastnosti tablet (trdnost in razpadni čas). S študijo tabletabilnosti smo dokazali, da so imele snovi s poudarjeno plastično deformacijo (mikrokristalna celuloza /brez silicija in s silicijem/, sorbitol) najboljše tabletabilne lastnosti. Ob dodatku veziva hidroksipropilceluloze se je tabletabilnost še izboljšala, medtem ko se je ob dodatku probiotikov nekoliko zmanjšala, vendar ne bistveno. Na izbranih najboljših formulacijah smo preizkus živosti probiotičnih bakterij izvedli z dvema metodama – s štetjem bakterij na agarški plošči in s pretočno citometrijo, ki je bolj kompleksna. Z izbiro dveh metod smo ocenili učinkovitost mehkega tabletiranja.

Nina Zupan, Faculty of Pharmacy, University of Lille
Supervisor: **Ilija German Ilić**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Susanne Muschert**, Faculty of Pharmacy, University of Lille

Soft Tableting of *Bifidobacterium Longum*: A Screening Study of Various Filler and Binder Influences

The pharmaceutical industry's interest in oral probiotics is growing. Tablets are the dosage form of choice that represents the highest level of adherence to treatments. They are convenient for patients, and the drug dosing is accurate. In the study, tablets were produced by direct compression using various fillers/binders, lubricant, and 10% of *Bifidobacterium longum* with the Styl One Nano tableting press. We wanted to achieve excellent powder flowability and compaction properties of the powder blend for good manufacturing properties. Bacteria are highly sensitive to inactivation during the process. Soft tableting was chosen as an approach to reduce mechanical stress during production, which is expected to lead to higher bacterial viability. The challenge was to determine the suitable combination of fillers and binders for the direct compression of probiotics. We evaluated flowability, compaction (tabletability by tensile strength versus compaction pressure profiles, and compressibility by the Heckel profile based on yield pressure, both in-die) and tablet properties (hardness and disintegration time). Tabletability studies demonstrated that excipients with dominant plastic deformation (microcrystalline cellulose (silicified and non-silicified), sorbitol) exhibited the best tabletability properties. Furthermore, increasing binder hydroxypropyl cellulose concentration induced better tabletability, while probiotics reduced it a little, but not significantly. For the selected most promising formulations, bacterial viability was determined with two different methods (plate counting and flow cytometry). Both methods were used to evaluate the efficacy of the soft tableting approach.

Teo Mlinšek, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Katarina Trebušak Podkrajšek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Marija Holcar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Analiza majhnih nekodirajočih RNA iz urinskih zunajceličnih veziklov pri Fabryjevi bolezni

Fabryjeva bolezen (FB) je redka bolezen, pri kateri pride do kopičenja glikosfingolipidov v različnih celicah. Fabryjeva nefropatija pomembno prispeva k zgodnji obolevnosti in umrljivosti bolnikov s FB. Trenutni biološki označevalci so pozni pokazatelji ledvične okvare, prav tako ne omogočajo napovedi hitrosti napredovanja bolezni. Urinski zunajcelični vezikli (uZV) so se pri pogostejših ledvičnih boleznih pokazali kot možen zgodnji označevalec ledvične okvare. Pri bolnikih s FB uZV še niso bili raziskovani. Zato smo želeli preveriti, ali se koncentracija in velikost uZV ter raven petih vezikularnih mikroRNA (miRNA), ki so bile predhodno povezane s patološkimi procesi v ledvicah, razlikujejo med bolniki s Fabryjevo nefropatijo ali brez nje, ter kako napredovanje bolezni vpliva na značilnosti uZV in miRNA v njih. V retrospektivno raziskavo smo vključili 20 bolnikov s FB, ki smo jih razdelili v dve kohorti glede na prisotnost nefropatije. Za vsakega bolnika smo analizirali do tri kronološke vzorce, odvzete na rutinskih pregledih v zadnjih desetih letih v razmaku petih let. Naša raziskava je prva, ki se je osredotočila na uZV pri bolnikih s FB. Ugotovili smo, da se lastnosti uZV med bolniki z nefropatijo in brez nje tudi kronološko statistično značilno ne razlikujejo. Med napredovanjem bolezni pa se statistično značilno spremeni raven nekaterih miRNA, izoliranih iz uZV, kar bo osnova za nadaljnje raziskave na tem področju.

Teo Mlinšek, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: **Katarina Trebušak Podkrajšek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Marija Holcar**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Analysis of Small Non-Coding RNAs from Urinary Extracellular Vesicles in Fabry Disease

The Fabry disease (FD) is a rare disorder in which there is an accumulation of glycosphingolipids in various cells of the body. Fabry nephropathy contributes significantly to the morbidity and mortality of patients with FD. Current biomarkers lack sensitivity in detecting early renal injury and do not predict the progression of nephropathy. Urinary extracellular vesicles (uEV) have been shown to be a promising biomarker of early renal impairment in various kidney diseases, but currently, there are no data on uEV in FD. Therefore, we aimed to investigate whether the size and concentration of uEV and the levels of five vesicular microRNAs (miRNAs) previously associated with kidney disease are statistically different in patients with and without Fabry nephropathy, and how FD progression affects the size and concentration of uEV and their miRNA cargo. Our retrospective study was conducted on 20 patients who have been further divided into two cohorts according to the presence or absence of Fabry nephropathy. Up to three chronological samples for each patient were collected approximately five years apart over a ten-year period at regular follow-up visits. Our study was the first to focus on uEV in patients with FD. We found no differences in the characteristics of uEV either in patients with or without Fabry nephropathy or in chronological samples. We found differences in the levels of some vesicular miRNAs in chronological samples, which could serve as a basis for further research in this field.

Tanja Zupan, Institut Jožef Stefan

Mentorica: **Jerica Sabotič**, Institut Jožef Stefan

Somentor: **Gregor Gunčar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Vpliv kokaprina in makrocipina na biofilm listerij

Listeria monocytogenes je po Gramu pozitivna patogena bakterija, ki povzroča listeriozo. Pri delu smo uporabili sorodno nepatogeno vrsto *Listeria innocua*, ki se pogosto uporablja kot modelni organizem za *L. monocytogenes*. Bakterije rastejo v obliki biofilma, ki jim omogoča rast na različnih površinah in ima pomembno vlogo pri njihovem preživetju v okolju. Biofilmi listerije so v literaturi običajno opisani kot monoslojni, med delom pa smo opazili, da tvori tudi dvo- in večslojne strukture, podobne piramidam. Proteini iz gob so razmeroma neraziskana skupina proteinov z edinstvenimi lastnostmi. Izstopajo inhibitorji peptidaz in lektini, med katerimi sta tudi kokaprin in makrocipin. V bakterijskem ekspresijskem sistemu smo pripravili rekombinantne proteine Mcp1, KKP1 in štiri mutante KKP1 (N22R, D47R, FH32EE, G13E). Z merjenjem inhibitorne aktivnosti za encim papain smo potrdili inhibitorno aktivnost makrocipina, z encimoma papain in pepsin pa smo preverili inhibitorno aktivnost za KKP1 in njegove mutante. Med njimi je izstopal mutant N22R, pri katerem smo uspešno spremenili reaktivno mesto za inhibicijo papaina. Preverili smo vpliv izoliranih proteinov iz gob na biofilm bakterije *L. innocua*, za kar smo predhodno uspešno pripravili bakterije, ki so izražale različne reporterske proteine, od katerih se je najbolj izkazal DsRED Express. S preverjanjem, ali izbrani proteini iz gob vplivajo na razvoj biofilma bakterije *L. innocua*, smo ugotovili, da tako kokaprin kot makrocipin povzročita zmanjšano adhezijo bakterij na substrat. Opazili smo tudi viden učinek kokaprina na razbijanje statičnega biofilma in učinek makrocipina na razbijanje dinamičnega biofilma.

Tanja Zupan, Jožef Stefan Institute

Supervisor: **Jerica Sabotič**, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: **Gregor Gunčar**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Effect of Cocaprin and Macrocyprin on *Listeria* Biofilm

Listeria monocytogenes is a Gram-positive pathogenic bacterium that causes listeriosis. We used the related non-pathogenic species *Listeria innocua*, which is often used as a model organism for *L. monocytogenes*. Bacteria grow in the form of a biofilm that can resist different types of stress and plays an important role in their survival in the environment. *Listeria* biofilms are usually described as monolayers in literature. In our work, we observed that they also form bilayer and multilayer pyramid-like structures. Fungal proteins represent a relatively unexplored group of proteins with unique properties. These include peptidase inhibitors and lectins, including cocaprin and macrocyprin. The recombinant proteins Mcp1, KKP1 and four KKP1 mutants (N22R, D47R, FH32EE, G13E) were produced in a bacterial expression system. By measuring the inhibitory activity for the enzyme papain, we confirmed the activity for macrocyprin, and using the enzymes papain and pepsin, we analysed the inhibitory activity of KKP1 and its mutants. Among them, the mutant N22R stood out, in which we successfully changed the reactive site for papain inhibition. This suggests that cocaprin has separate sites for inhibition of cysteine and aspartic peptidases. We investigated the effect of isolated fungal proteins on the biofilm of *L. innocua*, for which we had previously successfully produced bacteria expressing different reporter proteins, of which DsRED Express proved to be the best. When investigating whether selected fungal proteins affect *L. innocua* biofilm development, we found that both cocaprin and macrocyprin caused decreased adhesion of bacteria to the substrate. However, we also observed a visible effect of cocaprin on the degradation of static biofilms and the effect of macrocyprin on the degradation of dynamic biofilms.



Nina Hrvatič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Mirjam Gosenca Matjaž**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Mercedes Vitek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Razvoj in vrednotenje liotropnih tekočih kristalov na osnovi konopljinega ali lanenega olja

Atopijski dermatitis je najpogostejša kronična vnetna bolezen kože, ki predstavlja velik terapevtski izziv. Z raziskovalnim delom, ki temelji na razvoju inovativnih dostavnih sistemov na osnovi liotropnih tekočih kristalov z vgrajenim betametazondipropionatom, smo želeli prispevati k učinkovitejšemu zdravljenju te bolezni. Na začetku smo s sistematičnim načrtovanjem izbrali komplementarne sestavine, ki podpirajo in obnavljajo barierne lastnosti atopične kože. Za lipidno fazo smo uporabili konopljino ali laneno olje, ki vsebujeta veliko esencialnih maščobnih kislin s protivnetnim in negovalnim delovanjem. Emulgatorska faza je bila sestavljena iz biokompatibilnih površinsko aktivnih snovi, ki spodbujajo nastanek lamelarnih tekočih kristalov, in sicer iz lecitina v kombinaciji s Tween 80 ali Montanov 68. Hidrofilno fazo je predstavljala prečiščena voda. Z izdelavo psevdotrikomponentnih faznih diagramov in s polarizacijsko mikroskopijo smo potrdili nastanek lamelarnih tekočih kristalov za obe olji. Mikrostruktura se je po vgradnji zdravilne učinkovine ohranila, pri vzorcih Tween 80 pa se vgradnja odraža v spremenjenih vrednostih viskoznosti in dinamičnih modulov. S polarizacijsko mikroskopijo smo potrdili, da se mikrostruktura ohranja tudi pri višjih temperaturah, pri določenih vzorcih pa smo zaznali temperaturno odvisne spremembe viskoznosti. Zaključili smo, da so na novo razviti liotropni tekoči kristali primerni za vgradnjo betametazondipropionata in predstavljajo izjemno obetaven dostavni sistem za sodobno zdravljenje atopijskega dermatitisa.

Nina Hrvatič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Mirjam Gosenca Matjaž**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Mercedes Vitek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Development and Characterisation of Hempseed or Flaxseed Oil-Based Lyotropic Liquid Crystals

Atopic dermatitis is the most common chronic inflammatory skin disease that represents a prominent therapeutic challenge. The aim of our research was to improve the treatment of this disease by developing innovative drug delivery systems based on lyotropic liquid crystals with incorporated betamethasone dipropionate. Through systematic design we initially selected complementary ingredients that support and restore the barrier function of atopic skin. Hemp or flaxseed oil was chosen as the lipid phase due to its high content of essential fatty acids with anti-inflammatory and nourishing activity. The emulsifier phase consisted of biocompatible surfactants that promote the formation of lamellar liquid crystals, namely lecithin in combination with Tween 80 or Montanov 68. Purified water was chosen as the hydrophilic phase. By phase diagram construction and polarisation microscopy formation of lamellar liquid crystals was confirmed for both oils. In case of drug-loaded samples the microstructure was preserved, whereas altered viscosity and dynamic modules were observed within rheological analysis in case of samples with Tween 80. The microstructure was maintained even at higher temperatures as confirmed by polarisation microscopy, while temperature-dependent changes in viscosity were detected for specific samples. To conclude, the newly developed lyotropic liquid crystals are suitable for the incorporation of betamethasone dipropionate and represent a very promising drug delivery system for modern treatment of atopic dermatitis.

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

Sinteza novih fluorescentnih molekul na osnovi naftalena

V magistrskem delu smo se ukvarjali s pripravo novih »pametnih« molekularskih sond, ki bi lahko bile uporabljene za zgodnje odkrivanje Alzheimerjeve bolezni. Spojine smo zasnovali tako, da so ustrezale »push-pull« arhitekturi – gre za π -sistem, ki je na eni strani zaključen z elektrondonorsko skupino in na drugi strani z elektronakceptorsko skupino, vmes pa je konjugiran π -sistem (D- π -A). Da bi omogočili čim hitrejšo in enostavnejšo spreminjanje elektrondonorskega dela molekule, smo se ukvarjali tudi z optimizacijo reakcijskih pogojev za s paladijem katalizirano tvorbo vezi C-N v zadnjem koraku sinteze. S proučevanjem reakcijskih pogojev na modelni reakciji smo pokazali, da je aminiranje v zadnjem koraku mogoče kljub prisotnosti 4-metil-2-okso-2H-piran-3-karbonitrilne skupine, in reakcijo uspešno izvedli še z uporabo dimetilamina. Pripravljene produkte smo okarakterizirali z ^1H in ^{13}C NMR ter IR-spektroskopijo, masno spektrometrijo visoke ločljivosti in meritvijo tališča ter čistost določili s HPLC-analizo. Za izbrane spojine smo posneli optične lastnosti in določili absorpcijske, emisijske in ekscitacijske maksimume ter za dane molekule izračunali molarne absorptivnosti in kvantne izkoristke. Partnerji pri projektu so na izbranih spojinah že naredili preliminarne *in vitro* ter *ex vivo* biološke teste, ki so dali zelo spodbudne rezultate.

