

**55. KRKINE NAGRADE**

**35. SIMPOZIJ**

# **ZBORNIK POVZETKOV**

35. SIMPOZIJ  
35th SYMPOSIUM

# **ZBORNIK 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.*

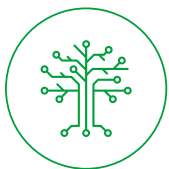
# Mission

*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

**55. KRKINE NAGRADE | Zbornik povzetkov**

Novo mesto, 17. oktober 2025

**Izdajatelj**

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

**Predstavitev nagrajencev**

Elvira Medved

**Jezikovni pregled (slovenski jezik)**

Marta Anžlovar, Mateja Slavec, Tina Vehovec

**Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik)**

Mojca Ceferin, Katarina Tomc, Iva Ogorelec

**Oblikovanje**

Renata Burnik

**Produkcija**

Tanja Balantič, Klaudija Sečen

**Fotografije**

Andrej Križ

**Tisk**

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

[www.krkinenagrade.si](http://www.krkinenagrade.si)

### **Častni odbor 55. 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  
prof. dr. Andreja Žgajnar Gotvajn, predsednica 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**

doc. dr. Klemen Korasa, predsednik  
dr. Jure Bezenšek  
dr. Matjaž Deželak  
dr. Eva Pušavec Kirar  
Gordan Sladič  
dr. Vida Škrabanja  
dr. Joanna Anna Trykowska Konc  
dr. Luka Žnideršič

### **Člani**

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

### **Glavni in odgovorni urednik**

dr. Miha Plevnik

## Recenzenti

Maja Ajdišek, Dita Aplinc, Mojca Bahor, Grega Bajc, dr. Tina Bakarič, Breda Barbič Žagar, Nastja Bašelj, dr. Primož Benkič, Marko Benković, dr. Ana Bergant Simončič, Franci Bevec, dr. Jure Bezenšek, dr. Marko Bitenc, Tanja Blatnik, Kaja Blažič, dr. Jernej Bobnar, dr. Sergeja Bombek, Petra Brlogar, Ilija Buzar, dr. Irena Čarman, dr. Sabina Devjak Novak, dr. Matjaž Deželak, dr. Katarina Dobrovoljc, Matej Dragovan, mag. Tina Dular Meglič, dr. Aleša Dular Vovko, Alen Gabrič, dr. Mateja Gabrijel Blatnik, dr. Aleš Gasparič, Jaka Glavač, Matej Godec, Jana Golob, Ana Gorenc, Aljoša Gradišek, mag. Anica Grandovec, Tadej Grobelšek, Vendi Grobelšek, dr. Alenka Grošel, dr. Jasna Grželj, Peter Hančič, Mojca Hiti, Dejan Hočevar, Blaž Hodnik, dr. Žiga Hodnik, mag. Damjan Hodžar, Bor Hodžić, Patrik Horžen, Borut Hrastar, Žan Hribar, Sara Hrovat, Nina Hrvatič, dr. Grega Hudovornik, Jernej Hvala, mag. Miran Hvalec, dr. Gregor Ilc, Helena Jakše, Dušan Janežič, Špela Javornik, dr. Boštjan Jerman, Jernej Jerman, Peter Jovič, Anže Kastelic, Sendi Kersnič, dr. Dejan Klement, mag. Andrej Klobčar, dr. Slavko Klobčar, Boštjan Kmet, mag. Aleš Knoll, Anton Kočev, Tanja Kohek, Ivanka Kolenc, dr. Tanja Koleča, Nejc Koračin, doc. dr. Klemen Korasa, Ronald Korthouwer, Jernej Kos, mag. Berta Kotar Jordan, mag. Helena Kotnik, dr. Borut Kovačič, Simon Kovačič, Zala Kovačič, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, dr. Vesna Krošelj, Nina Kukovičič, dr. Barbara Kunič, dr. Jernej Kužner, dr. Brigita Lapornik, dr. Roman Lenaršič, mag. Denise Leskovar, dr. Tadej Lešer, dr. Gregor Lorbek, dr. Nina Lukač, dr. Mateja Lumpert, Eva Majhenič, Matej Makše, mag. Simon Makuc, dr. Jelena Mandić, Sanja Markez, dr. Tatjana Rojnik Mateović, dr. Primož Meh, Maja Mejač, Tomaž Meško, Mateja Mežnar, dr. Špela Miklič, Darja Milovanović Jarh, Aleksander Miložič, dr. Janja Mirtič, mag. Damjan Možina, Lucija Mrgole, Jože Mužerlin, Duša Oblak, Maja Oblak Fritz, mag. Irena Orel, dr. Renata Osolnik, Andreja Osredkar, mag. Vesna Pahor, dr. Anica Pečavar, Iza Pekle Simonič, Mitja Pelko, Mojca Peršuh, Deja Petrovič Kuclar, dr. Lidija Pezdirc, Boštjan Piltaver, Katja Pisanec, dr. Miha Plevnik, Primož Podbregar, dr. Mitja Pohlen, dr. Gašper Poklukar, Yuriy Polagaev, Aleš Polovič, dr. Maja Preskar, Aleša Primožič, dr. Anja Pucer Janež, Urh Pucihar, mag. Aleša Punčuh Kolar, dr. Gašper Pustovrh, dr. Eva Kirar Pušavec, dr. Katarina Rade, dr. Andreja Radman Kastelic, Radivoje Rašković, Žiga Rebernik, dr. Nataša Rebolj, Vojko Rebolj, dr. Tadej Recelj, Aleksander Rekič, Matej Repovž, Urška Ribič, dr. Aleš Rotar, dr. Saša Rožman, Petra Ruter, Miloš Ružič, Tanja Seničar, dr. Zvone Simončič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, dr. Marko Slana, Janika Slanc Vovk, Domen Smodiš, dr. Janez Smodiš, dr. Tina Smolič, dr. Matej Smrkolj, Matej Stergar, Maša Sterle, dr. Gregor Strle, dr. Žiga Strmšek, Tadej Stropnik, dr. Jerneja Šauta Ogorevc, mag. Nada Šavor, Eva Šavrič, Mojca Šegula Žakelj, dr. Luka Šenica, Alenka Šenk Erpič, Roman Šiler, dr. Ervin Šinkovec, Anja Škoporc, dr. Vida Škrabanja, dr. Natalija Škrbina Zajc, dr. Katja Škrlec, Vanja Škufca, Anja Šribar, dr. Urša Štanfel, Urška Štangelj, Davor Štefanič, dr. Marko Štefanič, Nika Terlep, dr. Ana Testen, dr. Jaroslav Tihi, Andreja Toplišek, Tilen Tori, dr. Elizabeta Tratar Pirc, mag. Simon Tratnik, dr. Joanna Anna Trykowska Konc, Sandra Turk, mag. Robert Ucman, Nataša Uranič, Manca Urh, dr. Darko Uršič, Nina Vajdič, dr. Ana Vidmar, dr. Tanja Vnučec Popov, Blaž Vončina, dr. Dejan Vražič, dr. Miha Vrbinc, Tomaž Vrbinc, mag. Julija Vrbovšek, dr. Irena Vrečar, dr. Franc Vrečer, dr. Mateja Vrečer, dr. Jernej Zadnik, Timotej Zaletel, Martina Zobarič, David Zupančič, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, mag. Tanja Žibert, Saša Žikič, dr. Luka Žnideršič

# VSEBINA

## CONTENT

---

### 55. KRKINE NAGRADE

12 | Aleš Rotar, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

14 | Krkini nagrajenci 2025

### 35. SIMPOZIJ

#### ZBORNİK POVZETKOV

24 | Klemen Korasa, predsednik Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad

### VELIKE KRKINE NAGRADE

#### PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

32 | Dominik Jankovič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj s kovinami prehoda kataliziranih reakcij za selektivne modifikacije biomolekul

38 | Anže Zidar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj terapevtskih nanovlaken in vrednotenje njihove imunogenosti *in vitro*

44 | Ana Baumgartner, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj dobro stisljivega in pretočnega koprosesanega mezoporoznega silicijevega dioksida za izdelavo amorfnih trdnih disperzij in orodisperzibilnih tablet

50 | Jaka Dernovšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev proteina toplotnega šoka 90 s protitumornim delovanjem

56 | Matic Broz, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Preučevanje sekundarne strukture proteinov z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike in nevronskimi mrežami

## KRKINE NAGRADE S PRIZNANJEM ZA IZSTOPAJOČE RAZISKOVALNO DELO POVZETKI

- 64 | Maja Sever, Dominik Škrinjar, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Razvoj *in vitro* modela kože
- 65 | Taja Skube, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Ugotavljanje vsebnosti nizkomolekularnih nitrozaminov v zdravilih s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo visoke ločljivosti
- 66 | Manca Bahor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Pretvorbe azakinolizinil diazonijevih tetrafluoroborotov s tioli

## KRKINE NAGRADE POVZETKI

- 70 | Tjaša Felicijan, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Preučevanje mehanizmov prenasičenja in obarjanja zdravilnih učinkovin *in vitro* v ponazorjenih *in vivo* pogojih
- 71 | Jernej Vajda, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Razvoj novih metod izdelave in karakterizacije mikrožilja v *in vitro* modelih
- 72 | Barbara Herlah, Kemijski inštitut Ljubljana  
Dinamični model DNA topoizomeraze tipa II ter *in silico* načrtovanje novih katalitičnih zaviralcev kot potencialnih kemoterapevtikov
- 73 | Katja Schoss, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Raziskave sestave in biološke učinkovitosti rastlinskih izvlečkov, pridobljenih s sub- in superkritičnimi fluidi
- 74 | Blaž Grilc, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj bukalnih polimernih filmov za sistemsko dostavo zdravilnih učinkovin in diskriminatorne *in vitro* metode sproščanja
- 75 | Nika Kučuk, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Napredni biološko aktivni transportni sistemi ekstraktov manga (*Mangifera indica*) za terapevtske aplikacije *in vitro*
- 76 | Nika Strašek Benedik, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj zaviralcev imunoproteasoma in modulatorjev signalnih poti, udeleženih v imunskem odzivu, s protitumornim in protivnetnim delovanjem
- 77 | Kaja Kupnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru  
Sinteza funkcionaliziranih nanoceluloznih hibridov z ekstrakti avokada (*Persea americana*) s protibakterijskim delovanjem

- 78 | **Aljaž Škrjanc**, Kemijski inštitut Ljubljana  
Zelena sinteza zeolitnih imidazolatnih ogrodiv in njihovo ovrednotenje za zajem CO<sub>2</sub> v vlažnih pogojih
- 79 | **Lucija Ana Vrščaj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Vloga nekodirajočih RNA pri anaboličnem zdravljenju osteoporoze s teriparatidom
- 80 | **Rok Šmerc**, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani  
Mehanizmi elektroporacije in fizikalno-kemijski dejavniki pomembni pri terapijah z elektroporacijo
- 81 | **Nina Zupan**, Graduate school of Biology and Health Sciences, University of Lille  
Izdelava polimernih zmesi z glibenklamidom z iztiskanjem v talini: povezava med procesnimi pogoji, fizikalno obliko in raztapljanjem
- 82 | **Matevž Turk**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Interakcija perfluoriranih ionskih surfaktantov s polielektroliti
- 83 | **Barbara Šernek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Vpliv zdravljenja z zaviralci proprotein konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 na biokemične označevalce vnetja žilne stene
- 84 | **Eva Rotar Pucko**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Študij vpliva procesnih parametrov kontinuiranega vlažnega granuliranja v dvopolžni napravi na lastnosti zrn in primerjava s šaržnimi procesi granuliranja
- 85 | **Vid Kermelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Radikalno-polarni prekop v bizmutovi LMCT-fotokatalizi
- 86 | **Juš Navratil**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje analogov belnaka s novimi elektrofilnimi bojnimi glavami kot kovalentnih zaviralcev kaspaze 1
- 87 | **Sergej Praček**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Določanje molekularnega mehanizma bioinsekticidnega delovanja novih glivnih lektinov na invazivne škodljivce
- 88 | **Žiga Gerdina**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Imobilizacija glukoze oksidaze v zamrežene encimske agregate z uporabo mikro pretočnega sistema
- 89 | **Jakob Kolar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj in optimizacija mikrofluidnega sistema endotelija na čipu
- 90 | **Tilen Zorko**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Fotoredoks katalitske pretvorbe triklorometansulfenil klorida
- 91 | **Pia Hrovat**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Odstranjevanje bisfenolov iz pitne in odpadne vode s fotokatalizo in hidrodinamsko kavitacijo
- 92 | **Benjamin Poljanc**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Recikliranje plemenitih kovin s selektivnim obarjanjem z uporabo izbranih derivatov piritiona

- 93 | **Martin Rihtaršič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
**Oksidativno jodiranje fenolov in spajanje jodofenolov v odsotnosti prehodnih kovin**
- 94 | **Jakob Höfferle**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
**Sinteza in uporaba iridijevih katalizatorjev za izotopsko izmenjavo vodika na osnovi dendrimernih nosilcev**
- 95 | **Urh Bertoncelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
**Poskus vezave piritionskih derivatov in njihovih kovinskih kompleksov na izbrane nanonosilce**
- 96 | **Lovro Klenovšek**, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani  
**Analiza slik vrstičnega elektronskega mikroskopa z metodami strojnega učenja**
- 97 | **Lara Plohl**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
**Impregnacija biokompozitnih aerogelov za biomedicinske aplikacije**
- 98 | **Špela Kladnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
**Spremljanje preoblikovanja citoskeleta glioblastomskih celic v prisotnosti nanoteles usmerjenih proti transmembranskemu proteinu FREM2**
- 99 | **Neža Štrukelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Analiza učinkovitosti peroralnega in injekcijskega semaglutida pri osebah s sladkorno boleznijo tipa 2**
- 100 | **Žiga Petančič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Vpliv kombinacij pomožnih snovi na znižanje viskoznosti visokokoncentriranih formulacij monoklonskih protiteles za subkutano aplikacijo**
- 101 | **Zala Čuk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Razvoj trdnih lipidnih nanodelcev za dostavo učinkovine z delovanjem na mitohondrije**
- 102 | **Larisa Knap**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Preučevanje imunomodulatornega delovanja zmesi bisfenola A in njegovih nadomestkov v limfoblastoidnih celičnih linijah**
- 103 | **Zala Stopar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
**Sinteza in reaktivnost koordinacijskih spojin kovinskih karbonilov s karbenskimi ligandi**
- 104 | **Anja Šenk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Razvoj in optimizacija večstopenjske kemijske sinteze desmetoksisulfazecina**
- 105 | **Polona Kalan**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani  
**Kvantifikacija bakterij *Campylobacter jejuni* v biofilmih s kapljično digitalno verižno reakcijo s polimerazo ob uporabi propidijevega monoazida**
- 106 | **Lucija Rus**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
**Vzorci predpisovanja antibiotikov in njihov vpliv na izide zdravljenja z imunoterapijo z zaviralci imunskih kontrolnih točk pri bolnikih z napredujočim nedrobnoceličnim rakom pljuč**

- 107 | **Janja Zabukovnik**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Majhne sile, velik vpliv: kvantifikacija gastrointestinalnih mehanskih obremenitev v pogojih s hrano za izgradnjo biorelevantnih modelov sproščanja
- 108 | **Maja Cvetanoska**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Karakterizacija različnih sevov vaginalnih laktobacilov in njihovo vključevanje v nanovlakna
- 109 | **Eva Ravnikar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Testiranje stabilnosti hidrolatov poprove mete (*Mentha x piperita*) in pelargonije (*Pelargonium graveolens*)
- 110 | **Blažka Štefin**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Optimizacija priprave sferoidov tumorskih celic raka dojke in fibroblastov
- 111 | **Adela Avdičević**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Uporaba modernih računalniških pristopov za iskanje novih protivirusnih zdravil
- 112 | **Tinara Šuštarč**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Sistematični pregled raziskav o liofilizaciji laktobacilov in preizkus uporabnosti velikega jezikovnega modela pri zbiranju in vrednotenju podatkov
- 113 | **Pia Žižek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Vpliv bisfenola A in njegovih izbranih analogov na izločanje citokinov v monocitni celični liniji THP-1
- 114 | **Lamija Ahmetović**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Računalniško modeliranje antikarcinogenih učinkov naringenina
- 115 | **Špela Žunec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Razvoj ekstrakcijske metode za perfluoroalkilna onesnaževala v vodi
- 116 | **Živa Andeluh, Jošt Dolinar**, Gimnazija Vič  
pH-občutljivi fluorescenčni označevalci za odkrivanje okužb sečil
- 117 | **Neža Kuhar**, II. gimnazija Maribor  
Semaglutid v tabletah kot zdravilo za debelost pri odraslih
- 118 | **Maša Pelan**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
Vrednotenje delovanja lipofilnih in vodotopnih fluorescenčnih učinkovin s ksantenskim tricikličnim strukturnim motivom na celično linijo Burkittovega limfoma
- 119 | **Vinko Kosten**, Gimnazija Ledina  
Sinteza in optimizacija procesa pridobivanja grafenskih materialov iz odpadnih ogljikovih kompozitov
- 120 | **Ajk Kalaba, Luka Tomažin, Aljaž Maraž**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje  
Mr-Pingvini vs. Pasozavri: igra z mešano resničnostjo za boj proti PAS
- 121 | **Jon Milič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer  
Protimikrobno in protibiofilmsko delovanje naravnih snovi proti bakterijam *Escherichia coli*

- 122 | **Emilija Rojnik, Mija Kapun**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana  
**Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana**
- 123 | **Teja Kljun**, Gimnazija Bežigrad  
**Vpliv umetnih sladil na jetrne celice sferoidov in oksidativen stres ter ozaveščenost mladih**
- 124 | **Neža Botica, Vesna Potočnik**, Gimnazija Kranj  
**Ugotavljanje vpliva sindroma relativnega energijskega primanjkljaja na telesno sestavo športnikov z namenom določanja smernic za diagnostiko**
- 125 | **Maja Klun, Iza Levstek**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
**Analiza alelnih profilov sortno izvornih in brezvirusnih genotipov česna (*Allium sativum* L.) sorte ptujski spomladanski**
- 126 | **Sibila Mežnar**, Škofijska klasična gimnazija  
**Določevanje koncentracije mRNK**
- 127 | **Vida Markovič, Zoja Štrubelj**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
**Feromoni pri pajkih: Ali samci zaznajo paritveni status samice?**
- 128 | **Vid Kodrič, Matic Izak, Anika Gregori Kmecl**, Gimnazija Vič  
**Vpliv lektina CnGL iz glive poprhnjene livke na rast bakterij *Escherichia coli* in *Listeria innocua***
- 129 | **Saša Stanić Mencin, Nika Srdarev**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
**Aerobna in glikolitična kapaciteta mišičnih vlaken mišic vitkih in debelih miši**
- 130 | **Nuša Gorišek, Stela Maček**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
**Repozicioniranje terapevtskih učinkovin kot interdisciplinarni pristop k obravnavi in zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojk**
- 131 | **Monika Minjovič**, Gimnazija Bežigrad  
**Vejp: nedolžen trend ali zdravstvena grožnja prihodnosti?**
- 132 | **Vita Žigart Rubelj**, II. gimnazija Maribor  
**Vpliv organskih kislin na hidrolizo škroba**
- 133 | **Kristina Golja**, Gimnazija Tolmin  
**Prehodnost por v kromatografskih nosilcih**
- 134 | **Klara Grantaša, Brina Zver**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer  
**Rezalne deske kot vir mikroplastike**
- 135 | **Ela Marčič**, II. gimnazija Maribor  
**Od vanilije do plastike: Sinteza bio-polimera iz vanilin metakrilata**

- 136 | **Zoja Verbič, Žana Nemec**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
**CO<sub>2</sub> iz tal – skriti vpliv kmetijstva na podnebje**
- 137 | **Lan Dular, Aljaž Maraž, Nejc Murn Blažič**, Gimnazija Ledina  
**Voda ne laže: skriti vzorci uporabe psihoaktivnih snovi**
- 138 | **Živa Avdičaušević**, II. gimnazija Maribor  
**Recikliranje odpadnega celuloznega tekstila z encimsko hidrolizo**
- 139 | **Rika Dolžan, Vida Žemlja, Klara Dolar**, Biotehniški center Naklo  
**Antibiotično in antimikotično delovanje rastlinskih ekstraktov invazivk na povzročitelje bolezni krompirja**
- 140 | **Jan Luka Fatur**, Gimnazija Koper  
**Sinteza in vrednotenje magnetnih mikropalčk železovega oksida s prevleko iz silicijevega dioksida in nanodelci cerijevega dioksida za potencialno uporabo v katalizi**
- 141 | **Lara Marzidovšek, Katarina Šela**, Srednja šola Slovenska Bistrica  
**Elektrokemijska določitev bisfenola S v termo papirju**
- 142 | **Tajda Adrovič Flisar, Brina Vita Mauhar, Žan Hace**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra  
**Vpliv delcev asfalta na rastline graha in kopenske rake mokrice**



## *Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!*

Življenje, v katerem je cilj raziskovati, je lepo, a zahtevno. Raziskovalno delo je namreč vedno povezano z negotovostjo, saj gre za odkrivanje novega, neznanega. Ključ do uspeha pa je vztrajno in sistematično prizadevanje, da spoznanja iz na videz kaotičnega sveta povežemo v oprijemljiv rezultat. Na tej poti med entropičnim stanjem neznanega in ustvarjanjem izdelkov in tehnologij raziskovalci dosegamo cilje, ki smo si jih postavili sami, od nas pa jih pričakuje tudi skupnost. To še posebno drži, ko gre za tako plemenita cilja, kot sta zdravje in kakovostno življenje. Zato jima upravičeno posvečamo svoj čas in energijo, v zameno za to pa smo nagrajeni z zavedanjem, da smo prispevali k nedvomno ključnemu področju človeškega razvoja. Znanost je tudi na tem področju v zadnjih letih dosegla nepričakovane razsežnosti, odprla nam je povsem nove možnosti, vse pa nas postavlja pred zelo zahtevno nalogo: povezati te presenetljive možnosti z oprijemljivimi in tudi koristnimi rezultati. Veseli smo, da ste na tej poti z nami tudi mladi raziskovalci, Krkini nagrajenci. S svojimi deli ste dokazali, da ste pripravljeni na izzive, ki nas čakajo. Prihodnost je bogata s priložnostmi, odkrijte jih!