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

Synthesis of Novel Naphthalene-Based Fluorescent Molecules

In this thesis, we focused on the preparation of new smart molecular probes that could be used in early detection of Alzheimer's disease. Compounds were designed based on the 'push-pull' architecture – this is a conjugated π -system (D- π -A) that is end-capped with an electron-donating group on one side and with an electron-accepting group on the other side. To allow for a fast and straightforward diversification of the electron-donating part of the molecule, we also worked on developing optimised reaction conditions for a palladium catalysed late-stage C-N coupling. With methodical screening of the reaction conditions in a model reaction, we showed that amination in the last step is possible despite the presence of 4-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile group, and also demonstrated this transformation using dimethylamine as an amine source. We characterised synthesised compounds with a ^1H and ^{13}C NMR and IR spectroscopy, high-resolution mass spectrometry, recorded their melting point and determined their purity with HPLC analysis. In addition, we recorded optical properties of chosen compounds and determined their absorption, emission and excitation maximums. For those compounds, we also calculated their molar absorptivity and quantum yields. Partners on the project performed preliminary *in vitro* and *ex vivo* biological tests using selected compounds, which gave very promising results.

Ana Medic, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Lovro Žiberna**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Irena Zajc**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vpliv izbranih učinkovin na uravnavanje energijske presnove človeškega endotelija

Endotelijske celice v krvnih žilah so prve celice v organizmu, ki pridejo v stik z zdravilom po intravenski aplikaciji. Celice v mirujočem stanju zadostijo energijskim potrebam prek glikolitične poti. V času stresa oziroma patološkega stanja se potrebe po energiji povečajo, kar spodbudi večji obseg oksidativne fosforilacije. Pri tem nastane oksidativni stres, ki je eden ključnih dejavnikov tveganja za razvoj endotelijske disfunkcije. Uravnavanje energijske presnove ima zato velik potencial v terapiji preprečevanja srčno-žilnih bolezni. V raziskovalni nalogi smo preverili vpliv izbranih učinkovin iz štirih različnih skupin – neopioidnih analgetikov (paracetamol, ibuprofen, acetilsalicilna kislina), antipsihotikov (haloperidol, flufenazin, risperidon), antidepresivov (citalopram, amitriptilin, fluoksetin) – in učinkovin z delovanjem na žilno steno (adrenalin, N- ω -nitro arginin, acetilholin, sildenafil) na energijsko presnovo človeške endotelijske celične linije Ea.hy926 v fizioloških in acidoznih pogojih. Uporabili smo koncentracije v zgornjem terapevtskem oziroma spodnjem toksičnem območju. Analizator zunajceličnega pretoka Agilent Seahorse XFe24 nam je omogočil spremljanje hitrosti zunajcelične acidifikacije (glikolize) in hitrosti porabe kisika (mitohondrijskega dihanja) v realnem času. Vzporedno z določanjem energijskega fenotipa endotelija smo z metodo redukcije resazurina v enakih eksperimentalnih pogojih preverili tudi viabilnost celic. Raziskava je pokazala vpliv paracetamola in ibuprofena na mitohondrije ter povezavo med regulatorji dušikovega oksida (N- ω -nitro arginina in acetilholina) in glikolizo. Ostale učinkovine niso vplivale na energijsko presnovo endotelijskih celic in niso bile mitotoksične.

Ana Medic, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Lovro Žiberna**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Irena Zajc**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Effect of Selected Substances on Modulation of Energy Metabolism in Human Endothelium

Endothelial cells in blood vessels are the first cells that come in direct contact with a drug after intravenous application. When cells are in a quiescent state, they fulfil their energy demands through glycolysis. The pathologic changes in endothelium lead to increased energy demands through oxidative phosphorylation. Mitochondrial respiration leads to oxidative stress, which is known to be the principal risk factor for the development of endothelial dysfunction. Therefore, the modulation of endothelial energy metabolism has potential in preventing cardiovascular disease. Here we studied the effect of substances from four different groups: non-opioid analgesics (paracetamol, ibuprofen, acetylsalicylic acid), antipsychotics (haloperidol, fluphenazine, risperidone), antidepressants (citalopram, amitriptyline, fluoxetine) and substances with effect on the vessel wall (adrenaline, N- ω -nitro arginine, acetylcholine, sildenafil) on the energy metabolism in human endothelial cell line Ea.hy926 under physiological and acidic conditions. We used concentrations in the upper therapeutic or lower toxic range. The extracellular flux analyser Agilent Seahorse XFe24 enabled us to observe the extracellular acidification rate (glycolysis) and the oxygen consumption rate (mitochondrial respiration) in real time. In parallel, we tested the cell viability under the same experimental conditions with a resazurin reduction assay. We observed the effect of paracetamol and ibuprofen on mitochondria and a correlation between nitric oxide regulators (N- ω -nitro arginine and acetylcholine) and glycolysis. The other tested substances did not affect the endothelial energy metabolism of endothelial cells and were not mitotoxic.

Nina Ravbar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Univerzitetna klinika Golnik
Mentorica: **Lea Knez**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Univerzitetna klinika Golnik

Ocena možnosti zmanjšanja intenzivnosti zdravljenja z zaviralci protonske črpalke in ovrednotenje njihovih potencialnih interakcij pri bolnikih na Univerzitetni kliniki Golnik

Zdravljenje z zaviralci protonske črpalke (ZPČ) pogosto ni skladno s smernicami, saj se velikokrat uporabljajo brez veljavne indikacije in dlje, kot je priporočeno. Nepotrebna uporaba predstavlja stroškovno obremenitev ter tveganje za dolgotrajne neželene učinke in potencialne interakcije z zdravili. Namen raziskave je bil opisati značilnosti zdravljenja z ZPČ-ji, oceniti možnosti zmanjšanja intenzivnosti zdravljenja in s strokovnim panelom ovrednotiti klinično pomembnost interakcij med ZPČ-ji in ostalimi zdravili. Podatke o bolnikih smo pridobili iz bolnišničnega informacijskega sistema in zgodovine zdravljenja z zdravili. Interakcije med zdravili smo iskali s podatkovnimi zbirkami interakcij (Drugs.com, Lexicomp), njihovo klinično pomembnost pa smo ocenili s strokovnim panelom kliničnih farmacevtov. Pri večini bolnikov (74 %) zdravljenje ni bilo skladno s smernicami. Pri 60 % bolnikov bi lahko intenzivnost zdravljenja zmanjšali bodisi z ukinitvijo (38 %) ali zmanjšanjem odmerka (22 %). Pri 86 % bolnikov smo zaznali vsaj eno interakcijo, mediana števila zaznanih interakcij pri eni osebi je znašala 2. Skupno smo pri bolnikih odkrili 76 različnih interakcij. Strokovni panel je 3 ocenil kot zelo pomembne, to so interakcije med klopidogrelom in esomeprazolom/omeprazolom ter rifampicinom in omeprazolom. ZPČ-je jemlje veliko bolnikov, pri več kot polovici bolnikov je možno zmanjšanje intenzivnosti zdravljenja. Interakcije z ZPČ-ji so pogoste, vendar le redko klinično pomembne.

Nina Ravbar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana; University Clinic Golnik
Supervisor: **Lea Knez**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, University Clinic Golnik

Assessing the Possibility of Deprescribing Proton Pump Inhibitors and Evaluating Their Potential Interactions in Patients at the University Clinic Golnik

Proton pump inhibitors (PPIs) use is often outside treatment guidelines, i.e. without a valid indication and for longer than recommended. Unnecessary use represents a financial burden, a risk of long-term side effects, and potential drug interactions. Our study aimed to describe the characteristics of treatment with PPIs, assess the possibilities of deprescribing, and evaluate clinically important drug interactions with PPIs. Patient data were obtained from the hospital information system and patient medication history. Drug interactions were searched for in drug interaction databases (Drugs.com, Lexicomp), and their clinical significance was assessed by an expert panel of clinical pharmacists. In most patients (74%) treatment was not in line with the guidelines, allowing for drug deprescribing in 60% of patients by either discontinuation (38%) or dose reduction (22%). At least one interaction was detected in 86% of patients, with a median of two interactions per patient. Overall, 76 different interactions were detected, and three were identified by the expert panel as clinically very important. These were the interactions between clopidogrel and esomeprazole/omeprazole, and rifampicin and omeprazole. Many patients are prescribed PPIs, and drug deprescribing is possible in over half of these patients. Drug interactions with PPIs are common, however, only rarely clinically important.



Rok Herman, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Mojca Jensterle Sever**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Biokemične in klinične značilnosti bolnikov z akromegalijo ter njihov vpliv na z zdravjem povezano kakovost življenja

Namen presečne raziskave z 72 bolniki je bil oceniti uporabnost točkovnika urejenosti bolezni SAGIT in vprašalnika o kakovosti življenja AcroQoL, ki predstavljata dve novi orodji za standardizirano celostno obravnavo akromegalije. Retrospektivno smo po standardiziranem točkovniku SAGIT zajeli podatke o značilnostih akromegalije ob postavitvi diagnoze. Na podlagi dokumentacije zadnjega kontrolnega pregleda smo ponovno opredelili rezultat točkovnika SAGIT in bolnike povabili k izpolnitvi vprašalnika AcroQoL. Rezultati točkovnika SAGIT so se od diagnoze do zadnjega pregleda signifikantno poslabšali. Točkovnik SAGIT ob diagnozi ni bil zmožen razlikovati med biokemično urejenostjo bolezni ob zadnjem pregledu, medtem ko so skupni rezultat ter podenoti »G« in »I« ob zadnjem pregledu diskriminirali glede na kategorijo urejenosti bolezni. Ob zadnjem pregledu je median rezultat vprašalnika AcroQoL znašal 69,3, ni pa razlikoval med kategorijami biokemične urejenosti bolezni. Podenoti »S« in »A« točkovnika SAGIT sta ob diagnozi in zadnjem pregledu statistično značilno negativno korelirali z vsemi kategorijami vprašalnika AcroQoL. Od specifičnih elementov podenot »S« in »A« pa so na rezultat vprašalnika AcroQoL signifikantno vplivali otekanje mehkih tkiv, težave s sklepi, glavobol, spalna apneja in arterijska hipertenzija. Z raziskavo smo potrdili komplementarnost obeh orodij in prepoznali nove potencialne cilje zdravljenja, katerih obravnavo bi lahko izboljšala kakovost življenja bolnikov z akromegalijo.

Rok Herman, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: **Mojca Jensterle Sever**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Biochemical and Clinical Characteristics of Patients with Acromegaly and Their Impact on Health-Related Quality of Life

The aim of our cross-sectional study with 72 patients was to evaluate clinical applicability of the SAGIT Instrument and Acromegaly Quality of Life questionnaire (AcroQoL), which present two new tools for the management of acromegaly. We retrospectively determined the SAGIT score at the time of diagnosis. Based on the data from the most recent follow-up, we determined the patients' current SAGIT score and assessed their quality of life by AcroQoL. All SAGIT subscores significantly dropped from baseline to follow-up. SAGIT at baseline did not discriminate the current disease control status, whereas the follow-up global score and its subscores 'G' and 'I' distinguished between the current disease control status. At follow-up, the median global AcroQoL score for our cohort was 69.3 and was not able to discriminate the current disease control status. At baseline and follow-up, there were statistically significant negative correlations between SAGIT subscores 'S' and 'A' and all AcroQoL subscales. From specific SAGIT elements, the presence of swelling, joint symptoms, headaches, sleep apnea, and hypertension significantly affected the global AcroQoL result. Our results emphasised the complementary nature of patient- and clinician-reported outcome tools in assessing disease control status and identified an expanded set of treatment goals that could help clinicians improve the impaired quality of life in this population.

Špela Bizjak, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Žiga Jakopin**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Samo Guzelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Farmakokinetična in farmakodinamična optimizacija dezmuramilpeptidnih agonistov receptorja prirojene imunosti NOD2

Imunske celice prepoznajo s patogeni povezane molekulske vzorce prek receptorjev za prepoznavo vzorcev, kamor spada tudi receptor NOD2. Ob vezavi agonista na NOD2 se sproži aktivacija prirojenega in pridobljenega imunskega odziva, zaradi česar imajo agonisti NOD2 potencialno klinično uporabnost kot adjuvansi v cepivih. V magistrski nalogi smo raziskovali kemijski prostor okoli spojin vodnic SG8 in SG29, ki imata na tripeptid Gly-L-Val-D-Glu vezano *trans*-ferulično kislino. Sprva smo se lotili farmakodinamične optimizacije SG8, pri čemer smo L-Val zamenjali z večjimi in hidrofobnejšimi aminokislinami, *trans*-ferulično kislino pa smo nadomestili z derivati cimetine kisline, substituiranimi na mestih 3 in 4, ter z rigidiziranimi heterocikli. Nato smo spojini vodnici podvrgli še farmakokinetični optimizaciji, tako da smo prek uvedbe ciklopentilnih estrov in adamantana pripravili predzdravila. Učinek vseh uvedenih sprememb smo biološko ovrednotili na celicah HEK-Blue hNOD2. Pri derivatih, katerih centralno aminokislino smo zamenjali z večjimi aminokislinami, smo zaznali signifikanten upad aktivnosti. Podoben trend je bil prisoten tudi ob posnemanju *trans*-ferulične kisline z vpeljavo bioizosterov. Med derivati z vgrajeno cimetano kislino so se bolje izkazali 3-substituirani kot 4-substituirani analogi, aktivnost pa je bila močno odvisna od velikosti uvedenih substituentov. Farmakokinetična optimizacija SG8 z vpeljavo adamantana je privedla do spojine 41, ki je kar 20-krat močnejši agonist NOD2 od SG8 in z vrednostjo $EC_{50} = 4,5$ nM predstavlja najmočnejši sintetični dezmuramilpeptidni agonist NOD2 do sedaj.

Špela Bizjak, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Žiga Jakopin**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Samo Guzelj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Optimisation of Desmuramylpeptide Agonists of Innate Immune Receptor NOD2

Immune cells recognise pathogen-associated molecular patterns via pattern recognition receptors, including the NOD2 receptor. Binding the agonist to NOD2 triggers the activation of both innate and specific immune responses, making NOD2 agonists clinically useful as potential adjuvants in vaccines. In the master's thesis, we investigated the chemical space around hit compounds SG8 and SG29, which consist of tripeptide Gly-L-Val-D-Glu bound to *trans*-ferulic acid. First, pharmacodynamic optimisation of SG8 was performed in which L-Val was replaced with larger and more hydrophobic amino acids, and *trans*-ferulic acid with either cinnamic acid derivatives substituted at positions 3 and 4 or with rigid heterocycles. Then, the lead compounds were subjected to pharmacokinetic optimisation by preparing prodrugs through the introduction of cyclopentyl ester and adamantane moieties into the parent molecules. The effects of all introduced changes were biologically evaluated in HEK-Blue hNOD2 cells. A significant decrease in activity was observed for derivatives in which central amino acid was replaced by larger amino acids. A similar trend was also observed when *trans*-ferulic acid was replaced with bioisosteres. Among the derivatives incorporating cinnamic acid, 3-substituted analogues showed higher activity than 4-substituted analogues. Moreover, the activity largely depended on the size of incorporated functional groups. Pharmacokinetic optimisation of SG8 with the introduction of adamantane led to compound 41 ($EC_{50} = 4.5$ nM), which is 20-fold more potent than SG8, thus making it the most potent synthetic desmuramylpeptide NOD2 agonist to date.



Eva Rajh, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentorica: **Mojca Benčina**, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: **Gregor Gunčar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Optimizacija RT-LAMP za detekcijo SARS-CoV-2 v slini

Množično testiranje populacije je ključno za ustavitev širjenja pandemije kovida-19. Zaradi preprostosti uporabe, hitrosti in konstantne temperature reakcije je metoda obratne transkripcije in z zankami posredovanega pomnoževanja (RT-LAMP) zanimiva alternativa klasičnemu testiranju RT-qPCR. Slina je v primerjavi z nosno-žrelnimi vzorci preprostejša za odvzem in neinvazivna. Cilj raziskave je bil oblikovati diagnostično metodo na osnovi kolorimetričnega RT-LAMP za hitro detekcijo SARS-CoV-2 s prostim očesom v vzorcu sline brez izolacije virusne RNA. Optimizirali smo sestavo vzorčnega pufra, reakcijske pogoje enostopenjske reakcije RT-LAMP ter določili analitično občutljivost in specifičnost metode. Z metodo RT-LAMP smo na tarčni regiji N2 dosegli analitično občutljivost 615 molekul RNA/ μ L vzorca in 97,5-odstotno analitično specifičnost. Ko smo metodo RT-LAMP preizkusili s testiranjem vzorcev sline, zbranih na kovidni vstopni točki, smo dosegli 61-odstotno občutljivost in 89-odstotno specifičnost. Z metodo RT-qPCR smo na istih vzorcih sline dosegli 95-odstotno občutljivost in 100-odstotno specifičnost. Ugotovili smo, da je slina, shranjena v virusnem stabilizacijskem puftru, ki smo ga razvili, tudi brez izolacije virusne RNA primerna za detekcijo virusne RNA z metodo RT-qPCR, metoda RT-LAMP pa je za množično testiranje premalo občutljiva.

Eva Rajh, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Supervisor: **Mojca Benčina**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Co-supervisor: **Gregor Gunčar**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Optimisation of RT-LAMP for Detection of SARS-CoV-2 in Human Saliva

Mass population testing is key to preventing the spread of COVID-19 pandemic. Due to ease of use, speed, cost-effectiveness, and constant reaction temperature, reverse transcription and loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) is an interesting alternative to classical RT-qPCR testing. Collection of saliva is easy and non-invasive. The aim of this study was to design a diagnostic method based on colorimetric RT-LAMP for rapid detection of SARS-CoV-2 in saliva samples without prior isolation of viral RNA. We optimised the composition of the sample buffer, conditions for one-step colorimetric RT-LAMP reaction, and determined analytical sensitivity and specificity. RT-LAMP method targeting region N2 of SARS-CoV-2 genome was used to achieve analytical sensitivity of 615 molecules/ μ l of the sample and an analytical specificity of 97.5%. When the RT-LAMP method was tested on saliva samples collected at the COVID entry point, we achieved 61% sensitivity and 89% specificity. With the RT-qPCR method, we achieved 95% sensitivity and 100% specificity on the same set of saliva samples. We found that saliva is suitable for viral RNA detection even without viral RNA isolation with RT-qPCR if stored in the viral stabilisation buffer we developed, but the RT-LAMP method is not sensitive enough for reliable mass testing.

Maja Mavri, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Tihomir Tomašič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Sommentor: **Jaka Dernovšek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Sinteza 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnih zaviralcev C-končne domene proteina toplotnega šoka 90

Protein toplotnega šoka 90 (Hsp90) je eden od najpomembnejših molekularnih šaperonov, ki pomaga ohranjati proteostazo. Omogoča pravilno zvijanje in aktivacijo več kot 400 proteinov, med katerimi so tudi številni onkoproteini, ki so vključeni v kancerogenezo. Zato je Hsp90 postal potencialna tarča v razvoju protirakavih učinkovin. V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali potencialne C-končne zaviralce Hsp90 s 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnim skeletom. Osredotočili smo se na optimizacijoaminskega dela spojin, vezanega na mesto 2 osnovnega skeleta, kamor smo uvedli substituentne različnih dolžin in velikosti. Sintetizirane spojine smo glede na konfiguracijo stereogenega centra na mestu 6 ločili v dve knjižnici in na podlagi rezultatov bioloških testiranj ugotovili, da kiralnost spojin na mestu 6 osnovnega skeleta ne vpliva bistveno na delovanje. Potrdili smo pomembnost razdalje med aromatskim obročem in kationskim centrom, saj je bila pri aktivnih spojinah veriga ogljikovih atomov med amidno in amino skupino dolga več kot dva atoma. Obenem se je pokazalo, da je zelo pomembna tudi usmerjenost kationskega centra v vezavnem žepu. Dodani ciklopropilni obroč na ogljikovem atomu poleg amidne skupine in rigidizacija povezovalne verige ogljikovih atomov sta namreč oslabila delovanje spojin, saj sta kationski center usmerila na manj ugoden položaj. Naše ugotovitve lahko pomembno pripomorejo k razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnih zaviralcev C-končne domene Hsp90.

Maja Mavri, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Tihomir Tomašič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Jaka Dernovšek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Synthesis of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzothiazole-Based Heat Shock Protein 90 C-Terminal Domain Inhibitors

The 90-kDa heat shock protein (Hsp90) is one of the most important molecular chaperones involved in proteostasis regulation. It is involved in the folding and activation of more than 400 proteins, including many oncoproteins that play crucial roles in carcinogenesis. Therefore, Hsp90 has emerged as a promising target for cancer therapy. In this master's thesis we synthesised potential 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazole-based Hsp90 C-terminal domain inhibitors. Our main focus was optimisation of the amine-bearing moiety attached to position 2, where we introduced substituents of different lengths and sizes. The designed pairs of analogous compounds were divided into two libraries with different configurations of the stereocentre on position 6. With the collected results we were able to conclude that the chirality of compounds on position 6 does not significantly affect the activity of Hsp90 inhibitors. We confirmed the importance of the distance between the aromatic ring and the cationic centre, since a chain of carbon atoms between an amide and an amine group was more than two atoms long in all active compounds. At the same time, orientation of the cationic centre in the binding site of Hsp90 has also proven to be very important. The addition of the cyclopropyl ring to the carbon atom next to the amide group and rigidisation of the carbon atoms' chain weakened compounds' activity due to the orientation of the cationic centre to a less favourable position. Overall, our new findings contribute to a better understanding of structure-activity relationship of the 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazole-based heat shock protein 90 C-terminal domain inhibitors.



Ana Gorenc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Uroš Grošelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Uporaba pirolon vsebujočih substratov v organokataliziranih reakcijah

V sklopu magistrskega dela sem proučevala asimetrične pretvorbe derivatov pirolinona. Enantioselektivno sintezo sem dosegla z uporabo kiralnih nekovalentnih bifunkcionalnih organokatalizatorjev. Moje delo je obsegalo pripravo knjižnice racemnih produktov, s katerimi sem določila pogoje ločitve enantiomerov na kiralni HPLC-koloni, ter enantiomerno obogatenih produktov, ki sem jim določila enantiomerni presežek. Sprva sem izvedla [4+2] anulacijo *N*-nesubstituiranih ariliden- Δ^2 -pirolin-4-onov z malononitrilom, rezultat katere so enantiomerno obogateni derivati dihidropirano[3,2-*b*]pirola. Pri določanju enantiomernega presežka pretvorbe s kiralno HPLC-kolono sem naletela na veliko dejavnikov, ki močno vplivajo na njegovo natančno določitev. V drugem delu sem kot izhodne substrate organokataliziranih pretvorb uporabila derivate tetramskih kislin. Z 1,4-adicijo tetramskih kislin na derivate *trans*- β -nitrostirena sem s tvorbo vezi C–C ustvarila kiralni center. Sintetizirala sem manjšo knjižnico aduktov tetramskih kislin in derivatov *trans*- β -nitrostirena, na katerih sem izvedla *O*-alkiliranje. Na izbrani neracemni *N*-Gly-Boc substituirani tetramski kislini sem izvedla serijo naknadnih pretvorb. S strategijo ortogonalne zaščite in peptidne kemije sem sintetizirala makrociklični produkt, ki vsebuje skelet pirolin-2-ona.

Ana Gorenc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Uroš Grošelj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Application of Pyrrolone Involving Substrates in Organocatalysed Reactions

In this master's thesis, the research was focused on the application of pyrrolinone derivatives in asymmetric transformations. Enantioselective synthesis was achieved with the application of chiral noncovalent bifunctional organocatalysts. This work covers the preparation of a library of racemic compounds that were used for the optimisation of chiral HPLC method for the separation of enantiomers and subsequently for the determination of enantiomeric excess of the corresponding enantiomerically enriched compounds. In the first part, [4+2] annulation of *N*-unsubstituted arylidene- Δ^2 -pyrrolin-4-ones with malononitrile were examined, which resulted in nonracemic dihydropyrano[3,2-*b*]pyrrole derivatives. The determination of enantiomeric excess of chiral nonracemic compounds, done by chiral HPLC method, was accompanied with numerous factors that must be considered to be able to obtain accurate enantioselectivity results. In the following part of the research, tetramic acid derivatives were applied in organocatalysed reactions. 1,4-addition of tetramic acids to *trans*- β -nitrostyrene derivatives resulted in a chiral centre formation as a new C–C bond was formed. A small library of *O*-alkylated adducts of tetramic acids and *trans*- β -nitrostyrene derivatives was synthesised. A chiral nonracemic *N*-Gly-Boc substituted tetramic acid derivative was used for the selected follow-up modifications. With the implementation of orthogonal protection and peptide chemistry, macrocyclic product containing pyrrolin-2-one heterocycle was synthesised.

Mišel Hozjan, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Uroš Grošelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Uporaba tetramskih kislin kot izhodnih substratov v organokataliziranih pretvorbah

Izvedel sem organokatalizirano asimetrično reakcijo Michaelove adicije iz *N*-Boc-glicina pridobljene tetramske kisline na različne derivate *trans*- β -nitrostirena. Produkta adicije sem alkiliral z različnimi alkilnimi sredstvi, predvsem pa z benzil bromidom. Reakcije so potekle enantioselektivno (% *ee* od 81 do 94). Uspešno sem asimetrično adiral tudi iz *N*-Boc-glicilglicilglicina pridobljeno tetramsko kislino na *trans*- β -nitrostiren. Po alkiliranju z benzil bromidom sem produktu določil 59 % *ee*. Izbranim produktom sem odstranil zaščitno skupino Boc in jih poskusil kristalizirati, da bi pridobil monokristale. Z elektrofilnim fluoriranjem sem fluor vnesel v derivat tetramske kisline. S pripravljenim karboksilnim derivatom tetramske kisline sem z aktivacijo *in situ* in dodatkom aminokisline tvoril amid. Tetramsko kislino sem poskusil asimetrično adirati na benziliden malononitril v prisotnosti organokatalizatorja, vendar mi je uspelo pridobiti le racemni produkt.

Mišel Hozjan, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Uroš Grošelj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Use of Tetramic Acids as Starting Substrates in Organocatalysed Conversions

In this paper, organocatalysed asymmetric Michael addition involving *N*-Boc derived tetramic acid and different *trans*- β -nitrostyrene derivatives was carried out. The addition products were alkylated with different alkylating agents, mostly benzyl bromide. Reactions were enantioselective (% *ee* from 81 to 94). Tetramic acid prepared from *N*-Boc-glycylglycylglycine was also successfully asymmetrically added to *trans*- β -nitrostyrene. After alkylating the product with benzyl bromide, the enantioselectivity was determined to be 59%. For selected products, the Boc protecting group was removed and crystallisation was attempted to obtain monocrystals. With electrophilic fluorination, fluorine was introduced into the tetramic acid derivative. An amide was synthesised from the carboxylic acid derivative of tetramic acid using *in situ* activation and addition of amino acid. An asymmetric addition of tetramic acid to benzylidene-malononitrile catalysed by organocatalyst was also undertaken, but it only resulted in a racemic product.