Dr. Aleš Rotar

*predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad*

*Dear Prize winners,*

A life dedicated to research is fulfilling, yet challenging, as research work, in its quest to unravel the new and the unknown, is inevitably accompanied by uncertainty. The key to success lies in persistent and systematic efforts to transform a multitude of conceptions drawn from what feels like a world of chaos into tangible results. Researchers walk this path from the entropic state of the unknown toward the creation of products and technologies, delivering on both their goals and expectations of the community. This is especially true when the goals are as noble as the pursuit of health and quality of life. Devoting our time and energy to such meaningful pursuits is more than justified – it brings us the satisfaction of knowing that our actions have made a difference in an undeniably vital domain of human development. Science has reached unprecedented dimensions in recent years, offering exciting new opportunities while posing a major challenge: how to translate these exciting possibilities into tangible and useful results. Young researchers and Krka Prize winners, we are pleased that you walk this path alongside us. You have proven by your work that you are well equipped to meet the challenges ahead. The future is full of opportunities. Grasp them fully!

Dr Aleš Rotar  
*President of the Krka Prizes Council*

## KRKINI NAGRAJENCI 2025

### KRKA PRIZE WINNERS 2025

#### VELIKE KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

| Nagrajenec              | Naziv                                      | Mentor, somentor                | Številka |
|-------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|----------|
| <b>Dominik Jankovič</b> | doktor znanosti<br>s področja kemije       | Martin Gazvoda                  | 3196     |
| <b>Anže Zidar</b>       | doktor znanosti<br>s področja farmacije    | Julijana Kristl<br>Matjaž Jeras | 3197     |
| <b>Ana Baumgartner</b>  | doktorica znanosti<br>s področja farmacije | Odon Planinšek                  | 3198     |
| <b>Jaka Dernovšek</b>   | doktor znanosti<br>s področja farmacije    | Tihomir Tomašič<br>Nace Zidar   | 3199     |
| <b>Matic Broz</b>       | doktor znanosti<br>s področja kemije       | Urban Bren                      | 3200     |

#### KRKINE NAGRADE S PRIZNANJEM ZA IZSTOPAJOČE RAZISKOVALNO DELO NAGRAJENCI

| Nagrajenec              | Naziv                | Mentor, somentor                          | Številka |
|-------------------------|----------------------|-------------------------------------------|----------|
| <b>Maja Sever</b>       | doktorica medicine   | Tina Maver                                | 3201     |
| <b>Dominik Škrinjar</b> | doktor medicine      | Tanja Zidarič<br>Lidija Gradišnik         | 3202     |
| <b>Taja Skube</b>       | magistrica farmacije | Robert Roškar<br>Timeja Planinšek Parfant | 3203     |
| <b>Manca Bahor</b>      | magistrica kemije    | Jurij Svete                               | 3204     |



## KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

| Nagrajenec                  | Naziv                                                   | Mentor, somentor                            | Številka |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------|
| <b>Tjaša Felicijan</b>      | doktorica znanosti<br>s področja farmacije              | Marija Bogataj                              | 3205     |
| <b>Jernej Vajda</b>         | doktor znanosti<br>s področja medicinskih ved           | Uroš Maver<br>Boštjan Vihar                 | 3206     |
| <b>Barbara Herlah</b>       | doktorica znanosti<br>s področja farmacije              | Andrej Perdih<br>Izidor Sosič               | 3207     |
| <b>Katja Schoss</b>         | doktorica znanosti<br>s področja farmacije              | Nina Kočevar Glavač<br>Samo Kreft           | 3208     |
| <b>Blaž Grilc</b>           | doktor znanosti<br>s področja farmacije                 | Odon Planinšek                              | 3209     |
| <b>Nika Kučuk</b>           | doktorica znanosti<br>s področja kemijskega inženirstva | Maja Leitgeb<br>Mateja Primožič             | 3210     |
| <b>Nika Strašek Benedik</b> | doktorica znanosti<br>s področja farmacije              | Izidor Sosič<br>Matej Sova                  | 3211     |
| <b>Kaja Kupnik</b>          | doktorica znanosti<br>s področja kemije                 | Maja Leitgeb<br>Mateja Primožič             | 3212     |
| <b>Aljaž Škrjanc</b>        | doktor znanosti s področja kemije                       | Nataša Zabukovec Logar                      | 3213     |
| <b>Lucija Ana Vrščaj</b>    | doktorica znanosti<br>s področja medicinskih ved        | Janja Marc<br>Barbara Ostanek               | 3214     |
| <b>Rok Šmerc</b>            | doktor znanosti<br>s področja elektrotehnike            | Samo Mahnič-Kalamiza                        | 3215     |
| <b>Nina Zupan</b>           | doktorica znanosti<br>s področja farmacije              | Susanne Florin Muschert<br>Emeline Dudognon | 3216     |
| <b>Matevž Turk</b>          | magister kemije                                         | Ksenija Kogej<br>Per Hansson                | 3217     |
| <b>Barbara Šernek</b>       | doktorica medicine                                      | Miran Šebeštjen<br>Tina Levstek             | 3218     |
| <b>Eva Rotar Pucko</b>      | magistrica farmacije                                    | Rok Dreu<br>Zoran Lavrič                    | 3219     |
| <b>Vid Kermelj</b>          | magister kemije                                         | Jernej Iskra<br>Burkhard König              | 3220     |



| Nagrajenec              | Naziv                                          | Mentor, somentor                         | Številka |
|-------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|----------|
| <b>Juš Navratil</b>     | magister farmacije                             | Damijan Knez<br>Anže Meden               | 3221     |
| <b>Sergej Praček</b>    | magister biotehnologije                        | Kristina Sepčič<br>Jerica Sabotič        | 3222     |
| <b>Žiga Gerdina</b>     | magister inženir<br>kemijskega inženirstva     | Polona Žnidaršič Plazl                   | 3223     |
| <b>Jakob Kolar</b>      | magister farmacije                             | Lovro Žiberna<br>Klemen Kirbus           | 3224     |
| <b>Tilen Zorko</b>      | magister kemije                                | Bogdan Štefane                           | 3225     |
| <b>Pia Hrovat</b>       | magistrica kemije                              | Ester Heath<br>Urška Lavrenčič Štangar   | 3226     |
| <b>Benjamin Poljanc</b> | magister kemije                                | Iztok Turel                              | 3227     |
| <b>Martin Rihtaršič</b> | magister kemije                                | Jernej Iskra                             | 3228     |
| <b>Jakob Höfferle</b>   | magister kemije                                | Janez Košmrlj                            | 3229     |
| <b>Urh Bertoncelj</b>   | magister kemije                                | Iztok Turel                              | 3230     |
| <b>Lovro Klenovšek</b>  | magister računalništva in<br>informatike       | Jure Žabkar                              | 3231     |
| <b>Lara Plohl</b>       | magistrica inženirka<br>kemijskega inženirstva | Zoran Novak<br>Milica Pantić             | 3232     |
| <b>Špela Kladnik</b>    | magistrica biokemije                           | Ivana Jovčevska                          | 3233     |
| <b>Neža Štrukelj</b>    | magistrica farmacije                           | Lovro Žiberna<br>Mojca Lunder            | 3234     |
| <b>Žiga Petančič</b>    | magister farmacije                             | Pegi Ahlin Grabnar<br>Monika Prašnikar   | 3235     |
| <b>Zala Čuk</b>         | magistrica farmacije                           | Petra Kocbek<br>Črt Dragar               | 3236     |
| <b>Larisa Knap</b>      | magistrica farmacije                           | Marija Sollner Dolenc<br>Tijana Markovič | 3237     |
| <b>Zala Stopar</b>      | magistrica kemije                              | Gašper Tavčar<br>Andrej Pevec            | 3238     |
| <b>Anja Šenk</b>        | magistrica industrijske farmacije              | Stanislav Gobec<br>Alen Krajnc           | 3239     |

| Nagrajenec              | Naziv                                                  | Mentor, somentor                                                | Številka |
|-------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Polona Kalan</b>     | magistrica molekularne in funkcionalne biologije       | Anja Klančnik                                                   | 3240     |
| <b>Lucija Rus</b>       | magistrica farmacije                                   | Lea Knez<br>Urška Janžič                                        | 3241     |
| <b>Janja Zabukovnik</b> | magistrica industrijske farmacije                      | Igor Locatelli<br>Grzegorz Garbacz                              | 3242     |
| <b>Maja Cvetanoska</b>  | magistrica farmacije                                   | Aleš Berlec<br>Spase Stojanov                                   | 3243     |
| <b>Eva Ravnikar</b>     | magistrica farmacije                                   | Nina Kočevlar Glavač<br>Katja Schoss                            | 3244     |
| <b>Blažka Štefin</b>    | magistrica farmacije                                   | Ana Mitrović                                                    | 3245     |
| <b>Adela Avdičević</b>  | magistrica kemije                                      | Urban Bren<br>Samo Lešnik                                       | 3246     |
| <b>Tinara Šuštarčič</b> | magistrica farmacije                                   | Špela Zupančič<br>Igor Locatelli                                | 3247     |
| <b>Pia Žižek</b>        | magistrica laboratorijske biomedicine                  | Marija Sollner Dolenc<br>Nina Franko                            | 3248     |
| <b>Lamija Ahmetović</b> | univerzitetni diplomirani inženir kemijske tehnologije | Urban Bren<br>Veronika Furlan                                   | 3249     |
| <b>Špela Žunec</b>      | univerzitetna diplomirana kemičarka                    | Helena Prosen<br>Ida Kraševc                                    | 3250     |
| <b>Živa Anderluh</b>    | dijakinja                                              | Janez Mravljak                                                  | 3251     |
| <b>Jošt Dolinar</b>     | dijak                                                  | Alenka Mozer                                                    | 3252     |
| <b>Neža Kuhar</b>       | dijakinja                                              | Mitja Krajnc<br>Helena Bajec                                    | 3253     |
| <b>Maša Pelan</b>       | dijakinja                                              | Marko Jeran<br>Tomaž Prelog<br>Tanja Jesenko<br>Lidija Zavasnik | 3254     |
| <b>Vinko Kosten</b>     | dijak                                                  | Nika Cebin<br>Boštjan Genorio                                   | 3255     |
| <b>Ajk Kalaba</b>       | dijak                                                  | Uroš Ocepek                                                     | 3256     |
| <b>Luka Tomažin</b>     | dijak                                                  | Stana Kovač Hace                                                | 3257     |
| <b>Aljaž Maraž</b>      | dijak                                                  | Nika Cebin                                                      | 3258     |
| <b>Jon Milič</b>        | dijak                                                  | Marija Meznarič<br>Martina Oder                                 | 3259     |



| Nagrajenec                                                           | Naziv                       | Mentor, somentor                                                                 | Številka             |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <b>Emilija Rojnik</b><br><b>Mija Kapun</b>                           | dijakinja<br>dijakinja      | Darja Silan<br>Polona Zalar<br>Martina Turk                                      | 3260<br>3261         |
| <b>Teja Kljun</b>                                                    | dijakinja                   | Špela Tršek<br>Martina Štampar<br>Katja Kološa                                   | 3262                 |
| <b>Neža Botica</b><br><b>Vesna Potočnik</b>                          | dijakinja<br>dijakinja      | Rok Bavdek<br>Katarina Frelih                                                    | 3263<br>3264         |
| <b>Maja Klun</b><br><b>Iza Levstek</b>                               | dijakinja<br>dijakinja      | Barbara Pipan<br>Živa Jurič<br>Zala Bohar<br>Metod Kovačič                       | 3265<br>3266         |
| <b>Sibila Mežnar</b>                                                 | dijakinja                   | Martin Tine Perger<br>Anže Martinčič Celjar                                      | 3267                 |
| <b>Vida Markovič</b><br><b>Zoja Štrubelj</b>                         | dijakinja<br>dijakinja      | Simona Kralj Fišer<br>Tim Prezelj<br>Metod Kovačič                               | 3268<br>3269         |
| <b>Vid Kodrič</b><br><b>Matic Izak</b><br><b>Anika Gregori Kmecl</b> | dijak<br>dijak<br>dijakinja | Helena Potočnik Vičar<br>Jerica Sabotič<br>Nika Zaveršek                         | 3270<br>3271<br>3272 |
| <b>Saša Stanić Mencin</b><br><b>Nika Srdarev</b>                     | dijakinja<br>dijakinja      | Miha Slapničar<br>Nejc Umek                                                      | 3273<br>3274         |
| <b>Nuša Gorišek</b><br><b>Stela Maček</b>                            | dijakinja<br>dijakinja      | Marko Jeran<br>Luka Irenej Pečan<br>Minja Zorc<br>Anja Tanšek<br>Lidija Zavasnik | 3275<br>3276         |
| <b>Monika Minjovič</b>                                               | dijakinja                   | Gregor Križ<br>Metka Novak<br>Martina Štampar                                    | 3277                 |
| <b>Vita Žigart Rubelj</b>                                            | dijakinja                   | Sanja Cvar                                                                       | 3278                 |
| <b>Kristina Golja</b>                                                | dijakinja                   | Milan Ambrožič<br>Jan Damjan Pavlica                                             | 3279                 |
| <b>Klara Grantaša</b><br><b>Brina Zver</b>                           | dijakinja<br>dijakinja      | Marija Meznarič<br>Manca Kovač Viršek                                            | 3280<br>3281         |
| <b>Ela Marčič</b>                                                    | dijakinja                   | Natalija Jančič<br>Muzafera Paljeva                                              | 3282                 |

| Nagrajenec                  | Naziv     | Mentor, somentor         | Številka |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|----------|
| <b>Zoja Verbič</b>          | dijakinja | Rok Mihelič              |          |
| <b>Žana Nemec</b>           | dijakinja | Metod Kovačič            | 3283     |
|                             |           | Ana Schwarzmann          | 3284     |
|                             |           | Sara Mavsar              |          |
| <b>Lan Dular</b>            | dijak     | Nika Cebin               |          |
| <b>Aljaž Maraž</b>          | dijak     | Stana Kovač Hace         | 3285     |
| <b>Nejc Murn Blažić</b>     | dijak     | Uroš Ocepek              | 3286     |
|                             |           | Ana Kroflič              | 3287     |
| <b>Živa Avdičaušević</b>    | dijakinja | Natalija Jančič          |          |
|                             |           | Mojca Poberžnik          | 3288     |
| <b>Rika Dolžan</b>          | dijakinja | Marjetka Kastelic Švab   |          |
| <b>Vida Žemlja</b>          | dijakinja |                          | 3289     |
| <b>Klara Dolar</b>          | dijakinja |                          | 3290     |
|                             |           |                          | 3291     |
| <b>Jan Luka Fatur</b>       | dijak     | Nina Križaj Kosi         |          |
|                             |           | Sebastjan Nemec          | 3292     |
| <b>Lara Marzidovšek</b>     | dijakinja | Damijana Gregorič        |          |
| <b>Katarina Šela</b>        | dijakinja | Kristina Žagar Soderžnik | 3293     |
|                             |           | Neža Sodnik              | 3294     |
| <b>Tajda Adrovič Flisar</b> | dijakinja | Cirila Jeras             |          |
| <b>Brina Vita Mauhar</b>    | dijakinja | Andraž Dolar             | 3295     |
| <b>Žan Hace</b>             | dijak     |                          | 3296     |
|                             |           |                          | 3297     |

## KRKINA PRIZNANJA PREJEMNIKI

| Prejemnik                        | Naziv                                                            | Mentor, somentor              |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Katarina Petra van Midden</b> | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Marina Klemenčič              |
| <b>Anže Ivančič</b>              | doktor znanosti s področja kemije                                | Martin Gazvoda                |
| <b>Iris Šalamon Arčan</b>        | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Alja Videtič Paska            |
| <b>Sara Orehek</b>               | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Iva Hafner Bratkovič          |
| <b>David Lukanović</b>           | doktor znanosti s področja medicinskih ved                       | Borut Kobal<br>Katarina Černe |



| Prejemnik                             | Naziv                                                            | Mentor, somentor                                  |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Jan Gnidovec</b>                   | doktor znanosti s področja kemije                                | Gašper Tavčar                                     |
| <b>Jure Gregorc</b>                   | doktor znanosti s področja kemije                                | Jernej Iskra<br>Thierry Brigaud<br>Grégory Chaume |
| <b>Lara Slavec Janev</b>              | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Ksenija Geršak<br>Nataša Karas Kuželički          |
| <b>Taja Ložar</b>                     | doktorica znanosti s področja medicinskih ved                    | Paul F. Lambert<br>Cvetka Grašič Kuhar            |
| <b>Eva Kočar</b>                      | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Damjana Rozman                                    |
| <b>Tina Levstek</b>                   | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Katarina Trebušak Podkrajšek                      |
| <b>Barbara Čugalj Kern</b>            | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Nataša Bratina<br>Jernej Kovač                    |
| <b>Žana Lovšin</b>                    | doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije | Tadej Kotnik<br>Anja Klančnik                     |
| <b>Živa Pišljar</b>                   | doktorica znanosti s področja medicinskih ved                    | Tanja Jesenko<br>Maja Čemažar                     |
| <b>Samir Salmanov</b>                 | doktor znanosti s področja kemije                                | Mojca Otoničar<br>Danjela Kuščer Hrovatin         |
| <b>Daša Klander</b>                   | magistrica kemije                                                | Janez Košmrlj                                     |
| <b>Neža Kajsner</b>                   | magistrica farmacije                                             | Špela Zupančič<br>Nina Katarina Grilc             |
| <b>Pavle Simić</b>                    | magister inženir živilstva                                       | Nataša Poklar Ulrih<br>Nives Ogrinc               |
| <b>Maj Virant</b>                     | magister inženir biokemijskega inženirstva                       | Urban Bren<br>Veronika Furlan                     |
| <b>Ela Erhatic</b>                    | magistrica farmacije                                             | Lovro Žiberna<br>Igor Locatelli                   |
| <b>Vid Bukovec</b>                    | doktor medicine                                                  | Mateja Starbek Zorko                              |
| <b>Rebeka Kastelic<br/>Anita Tara</b> | študentka medicine<br>študentka medicine                         | Urh Grošelj<br>Jaka Šikonja                       |

| Prejemnik                                         | Naziv                                                           | Mentor, somentor                              |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Nina Bernat</b><br><b>Lara Betocch</b>         | študentka medicine<br>študentka medicine                        | Jure Derganc<br>Špela Zemljič Jokhadar        |
| <b>Nina Milostnik</b>                             | magistrica farmacije                                            | Marija Nika Lovšin                            |
| <b>Sara Bobnar</b>                                | magistrica farmacije                                            | Izidor Sosič                                  |
| <b>Tadej Pirc</b>                                 | magister inženir kemijskega inženirstva                         | Rok Ambrožič                                  |
| <b>Nina Ekart</b>                                 | magistrica farmacije                                            | Joško Osredkar<br>David Drobne                |
| <b>Nina Martinc</b>                               | magistrica kemije                                               | Gregor Marolt                                 |
| <b>Ema Serianz</b>                                | magistra laboratorijske biomedicine                             | Katarina Trebušak Podkrajšek<br>Katja Goričar |
| <b>Milan Krnojelac</b><br><b>Andrea Milaković</b> | študent medicine<br>študent medicine                            | Andreja Nataša Kopitar<br>Mojca Pavlin        |
| <b>Lara Ropič Bizjak</b>                          | univerzitetni diplomirani inženir<br>laboratorijske biomedicine | Tina Kosjek<br>Milena Horvat                  |
| <b>Sara Kodrič</b>                                | magistrica farmacije                                            | Mirjam Gosenca Matjaž<br>Robert Roškar        |
| <b>Luka Podboršek</b>                             | magister farmacije                                              | Damijan Knez<br>Anja Pišlar                   |
| <b>Bor Ivanuš</b>                                 | magister industrijske farmacije                                 | Lea Rems<br>Mounir Tarek                      |
| <b>Nina Ozimič</b>                                | magister ekonomije                                              | Aljoša Valentinčič                            |
| <b>Erazem Bahčič</b>                              | študent medicine                                                | Katarina Trebušak Podkrajšek<br>Tina Levstek  |
| <b>Nika Biškup</b>                                | magistrica laboratorijske biomedicine                           | Alenka Šmid<br>Dunja Urbančič                 |
| <b>Lana Embreuš</b>                               | magistrica kemije                                               | Matjaž Finšgar<br>David Majer<br>Aljaž Šporin |
| <b>Katja Mihalinec</b>                            | magistrica fizioterapije                                        | Renata Vauhnik<br>Carmen Belén Martínez Cepa  |
| <b>Katja Stanovšek</b>                            | magistrica molekularne in<br>funkcionalne biologije             | Maja Čemažar<br>Simona Kranjc Brezar          |
| <b>Armina Rahmanović</b>                          | magistrica kemijskega inženirstva                               | Maša Knez Marevci                             |

| Prejemnik                              | Naziv                                       | Mentor, somentor                                 |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Manca Bregar</b>                    | doktorica medicine                          | Jasna Klen<br>Miha Petrič                        |
| <b>Metka Fišer</b>                     | magistrica farmacije                        | Eva Tavčar<br>Marko Vidak                        |
| <b>Urška Janžič</b>                    | magistrica laboratorijske biomedicine       | Katarina Trebušak Podkrajšek<br>Maruša Debeljak  |
| <b>Laura Martinjak<br/>Žiga Merčun</b> | študentka medicine<br>študent medicine      | Katica Bajuk Studen                              |
| <b>Ana Šijanec</b>                     | magistrica kemije                           | Matevž Pompe                                     |
| <b>Sara Štebe</b>                      | magistrica mikrobiologije                   | Mario Poljak<br>Tomaž Mark Zorec                 |
| <b>Tilen Šimenko Lalič</b>             | magister kemije                             | Helena Prosen                                    |
| <b>Veronika Škrjanc</b>                | Master of Science,<br>Kraljevina Nizozemska | Tanja Jesenko<br>Katarina Žnidar                 |
| <b>Ana Babnik</b>                      | magistrica biokemije                        | Iva Hafner Bratkovič<br>Vera Župunski            |
| <b>Ida Vrščaj</b>                      | magistrica farmacije                        | Nina Kočevlar Glavač<br>Petra Ratajc             |
| <b>Eva Sitar</b>                       | magistrica inženirka živilstva              | Anja Klančnik<br>Jerica Sabotič                  |
| <b>Ela Krnc</b>                        | magistrica farmacije                        | Lovro Žiberna<br>Azra Herceg                     |
| <b>Patricija Lunar<br/>Hana Meglič</b> | študentka medicine<br>študentka medicine    | Miran Šebeštjen<br>Janja Zupan                   |
| <b>Tomaž Nemanič</b>                   | magister družboslovne informatike           | Janez Balkovec                                   |
| <b>Tilen Strmšnik</b>                  | magister farmacije                          | Lovro Žiberna                                    |
| <b>Polona Komel</b>                    | magistrica mikrobiologije                   | Anja Klančnik<br>Tadej Kotnik                    |
| <b>Tjaša Jugović</b>                   | magistrica farmacije                        | Lea Knez<br>Nanča Čebren Lipovec                 |
| <b>Ula Mikoš</b>                       | univerzitetna diplomirana biokemičarka      | Barbara Breznik                                  |
| <b>Lara Šneider</b>                    | diplomirana kozmetologinja                  | Mirjam Gosenca Matjaž<br>Maja Bjelošević Žiberna |

| Prejemnik                            | Naziv                                      | Mentor, somentor                              |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Anja Zaverla</b>                  | univerzitetna diplomirana kemičarka        | Gregor Hostnik<br>Urban Bren<br>Matja Zalar   |
| <b>Martina Mileva</b>                | univerzitetna diplomirana kemičarka        | Helena Prosen                                 |
| <b>Živa Vilfan</b>                   | univerzitetna biotehnologinja              | Monika Novak Babič                            |
| <b>Ana Šmid</b>                      | univerzitetna diplomirana kemičarka        | Ellen Backus                                  |
| <b>Petra Avsenik</b>                 | diplomirana kozmetologinja                 | Tihomir Tomašič<br>Wolfgang Frieß             |
| <b>Ema Prevalšek</b>                 | univerzitetna diplomirana kemičarka        | Urška Lavrenčič Štanger<br>Boštjan Žener      |
| <b>David Ōri</b>                     | diplomirani inženir kemijske tehnologije   | Maša Knez Marevci<br>Taja Žitek Makoter       |
| <b>Adna Begić</b>                    | diplomirana inženirka kemijske tehnologije | Anton Meden                                   |
| <b>Urška Dornik</b>                  | inženirka živilstva in prehrane            | Rosvita Arzenšek Pinter<br>Petra Terpin       |
| <b>Jernej Baša<br/>Jana Agg</b>      | dijak<br>dijakinja                         | Mateja Godec<br>Mira Domjan                   |
| <b>Mia Grčman<br/>Hana Poljak</b>    | dijakinja<br>dijakinja                     | Ester Stajič<br>Tea Gajšek Kodrič             |
| <b>Jan Mihelič</b>                   | dijak                                      | Zorica Potisk<br>Žiga Ogorelec<br>Miha Kavšek |
| <b>Iva Jaklin<br/>Anže Škrget</b>    | dijakinja<br>dijak                         | Nina Žuman                                    |
| <b>Jakob Ritlop<br/>Maj Matjašec</b> | dijak<br>dijak                             | Nina Žuman                                    |
| <b>Ana Krošl</b>                     | dijakinja                                  | Lea Jusufović Glažar<br>Tjaša Drolc           |
| <b>Maks Leon Rogelj</b>              | dijak                                      | Petra Tavčar Verdev<br>Helena Potočnik Vičar  |
| <b>Anika Sever</b>                   | dijakinja                                  | Vera Cunk Manić<br>Alenka Pislak              |
| <b>Urban Komelj</b>                  | dijak                                      | Nina Kostevšek<br>Helena Potočnik Vičar       |

| Prejemnik                                                                                        | Naziv                                | Mentor, somentor                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Anja Koritnik</b>                                                                             | dijakinja                            | Petra Kotnik<br>Anita Mustač                         |
| <b>Maja Satošek</b><br><b>Maja Kitek</b>                                                         | dijakinja<br>dijakinja               | Marko Jeran<br>Maja Ponikvar-Svet<br>Lidija Zavasnik |
| <b>Arina Zhdanova</b>                                                                            | dijakinja                            | Natalija Jančič                                      |
| <b>Gregor Čekada</b><br><b>Niko Nolimal</b>                                                      | dijak<br>dijak                       | Miha Slapničar<br>Janez Mavri                        |
| <b>Ana Kočnar</b><br><b>Metka Velikonja</b>                                                      | dijakinja<br>dijakinja               | Mitja Suvajac<br>Darja Rizmal                        |
| <b>Martin Rus</b><br><b>Zala Hajdič</b><br><b>Aleksander Miha Mihalj</b><br><b>Nik Špoljarić</b> | dijak<br>dijakinja<br>dijak<br>dijak | Sonja Kitak<br>Borut Kosec                           |
| <b>Eva Župevc</b><br><b>Maja Potočnik</b>                                                        | dijakinja<br>dijakinja               | Viktorija Kmetič<br>Mitja Suvajac<br>Darja Rizmal    |
| <b>Taja Leber</b>                                                                                | dijakinja                            | Darja Rizmal<br>Mitja Suvajac                        |
| <b>Neža Čerič</b>                                                                                | dijakinja                            | Helena Bajec<br>Astrid Marovič                       |
| <b>Zala Vaupotič</b><br><b>Lana Rajh</b>                                                         | dijakinja<br>dijakinja               | Nataša Horvatić Dolamič                              |
| <b>Ana Crnogaj</b><br><b>Lara Funtek</b>                                                         | dijakinja<br>dijakinja               | Dorotea Vrbanović Lisac                              |
| <b>Zala Fijavž</b>                                                                               | dijakinja                            | Sebastian Klovar                                     |
| <b>Ana Crnogaj</b>                                                                               | dijakinja                            | Martina Ferenčič                                     |





Krkinge nagrade že od začetka sedemdesetih let prejšnjega stoletja, ko je bilo na pobudo mag. Borisa Andrijaniča v Krkini knjižnici v Ločni podeljenih prvih šest nagrad, razveseljujejo mlade raziskovalce in jih spodbujajo k nadaljnjemu raziskovalnemu udejstvovanju. Od tedaj smo podelili že več kot 3000 nagrad, za katerimi je več tisoč izjemnih posameznikov in nešteto zgodb, ki so pomembno sooblikovale današnji čas.

Ponosni smo, da ob 55. izvedbi Krkingih nagrad te ne le ohranjajo svojo prepoznavnost in veljavo, temveč z vsakim letom, glede na število prispelih nalog in njihovo kakovost, postajajo še pomembnejše znanstveno priznanje. Na letošnji razpis smo prejeli kar 175 nalog, med katerimi so številni raziskovalni presežki. Tudi zato smo se v Svetu Sklada Krkingih nagrad odločili, da poleg petih najprestižnejših velikih Krkingih nagrad, ki jih praviloma prejmejo doktorandi, letos podelimo še tri Krkinge nagrade s priznanjem za izjemno raziskovalno delo. Izbrali smo tri najboljše raziskovalne naloge na diplomski in magistrski ravni, saj je prav v tej skupini največji odziv na razpis.

Veliko število prejetih nalog za ocenjevalce in Znanstveni odbor pomeni odgovornost in obveznost, hkrati pa tudi priložnost, da pridemo do novih spoznanj in idej. Tudi kadar neko raziskovalno področje ni neposredno povezano z našimi aktualnimi izzivi, nam način obravnave in reševanja znanstvenih problemov pogosto odpre nov pogled, ki lahko hitreje vodi do industrijsko uporabne rešitve. Primeri iz bolj in manj oddaljene preteklosti kažejo, da številna najpomembnejša odkritja niso bila zgolj rezultat načrtovanega procesa, temveč tudi splet srečnih naključij. In prav to je tisto, kar sicer sistematično znanost dela skrivnostno, edinstveno in privlačno.

V imenu Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkingih nagrad se zahvaljujem vsem sodelujočim raziskovalcem in njihovim mentorjem ter iskreno čestitam prejemnikom nagrad in priznanj. Naj vas nepredvidljivost narave še naprej navdihuje pri odkrivanju novega.

Doc. dr. Klemen Korasa

*Predsednik Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkingih nagrad*

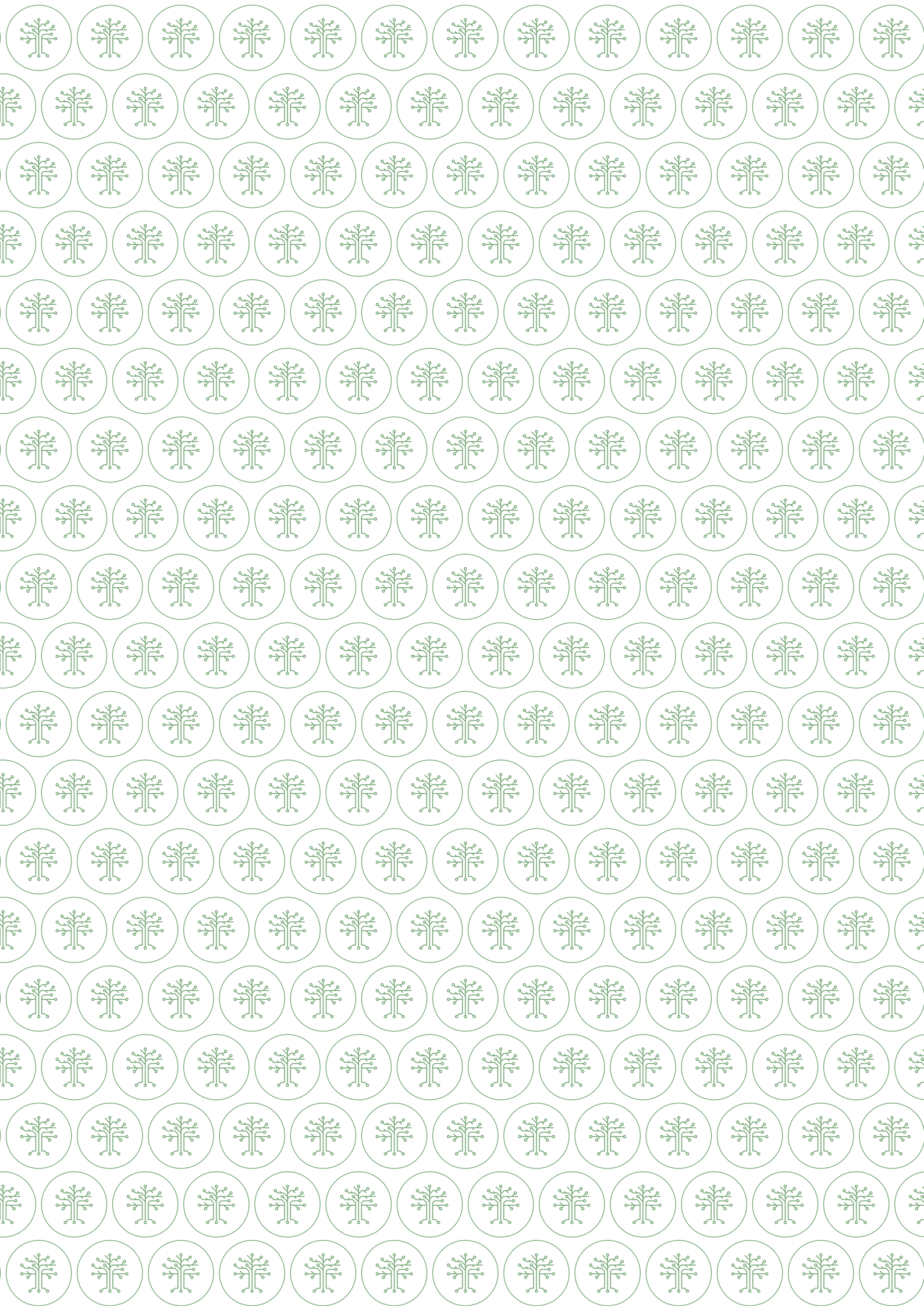
Since the early 1970s, when the first six Krka Prizes were awarded at the Krka Library in Ločna on the initiative of Boris Andrijanič, these prizes have inspired young researchers and encouraged them to continue their pursuit of scientific knowledge. To date, we have presented more than 3,000 Krka Prizes, recognising the contributions of thousands of exceptional researchers whose work has helped shape today's world.

We are proud that the 55th Krka Prizes not only continue to hold their significance, but are increasingly seen as an important scientific distinction, as reflected in the growing number and quality of submitted papers. This year, we received 175 papers, many of which stand out for their research proficiency. The Krka Prizes Council thus decided that this year, alongside the five Grand Krka Prizes generally awarded to doctoral students, we will also present three Krka Special Recognition Prizes for exceptional research work. In this way, we aim to honour outstanding research papers at the undergraduate and master's levels, representing the majority of submissions.

The large number of submitted papers brings both responsibility and commitment for the reviewers and the Scientific Committee, while offering us a valuable opportunity to gain new insights and ideas. Even when the subject matter of a research paper is not directly related to our current challenges, the approaches used to address scientific problems often provide fresh perspectives that can lead to industrially applicable solutions. Examples from both our recent and distant past have shown us that many major discoveries were not solely the result of a planned process, but also the outcome of a chain of fortunate events – making systematic scientific work uniquely mysterious and compelling.

On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council, I would like to express my sincere thanks to all researchers who submitted their papers and their supervisors and congratulate all recipients of this year's Krka prizes and recognitions. May nature's unpredictability continue to inspire your pursuit of scientific discovery.

Assist. Prof. Dr Klemen Korasa  
*President of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council*



# **VELIKE KRKINE NAGRADE**

---

KRKA GRAND PRIZES

**PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV**  
PRIZE WINNERS

# DR. DOMINIK JANKOVIČ

---

Prihaja iz vasice Blatnik pri Črnomlju v Beli krajini. V osnovni šoli je razmišljal o študiju angleščine, a je v srednji šoli hitro spoznal, da je bolj naravoslovec. Prihaja iz družine, v kateri so vse od gradbenih del in prekrivanja streh do popravila motorjev in strojev vedno naredili sami. Tehnična naravnost ga je skoraj prepričala v študij strojništva, a je prevladalo zanimanje za kemijo. Izobraževanje je tako nadaljeval na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, kjer se je med diplomskim, magistrskim in predvsem doktorskim študijem usmeril v organsko kemijo. Po končanem doktoratu na Katedri za organsko kemijo se je zaposlil v Krki v Oddelku za razvoj in raziskave učinkovin.



# Predanost in doslednost sta pot do uspeha

## IZ OSNOVNIH MOLEKUL JE MOGOČE SESTAVLJATI MOLEKULE, KI ZDRAVIJO

Področje mojega raziskovanja je organska kemija – sinteza, analiza in razvoj sinteznih metod in procesov pretvarjanja molekul. Ob prvem srečanju z organsko kemijo v 3. letniku gimnazije me je fasciniralo, kako je mogoče iz osnovnih molekul sestavljati take, ki zdravijo bolezni. Ključen pa je bil sprejem v raziskovalno skupino prof. dr. Janeza Košmrlja na Katedri za organsko kemijo, ki je še okrepil mojo vnemo in v kateri sem pod mentorstvom izr. prof. dr. Martina Gazvode razvijal svoje znanstvenoraziskovalne sposobnosti.

## REŠITEV PROBLEMA TEMPERATURNE OBČUTLJIVOSTI SEDANJIH TERAPEVTSKIH OBLIK INZULINA

V doktorski disertaciji sem se ukvarjal s kovinsko kataliziranimi reakcijami. Razvijali smo nove pretvorbe in pokazali, da je mogoče kovinsko katalizirane reakcije uspešno uporabiti tudi na večjih biomolekulah, kot so peptidi in proteini. Na primeru inzulina smo dokazali, da lahko s takšnimi reakcijami ciljno spreminjamo lastnosti proteinov. Inzulin smo stabilizirali tako, da tudi ob izpostavitvi visokim temperaturam ne razpade in izgubi svoje funkcije, kar bi lahko pomembno prispevalo k reševanju temperaturne občutljivosti sedanjih terapevtskih oblik inzulina, zlasti v nerazvitih državah in zahtevnih logističnih verigah.

## NAJBOLJŠE IDEJE SE PORODIJO, KO STVARI NE POTEKAJO GLADKO

Ko se hipoteza izkaže za napačno ali naletim na nerazložljiv znanstveni problem, se ustavim, poskusim razmisliti zunaj okvirov in poiskati nove rešitve. Takrat se zgodi preblisk, ki vodi do rešitve problema. Najlepši pa so trenutki, ko odkriješ kaj povsem novega – kaj, česar še ni v knjigah ali znanstvenih člankih. Takrat je občutek, da si morda tisti hip edini na svetu s tem svežim znanjem, resnično izjemen.

## MENTOR MI JE POMAGAL ZAČRTATI RAZISKOVALNO POT

Mentor mora študenta usmerjati, mu predajati ideje, ga spodbujati, pohvaliti, včasih tudi kaj kritično komentirati. Ključno pa je, da mu pusti dovolj svobode, da sam razvija svoje zamisli, oblikuje spoznanja in razmišlja zunaj okvirov. Izr. prof. dr. Martin Gazvoda je to zahtevno nalogo opravil odlično. Pretežno je prav on s svojim znanjem, nasveti in podporo zaslužen za moj strokovni in raziskovalni razvoj. Skupaj sva prispevala k številnim znanstvenim dognanjem, objavljenim v več znanstvenih člankih.

## KLJUČNO JE UŽIVATI PRI DELU

Poglobljen doktorski študij zahteva stoodstotno predanost, zato nam velikokrat zmanjka časa za zasebno življenje. Delo težko povsem ločimo od njega, saj je del naše strasti. Zato je ključno, da pri tem uživamo, saj bomo le tako lahko zares uspešni. Prosti čas izkoristim za ohranjanje telesne pripravljenosti – hodim v fitnes in v hribe. Oba hobija delujeta kot nekakšen ventil za sproščanje.

## KARIERA V RAZVOJU SINTEZE V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI

Doktorski študij mi je dal dobro popotnico za delo v razvoju sinteze v farmacevtski industriji. Zdaj kot raziskovalec v Krki delam prav na tem področju ter pri tem nadgrajujem svoje znanje in izkušnje. Na tem področju vidim nadaljevanje svoje kariere in tukaj bi rad svoj potencial usmeril v napredek podjetja. V prihodnosti želim biti tudi mentor mlajših generacij znanstvenikov, voditi raziskovalno ekipo ter deliti svoje znanje in izkušnje.

## UČIM SE OD VSEH LJUDI

Imam jasno vizijo – postavim si cilje in opredelim vmesne korake. Ko se lotim česa, kar se mi zdi pomembno in mi prinaša zadovoljstvo, se temu posvetim in vložim maksimalen trud. Uspeh zame temelji na doslednosti in zanesljivosti, zato se nalog lotevam z vso predanostjo. Držim dano besedo. Učim se od vseh ljudi, ki jih srečam na svoji poti.

## KRKINE NAGRADE SPODBUJAJO ZNANSTVENO ODLIČNOST

Lepo je, da Krka že več kot pol stoletja podeljuje Krkine nagrade in tako spodbuja znanstveno odličnost v Sloveniji.

## PRIDOBITE ČIM VEČ ZNANJA NA SVOJEM PODROČJU

Med raziskovanjem in študijem se čim bolj poglobite in pridobite kar največ znanja in izkušenj, kajti to je temelj, pomemben za nadaljnji karierni razvoj.

## NAJBOLJŠI NASVET

Vsak človek, ki ga srečaš, je učitelj – nekateri pokažejo, kaj si želiš doseči, drugi, kakšen nočeš postati. V obeh primerih lahko najdeš navdih in lastnosti, ki jih pretvoriš v svojo prednost.