Kristina Matić, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Bojana Bogovič Matijašič**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Sommentor: **Robert Roškar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Izraba odpadne kisle sirotke za gojenje propionibakterij, ki proizvajajo vitamin B₁₂

Osiromašeno kisló sirotko z manjšim deležem proteinov smo uporabili za gojenje *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* van Niel 1928, ki proizvaja vitamin B₁₂. Za boljšo rast in večjo proizvodnjo vitamina smo dodali 2,5 % (m/v) kvasnega ekstrakta, CoCl₂ ter 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBMZ), ki je nujno potreben za sintezo liganda vitamina B₁₂. Procese smo izvedli v manjšem laboratorijskem merilu (v 10-mililitrskih centrifugirkah) in v bioreaktorju (1 L in 2,5 L). V manjšem laboratorijskem merilu smo našli optimalne pogoje za rast propionibakterij, ki smo jih prenesli v večje merilo, v bioreaktor. Ugotovili smo, da sta tako uravnavanje vrednosti pH kot obogatitev gojišča izjemno pomembna za uspešno proizvodnjo vitamina B₁₂. Ugotovili smo tudi, da je za uspešno proizvodnjo vitamina B₁₂ bolje, če sev pred inokulacijo gojimo dva dni v komercialnem gojišču RCM. Propionibakterije med procesom porabljajo laktozo in mlečno kislino, pri tem pa nastaja vitamin B₁₂. Dokazali smo, da je obogatena kisló sirotka ustrezno gojišče za propionibakterije, ki proizvajajo vitamin B₁₂.

Kristina Matić, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: **Bojana Bogovič Matijašič**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Robert Roškar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Use of Waste Acid Whey for Cultivation of Propionibacteria that Produce Vitamin B₁₂

We used partially deproteinised acid whey to culture *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* van Niel 1928, which is known to produce vitamin B₁₂. To stimulate the growth of propionibacterium, we added 2.5% of yeast extract, CoCl₂ and DMBMZ which is crucial for the synthesis of the lower ligand in vitamin B₁₂. We performed the experiment at the smaller level in a laboratory and after that, we carried out the process in 1-L and 2.5-L bioreactors. At the beginning of the experiment, we found optimal conditions for the growth of propionibacteria, which were then used for the bioprocess in bioreactors. We found that pH regulation is crucial for successful production of vitamin B₁₂ as well as the enrichment of acid whey. For successful production of vitamin B₁₂ we had to pre-cultivate the strain in a commercial medium RCM for two days before inoculation. During the process, the propionibacteria uses lactose and lactic acid to produce vitamin B₁₂. We proved that enriched acid whey is a suitable medium for propionibacteria that produce vitamin B₁₂.

Suzana Kralj, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Anja Klančnik**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Primerjava adhezinov med patogenimi bakterijami rodu *Salmonella*, *Escherichia* in *Campylobacter*

Adhezini so beljakovinske površinske strukture bakterij, ki se specifično vežejo na receptorje gostiteljske celice in na pritrjevalne površine. Najpogostejši receptorji oz. tarčne molekule so različni glikoproteini in saharidni ostanki na površini celic gostitelja. Namen raziskave je primerjava različnih najpogostejših adhezinov patogenih bakterij rodu *Salmonella*, *Escherichia* in *Campylobacter*. Med njimi so najpogostejši fimbrijski adhezini, ki so ključni za ireverzibilno pritrnitev na površino. Bakterije rodu *Campylobacter* nimajo fimbrij oz. jih pri njih še niso odkrili, zato primerjava ni bila mogoča. Podobnosti z bakterijskimi adhezini pa smo ugotovili pri vezavi na tarčne molekule, kot so fibronektin, laminin in manzoza. Na podlagi te ugotovitve lahko sklepamo, da predstavlja mehanizem vezave adhezinov novo potencialno strategijo nadzora nad patogenimi bakterijami, saj lahko tarčne molekule zamenjamo z različnimi učinkovinami. Poleg tega smo ugotovili, da imajo vsi trije rodovi bakterij izraženo flagelo, ki pripomore k adheziji na površino. Adhezini tako predstavljajo specifičen odtis vsakega rodu bakterij.

Suzana Kralj, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: **Anja Klančnik**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Comparison of Adhesins between Pathogenic Bacteria *Salmonella*, *Escherichia* and *Campylobacter*

Adhesins are protein cell surface components or appendages of bacteria that enable adhesion to host cell receptors and adhesion surfaces. The most common targets (receptors) are various glycoproteins and sugar residues such as the mannose receptor. The aim of this work was to compare different adhesins between pathogenic bacteria *Salmonella*, *Escherichia* and *Campylobacter*. Fimbrial adhesins are the most abundant and play a major role in irreversible adhesion to the surface. Bacteria of the genus *Campylobacter* do not have fimbriae (they have not yet been discovered) so the comparison between them was not possible. The similarity between adhesins that adhere to target molecules such as fibronectin, laminin and mannose was discovered. We concluded that adhesins represent a new potential control strategy to interfere with pathogenic bacteria. The target molecules can be replaced by different substances. Furthermore, we discovered that all mentioned bacteria have an expressed flagella, which contributes to adhesion. All adhesins represent a specific expression of individual bacteria.

Martin Rihtaršič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jernej Iskra**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Z natrijevim nitritom katalizirano aerobno oksidativno jodiranje aromatskih spojin

Jodirane aromatske spojine imajo v organski sintezi pomembno vlogo kot intermediati za tvorbo vezi ogljik-ogljik in ogljik-heteroatom, še posebej v kovinsko kataliziranih reakcijah križnega spajanja in v pripravi organokovinskih reagentov. Preferenčni sintezni pristop k tem spojinam je oksidativno jodiranje, ki je cenejše, varnejše in za okolje manj škodljivo od elektrofilnega jodiranja, saj omogoča 100-odstotno atomsko ekonomičnost joda. Uporaba molekularnega I_2 v reakcijah jodiranja zahteva aktivacijo z oksidantom ali kislino. Za oksidativno jodiranje sta posebno privlačna okoljsko sprejemljiva oksidanta H_2O_2 in O_2 . Dodatna aktivacija prek tvorbe hipervalentnega jodirnega reagenta s tema oksidantoma je zahtevna. Obetavni metodi oksidativnega jodiranja izkoriščata sinergijo sistemov $I_2/H_2O_2/HCl$ oz. $I_2/O_2/HCl/NaNO_2$ s templatno katalizo v fluoriranih alkoholih. Razvili smo metodo aerobnega oksidativnega jodiranja arenov z I_2 kot jodirnim reagentom, kisikom kot zunanjim oksidantom in dušikovimi oksidi kot katalizatorji. HCl smo zamenjali z žveplovo kislino in tako dosegli potek reakcije v klasičnih polarnih topilih, s čimer smo odpravili potrebo po uporabi fluoriranih topil.

Martin Rihtaršič, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Jernej Iskra**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Aerobic Oxidative Iodination of Aromatic Molecules Catalysed with Sodium Nitrite

Iodinated aromatic compounds are invaluable in organic synthesis as intermediates for carbon-carbon and carbon-heteroatom bond formation, specifically in transition metal-catalysed cross-coupling reactions and in preparation of organometallic reagents. The preferred synthetic approach for these compounds is oxidative iodination, which is cheaper, safer, and more environmentally friendly compared to electrophilic iodination, as it enables 100% iodine atom economy. The use of molecular I_2 in iodination reactions proves to be difficult and requires activation by an oxidant or an acid. Two environmentally acceptable oxidants are especially compelling for oxidative iodination, namely H_2O_2 and O_2 . Additional activation by generating a hypervalent iodination reagent is difficult with these two oxidants. A synergy was observed when systems $I_2/H_2O_2/HCl$ and $I_2/O_2/HCl/NaNO_2$ were combined with template catalysis by fluorinated alcohols, creating two methods for oxidative iodination of arenes. In our work, we present a method for aerobic oxidative iodination of arenes using I_2 as iodinating agent, oxygen as external oxidant, and nitrogen oxides as catalysts. By replacing HCl with sulfuric acid, the reaction can also proceed in classical polar solvents, thus eliminating the need for fluorinated solvents.

Kristina Žagar, Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin, Jesenice
Mentorica: **Katja Pesjak**, Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin, Jesenice
Somentorica: **Saša Kadivec**, Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin, Jesenice

Pomen komunikacije v podjetju za občutek večje varnosti med zaposlenimi med epidemijo Covid-19 – študija primera ene organizacije

Kriza zaradi covid-19 vpliva na tržno vrednost in prodajo podjetij ter spreminja njihovo organizacijsko strukturo in notranje procese. V tem okviru morajo podjetja redefinirati tudi svojo notranjo komunikacijsko strategijo. V kriznih časih je ustrezna interna komunikacija v podjetjih zelo pomembna. Cilj magistrskega dela je bil raziskati uspešnost internega komuniciranja v podjetju X med epidemijo covid-19 (marec in april 2020). Ugotovili smo, da se je kakovostnejša interna komunikacija odražala v večjem občutku varnosti pred okužbo z virusom SARS-CoV-2 na delovnem mestu, da je bil pogostejši osebni stik vodje z zaposlenimi povezan z večjim občutkom varnosti pred okužbo in da več, kot so imeli zaposleni na voljo internih virov informacij, bolj so zaupali, da je malo verjetno, da bi se lahko na delovnem mestu okužili. Dokazali smo, da večji, kot je stres, manjši je občutek varnosti pred okužbo z virusom SARS-CoV-2 na delovnem mestu. Kot pomembna se je pokazala tudi iracionalna komponenta interne komunikacije. Podjetju smo predlagali, da se v drugem valu osredotoči prav na to komponento.

Kristina Žagar, Angela Boškin Faculty of Health, Jesenice
Supervisor: **Katja Pesjak**, Angela Boškin Faculty of Health, Jesenice
Co-supervisor: **Saša Kadivec**, Angela Boškin Faculty of Health, Jesenice

Importance of Company Communication for Employees to Feel More Safe in Time of COVID-19 Epidemic – Case Study of One Organisation

The COVID-19 crisis is affecting market value and sales of companies as well as changing their organisational structure and internal processes. Companies had to redefine their internal communication strategies because proper internal communication is critical for coping with any crisis successfully. This paper aims to analyse how successfully internal communication was conducted in company X during the COVID-19 epidemic (March/April 2020). We found that better internal communication was reflected in a greater sense of security against SARS-CoV-2 infection in the workplace, that more frequent personal contact of managers with employees was associated with a greater sense of security against infection and that the more employees had available internal sources of information, the more they trusted that they were unlikely to become infected in the workplace. The survey proved that higher levels of stress are associated with a lower sense of security regarding the risk of contracting COVID-19 at the workplace. The irrational component of internal communication was shown to be significant. As a result, this component was suggested to be used as the main starting point during the next wave of the epidemic.

Barbara Makovec, Rok Sušnik, Gimnazija Vič
Mentorica: **Eva Šajn**, Gimnazija Vič
Sommentor: **Jure Mravlje**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vpliv različnih načinov izpostavitve hladni kisikovi plazmi na dekontaminacijo in kalitev semen tatarske ajde

Glive pogosto kontaminirajo semena kmetijskih rastlin in povzročajo rastlinska obolenja ali pa izločajo mikotoksine, kar ogrozi uporabo semen za sejanje, hrano ali krmo. V naši raziskavi smo proučevali vpliv hladne plazme (HP) na kaljivost semen in glivne združbe na semenih tatarske ajde ter primerjali učinke neposredne in posredne izpostavitve semen plazmi. HP smo proizvedli z induktivnim sklopljenim radiofrekvenčnim napajalnikom s frekvenco 27,12 MHz ter plinom kisika (O_2) pri delovnem tlaku 50 Pa in delovni moči 700 W. Parametri so bili pri vseh obdelavah enaki, spreminjala sta se le način in čas izpostavitve semen plazmi. Ugotovili smo, da je obdelava semen s HP v vseh primerih negativno vplivala na kaljivost. Po identifikaciji z molekularnimi metodami smo primerjali številčnost in raznolikost gliv na s plazmo obdelanih semenih in klasično steriliziranih semenih (s 30-odstotnim vodikovim peroksidom, H_2O_2). Najvišja raven dekontaminacije je bila dosežena pri 30- in 60-sekundni neposredni izpostavitvi. Ugotovili smo, da je neposredna izpostavitve učinkovitejša kot posredna, a se pri njej močno zmanjša kaljivost. Kljub temu so nekatere vrste gliv ostale tudi po najdaljši obdelavi s HP. Naši rezultati so pokazali, da bi bila obdelava semen s HP primerna pri semenih za uporabo v prehranski industriji in za shranjevanje, ne pa pri semenih, namenjenih za sejanje. Menimo, da so za določitev optimalnih parametrov obdelave semen tatarske ajde s HP potrebne nadaljnje raziskave.