## ŽIVLJENJSKO VODILO

*Predanost in doslednost sta pot do uspeha.*

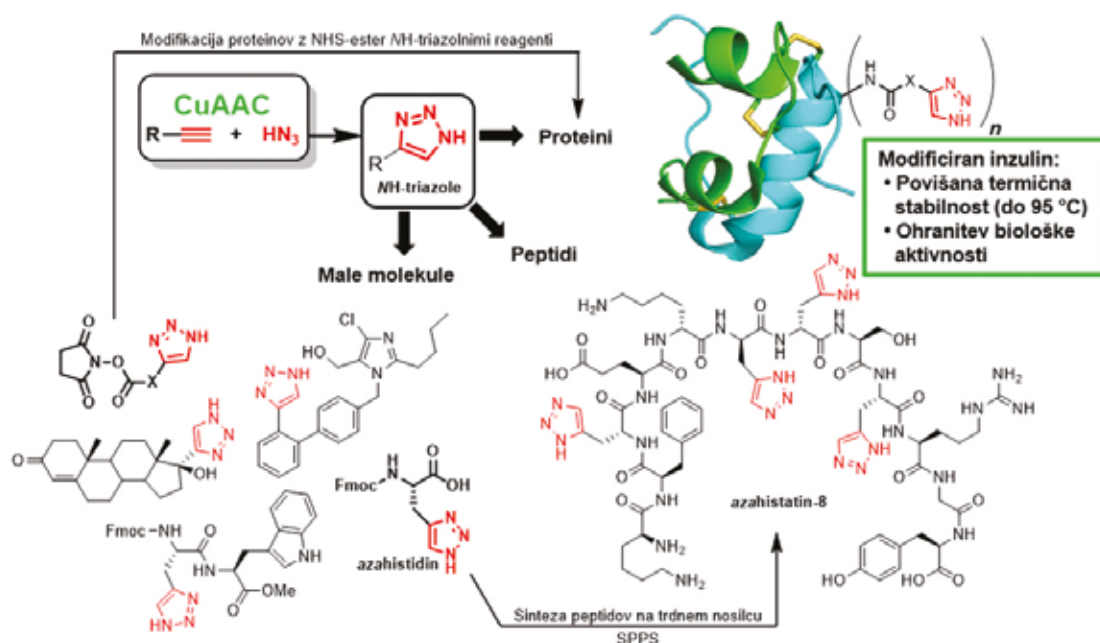


## Razvoj s kovinami prehoda kataliziranih reakcij za selektivne modifikacije biomolekul

S kovinami prehoda katalizirane reakcije so ključno orodje sintezne kemije in imajo široko industrijsko uporabnost, zlasti v farmacevtski sintezi, kar potrjuje tudi več Nobelovih nagrad. Unikatne lastnosti kovin prehoda omogočajo raznovrstne pretvorbe, zato se še danes intenzivno raziskujejo. Čeprav se razvoj zdravilnih učinkovin usmerja h kompleksnejšim molekulam in biološkim zdravilom, za pretvorbe katerih se navadno ne uporabljajo kovinsko katalizirane reakcije, sta njihovi selektivnost in vsestranskost obetaven vir inovacij na tem področju. V okviru doktorskega dela smo razvijali pretvorbe z bakrom, rutenijem in nikljem, pri čemer smo z bakrom katalizirano reakcijo s hidrazojsko kislino ( $\text{HN}_3$ ) uspešno razširili tudi na peptide in proteine.

Z Nobelovo nagrado nagrajeno reakcijo med alkini in azidi CuAAC (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) smo razširili na uporabo  $\text{HN}_3$ . Tako smo razvili reakcijo, ki omogoča enostavno sintezo NH-triazolov. To so imidazolu sorodne heterociklične spojine, ki imajo zaradi dodatnega dušikovega atoma edinstvene lastnosti. Reakcijo smo predstavili na veliko različnih substratih, s čimer smo pokazali njeno uporabnost in selektivnost ob prisotnosti drugih reaktivnih funkcionalnih skupin, ter jo uporabili na zadnji stopnji sintezne poti analoga losartana. Reakcijo smo z uporabo specifičnih kelatnih ligandov optimizirali, da poteka v vodnih medijih pri sobni temperaturi, kar je bil pogoj za prenos reakcije na občutljivejše substrate, kot so peptidi in proteini.

Uvedba NH-triazolnega fragmenta v peptide je bila pokazana na dva načina: z neposredno reakcijo na peptidnih substratih in posredno s sintezo peptidov na trdnem nosilcu (SPPS) z uporabo sintetične aminokisline *azahistidin*. Tako smo pripravili peptid *azahistatin-8*, NH-triazolni analog peptida, ki ima zaradi velikega števila imidazolnih obročev in njihove sposobnosti koordinacije bakrovih ionov v človeški ustni votlini pomembno protimikrobno vlogo ter prispeva k pospešenemu celjenju ran in regeneraciji tkiva. Zamenjava imidazolnih obročev z NH-triazoli poveča afiniteto do bakrovih ionov, kar lahko vodi v še učinkovitejše delovanje teh peptidov.



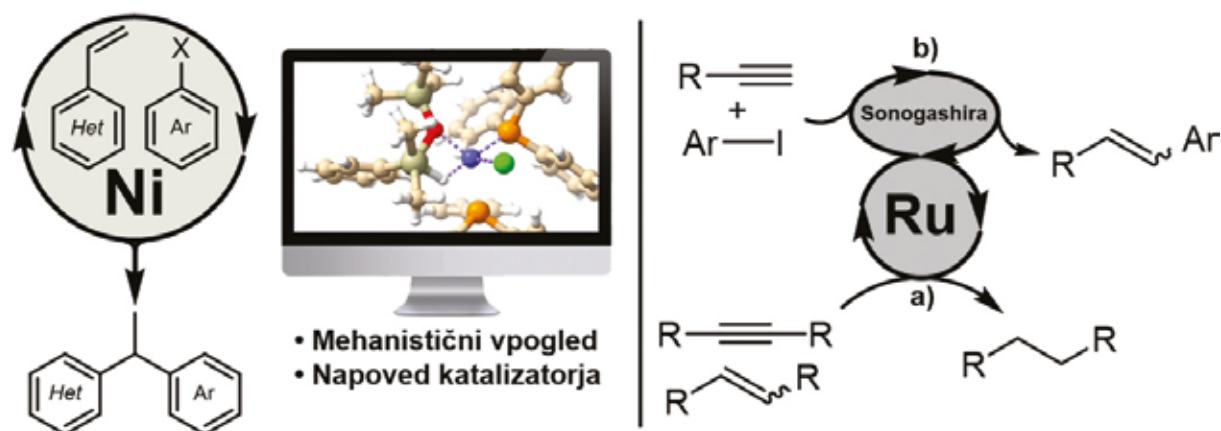
Slika 1. Sinteza NH-triazolov in njihova vgradnja v biomolekule.

Za prenos opisane reakcije na proteine smo v proteinsko strukturo z N-hidroksisukcinimid esterskimi (NHS) reagenti kovalentno uvedli terminalne alkinske ročice. Z uporabo vodnega medija z ustreznim pH smo razvito CuAAC-reakcijo uspešno uporabili za pretvorbo vnesenih alkinskih ročic v NH-triazole. Za spreminjanje lastnosti proteinov smo na opisani način modificirali proteine različne velikosti, med drugim inzulin. Ravno pri njem je bila sprememba proteinskih lastnosti največja, saj se je zaradi uvedbe NH-triazola njegova termična stabilnost močno izboljšala. V sodelovanju z raziskovalci z Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo pokazali, da inzulin kljub kemijski modifikaciji ohranja svojo biološko aktivnost tudi po dolgotrajni izpostavljenosti visokim temperaturam. Termična stabilnost se je najverjetneje izboljšala zaradi dodatka močno koordinativnih NH-triazolov, ki s koordinacijo bakrovih ionov inzulin strukturno stabilizirajo in onemogočijo denaturacijo pri segrevanju.

Glede na potencialno uporabnost NH-triazolov v proteinskih strukturah smo razvili tudi alternativen način njihovega vnosa, in sicer z uporabo NHS-reagentov, funkcionaliziranih z NH-triazoli. Takšni reagenti omogočajo enostavno in učinkovito vključitev NH-triazolnih fragmentov v poljubne proteine, s čimer je celoten postopek bistveno poenostavljen. Tovrsten pristop omogoča pripravo termično stabilnega inzulina v večjem merilu. Izum – termično stabilen inzulin in njegova priprava – je zaščiteno s patentno prijavo.

Ukvarjali se nismo samo z bakrovo katalizo in sintezo NH-triazolov, ampak tudi z razvojem klasičnih kovinsko kataliziranih pretvorb malih organskih molekul, pri čemer smo se omejili na cenejši kovini prehoda – rutenij in nikelj. Razvili smo z nikljem katalizirano reakcijo hidroariliranja stirenov, ki je alternativa obstoječim pristopom s paladijem. Razvoj reakcije je bil zahteven, saj je njen uspeh močno odvisen od reakcijskih pogojev, predvsem od izbire liganda. Učinkovitost reakcije smo prikazali na različnih substratih, pri čemer velja posebno poudariti možnost uporabe aril kloridov, ki so sicer v kovinsko kataliziranih reakcijah običajno nereaktivni, že pri sobni temperaturi. V sodelovanju z raziskovalci s Kemijskega inštituta smo s kvantnomehanskimi izračuni pojasnili mehanizem reakcije, ki je bil v skladu z eksperimentalnimi opažanji. S sodobnimi računalniškimi pristopi teoretične kemije smo razvili računalniški model, ki lahko napove, kateri ligand bo primeren za razvito reakcijo hidroariliranja.

Razvili smo dve z rutenijem katalizirani reakciji hidrogeniranja s katalitskim prenosom vodika: (a) popolno hidrogeniranje alkinov in alkenov v alkane, ki poteka brez visokotlačnih reaktorjev, plinastega vodika in paladijevih katalizatorjev, običajno uporabljenih pri takih transformacijah, ter (b) tandemsko reakcijo Sonogashirovega spajanja in delnega rutenijevega hidrogeniranja, s katero lahko iz široko dostopnih aril jodidov in terminalnih alkinov v eni stopnji pripravimo (E)- ali (Z)-alkene. Združevanje reakcij v t. i. enolončne procese je pomemben korak k bolj trajnostni sintezi. Obe reakciji smo prikazali na veliko raznovrstnih substratih, njihovo uporabnost pa ponazorili s sintezo naravnega produkta moscatilina in protirakave učinkovine combretastatin A4.



Slika 2. Z nikljem katalizirano hidroariliranje stirenov, podprto z naprednimi računalniškimi metodami, in rutenijevo hidrogeniranje alkinov s katalitskim prenosom vodika.

## Development of Transition-Metal-Catalysed Transformations for Selective Modifications of Biomolecules

Transition-metal-catalysed reactions are a key tool in synthetic chemistry with broad industrial applicability, particularly in pharmaceutical synthesis, as evidenced by several Nobel Prizes. The unique properties of transition metals enable diverse transformations, which is why they remain the subject of intensive research. Although drug development is increasingly moving toward more complex molecules and biologics – transformations of which are generally not carried out using metal-catalysed reactions – the selectivity and versatility of these reactions still represent a promising source of innovation in this field. In this doctoral work, we developed transformations with copper, ruthenium, and nickel, and extended the copper-catalysed reaction with hydrazoic acid ( $\text{HN}_3$ ) to peptides and proteins.

We expanded the Nobel Prize winning reaction between terminal alkynes and azides, CuAAC (copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition), to the use of hydrazoic acid ( $\text{HN}_3$ ). In this way, we developed a reaction that enables straightforward synthesis of NH-triazoles – heterocyclic compounds related to imidazole, but with unique properties arising from the presence of an additional nitrogen atom in the ring. We demonstrated the reaction across a broad range of substrates, thereby showing its utility and selectivity in the presence of other reactive functional groups, and applied it in the final step of the synthetic route to a losartan analogue. By employing specific chelating ligands, we optimised the reaction to proceed in aqueous media at room temperature, which was a prerequisite for extending it to more sensitive substrates such as peptides and proteins.

Incorporation of the NH-triazole fragment into peptides was demonstrated in two ways: directly on peptide substrates and indirectly via solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the synthetic amino acid *azahistidine*. In this way, we prepared the peptide *azahistatin-8*, an NH-triazole analogue of a peptide that, owing to its high content of imidazole rings and their ability to coordinate copper ions, plays an important antimicrobial role in the human oral cavity and contributes to accelerated wound healing and tissue regeneration. Replacing imidazole rings with NH-triazoles increases the affinity for copper ions, which can further enhance the biological activity of such peptides.

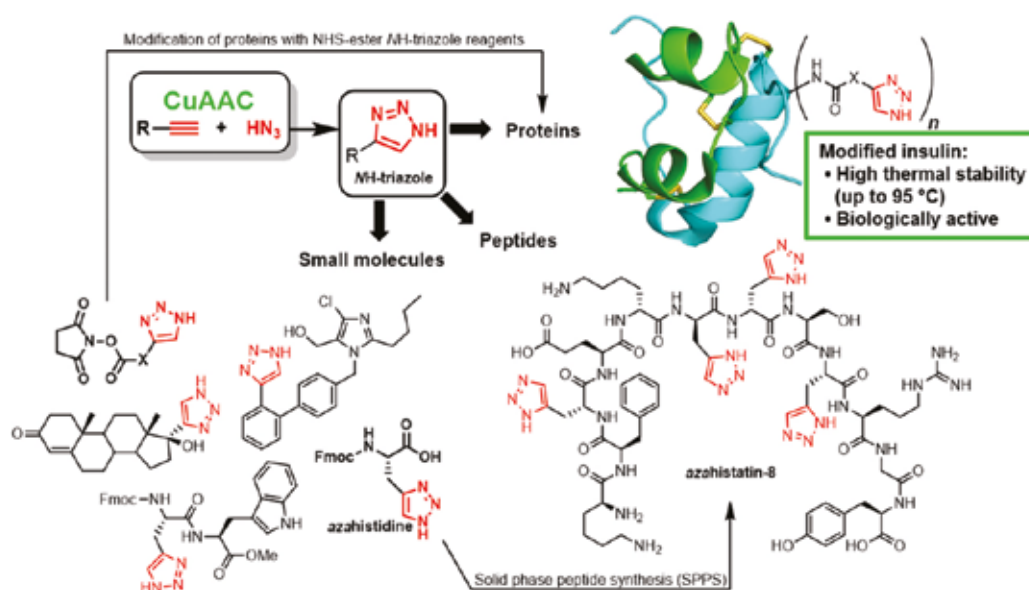


Figure 1. Synthesis of NH-triazoles and their incorporation into biomolecules.

To transfer the described reaction to proteins, we first introduced terminal alkyne handles into protein structures covalently, using N-hydroxysuccinimide ester (NHS) reagents. Under aqueous conditions at an appropriate pH, we then successfully applied the developed CuAAC reaction to convert the introduced alkyne handles into *NH*-triazoles. Using this approach, we modified proteins of various sizes to tailor and improve their functional properties. The most pronounced effect was observed with insulin, where introduction of *NH*-triazoles led to a significant increase in thermal stability. In collaboration with researchers from the Faculty of Medicine, University of Ljubljana, we demonstrated that insulin retains its biological activity even after prolonged exposure to elevated temperatures. The increase in thermal stability is most likely due to the strong coordination ability of *NH*-triazoles, which stabilise the insulin structure through copper binding and thereby prevent denaturation upon heating.

Given the potential utility of *NH*-triazoles in protein structures, we also developed an alternative strategy for their introduction, namely the use of NHS reagents functionalised with *NH*-triazoles. These reagents enable simple and efficient incorporation of *NH*-triazole fragments into virtually any protein, thereby greatly simplifying the overall process. This approach allows the preparation of thermally stable insulin on a larger scale. The invention of thermally stable insulin and its preparation method has been protected by a patent application.

In addition to copper catalysis and the synthesis of *NH*-triazoles, we also focused on developing classical transition-metal-catalysed transformations of small organic molecules, limiting our efforts to more cost-effective transition metals, namely ruthenium and nickel. We developed a nickel-catalysed hydroarylation of styrenes that provides an alternative to existing palladium-based methods. The development of this reaction was challenging, as its success strongly depends on the reaction conditions, particularly the choice of the ligand. We demonstrated the efficiency of the reaction on a range of substrates, including aryl chlorides at room temperature, which are otherwise typically unreactive in metal-catalysed reactions. In collaboration with researchers at the National Institute of Chemistry, we elucidated the reaction mechanism using quantum-mechanical calculations, which were consistent with experimental observations. Furthermore, by employing modern computational approaches in theoretical chemistry, we developed a predictive model capable of identifying suitable ligands for the newly developed hydroarylation reaction.

We developed two ruthenium-catalysed transfer hydrogenation reactions: (a) complete hydrogenation of alkynes and alkenes to alkanes, which proceeds without the need for high-pressure reactors, gaseous hydrogen, or palladium catalysts typically employed in such transformations, and (b) a tandem Sonogashira coupling and partial ruthenium-catalysed transfer hydrogenation, enabling the one-step conversion of readily available aryl iodides and terminal alkynes into either (*E*)- or (*Z*)-alkenes. The integration of reactions into such 'one-pot' processes is an important step toward more sustainable synthesis. Both reactions were demonstrated on a broad range of substrates, and their utility was exemplified by the synthesis of the natural product moscatilin and the anticancer agent combretastatin A4.

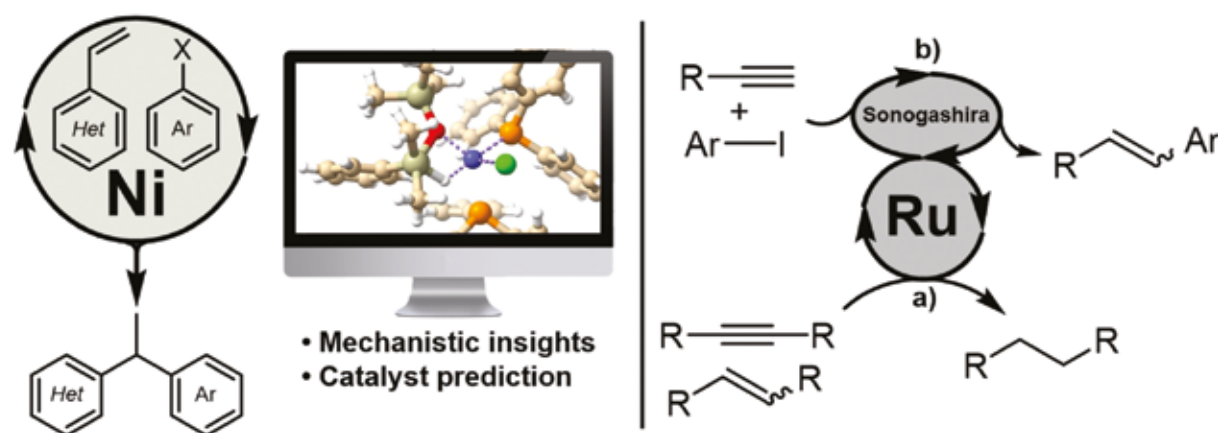


Figure 2. Nickel-catalysed hydroarylation of styrenes supported by advanced computational methods, and ruthenium-catalysed transfer hydrogenation of alkynes.

# DR. ANŽE ZIDAR

---

Vedno je želel priti stvarjem do dna, kar pa se ni vedno najbolje končalo, še posebno ne takrat, ko je poskušal odpreti baterijo, da bi videl njeno notranjost. Obiskoval je Gimnazijo Bežigrad v Ljubljani, ki jo je leta 2013 končal kot zlati maturant. V gimnazijskih letih se je redno udeleževal naravoslovnih tekmovanj in prejel več priznanj. Zanimanje za kemijo, biologijo in fiziko ga je nato usmerilo v študij farmacije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Med študijem je bil dejaven tudi v študentskem društvu, kjer je dobil dragocene izkušnje in dobre prijatelje. Leta 2019 je z odliko (*cum laude*) končal študij, se vpisal na doktorski študij in postal asistent za nanotehnologijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, kjer je zaposlen še danes.



# Že od malega me je zanimalo, kako stvari delujejo

## PRIVLAČIJO ME NAPREDNE TEHNOLOGIJE

Na mojem raziskovalnem področju se prepletata nanotehnologija in imunologija. Pri svojem delu se posvečam raziskovanju, kako nanomateriali vplivajo na imunski sistem in kako jih je mogoče oblikovati tako, da prinašajo čim več koristi ob čim manjšem tveganju za bolnika.

## REZULTATI RAZISKAVE UTIRAJO POT RAZVOJU INOVATIVNIH MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV

Glavna ugotovitev mojega raziskovalnega dela je, da so nanovlakna izjemen lokalni dostavni sistem za učinkovine in probiotike in da je pomemben vidik njihove klinične uporabnosti njihova imunološka varnost. Prav tako smo razvili nov model za imunološko testiranje nanovlaken *in vitro*, ki omogoča bolj ponovljive in zanesljivejše rezultate.

## ŽELJA PO NOVEM ZNANJU IN GLOBLJEM RAZUMEVANJU

Najbolj me navdihuje želja po novem znanju, novih spoznanjih in globljem razumevanju. Najboljše ideje in rešitve, ki bi jih lahko uporabil pri delu ali hobijih, se mi pogosto utrnejo, tik preden zaspim. Ko se to zgodi, navdušenje prežene spanec do poznih nočnih ur.

## DRAGOCENI NASVETI IN STROKOVNE RAZPRAVE

Mentor je tisti, ki raziskovalca usmerja, spodbuja in mu pomaga premagovati izzive. To sem jasno spoznal tudi pri svoji mentorici, zaslužni profesorici dr. Julijani Kristl, mag. farm., in somentorju, prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. Oba sta me ves čas spodbujala, mi dajala dragocene nasvete in z menoj razpravljala o idejah ter tako prispevala k smeri moje raziskovalne poti.

## RAVNOVESJE MED POKLICNIM IN ZASEBNIM ŽIVLJENJEM MI POMAGAJO OHRANJATI NAJBLIŽJI

Znanstvenoraziskovalno delo zahteva veliko časa in predanosti, zato je nujno prilagajanje urnika in ohranjanje ravnovesja med poklicnim in zasebnim življenjem, pri čemer mi pomagajo najbližji. Prosti čas najraje namenim dejavnostim v naravi, kot so kolesarjenje in izleti v gore, ter druženju s prijatelji, ki mi dajejo energijo in pogosto tudi nove ideje.

## RAZVOJ APLIKATIVNE REŠITVE ZA PREPREČEVANJE VNETHA DLESNI

Po doktoratu se je moja raziskovalna pot usmerila v razvijanje aplikativne rešitve za preprečevanje vnetja dlesni in parodontoze, ene najpogostejših bolezni sodobnega časa. Razvijamo oblogo iz nanovlaken, ki bo hkrati lajšala vnetje dlesni in zavirala rast patogenih bakterij. S tem bomo znanstvene dosežke pretvorili v učinkovite, kakovostne in varne izdelke za oralno zdravje ljudi.

## SEM RADOVEDEN, VZTRAJEN IN USTVARJALEN

Radovednost me žene k temu, da vedno iščem nova vprašanja in rešitve, zaradi vztrajnosti pa se tudi ob neuspehih ne ustavim, temveč jih vzamem kot izkušnjo za naprej. Rad razmišljam zunaj ustaljenih okvirov, kar mi pogosto pomaga do novih idej in pristopov pri raziskovanju.

## KRKINA NAGRADA JE PRIZNANJE IN SPODBUDA

Krkine nagrade zagotavljajo izjemno podporo raziskovalnemu delu mladih, kar nam daje dodatno motivacijo za predstavitev raziskav širši javnosti. Krkina nagrada ne pomeni le priznanja za vloženo delo, temveč tudi spodbudo za nadaljnje raziskovanje.

## OSTANITE RADOVEDNI IN SE NE BOJTE NEUSPEHOV

Ohranite radovednost, saj je prav ta največja gonilna sila znanosti. Ne bojte se neuspehov, saj so ključni del življenja in pogosto vodijo do najboljših idej in osebnosti rasti. Naj vas pri delu vodi misel, da raziskave niso same sebi namen, ampak pravi smisel dobijo šele takrat, ko jih iz laboratorija spravimo med ljudi.

## NAJBOLJŠI NASVET

Meri na luno. Tudi če zgrešiš, boš pristal med zvezdami.

## ŽIVLJENJSKO VODILO

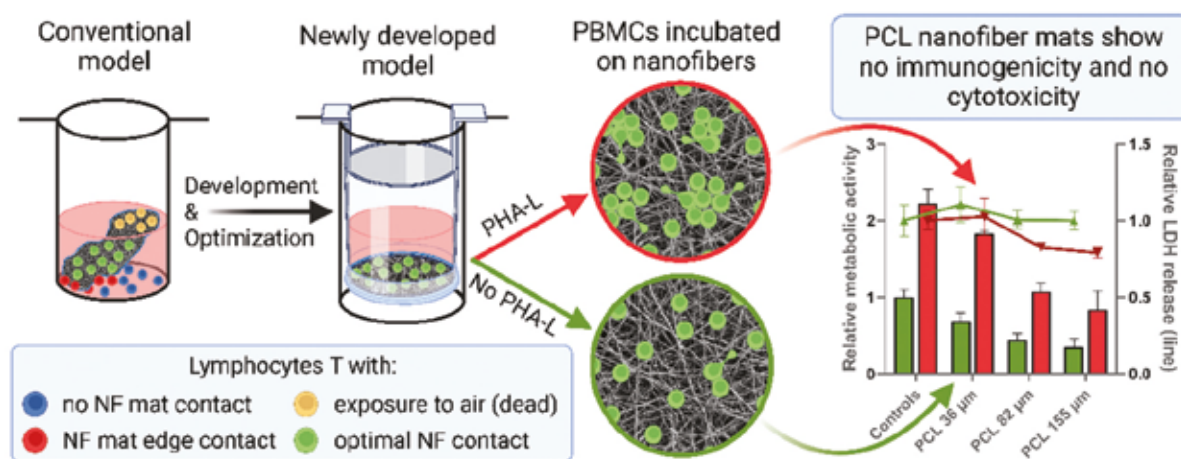
»Človek, ki premakne goro, začne z odnašanjem majhnih kamnov.« Konfucij



## Razvoj terapevtskih nanovlaken in vrednotenje njihove imunogenosti *in vitro*

V zadnjem desetletju se je nanotehnologija uveljavila kot eno ključnih raziskovalnih področij v biomedicini, kjer se nanomateriali vse pogostejše uporabljajo za razvoj naprednih dostavnih sistemov, diagnostičnih pripomočkov in tkivnih nadomestkov. Med njimi so še posebno zanimiva nanovlakna, saj omogočajo prilagajanje številnih raznovrstnih fizikalno-kemijskih lastnosti, imajo veliko specifično površino in omogočajo vgradnjo različnih bioaktivnih molekul. Kljub obetavnim lastnostim pa ostajata njihova varnost in vpliv na imunski sistem še vedno premalo raziskana, kar pomembno ovira njihov prenos v klinično prakso. V okviru doktorskega dela smo zato razvili zanesljiv celični model *in vitro* ter z njim ovrednotili vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti nanovlaken na imunske celice, nato pa smo pripravili še nanovlakna za lokalno dostavo imunomodulatorne učinkovine in probiotikov.

Konvencionalne metode testiranja vpliva nanovlaken na imunske celice so se izkazale za nezanesljive, saj temeljijo na modelih, razvitih za nanodelce in molekule. Ti modeli ne upoštevajo, da imajo nanovlakna dvodimenzionalno geometrijo v obliki membrane in se zato ne razporedijo homogeno po mediju kot nanodelci, posledica česar so zelo variabilni in slabo ponovljivi rezultati. Da bi premostili to težavo, smo razvili nov celični model na osnovi prirejenih vstavkov CellCrown™, ki omogočajo pripravo standardizirane testne površine, preprečujejo stik celic z robovi membran iz nanovlaken in zagotavljajo neprekinjen stik celic z materialom med inkubacijo celic na nanovlaknih (slika 1). Model smo dodatno optimizirali, kar je omogočilo robustnejše in bolj ponovljive rezultate kot pri konvencionalnem modelu.

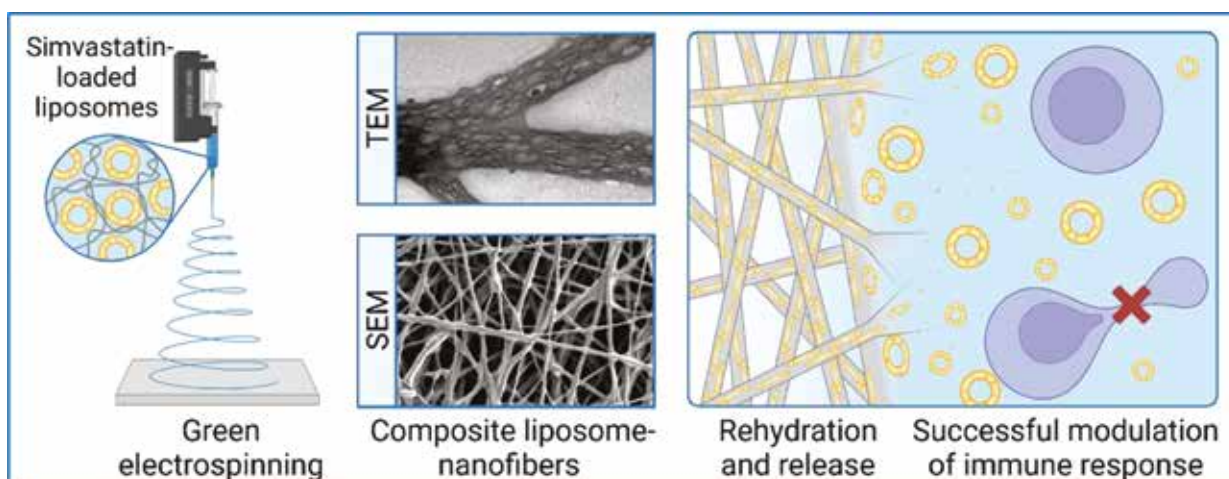


Slika 1. Shematski prikaz omejitev klasičnih modelov, prednosti novega celičnega modela in uporabljenih metod za določanje imunskega odziva na membrane iz nanovlaken (Zidar et al. International Journal of Pharmaceutics, 2024).

S tem novim modelom smo sistematično proučili vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti membran iz nanovlaken na imunske celice, in sicer na mononuklearne celice periferne krvi in na dendritične celice. Testirali smo membrane iz polikaprolaktona (PCL), kombinacije alginata in polietilenoksida (ALG, PEO), hitosana s polietilenoksidom (CS, PEO) in zeina s polivinilpirolidonom (zein, PVP). Dokazali smo, da je kemijska sestava ključna za imunogenost oziroma imunomodulacijo, pri čemer so bile membrane iz PCL ter ALG in PEO imunsko nevtralne, medtem ko so membrane iz zeina in PVP kazale znake potencialne imunogenosti, kar smo pripisali proteinski naravi zeina. Pri membranah iz CS in PEO smo opazili zmanjšano metabolično aktivnost, verjetno zaradi povečane viskoznosti v neposredni okolici celic, ki je posledica

raztapljanja PEO. Podobno smo zaznali tudi pri dendritičnih celicah, kjer so membrane iz PCL, CS in PEO ter zeina in PVP izrazito vplivale na njihovo zorenje in funkcijo, medtem ko so se membrane iz ALG in PEO izkazale kot najbolj nevtralne. Med fizikalnimi lastnostmi so imele največji vpliv na imunske celice debelejšje membrane, sledila je velikost por, najmanjši vpliv pa je imel premer posameznih vlaken. Učinek debelejših membran z večjimi porami smo pripisali temu, da so se celice pogosto ujele v notranjost strukture, kar je zaviralo njihovo rast in razmnoževanje ter zmanjševalo metabolično aktivnost.

V prejšnjih eksperimentih smo pokazali, da so membrane iz nanovlaken ALG in PEO najbolj imunsko nevtralne, zato smo jih uporabili kot osnovo za razvoj dostavnih sistemov za imunomodulatorno učinkovino in probiotike. Najprej smo se osredotočili na simvastatin, ki je znan po zniževanju holesterola, potrjeno pa je tudi njegovo protivnetno delovanje. Njegovo terapevtsko uporabo omejujeta zelo slaba topnost in nizka stabilnost v vodnem okolju, zato smo ga vgradili v liposome in jim za dodatno stabilizacijo dodali antioksidant butiliran hidroksianizol (slika 2). Rezultati so pokazali, da membrane iz nanovlaken z vgrajenimi liposomi izboljšajo topnost in stabilnost simvastatina, omogočajo podaljšano sproščanje učinkovine na terapevtskem območju in ohranjajo visoko učinkovitost v celičnem modelu. Taka formulacija omogoča doseganje lokalne terapevtske koncentracije že z zelo majhno količino materiala, kar je pomembna prednost pri klinični uporabi, zlasti pri zdravljenju parodontalne bolezni in kroničnih ran.



Slika 2. Shematski prikaz izdelave nanovlakenskih membran z vgrajenimi liposomi in simvastatinom ter rehidracije in sproščanja liposomov, ki omogočajo uspešno modulacijo imunskega odziva (Zidar et al. *Pharmaceutics* 2023).

Nazadnje smo razvili membrane iz nanovlaken, v katere smo uspešno vgradili spore probiotičnih sevov *Bacillus* z imunomodulatornimi lastnostmi. Ugotovili smo, da elektrostatsko sukanje ne vpliva niti na preživetje spor niti na njihovo imunomodulatorno delovanje. Tako pripravljen dostavni sistem bi se lahko uporabljal za lokalno nadomeščanje koristnih bakterij na prizadetem mestu, kot je pogosto potrebno pri parodontalni bolezni, ter s tem prispeval k zmanjšanju vnetja in spodbujanju regeneracije tkiva.

Rezultati raziskovalnega dela pomembno prispevajo k razumevanju razvoja lokalnih dostavnih sistemov iz nanovlaken za dostavo učinkovin in probiotikov, še posebno z vidika njihovih interakcij z imunskimi celicami. Razviti celični model *in vitro* omogoča zanesljivejše vrednotenje vplivov nanovlaken in drugih materialov z 2D-strukturo, kar je pomembno orodje za prihodnje raziskave. Dokazali smo, da je pri načrtovanju dostavnih sistemov nujno upoštevati fizikalno-kemijske lastnosti nanovlaken, saj te bistveno vplivajo na imunski odziv. Poleg tega smo razvili dva nova dostavna sistema iz imunološko varnih alginatnih nanovlaken, enega z imunomodulatorno učinkovino in drugega s probiotiki. S tem smo dopolnili znanje o varnosti in učinkovitosti nanovlaken ter tlakovali pot njihovi nadaljnji uporabi v biomedicini, ki jo tudi sami razvijamo naprej. Kot neposreden rezultat raziskav se je pokazala priložnost za razvoj izdelka iz nanovlaken, namenjenega reševanju realnih težav ljudi z gingivitisom in začetnim parodontitisom. Izkoristili smo jo, izdelek pa se še razvija.

## Development of Therapeutic Nanofibers and *In Vitro* Evaluation of Their Immunogenicity

Over the past decade, nanotechnology has emerged as one of the key research fields in biomedicine, with nanomaterials increasingly being used in the development of advanced delivery systems, diagnostic tools, and tissue substitutes. Among them, nanofibers are particularly attractive as they allow the modification of a wide range of physicochemical properties, offer a large specific surface area, and enable the incorporation of diverse bioactive molecules. Despite these promising features, the safety of nanofibers and their impact on the immune system remain poorly understood, significantly hindering their translation into clinical practice. In this doctoral work, we developed a reliable *in vitro* cell model that enabled us to evaluate the influence of the physicochemical properties of nanofiber membranes on immune cells, and we also designed nanofibers for the local delivery of an immunomodulatory drug and probiotics.

Conventional methods for testing the effects of nanofibers on immune cells have proven unreliable, as they are often based on approaches originally developed for nanoparticles or molecules. These models do not take into account that nanofibers possess a two-dimensional geometry in the form of membranes and, unlike nanoparticles, do not distribute homogeneously in the medium. This leads to highly variable and poorly reproducible outcomes. To address this limitation, we developed a novel cell model based on modified CellCrown™ inserts, which provide a standardised test surface, prevent cell contact with the edges of nanofiber membranes, and ensure continuous contact between cells and the material throughout the experiment (Figure 1). We further optimised the model, which enabled more robust and reproducible results compared to conventional approaches.

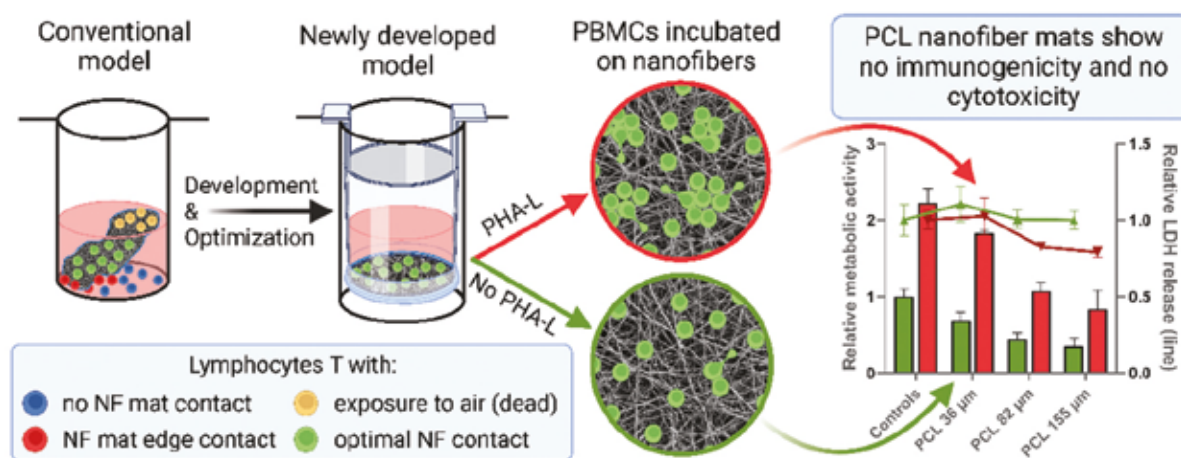


Figure 1. Schematic illustration of the limitations of conventional models, the advantages of the newly developed cell model, and the methods used to assess the immune response to nanofiber membranes (Zidar et al. International Journal of Pharmaceutics 2024).

Using the new model, we systematically studied the impact of the physicochemical properties of nanofiber membranes on peripheral blood mononuclear cells and dendritic cells. We tested membranes composed of polycaprolactone (PCL), alginate with polyethylene oxide (ALG/PEO), chitosan with polyethylene oxide (CS/PEO), and zein with polyvinylpyrrolidone (zein/PVP). We demonstrated that chemical composition was the key determinant of immunogenicity or immunomodulation: PCL and ALG/PEO membranes were immunologically neutral, whereas zein/PVP membranes showed signs of potential immunogenicity, most

likely due to the protein nature of zein. In CS/PEO membranes, we observed reduced metabolic activity, probably caused by increased viscosity in the immediate cell environment due to PEO dissolution. Similar trends were observed in dendritic cells, where PCL, CS/PEO, and zein/PVP membranes strongly affected their maturation and function, while ALG/PEO membranes proved to be the most neutral. Among the physical properties, membrane thickness had the greatest influence on immune cells, followed by pore size, while fiber diameter had the smallest effect. The impact of thicker membranes with larger pores was likely due to cells becoming trapped within the nanofiber mesh, which inhibited their proliferation and reduced metabolic activity.

In previous experiments, we demonstrated that ALG/PEO nanofiber mats were the most immunologically neutral, and we then employed them as a platform for developing local delivery systems for an immunomodulatory drug and probiotics. We first focused on simvastatin, a drug primarily known for lowering cholesterol; however, it was also confirmed to have anti-inflammatory effects. Its therapeutic use is limited by very poor solubility and low stability in water; therefore, we incorporated it into liposomes and added the antioxidant butylated hydroxyanisole for additional stabilisation. The results showed that nanofiber membranes containing liposomes with simvastatin improved its solubility and stability, provided sustained release within the therapeutic range, and maintained high efficacy in the cell testing. This formulation enabled the achievement of local therapeutic concentrations with small amounts of material, which is a major advantage for clinical applications, particularly in the treatment of periodontal disease and chronic wounds.

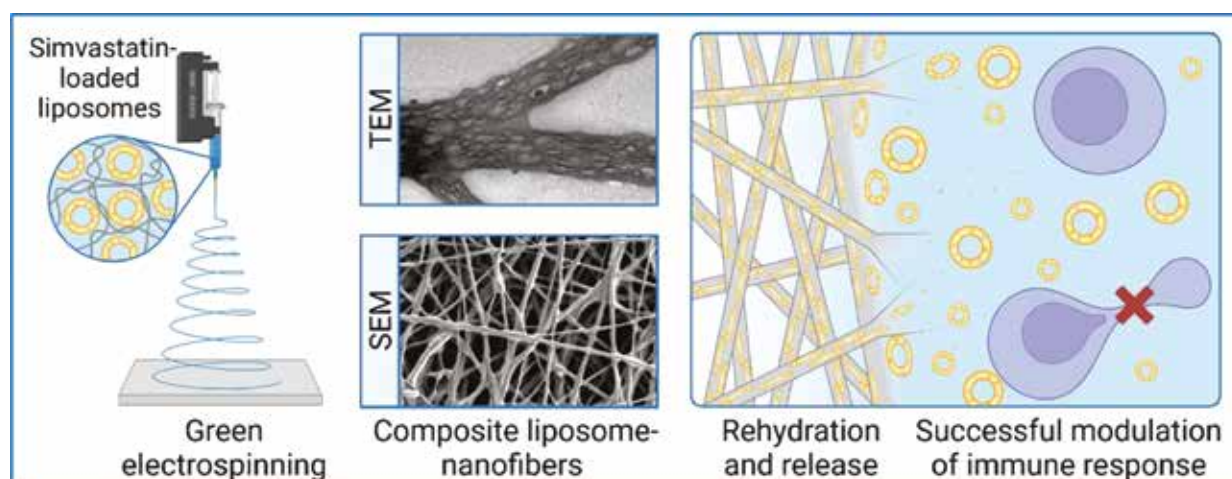


Figure 2. Schematic representation of the preparation of nanofiber membranes incorporating simvastatin-loaded liposomes, followed by rehydration and release of liposomes, enabling successful modulation of the immune response (Zidar et al. *Pharmaceutics* 2023).

Finally, we developed nanofiber membranes containing spores of the probiotic strains *Bacillus* with immunomodulatory properties. We found that the electrospinning did not affect either spore viability or their immunomodulatory activity. Such a delivery system could help replenish beneficial bacteria at the site of disease, as is often required in periodontal conditions, thereby helping to reduce inflammation and promote tissue regeneration.

The results of this research make an important contribution to the understanding of local nanofiber-based delivery systems for drugs and probiotics, particularly in terms of their interactions with immune cells. The developed *in vitro* cell model provides a more reliable tool for evaluating the effects of nanofibers and other 2D-structured materials, offering a valuable platform for future studies. We demonstrated that the physicochemical properties of nanofibers must be carefully considered when designing delivery systems, as they strongly influence immune responses. In addition, we developed two novel delivery systems based on alginate nanofibers, one for a small drug and the other for probiotics. These findings expand current knowledge on the safety and efficacy of nanofibers and pave the way for their broader biomedical application, which we continue to develop further. As a direct outcome of this work, a new opportunity has emerged for the development of a nanofiber-based product for addressing real clinical challenges associated with gingivitis and early-stage periodontitis, which is currently under development.

# DR. ANA BAUMGARTNER

---

Prihaja iz Ljubljane, kjer živi že vse življenje. Po gimnaziji se je vpisala na Fakulteto za farmacijo, kjer je leta 2020 magistrirala in še istega leta kot mlada raziskovalka začela doktorski študij. Septembra letos se je zaposlila v uredništvu Državne založbe Slovenije kot urednica za naravoslovna gradiva. Že v otroštvu se je rada učila, zanimalo jo je veliko stvari. Vedno je imela pozitiven odnos do šole, pa ne le do naravoslovnih, temveč do vseh predmetov. V devetem razredu je prvič pripravila raziskovalno nalogo iz kemije in že takrat jo je raziskovanje zelo pritegnilo.



# Zaupajte svojim idejam in odločitvam

## FARMACEVTSKE OBLIKE, KI BOLNIKOM OLAJŠAJO JEMANJE ZDRAVIL

Najprej sem se ukvarjala s farmacevtsko tehnologijo, predvsem z načrtovanjem farmacevtskih oblik, ki bolnikom olajšajo jemanje zdravil, in z analiznimi metodami za vrednotenje trdnih snovi. Farmacevtska tehnologija me je zanimala že med študijem, na študijski izmenjavi na Finskem pa sem imela pod mentorstvom dr. Leene Peltonen priložnost delati raziskovalno nalogo iz nanotehnologije. Takrat sem se odločila, da bo moja magistrska naloga s področja tehnologije, in nato so stvari same od sebe šle v to smer. V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali s tem, kako stroškovno učinkovito izdelati farmacevtske oblike z izboljšanimi lastnostmi raztapljanja učinkovine, ki bodo bolnikom olajšale jemanje. Izdelali smo nov material, ki je dobro pretočen in zato primeren za tabletiranje. Vanj smo vgradili fenofibrat, ki se je raztapljal hitreje kot v svoji prosti, kristalni obliki, nazadnje pa smo ta material uporabili za izdelavo orodisperzibilnih tablet, ki jemanje olajšajo predvsem otrokom in starejšim. Tako smo razvili pristop, ki hkrati rešuje dva izziva farmacevtskega razvoja (slabo topnost tablet in nesodelovanje bolnikov pri zdravljenju) in ki bi lahko postal podlaga tudi za druge učinkovine, s katerimi se še nismo ukvarjali. Model še ni bil klinično preizkušen.