Barbara Makovec, Rok Sušnik, Gimnazija Vič Grammar School
Supervisor: **Eva Šajn**, Gimnazija Vič Grammar School
Co-supervisor: **Jure Mravlje**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Effects of Different Modes of Exposure to Cold Oxygen Plasma on the Decontamination and Germination of Tartary Buckwheat Seeds

Crop seeds are often contaminated with fungi, which can compromise the use of seeds for sowing, food, or feed via plant disease or the production of mycotoxins. In our study, we investigated the effects of cold plasma (CP) on seed germination and fungal contamination of Tartary buckwheat seeds. We also compared the effects of direct and indirect exposure of seeds to CP. The plasma was generated by an inductively coupled radio frequency power supply with a frequency of 27.12 MHz, the gas used was oxygen (O_2) at an operating pressure of 50 Pa and an operating power of 700 W. These parameters remained the same across all treatments with only the duration and mode of exposure being changed. We found that CP treatment negatively affected seed germination. After identification with molecular methods, the frequency and diversity of fungal species were compared between different CP treatments and chemically sterilised (30% H_2O_2) seeds. The highest levels of decontamination were achieved with direct 30- and 60-second CP treatments. Direct CP exposure was much more effective at decontaminating the seeds compared to indirect exposure; however, it also greatly reduced seed germination. Nevertheless, some species of fungi proved to be more resistant to CP treatment. Our results indicate that CP may be used in the decontamination of seeds meant for postharvest and food production, but not for further sowing. More research is needed to determine the optimal parameters of CP treatment for Tartary buckwheat seeds.

Tjaša Karas, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Somentorici: **Darija Cör Andrejč**, **Maša Knez Marevci**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Artemisia annua L. proti covidu-19 – efekti artemisinina in njegovih derivatovh

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, s katerim topilom, po kateri ekstrakcijski metodi in iz katerega dela rastline lahko pridobimo največ preiskovane učinkovine, ovrednotiti njen delež v sladkem pelinu in ugotoviti, ali bi z dobljenimi izvlečki lahko zdravili oziroma vsaj olajšali simptome covid-19. Za pridobivanje izvlečkov artemisinina iz sladkega pelina (*Artemisia annua L.*) smo uporabili štiri različne ekstrakcijske metode: dve konvencionalni (hladna maceracija in ekstrakcija po Soxhletu) in dve nekonvencionalni (ekstrakcija z ultrazvokom in ekstrakcija s superkričnim CO₂). Pri konvencionalnih metodah smo uporabili tri topila: etil acetat, petroleter in etanol. Pri ekstrakciji z ultrazvokom smo uporabili le etil acetat in petroleter. Ekstrakcije smo izvedli na dveh frakcijah rastline: na cvetovih in na večjih delih, predvsem na steblih. Vsebnost artemisinina v 18 vzorcih smo na koncu analizirali še s HPLC.

Tjaša Karas, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer Grammar School
Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer Grammar School
Co-supervisors: **Darija Cör Andrejč**, **Maša Knez Marevci**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

Artemisia Annua L. against COVID-19: Effects of Artemisinin and Its Derivatives

The aim of the research paper was to determine which solvent with which extraction method and from which part of the plant can be used to obtain the largest amounts of active ingredients. Another objective was to evaluate the share of this solvent in sweet wormwood and whether the obtained extracts could cure or at least improve symptoms of COVID-19. Four different extraction methods were used to obtain artemisinin extracts from sweet wormwood (*A. annua L.*): two conventional methods (cold maceration and Soxhlet extraction) and two unconventional methods (ultrasonic extraction and supercritical CO₂ extraction). Three different solvents were used in the conventional methods: ethyl acetate, petrol ether and ethanol, while only ethyl acetate and petrol ether were used in ultrasonic extraction. Extractions were performed on two fractions of the plant: flowers separately from other parts of the plant (mostly stems). Artemisin content of 18 samples was then analysed with the HPLC method.

Lea Ažbe, Gimnazija Kranj
Mentor: **Rok Rudež**, Gimnazija Kranj

Skupna vsebnost polifenolov in antioksidativna kapaciteta temnih čokolad z različno vsebnostjo kakava

V zadnjih letih je temna čokolada zaradi številnih diet postala »zdrava« alternativa mlečni čokoladi. Za razliko od mlečne vsebuje večjo količino kakovitih zrn, ki so bogat vir polifenolov. Zaradi njih kakav in kakoviti izdelki delujejo kot antioksidanti, ki odstranjujejo reaktivne snovi in nas s tem varujejo pred škodljivimi vplivi. Cilj raziskovalne naloge je bil raziskati skupno vsebnost polifenolov in antioksidativno kapaciteto v temni čokoladi z različnimi odstotki kakava (66 %, 77 % in 88 %). Skupno vsebnost polifenolov sem merila z absorbanco svetlobe v spektrofotometru pri valovni dolžini 765 nm, antioksidativno kapaciteto pa z absorbanco svetlobe v spektrofotometru pri valovni dolžini 517 nm. Za meritve skupne vsebnosti polifenolov sem uporabljala FC-reagent, za meritve antioksidativne kapacitete pa DPPH-reagent. Na podlagi grafov absorbanco vzorcev in galne kisline sem izračunala TPC (skupno vsebnost polifenolov) in EC_{50} (polovično učinkovito koncentracijo) ter pripravila grafe, ki predstavljajo medsebojno odvisnost EC_{50} in TPC. Rezultati so pokazali, da ima čokolada z večjim odstotkom kakava večjo antioksidativno kapaciteto in skupno vsebnost polifenolov. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so čokolade z večjo vsebnostjo kakava zaradi polifenolov koristnejše za zdravje. Dodatno se je pokazalo, da sta skupna vsebnost polifenolov in antioksidativna kapaciteta medsebojno odvisni.

Lea Ažbe, Gimnazija Kranj Grammar School
Supervisor: **Rok Rudež**, Gimnazija Kranj Grammar School

Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Dark Chocolates with Different Percentage of Cocoa

Dark chocolate has become, with the recent increase in the number of diets, a 'healthier' alternative to milk chocolate. Dark chocolate has, compared to milk chocolate, more cocoa beans in it, which are a rich source of polyphenols. Because of polyphenols, cocoa and its products act as antioxidants, which eliminate reactive substances and protect us against harmful effects of reactive substances. The aim of this study was to investigate total phenolic content and antioxidant capacity in dark chocolates with different percentage of cocoa (66%, 77%, and 88%). Total phenolic content was measured spectrophotometrically with absorbance values at 765 nm, and antioxidant capacity was measured spectrophotometrically with absorbance values at 517 nm. We used FC reagent for the measurement of total phenolic content and DPPH reagent for the measurement of antioxidant capacity. We used raw data graphs and graph of gallic acid to calculate TPC (total phenolic content) and EC_{50} (efficient concentration value), and drew graphs that show the correlation between EC_{50} and TPC. Our results have shown that chocolates with higher percentage of cocoa have higher antioxidant capacity as well as higher total phenolic content, from which we can deduce that chocolates with higher percentage of cocoa used in this experiment are more beneficial for health than chocolates with lower percentage of cocoa. Furthermore, total phenolic content and antioxidant capacity have a correlational relationship.

Matija Derganc, Jakob Golubić, Gimnazija Vič
Mentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič
Mentor: **Tihomir Tomašič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Novi zaviralci proteina toplotnega šoka 90 za zdravljenje raka

Rak je drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu. Metode zdravljenja so povezane s številnimi neželenimi učinki, zato je ključen razvoj novih učinkovin za tarčno zdravljenje. Protein toplotnega šoka 90 ali stresni protein 90 (Hsp90) je šaperon, ki je v precejšnji meri odgovoren za neregulirano celično rast in posledično za rakava obolenja. Razvili so že veliko različnih zaviralcev Hsp90 in nekatere vrednotili tudi v kliničnih testiranjih. Obstaja več načinov za zaviranje Hsp90, posvetili pa smo se razvoju zaviralcev C-končne domene, ki v nasprotju z do sedaj najbolj raziskanimi zaviralci N-končne domene ne sprožijo toplotnega šoka. Z različnimi pristopi molekulskega modeliranja smo najprej ustvarili knjižnico potencialnih zaviralcev na osnovi spojine TZS-36, ki je že znan zaviralec Hsp90. Nato smo celotno knjižnico z različnimi programi za molekulsko sidranje sidrali na C-končno domeno Hsp90. Po pregledu rezultatov sidranja smo pripravili preglednico najbolje ocenjenih zaviralcev in jih sintetizirali v laboratoriju. Nato smo jih testirali na različnih rakavih celičnih linijah. Nekateri (TMM-7, TSF-15) so pokazali obetavne rezultate in veliko izboljšanje v primerjavi z začetno spojino TZS-36.

Matija Derganc, Jakob Golubić, Gimnazija Vič Grammar School
Supervisor: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič Grammar School
Supervisor: **Tihomir Tomašič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

New Heat Shock Protein 90 Inhibitors for the Treatment of Cancer

Cancer is one of the leading causes of death in the world, and current treatments are associated with many unwanted side effects. Hsp90 is a chaperone that is highly responsible for unregulated cell growth and thus cancer. Many different Hsp90 inhibitors have been developed, and some have already made it into clinical trials. There are several ways to inhibit Hsp90. We focused on inhibiting the C-terminal domain of Hsp90, which has several advantages over the traditional targeting of the N-terminal domain. By using different molecular modelling approaches, we began creating a library of potential ligands based on the compound TZS-36, which showed inhibition of Hsp90 and antiproliferative activity. We then examined the binding of the entire library to the C-terminal domain of Hsp90 using various molecular docking programs. We generated a table of the highest scoring ligands and synthesised them in the laboratory. They were then tested in several cancer cell lines, and some of them (TMM-7, TSF-15) showed promising anticancer results and improvements over the parent compound.

Tim Šinko, II. gimnazija Maribor

Mentorica: **Nina Kacjan Maršič**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorici: **Vesna Hojnik**, **Anita Mustač**, II. gimnazija Maribor

Količina in kakovost pridelka vrtné solate (*Lactuca sativa* L.), pridelane na hidroponski in talni način v jesenskem času

Hidroponika je način pridelave zelenjadnic, ki se na tržišču vedno bolj uveljavlja. Zaradi novosti in nepoznavanja tega načina se pri mnogih pojavljajo dvomi. Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti smiselnost pomislekov glede hidroponskega načina pridelave, kar smo dosegli tako, da smo ga primerjali s talnima načinoma (po smernicah že ustaljene integrirane metode pridelave zelenjadnic). Merili smo dinamiko mase in premera rozet, vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofila a in b), nitratnega dušika in nekaterih antioksidantov (vitamina C in karotenoidov) v vzorcih solate (*Lactuca sativa* L.).

Tim Šinko, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Nina Kacjan Maršič**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisors: **Vesna Hojnik**, **Anita Mustač**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Yield Quantity and Quality of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) Grown Hydroponically and in Soil in Autumn

Hydroponics is a way of growing vegetables that is gaining ground on the market. The novelty and unfamiliarity of this method has led many to have doubts. The aim of the research was to determine the validity of the concerns raised about the hydroponic method, which was achieved by comparing it with soil-based methods (following the guidelines of the already established integrated method of vegetable production). We measured the dynamics of weight and diameter of rosettes, the content of photosynthetic pigments (chlorophyll a and b), nitrate nitrogen and some antioxidants (vitamin C and carotenoids) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) samples.

Rea Doria Bergant, Tea Vovko, Gimnazija Novo mesto
Mentorica: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto
Somentorica: **Katarina Sluga Zupančič**, Gimnazija Novo mesto

Veganstvo in vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ je najbolj kompleksen v vodi topni vitamin. Sestavlja ga molekula kobalamina, ki jo lahko najdemo v različnih oblikah. Naravni obliki sta metilkobalamin in adenzilkobalamin, večinoma sintetični pa hidroskobalamin in cianokobalamin. Ko beseda nanese na vitamin B₁₂, skoraj takoj pomislimo na vegane, ki jih je v populaciji vedno več, kar kaže, da veganstvo postaja vse bolj priljubljeno. Ker je prehrana, predvsem njena sestava, velik del našega življenja, sva se odločili, da s to raziskovalno nalogo v ospredje postaviva vprašanje uravnoveženosti veganske prehrane, ki se ji prehranska dopolnila dodajajo ali pa tudi ne. Ugotovili sva, da se vitamin B₁₂, ki je esencialen za pravilno delovanje človeškega telesa, nahaja le v hrani živalskega izvora, kar naju je pripeljalo do ugotovitve, da vegani brez primernih prehranskih dopolnil ne morejo živeti popolnoma zdravo. Poleg analize nekaterih prehranskih dopolnil sva raziskali tudi slovenski trg in ugotovili, da so vrednosti, zapisane na embalaži, lahko nenatančne, da navedeni priporočeni dnevni odmerki (PDO) ne sledijo uradnim priporočilom in da kupec, ki ob nakupu zahteva certifikat o kakovosti izdelka, tega večinoma ne more dobiti niti na vpogled.

Rea Doria Bergant, Tea Vovko, Gimnazija Novo mesto Grammar School
Supervisor: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto Grammar School
Co-supervisor: **Katarina Sluga Zupančič**, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Veganism and Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ is a complex vitamin soluble in water. It consists of cobalamin, a molecule found in different forms. These are methylcobalamin, adenosylcobalamin (natural forms), hydroxocobalamin, and cyanocobalamin (synthetic form). Vitamin B₁₂ is often associated with vegans. Their number in general population is gradually increasing, which shows that veganism is becoming more popular in today's society. Human diet and its composition make up a large part of our lives; therefore, we decided to address in our research paper the question of the actual balance of vegan diet, in which specific food supplements can be used or not. We found out that vitamin B₁₂, which is essential for correct functioning of the human body, can only be extracted from animal-based foods. This led us to the conclusion that vegans cannot lead a healthy lifestyle without proper food supplements. We analysed some food supplements and researched the Slovenian market. We found out that values on certain packets can be misleading or inaccurately measured, that the specified daily intake does not follow the official recommendations, and that buyers often cannot obtain food quality certificates even if they request them.