## NENEHNO ODKRIVANJE NOVIH IZZIVOV

Všeč mi je, da je znanstvenoraziskovalno delo zelo raznoliko in da nenehno odkrivaš nove izzive, ki te presenetijo. Večino idej dobim, ko sem športno aktivna in ko so moje misli kje drugje.

## PODPORA IN PROSTE ROKE

Pri znanstvenoraziskovalnem delu je mentor zelo pomemben. Imela sem izjemnega mentorja, ki mi je zelo ustrezal kot znanstvenik in človek. Prof. dr. Odon Planinšek je verjetno najbolj inovativen človek, ki sem ga spoznala, ves čas se mu rojevajo nove, zanimive ideje, kar je za nas mlade sodelavce zelo navdihujoče. Poleg tega sem se z njim lahko pogovarjala tudi o stvareh, ki niso povezane z znanostjo, kar prav tako zelo cenim. Ves čas doktorata mi je pomagal pri delu, kadar sem to potrebovala, hkrati pa mi puščal dovolj proste roke, da sem se počutila samostojno in vredno zaupanja.

## ZNAM SE TUDI ODKLOPITI OD DELA

Za duševno zdravje je ključno, da se znaš odklopiti od dela. Svoj prosti čas večinoma preživljam v hribih, ukvarjam se s plezanjem in alpinizmom, kar je pomemben del moje identitete, tu imam tudi največ prijateljev. Ta aktivnost terja veliko časa in energije, te pa imam na srečo več kot dovolj.

V zadnjem obdobju se ukvarjam s tem, kako naravoslovne vede približati učencem in dijakom, jih narediti razumljive in zanimive. Upam, da bom uspešna tudi na tem področju.

## RAVNAM SE PO SEBI IN SVOJIH PREPRIČANJIH

Sem zelo vztrajna, brez te lastnosti verjetno ne bi nikamor prišla. Ravnam se po sebi in svojih prepričanjih, ne po tem, kar od mene pričakujejo drugi, in stojim za tem, kar rečem. To mi včasih koristi, včasih pa tudi škodi, vendar menim, da je zvestoba sebi in svojim načelom bistvena, če se hočeš dobro počutiti v svoji koži.

## KRKINE NAGRADE SO PREPOZNAVNE

Hvale vredno je, da se Krkine nagrade podeljujejo že toliko časa, zato ni presenetljivo, da so tudi v širši javnosti prepoznane kot pomembne. Biti Krkin nagrajenec je lepo priznanje, velika Krkina nagrada pa je bila zame kar precejšnje presenečenje. Veseli me, da je komisija moje delo ocenila kot kakovostno.

## ZAUPAJTE SVOJIM IDEJAM IN ODLOČITVAM

Zaupajte svojim idejam in odločitvam. Bodite vztrajni pri svojem delu, a pri tem ne pozabite nase in na druge stvari, ki jih imate v življenju. Noben znanstven rezultat ni vreden tveganja osebne sreče in zadovoljstva.

## NAJBOLJŠI NASVET

Ne obremenjuj se s stvarmi, na katere nimaš vpliva.

## ŽIVLJENJSKO VODILO

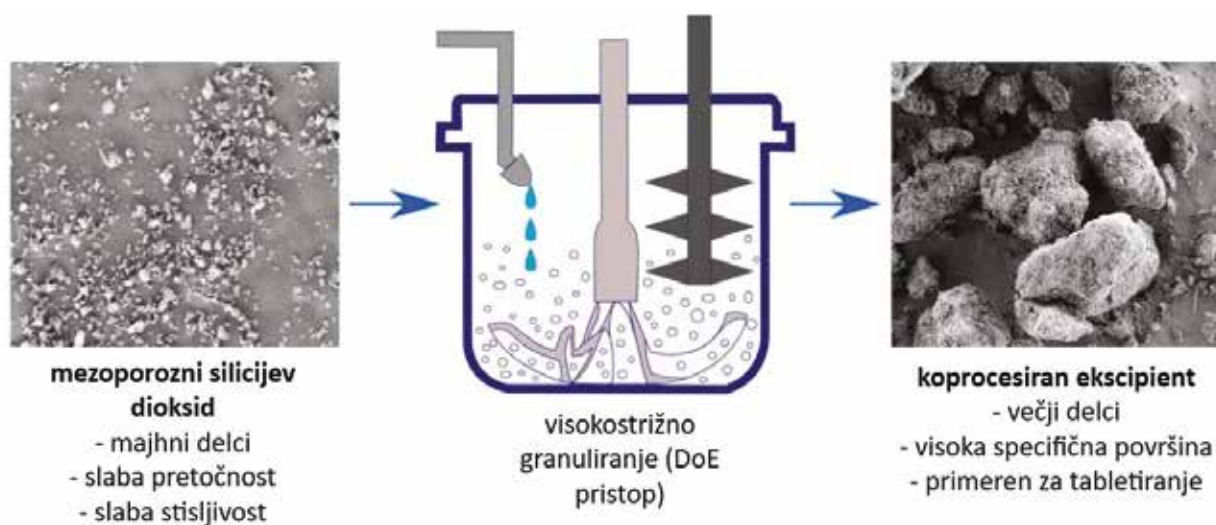
*Živeti je treba v sedanjem trenutku; nikoli ne veš, kaj te čaka naslednji dan.*



## Razvoj dobro stisljivega in pretočnega koprocesiranega mezoporoznega silicijevega dioksida za izdelavo amorfnih trdnih disperzij in orodisperzibilnih tablet

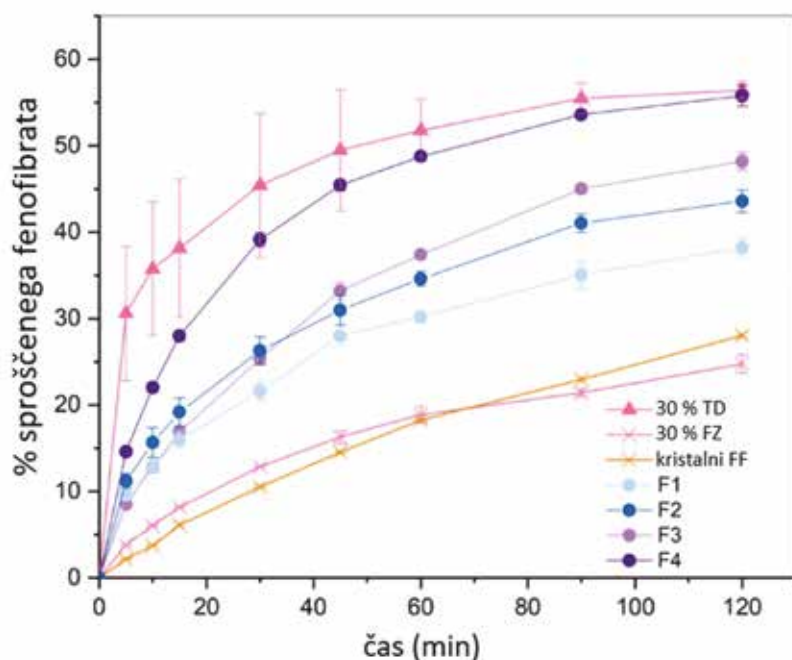
V zadnjem času se v farmacevtskem razvoju pogosto srečujemo s težko vodotopnimi zdravilnimi učinkovinami, kar je velik izziv pri razvoju peroralnih farmacevtskih oblik. Eden od načinov za izboljšanje topnosti in hitrosti raztapljanja je izdelava amorfnih trdnih disperzij, pri katerih je pomožna snov mezoporozni silicijev dioksid. Glavna pomanjkljivost tega materiala so slabe pretočne lastnosti in stisljivost, kar omejuje izdelavo trdnih farmacevtskih oblik, ki bolnikom olajšajo jemanje. Cilj doktorske disertacije je bil s koprocesiranjem izboljšati te lastnosti, nato pa v koprocesiran material vgraditi fenofibrat v amorfnih obliki in iz takšnih trdnih disperzij izdelati orodisperzibilne tablete. Zanimala nas je tudi možnost prekrivanja okusa v trdnih disperzijah z mezoporoznim silicijevim dioksidom.

Najprej smo z visokostrižnim granuliranjem izdelali koprocesirano pomožno snov iz mezoporozne silike in izomalta. Z načrtovanjem eksperimentov (Design of Experiments, DoE) smo ugotavljali, kateri procesni parametri so ključni za doseganje optimalnih lastnosti produkta. Na podlagi teh ugotovitev smo izdelali optimiziran material (slika 1).



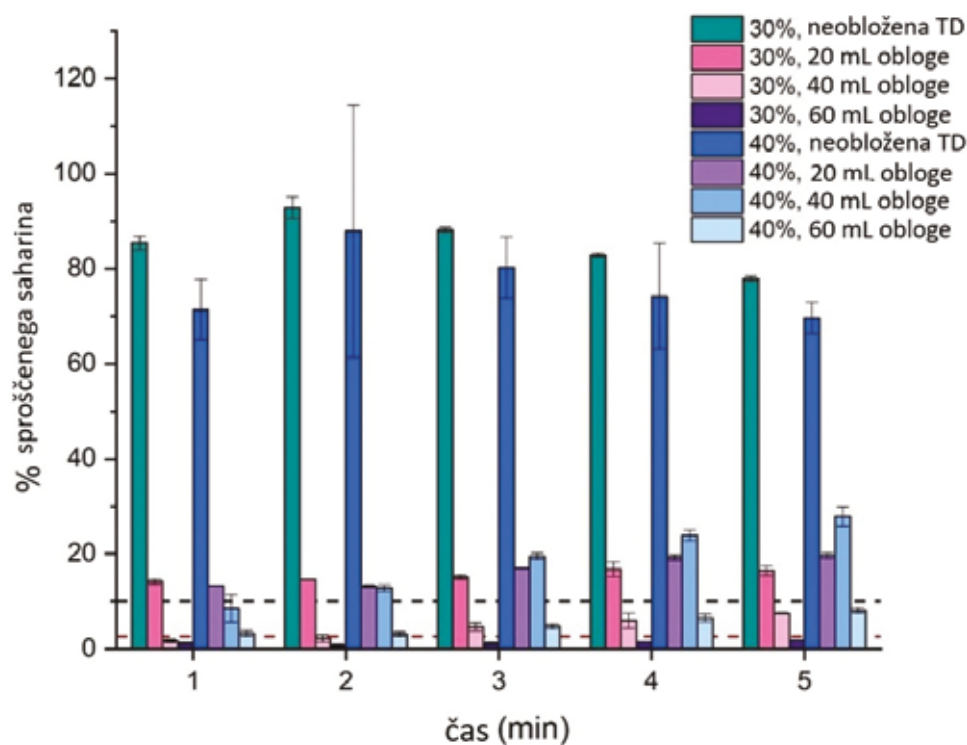
Slika 1. Shematski prikaz izdelave koprocesirane pomožne snovi in ključne izboljšave vhodnega materiala, ki smo jih dosegli s koprocesiranjem.

Z modelno učinkovino fenofibratom in neprocesirano siliko smo v rotacijskem uparjevalniku izdelali trdne disperzije ter proučevali vpliv različnih procesnih dejavnikov na stopnjo amorfnosti fenofibrata ter njegovo hitrost sproščanja in fizikalno stabilnost. Optimalne pogoje smo uporabili pri izdelavi trdnih disperzij s prej razvitim koprocesiranim materialom in izdelali 30-odstotno trdno disperzijo, ki je vsebovala popolnoma amorfno učinkovino in se je sproščala bistveno hitreje kot kristalni fenofibrat. Trdno disperzijo smo vgradili v več formulacij za orodisperzibilne tablete, pri čemer smo poskusili uporabiti čim manj dodatnih pomožnih snovi. Vse formulacije so bile v skladu z zahtevami Evropske farmakopeje za orodisperzibilne tablete in so se sproščale bolje kot fenofibrat.



Slika 2. Primerjava sproščanja fenofibrata iz različnih formulacij s sproščanjem iz 30-odstotne trdne disperzije, 30-odstotne fizikalne zmesi in raztapljanjem kristalnega fenofibrata.

Nazadnje smo proučevali možnost prekrivanja okusa v formulacijah z mezoporozno siliko, pri čemer smo kot modelno spojino uporabili saharin, trdne disperzije pa smo izdelali s sušenjem z razprševanjem. Trdne disperzije smo obložili s polimerom Eudragit EPO, ki je v nevtralnem pH, kakršen je v ustni votlini, netopen, raztopi pa se v kislem mediju, kakršen je v želodcu. Oblaganje je potekalo v rotavaporju, pri čemer smo Eudragit EPO raztopili v etanolu in dodali 20 mL, 40 mL in 60 mL raztopine, kar je ustrezalo različnim količinam nanese obloge. S testi sproščanja v omenjenih medijih smo dokazali, da je naš pristop lahko učinkovit pri prekrivanju okusa (slika 3).



Slika 3. Sproščanje saharina iz 30-odstotne in 40-odstotne trdne disperzije (TD); primerjava neobloženih TD ter TD z 20 mL, 40 mL in 60 mL dodane obloge.

## Development of Compressible and Free-Flowing Co-Processed Mesoporous Silica for Production of Amorphous Solid Dispersions and Orodispersible Tablets

Poorly water-soluble drugs present an important challenge in pharmaceutical development and industry, as limited solubility can be a major issue in the development of oral dosage forms. One approach to improving solubility and dissolution rate is the production of amorphous solid dispersions using mesoporous silica as the excipient. Main drawbacks of this material are its poor flowability and compressibility, which limit the production of patient-friendly solid dosage forms. The aim of this dissertation was to improve these properties through co-processing, and then to incorporate the model drug fenofibrate in its amorphous form into the co-processed material to produce orodispersible tablets. The potential for taste masking in mesoporous silica-based solid dispersions was also investigated.

Initially, we produced a co-processed excipient from mesoporous silica and isomalt via high-shear granulation. Using a design-of-experiments approach, we determined the key process parameters for achieving optimal product properties. Based on these results, we developed an optimised material (Figure 1).

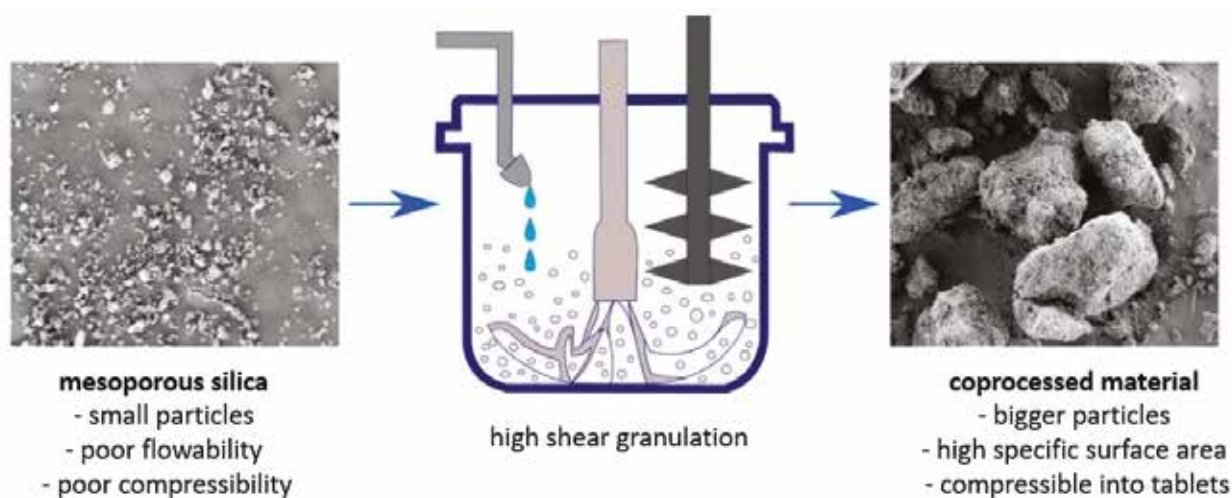


Figure 1. Schematic representation of co-processing and key improvements in the starting material achieved by the process.

We then prepared solid dispersions with fenofibrate and unprocessed silica in a rotary evaporator, where we studied the impact of various process factors on the degree of amorphicity, dissolution rate, and physical stability. The optimal conditions were applied to produce solid dispersions with the previously developed co-processed material, resulting in a 30% solid dispersion that was fully amorphous and demonstrated a significantly faster release compared to the crystalline drug. This solid dispersion was incorporated into several formulations for orodispersible tablets, aiming to minimise the amount of additional excipients. All formulations met the European Pharmacopoeia requirements for orodispersible tablets while still exhibiting improved release (Figure 2).

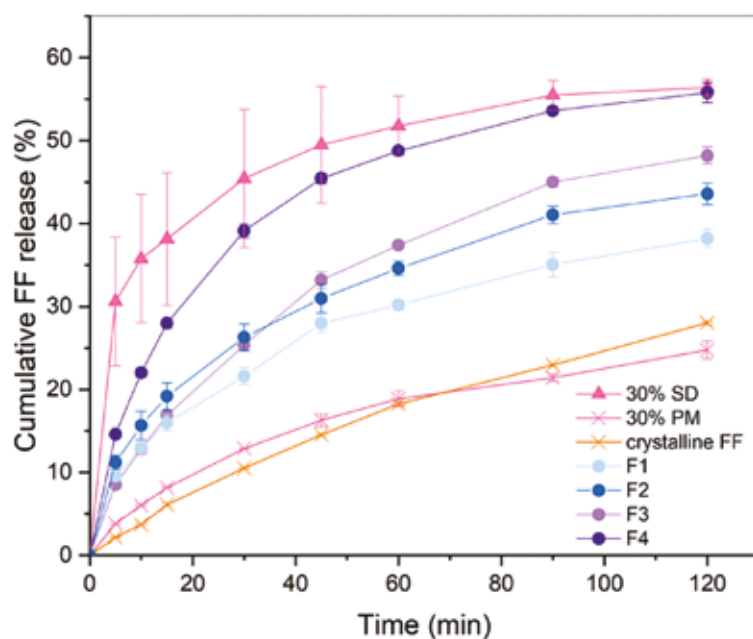


Figure 2. Fenofibrate release from different formulations, 30% uncompressed solid dispersion, 30% physical mixture, and the dissolution of crystalline fenofibrate.

Finally, we investigated the potential for taste masking in mesoporous silica-based formulations using saccharin as a model compound. The solid dispersions were prepared by spray drying and coated with the polymer Eudragit EPO, which is insoluble at the neutral pH typical of the oral cavity, but dissolves fast in the acidic environment of the stomach. Eudragit was dissolved in ethanol, and the film coating was performed in a rotary evaporator with different amounts of added coating solution (20 ml, 40 ml, and 60 ml). Release tests in acidic and neutral media confirmed that our approach has the potential to ensure taste masking (Figure 3).

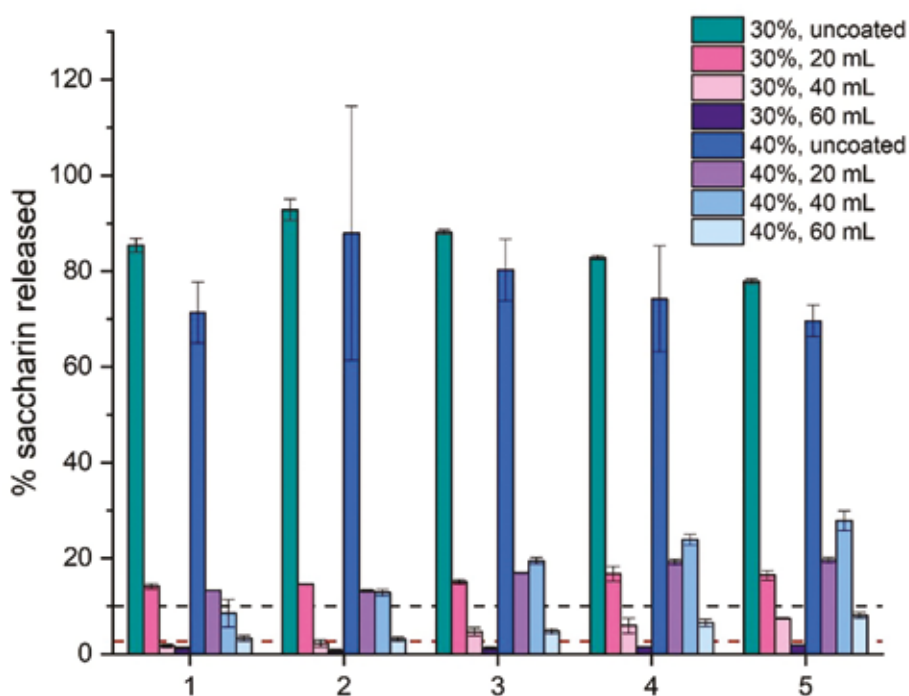


Figure 3. Saccharin release from 30% and 40% solid dispersions; comparison of the uncoated formulation with 20 ml, 40 ml and 60 ml added coating solution.