Julija Skrt, Jaša Krevh, Gimnazija Vič

Mentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

Mentorica: **Mihaela Skrt**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Ilja Gasan Osojnik Črnivec**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vpliv hidrolitičnih encimov na antioksidativno učinkovitost oljčnih listov

Oljčni listi so naravni in poceni vir fenolnih spojin (FS), ki so zaradi antioksidativne učinkovitosti (AU) potencialno koristne za človeško telo. Naš cilj je bil raziskati hitro, ugodno in za okolje manj škodljivo metodo ekstrakcije FS iz oljčnih listov z dodatkom mešanice hidrolitičnih encimov (HE), s katero bi pridobili znatno količino FS iz oljčnih listov. Učinek ekstrakcijskih metod smo določili z analizo skupne vsebnosti FS s Folin-Ciocalteuovo metodo in z analizo AU z DPPH-reagentom. Te rezultate smo primerjali z rezultati kontinuirne simulacije prebavnega sistema *in vitro*. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo določili vsebnost oleuropeina in hidroksitirozola v vodnih ekstraktih iz listov istrske belice. Naši rezultati so pokazali, da je mešanica HE, uporabljena v raziskavi, povečala učinkovitost ekstrakcije ter zmanjšala skupno vsebnost FS in AU ne glede na sorto oljke, letni čas obiranja listov in njihovo starost. Encimi so zmanjšali vsebnost oleuropeina in povečali vsebnost hidroksitirozola.

Julija Skrt, Jaša Krevh, Gimnazija Vič Grammar School

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

Supervisor: **Mihaela Skrt**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Supervisor: **Ilja Gasan Osojnik Črnivec**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Impact of Hydrolytic Enzymes on Antioxidant Activity of Olive Leaves

Olive leaves are a natural and low-price source of phenolic compounds (PC), which are potentially beneficial for human health due to their antioxidant activity (AA). Our aim was to research a fast, low-cost and environmentally friendly extraction technique for PC in olive leaves with the addition of a mixture of hydrolytic enzymes (HE) to obtain a substantial amount of PC from olive leaves. The effect of these extraction techniques was evaluated with the total phenolic content, determined with the Folin-Ciocalteu method, and AA, analysed with DPPH reagent. These results were compared with the results from the continuous *in vitro* simulation of the digestive system. We analysed the content of oleuropein and hydroxytyrosol in water extracts of Istrska belica olive variety using HPLC. Our results showed that the mixture of HE used in this study increased extraction efficiency, lowered the total phenolic content and AA regardless of the variety, time of collection and leaf age. HE lowered the content of oleuropein and increased the content of hydroxytyrosol.

Vid Bauman, Il. gimnazija Maribor

Mentorica: **Katja Andrina Kravanja**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,
Univerza v Mariboru

Mentorica: **Darja Kravanja**, Il. gimnazija Maribor

Antioksidativni in antimikrobni učinek ekstraktov olupka granatnega jabolka

Namen raziskovalne naloge je bil z različnimi konvencionalnimi in nekonvencionalnimi ekstrakcijskimi metodami iz olupka granatnega jabolka ekstrahirati snovi z antioksidativnimi in antimikrobnimi lastnostmi, jih analizirati in ugotoviti, ali bi bili pridobljeni ekstrakti zaradi vsebnosti fenolnih spojin lahko uporabni kot alternativa sintetičnim zdravilom. S tremi ekstrakcijskimi metodami (ekstrakcija po Soxhletu, ultrazvočna ekstrakcija in hladna maceracija) ter tremi različnimi topili smo pripravili devet ekstraktov in jih analizirali s spektrofotometričnimi metodami (DPPH, totalni fenoli in proantocianidini). Ugotovili smo, da je v ekstraktih veliko proantocianidinov in da imajo snovi močne antioksidativne učinke. Antimikrobni učinek smo merili z difuzijsko metodo z diski. Analize so pokazale protimikrobno učinkovitost proti po Gramu pozitivnim bakterijam (*Bacillus cereus*).

Vid Bauman, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Katja Andrina Kravanja**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering,
University of Maribor

Supervisor: **Darja Kravanja**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Antioxidant and Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel Extracts

The aim of this research was to extract substances with antioxidant and antimicrobial properties from pomegranate peels using various conventional and unconventional extraction methods, analyse the extracts obtained, and determine whether they can be used as an alternative to synthetic drugs in medicine, as they are an excellent source of phenolic compounds. Nine extracts were prepared using three extraction methods (Soxhlet, ultrasonic extraction, and cold maceration) and three different solvents. The extracts were analysed by spectrophotometric methods (DPPH, determination of total phenols and proanthocyanidins). We found a high content of proanthocyanidins and determined a strong antioxidant effect of substances in the extracts. Antimicrobial activity was measured by the disc diffusion method. The results showed successful antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*).



Emma Švarc, Zoja Gobec, Il. gimnazija Maribor

Mentor: **Jure Škraban**, Il. gimnazija Maribor

Somentorici: **Tadeja Vajdič, Janja Trček**, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru

Vrstna pestrost očetnokislinskih bakterij v kombučih

Naš cilj je bil raziskati pestrost in vrstno sestavo očetnokislinskih bakterij (OKB) v kombučih podjetja BeLife. Na podlagi že opravljenih raziskav, ki opisujejo številne mikroorganizme v kombučih, smo pričakovali veliko pestrost OKB. Vzorce kombučih podjetja BeLife smo cepili na gojiščih RAE in MYP in jih precepljali do pridobitve čistih kultur. Izbrali smo 6 izolatov, ki smo jih identificirali z barvanjem po Gramu in analizo medgenetskih regij 16S–23S rDNA in ITS1–5.8 rDNA–ITS2. Po sekvencioniranju smo ugotovili, da je izolat ZE1016 kvasovka *Pichia membranifaciens*, izolat ZE6055 je OKB vrste *Acetobacter okinawensis*, pri preostalih izolatih pa je nejasna uvrstitev med OKB rodu *Acetobacter*, in sicer med vrstama *Acetobacter lovaniensis* in *Acetobacter ghanensis*. Izdelali smo tudi filogenetsko drevo. Pri raziskovanju nismo našli nobene neopisane vrste, potrdili pa smo, da je v kombučih veliko mikroorganizmov, tako kvasovk kot OKB. Zaradi pridobitve čistih izoliranih kultur ta raziskava predstavlja odlično izhodišče za raziskovanje vodotopnih polisaharidov, saj smo pri nekaterih izolatih opazili povečano viskoznost gojišč. Tako lahko morda govorimo o producentih levana ali acetana ali acetanu podobnih heteropolisaharidov, za katere predvidevamo, da so primerni za raznoliko (bio)tehnološko uporabo.

Emma Švarc, Zoja Gobec, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Jure Škraban**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisors: **Tadeja Vajdič, Janja Trček**, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor

Diversity of Acetic Acid Bacteria in Kombucha

In this research paper we examined the diversity of acetic acid bacteria (AAB) in kombucha. According to existing research it appears that kombucha has a high variety of microorganisms. Hence we expected to find large AAB species diversity in our research. We acquired kombucha samples from a local brewery BeLife in Kamnik, Slovenia. We took the samples and began the fission process by transferring the samples onto two different growth mediums, RAE and MYP. We continued the fission of cultures on new mediums until pure cultures were obtained. We chose six cultures and identified them by using Gram staining and the analysis of the intergenic regions 16S–23S rDNA and ITS1–5.8 rDNA–ITS2. Based on the sequencing result, we identified ZE1016 as the species of yeast *Pichia membranifaciens* and ZE6055 as the acetic acid bacteria *Acetobacter okinawensis*. For the remaining four cultures, there was an unclear classification between two species of AAB genus *Acetobacter*, i.e. *Acetobacter lovaniensis* and *Acetobacter ghanensis*. We also built a phylogenetic tree. We did not find any unknown species; however, we confirmed the presence of different microorganisms, such as acetic acid bacteria and fungi, in kombucha. By obtaining pure cultures this research forms a sound basis for further research of water-soluble polysaccharides, because we could observe an increased viscosity in some growth mediums. These could be producers of levan, acetate, or acetate-like heteropolysaccharides, which could have great potential in different (bio)technological applications.

Nik Podkrajšek, Gimnazija Bežigrad
Mentorica: **Daniela Vlačić**, Gimnazija Bežigrad
Sommentor: **Miran Šebeštjen**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vpliv genetske variabilnosti na parametre vnetja med zdravljenjem hiperholesterolemije z zaviralci PCSK9

Pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze je povečana koncentracija aterogenih lipoproteinov, ki se lahko zmanjša z novejšimi zdravili, kot so zaviralci encima proprotein konvertaza subtilizin/keksin tipa 9 (PCSK9). Obseg vnetja pri aterosklerozi odražajo vnetni dejavniki, kot so interleukin 6 (IL6), dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α) in C-reaktivni protein (CRP). V nalogi smo se osredotočili na proučevanje genetskega vpliva na parametre vnetja med zdravljenjem z zaviralci PCSK9 pri preiskovancih, ki so že imeli miokardni infarkt, ker to področje še ni bilo podrobno raziskano. S kvantitativnim PCR smo v vzorcih DNA preiskovancev določili polimorfizme rs1800795 gena IL6, rs1800629 gena TNFA, rs1800947 gena CRP in rs2010963 gena VEGFA. Nato smo statistično ovrednotili njihovo povezavo z vnetnim stanjem, ki je bilo ocenjeno s koncentracijami dejavnikov vnetja hsCRP, IL6 in TNF- α pred začetkom zdravljenja in po šestih mesecih zdravljenja. V skladu s pričakovanji smo potrdili, da so zaviralci PCSK9 znižali skupni holesterol in holesterol LDL, niso pa vplivali na vrednosti vnetnih dejavnikov. Izmed analiziranih genetskih polimorfizmov smo potrdili le vpliv polimorfizma rs1800795 gena IL6 na spremembo koncentracije IL6. Razlog za to je lahko razmeroma majhna skupina preiskovancev, zato bi bilo v prihodnosti raziskavo smiselno razširiti.

Nik Podkrajšek, Bežigrad Grammar School
Supervisor: **Daniela Vlačić**, Bežigrad Grammar School
Co-supervisor: **Miran Šebeštjen**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Influence of Genetic Variability on Inflammatory Parameters during Treatment of Hypercholesterolemia with PCSK9 Inhibitors

Elevated cholesterol levels are an important risk factor for the development of atherosclerosis. They can be treated with newer drugs such as proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors. The extent of inflammation in atherosclerosis is reflected by inflammatory factors such as interleukin 6 (IL6), tumor necrosis factor α (TNF- α), and C-reactive protein (CRP). In this study, we focused on the genetic factors that may influence inflammatory parameters during treatment with PCSK9 inhibitors in subjects who had a previous myocardial infarction as this field has not yet been fully elucidated. Polymorphisms rs1800795 of the IL6 gene, rs1800629 of the TNFA gene, rs1800947 of the CRP gene and rs2010963 of the VEGFA gene were determined by quantitative PCR in DNA samples of included participants. We statistically evaluated their association with the inflammation, which was assessed by the concentrations of inflammatory factors hsCRP, IL6, and TNF- α before the treatment and after six months. We confirmed that as expected PCSK9 inhibitors lowered total cholesterol and LDL levels, but did not affect the inflammatory parameters. Among the analysed genetic polymorphisms only association of IL6 gene polymorphism on the change of IL6 levels was confirmed. This may be due to a relatively small group of subjects, warranting additional expanded studies.

Kaja Bedernjak, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Somentorica: **Gabrijela Horvat**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Polisaharidni kompoziti kot novi materiali za kostne implantate

V raziskovalni nalogi smo pripravili kompozitne materiale iz polimlečne kisline in etilne celuloze. Uporabili smo dve metodi sušenja. Pripravljene materiale smo karakterizirali z vrstičnim mikroskopom, da smo ugotovili njihovo mikrostrukturo in poroznost. Preverili smo tudi razpad teh biomaterialov v simulirani prebavni tekočini in ugotovili, da se ne glede na metodo sušenja obnašajo podobno. V materiale smo vezali modelno učinkovino indometacin, da bi preverili njeno sproščanje iz materiala. Ugotovili smo, da se indometacin uspešno vgradi v material in se sprošča dalj časa. Potrebne so še raziskave materialov na celičnih linijah *in vitro*, vendar dobljeni rezultati kažejo na velik potencial takih materialov za kostne implantate.

Kaja Bedernjak, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer Grammar School
Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer Grammar School
Co-supervisor: **Gabrijela Horvat**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Polysaccharide Composites as Bone Tissue Implants

In this research, composite scaffold materials for potential application for medical implants were prepared. They were prepared from polylactic acid and ethyl cellulose and then dried at ambient conditions or supercritically dried. The scaffolds were characterised by using a scanning electron microscope to investigate their porous structure. The presence of not only large macropores but also small mesopores in the range of a few tens of nanometres was confirmed. Such structure is highly favourable for cell adhesion and proliferation. The degradation of prepared scaffolds was investigated *in vitro* in simulated body fluid. Scaffolds, dried by different methods, showed similar degradation. Indomethacin, a model substance, was incorporated into the scaffold to investigate its dissolution profile *in vitro*. Indometacin was successfully incorporated into the scaffold and its controlled release was confirmed over one month. The results showed great potential for the use of the materials as bone implants.

Taja Natek, Lina Winkler, II. gimnazija Maribor

Mentor: **Eneko Jose Madorran Esteiro**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Katja Holnthaner Zorec**, II. gimnazija Maribor

Vpliv izbranih aditivov na človeške hepatocite

Negativen učinek aditivov na človeško telo je bil potrjen v številnih raziskavah po svetu, zato ni težko zaslediti opisov, kako aditivi učinkujejo na jetra. V naši raziskavi smo se lotili prav tega. Raziskovali smo, kako mononatrijev glutamat, tartrazin, saharin, citronska kislina in natrijev benzoat vplivajo na človekove jetrne celice. Te smo izpostavili dvema različnima koncentracijama aditivov in s spektrofluorimetrom merili ROS, z biokemičnim analizatorjem pa vrednosti albumina, trigliceridov in glukoze. Z analizo rezultatov smo potrdili ugotovitve preteklih raziskav. Vsi aditivi so vplivali na celice, tako na njihov ROS kot na njihove produkte, torej na albumin, glukozo in trigliceride. Rezultati so se razlikovali tudi glede na koncentracije aditivov, ki smo jim izpostavili celice. Kot smo pričakovali, so večje koncentracije povzročile večje spremembe na celicah. Čeprav smo testirali jetrne celice in ne jeter kot organa, prav tako ne človeka kot celote, lahko sklepamo, da aditivi negativno vplivajo na naše telo, zato svetujemo previdnost pri izbiri hrane in uživanju izdelkov, ki vsebujejo aditive.