# DR. JAKA DERNOVŠEK

---

Kot otrok se je rad igral predvsem z avtomobilčki in se zanimal za šport, treniral je košarko. Zanimale so ga zelo raznovrstne stvari – dejaven je bil na primer v lokalnem gledališču, pisal je tudi pesmi. Po osnovni šoli je izobraževanje nadaljeval na Gimnaziji Bežigrad, kjer pa se še ni zelo očitno navdušil nad posamezno stroko in je večino časa govoril, da bo postal pravnik. Po odločitvi za farmacijo je bil pred začetkom prvega letnika v precejšnjih dvomih glede izbire, a je študij hitro vzljubil. Najbolj so ga fascinirala predavanja o rakavih obolenjih, zato se je želel čim prej lotiti raziskovalnih projektov o tej temi. Da bi bolje spoznal farmacevtsko industrijo, je po prvem letniku začel delati v razvojnem centru farmacevtskega podjetja, v tretjem pa se je lotil raziskovalnega dela na področju glikokemije. Ko mu je prof. Tomašič ponudil mesto mladega raziskovalca, se je brez oklevanja odločil za doktorski študij na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, kjer danes deluje kot podoktorski raziskovalec.



# Vsak neuspeh lahko postane uspeh z dobro zgodbo

## **ŽELIM PRISPEVATI K PREBOJEM PRI ZDRAVLJENJU**

Moje primarno področje raziskovanja je farmacevtska kemija. Ukvarjam se predvsem z načrtovanjem, sintezo in vrednotenjem novih zaviralcev proteina toplotnega šoka 90 (Hsp90) s protirakavim delovanjem. S stališča zdravljenja me je že na začetku študija izjemno pritegnila onkologija, še najbolj zaradi kompleksnosti razvoja in heterogenosti bolezni ter pogosto zelo dokončne diagnoze. Zato želim po najboljših močeh prispevati k razumevanju tega področja in napredku ter v končni fazi k izboljšanju izidov zdravljenja.

## **NAŠE RAZISKAVE BODO POMAGALE PRI ODKRIVANJU NOVIH UČINKOVIN**

V doktorski nalogi smo se ukvarjali predvsem z različnimi možnostmi za zaviranje Hsp90. Pripravili smo serije treh vrst spojin, ki zaobidejo slabosti klasičnih zaviralcev Hsp90. Poleg tega smo veliko truda namenili mehanističnim raziskavam njihovih učinkov na biokemijski in biološki ravni. S tem želimo prispevati k posodobitvi ustaljenih praks pri vrednotenju in odkrivanju novih zaviralcev Hsp90.

## **NAJBOLJŠE IDEJE SE RAZVIJEJO V DOBRI EKIPI MED KRITIČNIMI RAZPRAVAMI**

Raziskovalno delo pogosto ne poteka po željah oziroma pričakovanjih in je lahko polno tako pozitivnih kot negativnih presenečenj. Zato je včasih težko vztrajati na načrtani poti. Zame je glavni motiv potencial za končni cilj, ki v primeru velikega preboja v znanosti, še posebno v farmaciji, omogoča, da se naš uspeh dotakne življenj ljudi in pomaga svet spremeniti na bolje. Pri tem je poleg vseživljenjskega prizadevanja posameznikov ključno dobro ekipno delo, saj se najboljše ideje razvijejo v dobri ekipi med kritičnimi razpravami.

## **MENTOR POMAGA, USMERJA IN DAJE SVOBODO**

Mentor je izjemno pomemben. Zaznati mora prave trenutke, da ti pomaga in te usmeri, a ti hkrati omogoča svobodo in te podpira pri tvojih idejah. Biti mora dobro praktično podkovan, da lahko skupaj rešujeta težave, ki se pojavijo med raziskavami. Poleg tega te mora empatično voditi čez pozitivne in negativne izkušnje. V raziskovalnem delu pod mentorstvom prof. dr. Tihomirja Tomašiča sem zelo užival, rezultate pa združil v magistrsko in doktorsko nalogo.

## **SLOVENIJA NUDI MIR, KI DRUGJE V SVETU NI VEČ TAKO SAMOUMEVEN**

Usklajevanje zasebnega in poklicnega življenja je v znanosti pogosto precej zahtevno. Zato je ključno, da te delo veseli. Prosti čas rad namenim predvsem ekipnim športom, kot sta odbojka ali košarka, uživam na smučanju, v potovanjih, ob dobrem filmu, kuhanju in še posebno v odlični hrani. Ljubljana je zelo dobro izhodišče za številne dejavnosti, predvsem pa Slovenija nudi mir, ki drugje v svetu ni več tako samoumeven.

## **ODPRT SEM ZA NOVE PRILOŽNOSTI IN IDEJE**

Raziskovalno delo me veseli in sem ga imel priložnost dobro spoznati ter nekaj izkusiti v tujini, kar je ena od možnosti za mojo nadaljnjo pot. Glede srednjeročne prihodnosti sem odprt za nove priložnosti in ideje, trenutno pa na fakulteti končujemo nekatere projekte.

## **Z VESELJEM SE UČIM O PROCESIH NA RAZLIČNIH RAVNEH**

Ocenjujem, da je moja prednost sposobnost za »poglobljeno površinsko« razumevanje raznovrstnih tem. Zanimajo me namreč zelo različne stvari, ki se jim lahko precej podrobno posvetim. Na srečo ravno farmacija združuje številne stroke in mi zato ustreza, saj se lahko učim o procesih na različnih ravneh.

## **KRKINA NAGRADA ME JE NAVDALA Z OPTIMIZMOM**

Pohvala in prepoznanje dela sta v znanosti in drugod nepogrešljivo gonilo napredka. Takrat, ko morda ne gre vse po načrtu, ti lahko že majhno priznanje vlije novo energijo. Zato menim, da Krkine nagrade s svojo prepoznavnostjo in tradicijo veliko doprinesejo h kakovosti znanstvenega dela pri nas.

## **VSAK NEUSPEH LAHKO POSTANE USPEH**

Novim generacijam sporočam, da lahko vsak neuspeh postane uspeh z dobro zgodbo.

## **NAJBOLJŠI NASVET**

Verjemi vase, pa bodo tudi drugi verjeli vate.

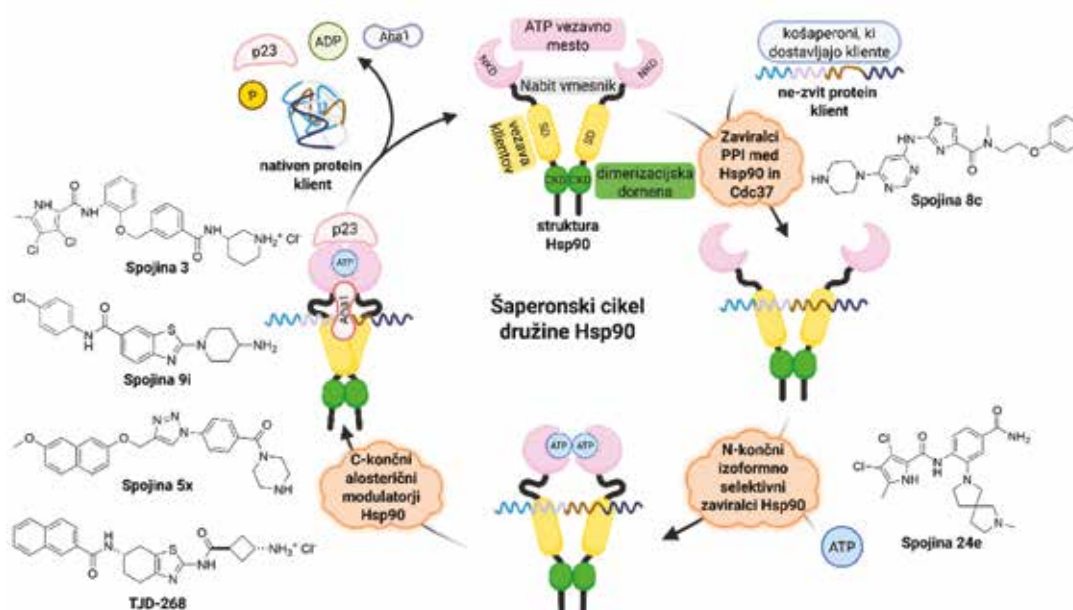
## **ŽIVLJENJSKO VODILO**

*Sadje ni sladica.*



## Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev proteina toplotnega šoka 90 s protitumornim delovanjem

Proteini toplotnega šoka 90 (Hsp90) predstavljajo družino šaperonov, odgovornih za pravilno zvijanje in zorenje t. i. proteinov klientov. Družino sestavljajo izooblike Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Grp94 in TRAP1 z različno znotrajcelično lokalizacijo in vlogami. Družina Hsp90 je najpogostejše proučevana kot tarča protirakavih učinkovin, saj zaviranje delovanja povzroči znižanje ravni več onkoproteinov, odvisnih od Hsp90. Kljub temu je klinična validacija klasičnih N-končnih zaviralcev Hsp90 ovirana zaradi njihovega sočasnega sprožanja citoprotektivnega odziva toplotnega šoka (HSR), ki poveča izražanje proteinov toplotnega šoka in tako preprečuje učinke zdravljenja. Raziskave so se zato usmerile v razvoj alternativnih pristopov k zaviranju Hsp90, ki na šaperonski cikel vplivajo drugače, s čimer še vedno povzročijo znižanje ravni proteinov klientov, vendar brez sprožanja HSR. Med takšne vrste spojin spadajo C-končni zaviralci Hsp90, N-končni izoformno selektivni zaviralci Hsp90 in zaviralci medproteinskih interakcij (PPI) med Hsp90 in košaperoni, ki uravnavajo njegovo delovanje (slika 1).



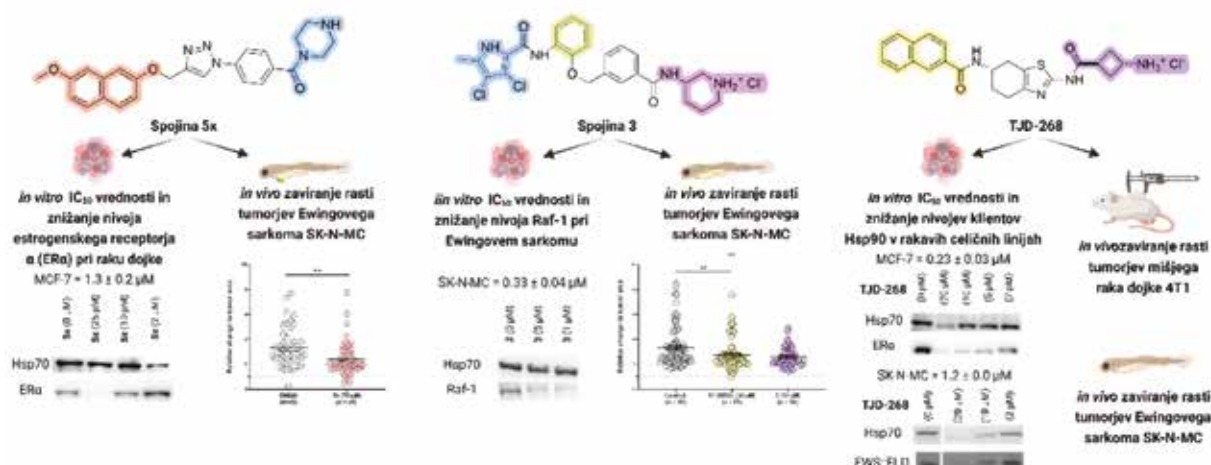
Slika 1. Shematski prikaz šaperonskega cikla Hsp90 z označenimi prijemališči za zaviranje brez sprožanja odziva toplotnega šoka in primeri zaviralcev, odkritih v okviru doktorske disertacije. PPI – medproteinske interakcije, Aha1 – aktivator Hsp90 ATPaze 1.

V okviru doktorske naloge smo z razvojem novih spojin obravnavali vse tri pristope k zaviranju Hsp90, ki ne sprožajo HSR. Z virtualnim reševanjem na osnovi liganda in nadaljnjo optimizacijo spojine zadetka smo razvili zaviralce PPI, usmerjene proti interakciji med Hsp90 in Cdc37, ki je pomembna predvsem za vstop proteinskih kinaz v šaperonski cikel. Tako tudi spojina 8c (slika 1) z vplivom na omenjeno medproteinsko interakcijo povzroči znižanje ravni proteinov klientov Hsp90 in ne spodbudi HSR.

Pri načrtovanju zaviralcev, selektivnih za N-končno domeno Hsp90 $\beta$ , smo izhajali iz ATP-kompetitivnih zaviralcev sorodnih proteinov bakterijske DNA-giraze in humane topoizomeraze II $\alpha$ , ki so bili predhodno

pripravljeni na Fakulteti za farmacijo. Z molekulskim sidranjem smo ovrednotili njihovo predvideno vezavo na ATP-vezavno mesto na N-koncu Hsp90 $\beta$ . Za najobetavnejše zadetke smo potrdili vezavo in odsotnost vezave na Hsp90 $\alpha$ , ki je sicer na ATP-vezavnem mestu s Hsp90 $\beta$  kar 95-odstotno identična. Delovanje in fizikalno-kemijske lastnosti spojin smo optimizirali s pripravo spojine 24e (slika 1), ki v celicah raka dojke povzroča znižanje ravni proteinov klientov brez pomembnejše spodbuditve HSR. Poleg tega smo pokazali tudi, da je za doseganje selektivnosti ključna predvsem razlika v Ala47 v Hsp90 $\beta$ , ki je pri Hsp90 $\alpha$  zamenjan s Ser52, kar lahko neugodno vpliva na entropijske prispevke k vezavi ob izpodrivanju ohranjenih molekul vode z vezavnega mesta.

Največ pozornosti pa smo posvetili razvoju C-končnih alosteričnih modulatorjev Hsp90, pri čemer smo odkrili in karakterizirali štiri strukturno različne razrede zaviralcev. Po raziskavi mehanizma delovanja in pripravi dodatnih analogov spojine 3 (sliki 1 in 2) smo prvi opisali dvojne zaviralce topoizomeraze II $\alpha$  in C-končne domene Hsp90. V študijah odnosa med strukturo in delovanjem triazolnih (spojina 5x, sliki 1 in 2), benzotiazolnih (spojina 9i, slika 1) in 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnih spojin (TJD-268, sliki 1 in 2) pa smo uspešno optimizirali njihovo protirakavo delovanje *in vitro*. Pokazali smo, da spojine prek vpliva na proteine kliente Hsp90 vplivajo na zaustavitev celičnega cikla in povzročajo apoptozo. Nekatere najobetavnejše spojine so se izkazale tudi kot učinkoviti zaviralci rasti tumorjev celične linije Ewingovega sarkoma SK-N-MC *in vivo*. Spojina TJD-268 pa poleg tega učinkovito zavira rast tumorjev v ortotopnem modelu mišjega raka dojke 4T1 in se proučuje v nadaljnjih raziskavah, ki bodo pomagale razjasniti mehanizem delovanja C-končnih zaviralcev Hsp90.



Slika 2. Povzetek rezultatov testiranja spojin 5x, 3 in TJD-268 *in vitro* ter *in vivo* na celičnih linijah raka dojke in Ewingovega sarkoma. Barvno označeni so deli posameznih molekul, ki smo jih optimizirali.

Trenutni rezultati kažejo, da ima ATP ob vezavi na N-konec Hsp90 pomembno vlogo pri vezavi TJD-268, kar je v skladu z našimi računalniškimi modeli. S proteomsko analizo na celični liniji raka dojke MCF-7 smo ugotovili, da spojina pomembno vpliva na homeostazo proteinov, pomembnih za endoplazemski retikulum in vezavo kalcija. V nadaljnjih raziskavah smo potrdili, da to povzroča pomembne spremembe v znotrajceličnih ravneh kalcija, ki vodijo v indukcijo apoptoze. Ugotovili smo tudi, da je delovanje spojine z vidika vpliva na proteine kliente in odziv toplotnega šoka precej odvisno od vrste uporabljene rakave celične linije, kar odpira številna nova raziskovalna vprašanja glede mehanizma delovanja C-končnih zaviralcev Hsp90.

Skupaj so tako naši rezultati z več kot 200 ovrednotenimi spojinami pripomogli k razširitvi kemijskega prostora na področju zaviralcev Hsp90. Ob tem pa smo z mehanističnimi študijami delovanja spojin prispevali k razumevanju zaviranja Hsp90, kar bo olajšalo in izboljšalo nadaljnji razvoj zaviralcev Hsp90 s protirakavim delovanjem.

## Design, Synthesis and Evaluation of New Heat Shock Protein 90 Inhibitors with Anticancer Activity

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a family of chaperones responsible for the proper folding and maturation of certain proteins, that is client proteins. The family consists of four isoforms: Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Grp94, and TRAP1, with different intracellular localisation and roles. The Hsp90 family is most frequently studied as a target for anticancer agents, since inhibition of its functions leads to decreased levels of several oncoproteins dependent on Hsp90. Nevertheless, clinical validation of classical N-terminal Hsp90 inhibitors is hindered by their simultaneous induction of the cytoprotective heat shock response (HSR), which increases the expression of heat shock proteins and thus counteracts the effects of the treatment. Research has therefore focused on the development of alternative types of Hsp90 inhibition that affect the chaperone cycle differently, still causing a decrease in the levels of client proteins but without inducing the HSR. Such types of compounds include C-terminal Hsp90 inhibitors, N-terminal isoform-selective Hsp90 inhibitors, and inhibitors of protein-protein interactions (PPI) between Hsp90 and co-chaperones, which regulate its activity (Figure 1).

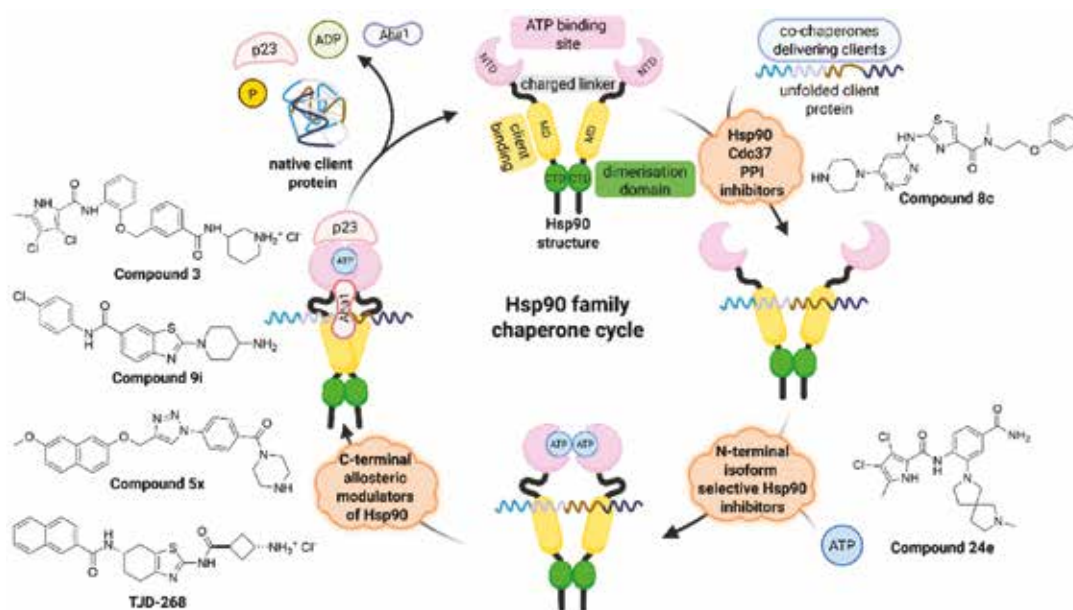


Figure 1. Schematic representation of the Hsp90 chaperone cycle with marked action sites for inhibition without induction of the heat shock response, and examples of inhibitors discovered within the scope of the doctoral dissertation. PPI – protein-protein interaction; Aha1 – activator of Hsp90 ATPase 1.

In the doctoral thesis, we addressed all three approaches to Hsp90 inhibition that do not trigger the HSR by discovering several mechanistically distinct compound classes. By using ligand-based virtual screening and subsequent optimisation of the hit compounds, we developed PPI inhibitors targeting the Hsp90-Cdc37 interaction, which is especially important for the entry of protein kinases into the chaperone cycle. Thus, compound **8c** (Figure 1) reduces the levels of Hsp90 client proteins by influencing the Hsp90-Cdc37 interaction and does not induce the unwanted HSR.

In designing inhibitors selective for the N-terminal domain of Hsp90 $\beta$ , we started from ATP-competitive inhibitors of related proteins, bacterial DNA gyrase and human topoisomerase II $\alpha$ , which had previously

been prepared at the Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana. Using molecular docking, we evaluated their predicted binding in the ATP-binding site at the N-terminus of Hsp90 $\beta$ . For the most promising hits, we confirmed binding, and some compounds already displayed selectivity for Hsp90 $\beta$  over Hsp90 $\alpha$ , which are 95% identical in the ATP-binding site. We optimised the activity and physicochemical properties of the compounds with the preparation of compound **24e** (Figure 1), which decreases the levels of client proteins without significant induction of the HSR in breast cancer cells. Additionally, we have shown that the key to achieving selectivity lies mainly in the difference at Ala47 in Hsp90 $\beta$ , which is replaced by Ser52 in Hsp90 $\alpha$ . This can unfavourably influence entropic contributions to binding upon displacement of structural water molecules from the binding site.

Most of our attention was devoted to C-terminal allosteric modulation of Hsp90, with the discovery and characterisation of four structurally diverse inhibitor classes. Through the study of the mechanism of action and the preparation of additional analogues of compound **3** (Figures 1 and 2), we were the first to describe dual inhibitors of topoisomerase II $\alpha$  and the C-terminal domain of Hsp90. In studies of the structure-activity relationship of triazoles (compound **5x**, Figures 1 and 2), benzothiazoles (compound **9i**, Figure 1), and 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazoles (compound **TJD-268**, Figures 1 and 2), we successfully optimised their anticancer activity *in vitro*. We demonstrated that the compounds, through their influence on Hsp90 client proteins, affect cell cycle arrest and cause apoptosis. Some of the most promising compounds also proved to be effective *in vivo* inhibitors of tumour growth of the Ewing sarcoma SK-N-MC cell line. Moreover, compound **TJD-268** effectively inhibited tumour growth in the orthotopic model of mouse breast cancer 4T1 and is currently the subject of further studies, which will help to elucidate the mechanism of action of C-terminal Hsp90 inhibitors.