Taja Natek, Lina Winkler, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Eneko Jose Madorran Esteiro**, Faculty of Medicine, University of Maribor

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

Effect of Selected Additives on Human Hepatocytes

The negative effect of additives on the human body has already been confirmed in many studies around the world. Therefore, it is not difficult to find many that include descriptions of how additives affect the liver. In our research we focused on this subject and investigated how tartrazine, saccharine, citric acid, monosodium glutamate and sodium benzoate affect human liver cells. The cells were exposed to two different concentrations of additives. ROS was measured with a spectrofluorometer and albumin, triglyceride and glucose values with a biochemical analyser. By analysing the results, we confirmed the claims of past research. All additives had an effect on the cell, both on its ROS and on its products, i.e. albumin, glucose and triglycerides. However, the results differed according to the concentrations of the additives to which the cells were exposed. As expected, higher concentrations caused greater cell changes compared to lower concentrations. Despite the fact that we tested liver cells and not the liver as an organ, nor a whole human body, we can conclude that additives have a negative effect on our body and therefore advise caution when selecting foods and consuming products that contain additives.

Ana Pibernik, Jakob Kecelj, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik
Mentorici: **Renata Capuder Mermal, Cirila Jeras**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik
Somentorica: **Elvira Boršič**, Kemijski inštitut Ljubljana

Vnetna naprava na osnovi molekule TRIF za potencialno imunoterapijo raka

Vzporedno z razvojem znanosti je prišlo tudi do večjega poznavanja in razumevanja celičnih obolenj, njihovih lastnosti in odzivov. Pomemben del prirojenega imunskega odziva v celicah so različne signalne poti, s katerimi celice odgovarjajo na patogene in bolezenske vplive. V raziskovalni nalogi smo proučevali možnost boljše aktivacije signalnih poti z vnetnimi napravami. S tehnikami molekulskega kloniranja smo pripravili vnetne naprave (konstrukte), sestavljene iz različnih odsekov molekule TRIF. Zanimalo nas je, ali vezava določenih odsekov TRIF z ogrodnim proteinom TDP-43 močnejše aktivira različne signalne poti in vodi v večjo produkcijo citokinov, ki so potrebni za nadaljnji imunski odziv. Proučiti smo želeli uporabo vnetne naprave na osnovi molekule TRIF in njen potencial za zdravljenje in imunoterapijo raka. Rakave celice imajo namreč za imunski sistem neprepoznavno celično membrano, kar onemogoča njihovo uničevanje. Z vnetnimi napravami pa bi rakave celice lahko same vzbudile in sprožile imunski odziv. Pri raziskovanju smo uporabili celično linijo HEK293, v katero smo vnesli pripravljene konstrukte. Njihov vpliv smo preverili z dvojnimi luciferaznim testom ter encimsko-immunskim testom ELISA, za vizualizacijo in ogled celic pa smo uporabili konfokalno mikroskopijo. Ugotovili smo, da lahko na osnovi izbranih odsekov TRIF v kombinaciji s TDP-43 pripravimo učinkovito vnetno napravo. To je odlična odskočna deska za nadaljnje raziskave, kako izboljšati vnetne naprave, pripravljene v tej raziskovalni nalogi, in bi lahko v prihodnosti pripomoglo k zdravljenju raka.

Ana Pibernik, Jakob Kecelj, Rudolf Maister Grammar and Secondary School Kamnik
Supervisors: **Renata Capuder Mermal, Cirila Jeras**, Rudolf Maister Grammar and Secondary School Kamnik
Co-supervisor: **Elvira Boršič**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

TRIF-Based Inflammatory Device for Potential Cancer Immunotherapy

In parallel with the development of science, there has been an increase in knowledge and understanding of cellular diseases, characteristics and responses. Various signalling pathways that cells use to respond to pathogens and diseases are an important part of the innate immune response in cells. In this research, we investigated the possibility of an improved activation of signalling pathways using inflammatory devices. By using molecular cloning techniques, we prepared different inflammatory devices (constructs) composed of different sections of the TRIF molecule. We were interested to learn whether binding of specific TRIF segments to the TDP-43 scaffold protein strongly activates different signalling pathways and enhances production of cytokines, which are essential for further immune response. Our work was aimed at studying TRIF-based inflammatory devices and their potential in cancer therapy and immunotherapy. Cancer cells have a cell membrane unrecognisable to the immune system, which makes them impossible to destroy. However, using inflammatory devices, the cells themselves could excite and trigger an immune response. The work was carried out using the HEK293 cell line, in which the prepared constructs were introduced. Their effect was verified by a double luciferase assay and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Confocal microscopy was used to visualise and view the cells. We found that an effective inflammatory device can be prepared based on the selected segments of TRIF bound to TDP-43. This is an excellent starting point for further research into the prepared inflammatory device, which could contribute to the treatment of cancer in the future.

Kaja Dragan, Lea Lisec, Pia Rak, Kristina Sinur, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija

Mentorica: **Irena Kurajić**, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija

Somentor: **Mitja Turk**, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija

Somentor: **Janez Gorenc**, Gimnazija Novo mesto, Razvojni center Novo mesto, d. o. o.

Razkužila z navdihom

S pomočjo difuzijskega antibiograma smo dokazali protibakterijsko delovanje 100-odstotno naravnih eteričnih olj iz timijana, rožmarina, evkalipta, limone, janeža, sivke, cimeta in nageljnovih žbic na sedem vrst testnih bakterij. Največje povprečje povprečnih premerov inhibicijskih con sta imeli eterični olji iz timijana (43,4 milimetra) in sivke (28,7 milimetra). Razvili smo božično, zeliščno in sivkino razkužilo s 100-odstotnimi naravnimi eteričnimi olji in glicerolom. Božično razkužilo je imelo statistično značilno večji protibakterijski učinek (premer cone 10,31 milimetra) na testne bakterije kot 70-odstotni etanol brez eteričnih olj (premer cone 9,29 milimetra). Večini od 107 anketirancev naša razkužila niso izsušila kože na rokah in niso pustila lepljivega občutka. Splošna ocena božičnega razkužila je znašala 4,3/5, sivkinega 4,2/5, zeliščnega 4,0/5, 70-odstotnega etanola pa le 2,9/5. V prihodnosti bomo svojo linijo razkužil z navdihom izpopolnili, certificirali ter prek spletne strani in družbenih omrežij uvedli na trg. Naslednji korak pa bo razvoj novih receptur za razkužila z različnimi kombinacijami 100-odstotnih naravnih eteričnih olj, ki bodo ekološko in lokalno pridelana.

Kaja Dragan, Lea Lisec, Pia Rak, Kristina Sinur, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Gymnasium

Supervisor: **Irena Kurajić**, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Gymnasium

Co-supervisor: **Mitja Turk**, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Agricultural School and Biotechnical Gymnasium

Co-supervisor: **Janez Gorenc**, Gimnazija Novo mesto Grammar School, Development Centre Novo mesto

Disinfectants with Inspiration

Using a disk diffusion method, we demonstrated the antibacterial activity of 100% natural essential oils of thyme, rosemary, eucalyptus, lemon, anise, lavender, cinnamon, and cloves on seven types of test bacteria. The essential oils of thyme (43.4 mm) and lavender (28.7 mm) had the highest average diameters of the inhibition zones. We developed Christmas, Herbal, and Lavender disinfectants with 100% natural essential oils and glycerol. Christmas disinfectant has a statistically significant greater antibacterial effect (zone diameter 10.31 mm) on test bacteria compared to 70% ethanol without essential oils (zone diameter 9.29 mm). Most of the 107 respondents reported that our disinfectants did not dry out their hands and did not leave a sticky feeling on their skin. The overall score for the Christmas disinfectant was 4.3/5, for Lavender 4.2/5, for Herbal disinfectant 4.0/5, and for 70% ethanol 2.9/5. We will continue to promote our product line through our website and Instagram profile to try to bring it to the market and get to know the different reactions people have to our disinfectants. We will continue to improve our products and test them for antimicrobial activity to address different needs. We also intend to develop new disinfectant formulations with different combinations of 100% locally produced natural organic essential oils.

Jan Špiclin, Prva gimnazija Varaždin
Mentor: **Marko Šafran**, Prva gimnazija Varaždin

Vpliv fenolov iz izvlečka prahu zelenega matcha na zmanjšanje poškodbe DNA-molekul iz sperme lososa zaradi izpostavljanja UVA-sevanju

V življenju smo vsi izpostavljeni sončnemu sevanju, del katerega je tudi UVA-sevanje, ki ob dolgotrajni izpostavljenosti poškoduje DNA-molekule. Zato uporabljamo izdelke za sončenje, v katerih so kemične spojine, ki absorbirajo UV-žarke in tako ščitijo DNA-molekule v koži. Vendar so te spojine pogosto zdravju škodljive (npr. paraben). Znano je, da fenoli zelo dobro absorbirajo UV-žarke, zato je bil cilj te raziskave preveriti, ali bodo izolirani fenoli iz prahu matcha vplivali na zmanjšanje poškodbe DNA-molekul iz lososove sperme zaradi izpostavljenosti UVA-sevanju v intervalih od 0 do 30 minut. Za določitev koncentracije skupnih fenolov v izvlečku prahu matcha je bil uporabljen FC-reagent. S pomočjo galne kisline je bila narejena standardna krivulja. V enačbo grafa je bila vključena tudi spektrofotometrično pridobljena absorbanca pri valovni dolžini 765,1 nm. Stopnja poškodbe fragmentov DNA-molekul iz lososove sperme je bila kvantificirana z gelsko elektroforezo. V raziskavi so bile štiri eksperimentalne skupine: denaturirani in nendenaturirani fragmenti DNA-molekul iz lososove sperme v raztopini fenolov in brez raztopine fenolov. V nobeni skupini ni bilo statistično značilnih razlik. Na podlagi rezultatov ni mogoče z gotovostjo trditi, ali izvleček fenolov iz prahu matcha ščiti pred UVA-sevanjem, zato so potrebne nadaljnje raziskave z drugimi metodami denaturacije in vizualizacije DNA-molekule.

Jan Špiclin, Prva Gimnazija Varaždin Grammar School
Supervisor: **Marko Šafran**, Prva Gimnazija Varaždin Grammar School

Effect of Phenols from Green Matcha Powder Extract on Reducing the Rate of Damage to DNA Molecules from Salmon Sperm Due to Exposure to UV-A Radiation

Throughout our lives we are exposed to solar radiation that consists of various radiation wavelengths, such as UV-A radiation, which causes permanent damage to DNA molecules. To combat these harmful effects people often use suntan lotion, which contains many chemical compounds with the ability to absorb UV-A rays, in order to protect their DNA molecules. However, oftentimes those very chemical compounds cause harm to the users. Taking into consideration that phenols absorb UV-A rays, the goal of this research was to determine the effects of isolated phenols from matcha powder on a salmon sperm DNA molecule following a 30-minute exposure to UV rays. An FC reagent was used to determine the concentration of phenols. A standard curve was obtained using gallic acid. Absorbance at the wavelength of 765.1 nm measured using a spectrophotometer was also included in the line equation of the said standard curve. Salmon sperm DNA molecule fragment damage rate was quantified by gel electrophoresis. Four experimental groups were included in this research: denatured and undenatured fragments of salmon sperm DNA molecules in phenol solution and without phenol solution. There were no statistically significant differences among the experimental groups individually. There were also no significant differences between undenatured fragments of DNA molecules exposed to UV-A rays from 0 to 30 minutes in the phenol solution and those exposed without phenol solution. Based on all results it could not be affirmed with certainty that matcha powder extract protects from UV-A radiation. For that reason, it is necessary to conduct further research using other methods of denaturation and visualisation of the DNA molecule.

Špela Polutnik, II. gimnazija Maribor
Mentorica: **Katja Holnthaner Zorec**, II. gimnazija Maribor
Somentorica: **Nataša Toplak**, Omega, d. o. o.

Ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka v kozjih in ovčjih siri s qPCR-metodo

Sodobne molekularne metode, na primer verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR), so del vsakodnevnih testiranj v laboratorijih živilske industrije. S hitrimi, občutljivimi in stroškovno učinkovitimi metodami, kot je qPCR, je mogoče zaznati odstopanja v proizvodnem procesu, če na primer proizvajalci dražjo sestavino zamenjajo s cenejšo. Primer tega so kozji in ovčji siri, pri katerih proizvajalci kozje ali ovčje mleko mešajo s cenejšim kravjim mlekom; kupcem to lahko povzroči zdravstvene težave, saj je mleko eno od najbolj alergeničnih živil. Cilj naše študije je bila uporaba qPCR-metode pri mlečnih proizvodih. To metodo smo uporabili za odkrivanje in kvantifikacijo dodanega kravjega mleka oziroma kravje DNA v različnih kozjih in ovčjih siri. Testirali smo 20 kozjih in/ali ovčjih sirov. Z rezultati smo bili zelo zadovoljni, saj je bilo v vseh vzorcih manj kot 1 % kravjega mleka. Ugotovili smo, da je kakovost kozjih in ovčjih sirov na slovenskem trgu dobra, boljša kot v preteklosti.

Špela Polutnik, II. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: **Katja Holnthaner Zorec**, II. Gimnazija Maribor Grammar School
Co-supervisor: **Nataša Toplak**, Omega d.o.o.

Quantification of Bovine Milk in Caprine and Ovine Cheeses with qPCR Method

Modern molecular methods, for example quantitative polymerase chain reaction (qPCR), have become a part of routine testing in food industry laboratories. With fast, sensitive, and cost-effective methods such as qPCR, it is possible to detect deviations in production of different food products, for example attempts to replace more expensive ingredients with cheaper ones to reduce the production costs of individual foods. Clear examples of this are caprine and ovine cheeses, where producers mix ovine or caprine milk with cheaper bovine milk. This can cause health problems for customers, as milk is one of the most allergenic foods. The goal of our study was to use the qPCR method with dairy products. We tested qPCR assays for the detection and quantification of bovine milk (cow DNA) in different cheeses made from caprine and/or ovine milk. To evaluate the method on actual samples, we tested 20 different caprine and/or ovine cheese samples. As bovine milk was detected only at levels $\leq 1\%$ in all samples, we concluded that the quality of ovine and caprine cheeses on the Slovenian market is good, better than in the past.

Lana Mohorič, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Mentorica: **Valerija Šemrl Kosmač**, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Mentor: **Jože Kotnik**, Institut Jožef Stefan, Oddelek za znanosti o okolju

Somentorici: **Karmen Slak Leoni, Marjanca Poljanšek**, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Somentorica: **Tatjana Dizdarevič**, Center za upravljanje z dediščino živega srebra Idrija

Vsebnost živega srebra v vrtninah

Prst v Idriji je močno onesnažena z živim srebrom (Hg). Na več raziskanih vrtovih njegova vsebnost presega kritično vrednost, tj. 10.000 µg Hg/kg suhe snovi prsti, določeno v Uradnem listu Republike Slovenije. Raziskali smo, ali se je vsebnost Hg v prsti v primerjavi s preteklimi raziskavami spremenila oziroma koliko se je spremenila. Zanimalo nas je, kakšna je vsebnost Hg v vrtninah, pridelanih na idrijskih vrtovih. Izbrali smo vzorce zelenjave, ki so bili na voljo v jesenskem času. Analizirali smo tudi kupljeno zelenjavo in primerjali rezultate, da bi ugotovili razliko med domačimi in kupljenimi vrtninami. Vsebnost Hg smo analizirali v čebuli, korenju, paradižniku, solati, ohrovту, radiču ter v korenini in listih peteršilja. Najmanj ga je bilo v čebuli, največ pa v zadnjih treh vzorcih, zato na s Hg onesnaženih območjih odsvetujemo njihovo gojenje in uporabo za prehrano. Zanimalo nas je tudi, ali lahko s termično obdelavo, torej s prekuhavanjem v vodi, zmanjšamo vsebnost Hg v vrtninah, vendar na to vprašanje z našimi analizami nismo mogli odgovoriti.

Lana Mohorič, Jurij Vega Grammar School Idrija

Supervisor: **Valerija Šemrl Kosmač**, Jurij Vega Grammar School Idrija

Supervisor: **Jože Kotnik**, Jožef Stefan Institute, Department of Environmental Sciences

Co-supervisors: **Karmen Slak Leoni, Marjanca Poljanšek**, Jurij Vega Grammar School Idrija

Co-supervisor: **Tatjana Dizdarevič**, Idrija Mercury Heritage Management Centre

Mercury Content in Garden Crops

The soil in Idrija is heavily contaminated with mercury (Hg). Concentrations of Hg in many surveyed gardens in Idrija exceed the critical value determined in the Official Gazette of the Republic of Slovenia, which is 10 000 µg Hg/kg of dry matter of soil. We researched whether or how much the concentration of Hg in soil changed compared to previous research. We were interested in Hg contents in garden crops in Idrija. We collected vegetable samples that were available in autumn. The results were also compared to purchased vegetables to determine Hg concentrations in those vegetables and compare home-grown foodstuffs with crops purchased at the store. The concentration of Hg was analysed in onions, which was found to be among the lowest, and in carrots, tomatoes, green salad, kale, chicory, and both the root and green parts of parsley. The highest concentrations were found in the latter three samples; therefore, we advise against their cultivation and consumption in contaminated areas. We were interested in whether it is possible to reduce the Hg concentration with heat treatment, i.e. boiling, but our analysis could not answer this question.

Lara Kalin, Jakob Auersperger, Jan Kastelec, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija Novo mesto
Mentor: **Goran Pešič**, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija Novo mesto
Somentor: **Kostja Makarovič**, Institut Jožef Stefan
Somentor: **Simon Vovko**, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija Novo mesto

Izdelava lastnega sistema za proizvodnjo etanola

V nalogi smo raziskovali pridobivanje biogoriv. Biogoriva so nefosilna goriva, proizvedena iz organske snovi rastlinskega ali živalskega izvora, tj. iz biomase. Bioetanol je trajnostno in za okolje neškodljivo gorivo, ki ga proizvajamo iz škrobne in lignocelulozne mase. V primerjavi s fosilnimi gorivi ima kar nekaj prednosti: ima višje oktansko število, zmanjšuje raven trdnih delcev v zraku, je ogljično nevtralno gorivo, v okolje sprošča do 90 % manj toplogrednih plinov, proizvodnja je cenejša, izdelamo ga lahko tudi doma. V raziskavi smo pridobivali etanol iz treh virov: krompirja, trave in odpadne hrane. Pri postopku smo uporabljali encimsko hidrolizo, fermentacijo in destilacijo. Z encimsko hidrolizo smo pridobili enostavne sladkorje in jih v procesu fermentacije pretvorili v bioetanol. Nastala mešanica je bila zmes alkohola in vode, zato smo uporabili destilacijo, da smo dosegli 90-odstotno koncentracijo oziroma koncentracije, ki so primerne za uporabo v motorjih. Največ etanola smo pridobili iz krompirja, manj iz riža, zanemarljive vrednosti pa iz trave. Uporabili smo ga za delovanje štiritaktnega motorja kosilnice in dvotaktnega motorja škropilnice. Testirali smo mešanice različnih koncentracij in ugotovili, da je proizvedeni bioetanol primeren za uporabo v motorjih z notranjim izgorevanjem.

Lara Kalin, Jakob Auersperger, Jan Kastelec, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Gymnasium Novo mesto
Supervisor: **Goran Pešič**, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Gymnasium Novo mesto
Co-supervisor: **Kostja Makarovič**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana
Co-supervisor: **Simon Vovko**, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Gymnasium Novo mesto

Developing Our Own Ethanol Production System

In this research paper we investigated the extraction of biofuels. Biofuels are non-fossil fuels produced from organic substance of plant or animal origin called biomass. Bioethanol is a sustainable and environmentally friendly fuel produced from starch and lignocellulosic mass. Bioethanol has several advantages: it has a higher octane number, reduces the level of solid particles, it is a carbon neutral fuel, its production entails lower costs, can be made at home, and releases up to 90% less greenhouse gasses than fossil fuels. In this study we obtained ethanol from three sources: potatoes, grass, and food waste. Enzymatic hydrolysis, fermentation, and distillation were used in the process. Enzymatic hydrolysis yielded simple sugars that were converted to bioethanol during the fermentation process. The resulting mixture contained alcohol and water and was concentrated by distillation to 90% or to concentrations suitable for use in engines. In the experiment, the highest amount of alcohol was obtained from potatoes, followed by rice, while negligible quantities were obtained from grass. The resulting bioethanol was used to operate a four-stroke lawn mower engine and a two-stroke sprayer engine. By testing mixtures of different bioethanol concentrations, we established that the produced bioethanol was suitable for use in internal combustion engines.

Živa Vilfan, Nina Malovrh, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorici: **Barbara Pipan, Teja Krpan**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Somentor: **Gašper Jan Simon**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Analiza prisotnosti odpornostnih genov pri križancih navadnega fižola

Križanje rastlin je ena od najpomembnejših metod za vzgajanje novih kmetijskih sort, saj omogoča kombiniranje različnih lastnosti parentalnih generacij. S križanjem lahko dobimo dobre fenotipske in genotipske lastnosti. To lahko preverimo z DNA-markerji ali t. i. MAS, kar so v program žlahtnjenja fižola na Kmetijskem inštitutu Slovenije uvedli že leta 2018. Na podlagi kombinacije rezultatov fenotipske selekcije v letu 2021 ter aplikacije lastnostno vezanih DNA-markerjev za odpornost proti biotskemu stresu smo identificirali le tiste križance druge filialne generacije, ki so bili nosilci odpornostnih genov za najbolj razširjene povzročitelje bolezni pri fižolu ter za enega od najpomembnejših škodljivcev.

Živa Vilfan, Nina Malovrh, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School, Biotechnical Educational Centre Ljubljana

Supervisors: **Barbara Pipan, Teja Krpan**, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School, Biotechnical Educational Centre Ljubljana

Co-supervisor: **Gašper Jan Simon**, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School, Biotechnical Educational Centre Ljubljana

Analysis of Presence of Resistance Genes in Common Bean Hybrids

Hand pollination is one of the most important breeding methods that allows the combination of different traits from parental lines. Targeted hand pollination enables both, improved phenotypic and genotypic characteristics assessed by DNA markers or by MAS approach, which was introduced into the national common bean breeding program at the Agricultural Institute of Slovenia in 2018. Based on a combination of phenotypic selection results in 2021 and the application of functional DNA markers linked to biotic stress resistance, only hybrids from the second filial generation with resistance genes for the most important common bean pathogens and for one of the major pests were identified.

KAZALO

INDEX

KAZALO AVTORJEV

103	Jakob Auersperger	40	Anja Kristl
88	Lea Ažbe	99	Lea Lisec
68	Grega Bajc	85	Barbara Makovec
93	Vid Bauman	104	Nina Malovrh
96	Kaja Bedernjak	67	Nika Marolt
91	Rea Doria Bergant	82	Kristina Matic
61	Kaja Bergant Loboda	79	Maja Mavri
77	Špela Bizjak	74	Ana Medic
28	Maja Bjelošević Žiberna	70	Teo Mlinšek
89	Matija Derganc	102	Lana Mohorič
34	Ana Dolšak	97	Taja Natek
99	Kaja Dragan	52	Nejc Petek
63	Veronika Furlan	98	Ana Pibernik
94	Zoja Gobec	46	Tina Vida Plavec
89	Jakob Golubić	95	Nik Podkrajšek
80	Ana Gorenc	64	Mitja Pohlen
76	Rok Herman	101	Špela Polutnik
60	Monika Horvat	66	Kity Požek
81	Mišel Hozjan	78	Eva Rajh
72	Nina Hrvatič	99	Pia Rak
103	Lara Kalin	75	Nina Ravbar
87	Tjaša Karas	84	Martin Rihtaršič
103	Jan Kastelec	99	Kristina Sinur
98	Jakob Kecelj	92	Julija Skrt
65	Ana Kovačič	86	Rok Sušnik
83	Suzana Kralj	90	Tim Šinko
92	Jaša Krevh	100	Jan Špiclin



KAZALO AVTORJEV

62	Andrej Šterman	69	Nina Zupan
94	Ema Švarc	71	Tanja Zupan
73	Uroš Vezonik	85	Kristina Žagar
104	Živa Vilfan	97	Lina Winkler
91	Tea Vovko		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

30	Pegi Ahlin Grabnar	70	Marija Holcar
78	Mojca Benčina	97, 101	Katja Holnthaner Zorec
48	Aleš Berlec	96	Gabrijela Horvat
82	Bojana Bogovič Matijašič	60, 84	Jernej Iskra
98	Elvira Boršič	77	Žiga Jakopin
63	Urban Bren	76	Mojca Jensterle Sever
98	Renata Capuder Mermal	98	Cirila Jeras
87	Darija Cör Andrejč	90	Nina Kacjan Maršič
62	Zdenko Časar	85	Saša Kadivec
79	Jaka Dernovšek	83	Anja Klančnik
102	Tatjana Dizdarevič	75	Lea Knez
64	Rok Dreu	87	Maša Knez Marevci
69	Ilija German Ilić	68	Klemen Korasa
87, 96	Mateja Godec	65	Tina Kosjek
99	Janez Gorenc	73	Janez Košmrlj
72	Mirjam Gosenca Matjaž	102	Jože Kotnik
80, 81	Uroš Grošelj	93	Darja Kravanja
71, 78	Gregor Gunčar	93	Katja Andrina Kravanja
77	Samo Guzelj	66	Igor Križaj
65	Ester Heath	104	Teja Krpan
90	Vesna Hojnik	99	Irena Kurajčić

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

67	Matic Legiša	36	Urban Švajger
66	Adrijana Leonardi	79, 89	Tihomir Tomašič
97	Eneko Jose Madorran Esteiro	101	Nataša Toplak
103	Kostja Makarović	94	Janja Trček
89, 92	Alenka Mozer	70	Katarina Trebušak Podkrajšek
86	Jure Mravlje	99	Mitja Turk
69	Susanne Muschert	94	Tadeja Vajdič
90	Anita Mustač	72	Mercedes Vitek
92	Ilja Gasan Osojnik Črnivec	95	Daniela Vlačić
61	Andrej Perdih	103	Simon Vovko
85	Katja Pesjak	68	Franc Vrečer
103	Goran Pešič	74	Irena Zajc
104	Barbara Pipan	74	Lovro Žiberna
102	Marjanca Poljanšek	66	Vera Župunski
42	Matevž Pompe		
91	Janja Pust		
82	Robert Roškar		
88	Rok Rudež		
71	Jerica Sabotič		
104	Gašper Jan Simon		
92	Mihaela Skrt		
102	Karmen Slak Leoni		
91	Katarina Sluga Zupančič		
61, 62	Izidor Sosič		
36	Matej Sova		
100	Marko Šafran		
86	Eva Šajn		
95	Miran Šebeštjen		
102	Valerija Šemrl Kosmač		
94	Jure Škraban		
54	Bogdan Štefane		
48	Borut Štrukelj		





KRKINE NAGRADE
ZNANOST POVEZUJE



| #krkinenagrade

| www.krkinenagrade.si