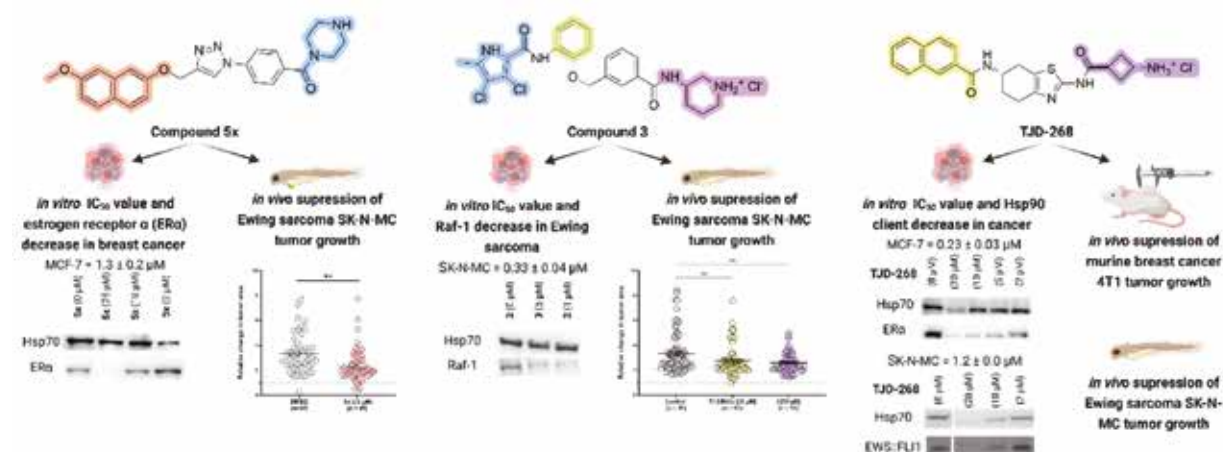


Figure 2. Summary of the results of *in vitro* and *in vivo* testing of compounds **5x**, **3**, and **TJD-268**, on breast cancer and Ewing sarcoma cell lines. Coloured elements of the molecules were subjected to changes in SAR optimisation efforts.

Our current results show that ATP, upon binding to the N-terminus of Hsp90, plays an important role in the binding of **TJD-268**, which is consistent with our computational models. Using proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cells, we determined that the compound has a considerable effect on the homeostasis of proteins important for the endoplasmic reticulum and calcium binding. In further studies, we confirmed that this contributes to significant changes in intracellular calcium levels, which lead to the induction of apoptosis. We also determined that the activity of the compound, with regard to its effect on client proteins and the heat shock response, is quite dependent on the type of cancer cell line used. This opens numerous new research questions regarding the exact mechanism of action of C-terminal Hsp90 inhibitors.

Altogether, our results with more than 200 evaluated compounds have contributed to the expansion of the chemical space in the field of Hsp90 inhibitors. Moreover, with mechanistic studies of compound activity, we contributed to the understanding of Hsp90 inhibition, which will help to improve further development of Hsp90 inhibitors with anticancer activity.

# DR. MATIC BROZ

---

Kemija ga je privlačila že od nekdaj, zato se je po splošni maturi vpisal na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru, kjer je diplomiral in magistriral. Raziskovalno delo ga je navduševalo, zato je študij nadaljeval na doktorski ravni. Leta 2024 je pod mentorstvom red. prof. dr. Urbana Brena doktoriral z disertacijo o proučevanju sekundarne proteinske strukture z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike in nevronskimi mrežami.



# Raziskovanje ni služba z rednim delovnim časom

## ŽELJA PO RAZUMEVANJU CELIČNE KEMIJE

Glavno področje mojega raziskovanja je računalniška kemija, natančnejše molekularna dinamika in globoko učenje pri proučevanju proteinskih struktur. K temu sta me usmerili želja po razumevanju celične biologije, pri kateri je še veliko neraziskanega, in možnost uporabe sodobnih računalniških metod za reševanje aktualnih znanstvenih vprašanj v bioinformatiki.

## Z RAČUNALNIŠKIMI PRISTOPI LAHKO UČINKOVITO PROUČUJEMO MOLEKULARNE MEHANIZME

V okviru doktorske disertacije sem raziskoval sekundarno proteinsko strukturo z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike in nevronske mreže. Osredotočil sem se na štiri ključne teme: vpliv mutacije Ala16Val na mitohondrijsko tarčno sekvenco proteina MnSOD, enostavno napovedovanje dihedralnih kotov proteinskega ogrodja z globokim učenjem, vpliv mikrovalovnega sevanja na proteinsko strukturo in proučevanje nevropilinov kot terapevtskih tarč. Moje raziskave so pokazale, da lahko z računalniškimi pristopi učinkovito proučujemo molekularne mehanizme, kar je pomembno za razvoj novih terapevtskih pristopov in razumevanje proteinskih bolezni.

## ŽELJA PO ODKRIVANJU NOVEGA

Pri raziskovalnem delu me motivirata želja po odkrivanju novega ter prispevanje novih spoznanj k razumevanju biokemičnih procesov in s tem k zdravljenju bolezni.

## MENTORJEVA NEPRECENLJIVA PODPORA IN KONSTRUKTIVNA KRITIKA

Mentor ne samo usmerja znanstveno delo in prenaša izkušnje, ampak tudi omogoča dostop do raziskovalnih projektov in opreme ter vzpostavlja povezave s sodelavci z drugih ustanov. Moj mentor red. prof. dr. Urban Bren me je izjemno podpiral in usmerjal s konstruktivno kritiko, predvsem pa mi je s svojimi poznanstvi in izkušnjami odprl vrata k marsikateremu sodelovanju, ki sicer ne bi bilo mogoče.

## KLJUČ JE V PRILAGODLJIVOSTI

Raziskovalno delo zahteva predvsem samodisciplino in dobro organizacijo časa. Včasih je treba delati cele dneve, posebno ko se bližajo roki za oddajo člankov ali zaključek eksperimentov, vendar si nato lahko

vzamem nekoliko več časa za zasebno življenje. Ključ je v prilagodljivosti – raziskovanje ni služba z rednim delovnim časom, temveč način življenja, ki zahteva prilagajanje dinamike dela potrebam projektov.

## NOVE RAČUNALNIŠKE METODE IN RAZVOJ UČINKOVITEJŠIH ALGORITMOV

Še naprej si želim raziskovati na področju računalniške kemije in molekularnega modeliranja, predvsem pri razvoju novih računalniških metod za proučevanje proteinskih struktur. Bioinformatika pogosto zahteva drago računalniško opremo, zaradi česar je raziskovanje odvisno od finančnih sredstev ustanove, zato vsi raziskovalci nimajo enakih možnosti. V prihodnje se želim osredotočiti tudi na reševanje tega problema z razvojem učinkovitejših algoritmov, ki bi omogočili kakovostne raziskave z manj sredstvi.

## ODGOVOR JE V RAZUMEVANJU PREPROSTIH PRAVIL

Znanost stremi k razvoju vse kompleksnejših metod, ki omogočajo vedno natančnejše rezultate. Vendar menim, da narava deluje po relativno preprostih pravilih in načelih, prav v njihovem razumevanju pa je ključ do odgovora na marsikatero težko vprašanje v biokemiji.

## UGLEDNO PRIZNANJE Z IZJEMNO TRADICIJO

Krkinge nagrade so ugledno priznanje z izjemno tradicijo. Cenim, da povezujejo akademski svet s farmacevtsko industrijo. Krkinga nagrada mi pomeni priznanje za opravljeno delo in motivacijo za nadaljnje raziskave.

## VČASIH PREPROSTI PRISTOPI VODIJO DO PRESENETLJIVIH REZULTATOV

Mladim raziskovalcem svetujem, naj bodo vztrajni in naj ne obupajo ob težavah. Pomembno je ohraniti radovednost in se ne bati preizkušanja preprostejših pristopov, ki lahko včasih vodijo do presenetljivih rezultatov.

## NAJBOLJŠI NASVET

Vprašanja so pomembnejša od odgovorov.

## ŽIVLJENJSKO VODILO

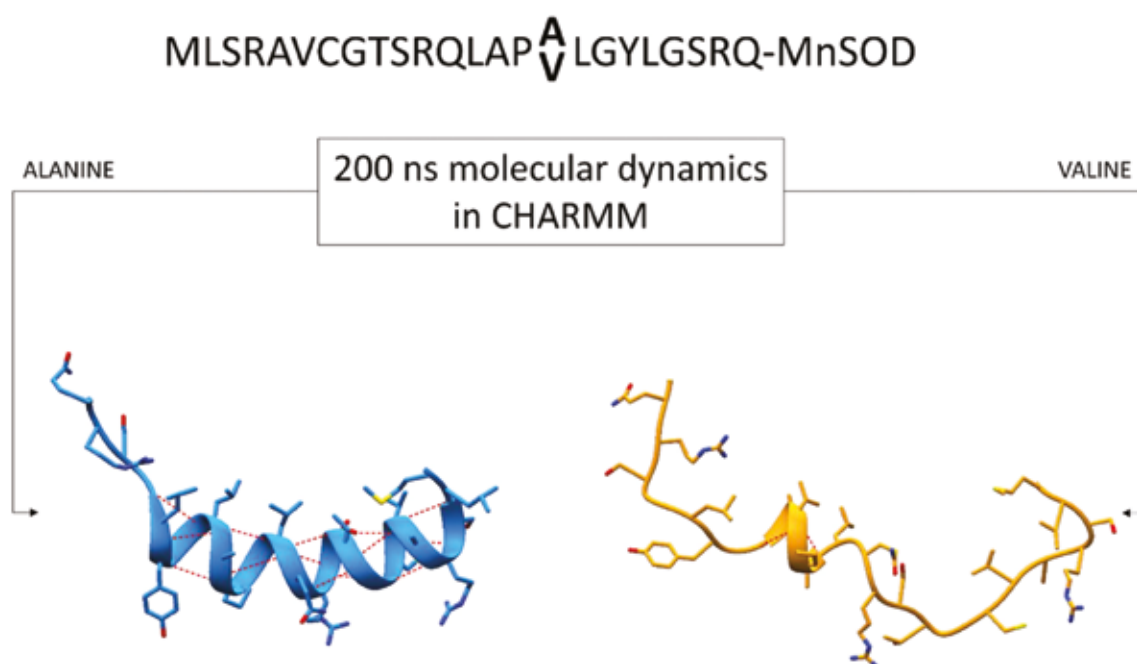
*Ni rešitev. Obstajajo samo kompromisi.*



## Proučevanje sekundarne strukture proteinov z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike in nevronskimi mrežami

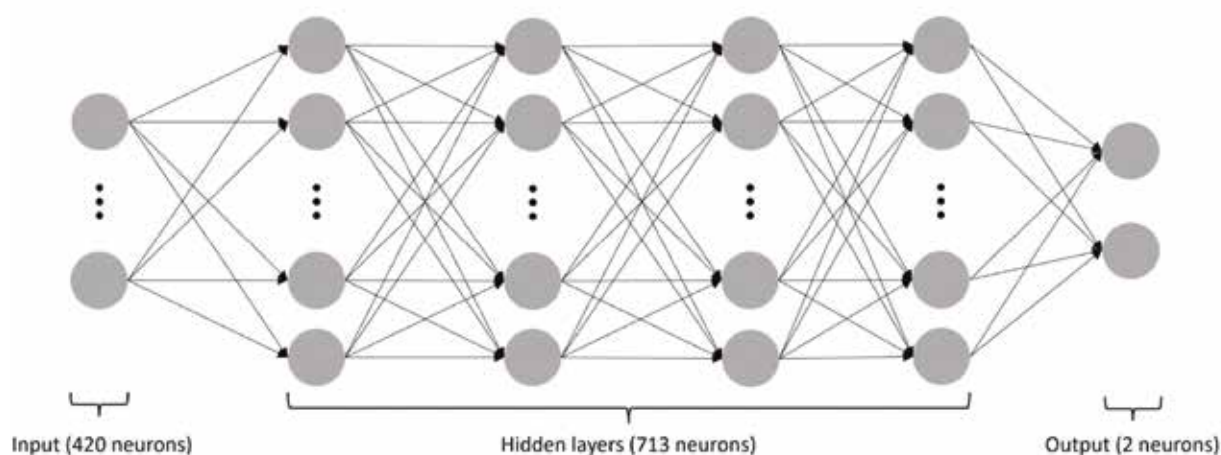
Proteini so ključne biomakromolekule, katerih funkcija je neposredno povezana z njihovo tridimenzionalno strukturo. Napačno zvijanje proteinov vodi do številnih patoloških stanj, vključno z nevrodegenerativnimi boleznimi in rakom. Za razumevanje molekularnih mehanizmov, ki določajo proteinsko strukturo, so potrebne napredne računalniške metode, ki omogočajo analizo dinamičnih procesov na ravni atomov oz. molekul.

V okviru doktorske disertacije smo si postavili štiri ključna raziskovalna vprašanja. Najprej smo s simulacijo molekularne dinamike proučili vpliv mutacije Ala16Val na sekundarno strukturo mitohondrijske tarčne sekvence manganove superoksidne dismutaze (MnSOD). Ta polimorfizem posameznega nukleotida rs4880 je bil odkrit leta 1996, vendar njegov vpliv na strukturo in funkcijo ostaja nepojasnen. Naše simulacije so pokazale, da mutacija alanina v valin povzroča destabilizacijo  $\alpha$ -vijačnice, ki verjetno oteži transport proteina v mitohondrijski matriks. S temi ugotovitvami prispevamo k razjasnitvi nasprotujočih si rezultatov kliničnih študij, povezanih s polimorfizmom posameznega nukleotida rs4880.



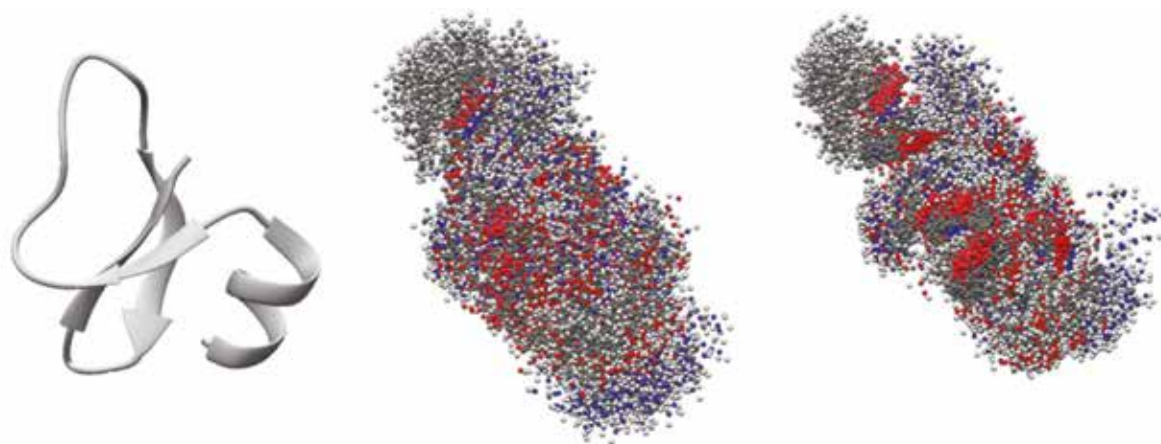
Slika 1. Shematski prikaz razlike med alaninsko in valinsko različico mitohondrijske tarčne sekvence MnSOD po 200 ns simulacij molekularne dinamike. Razlika je posledica polimorfizma posameznega nukleotida rs4880.

Razvili smo enostaven model nevronske mreže za napovedovanje dihedralnih kotov  $\phi$  in  $\psi$  proteinskega ogrodja na podlagi njegove primarne sekvence. Ta pristop je nasproten današnjim trendom, ki se osredotočajo na vedno kompleksnejše modele in obsežne podatkovne zbirke. Kljub uporabi minimalne arhitekture je naš model dosegel zadovoljivo točnost pri napovedovanju dihedralnih kotov, kar predstavlja računsko učinkovito izhodišče za naprednejše modele napovedovanja sekundarne strukture proteinov.



Slika 2. Shematski prikaz arhitekture uporabljene nevronske mreže za napovedovanje sekundarne strukture proteinov. Sivi krogi so posamezni nevroni, puščice pa povezave med njimi.

V nadaljevanju smo z neravnotežno molekularno dinamiko sistematično raziskali vpliv mikrovalovnega sevanja (v frekvenčnem območju 300 Mhz–20 GHz) na strukturo 29 različnih proteinov v vodnem okolju. Rezultati so pokazali, da mikrovalovi prek rotacijsko vzbujenih molekul vode značilno oslabijo hidracijo vseh proteinov. Proteini poskušajo izgubljene interakcije nadomestiti z močnejšim interagiranjem s seboj, kar vodi do kompaktnejše proteinske strukture z manjšim radijem sukanja. To povzroči značilne spremembe v sekundarni in terciarni strukturi proteinov, kar vpliva na njihove fizikalno-kemične lastnosti in biološko aktivnost. Ugotovitve imajo pomembne implikacije za razumevanje potencialnih zdravstvenih učinkov mikrovalovnega sevanja.



Slika 3. Primerjava strukture proteina humanega  $\beta$ -defenzina-1 (PDB ID 2NLS), eksperimentalno določene z rentgensko difrakcijo (levo), dobljene po 100 ns simulaciji molekularne dinamike za ravnotežno stanje (sredina) in po 100 ns neravnotežni simulaciji molekularne dinamike za obsevanje z mikrovalovi (desno).

Za konec smo temeljito pregledali vloge nevropilinov (NRP1, NRP2) pri različnih patoloških stanjih ter raziskali potencial njihovih modulatorjev kot terapevtskih sredstev. Pri tem smo analizirali vloge nevropilinov pri raku, virusnih okužbah (vključno s SARS-CoV-2), kardiovaskularnih boleznih in nevropatski bolečini. Identificirali smo obetavne modulatorje, kot so peptidomimetiki in antagonisti majhnih molekul, ki so potencialne zdravilne učinkovine.

## Studying Secondary Structure of Proteins with Molecular Dynamics Computer Simulations and Neural Networks

Proteins are key biomacromolecules whose function is directly related to their three-dimensional structure. Protein misfolding leads to numerous pathological conditions, including neurodegenerative diseases and cancer. To understand the molecular mechanisms governing protein structure, advanced computational methods are required to facilitate the analysis of dynamic processes at the atomistic or molecular level.

In the doctoral dissertation, we addressed four key research questions. First, we applied molecular dynamics simulations to study the effect of the Ala16Val mutation on the secondary structure of the mitochondrial targeting sequence of manganese superoxide dismutase (MnSOD). This single nucleotide polymorphism rs4880 was discovered in 1996, but its effects on protein structure and function remained unclear. Our simulations revealed that the mutation from alanine to valine causes destabilisation of the  $\alpha$ -helix, which likely affects protein transport to the mitochondrial matrix. Our findings contribute significantly to clarifying the contradictory results of clinical studies related to the rs4880 single nucleotide polymorphism.

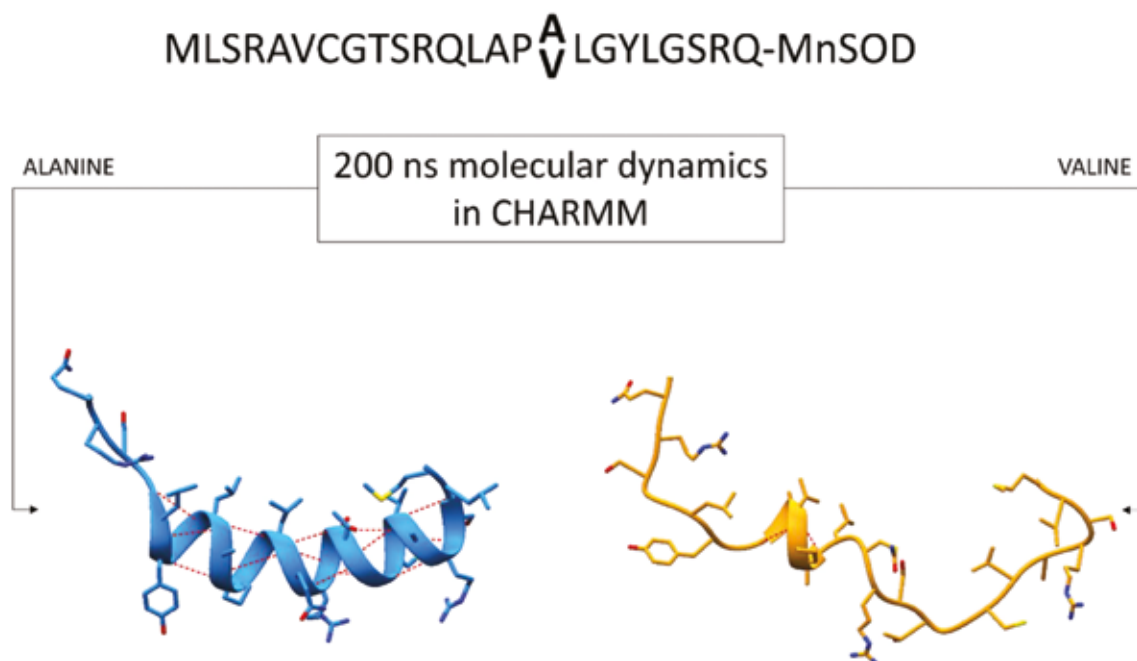


Figure 1. Schematic representation of the difference between alanine and valine variants of MnSOD mitochondrial target sequence after 200 ns molecular dynamics simulations, as a consequence of the rs4880 single nucleotide polymorphism.

We developed a simple neural network model for predicting  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angles of the protein backbone from the primary sequence. This approach is contrary to current trends that focus on increasingly complex models and extensive datasets. Despite using a minimal architecture, our model

achieved satisfactory accuracy in predicting dihedral angles, representing a computationally efficient starting point for more advanced protein secondary structure prediction models.

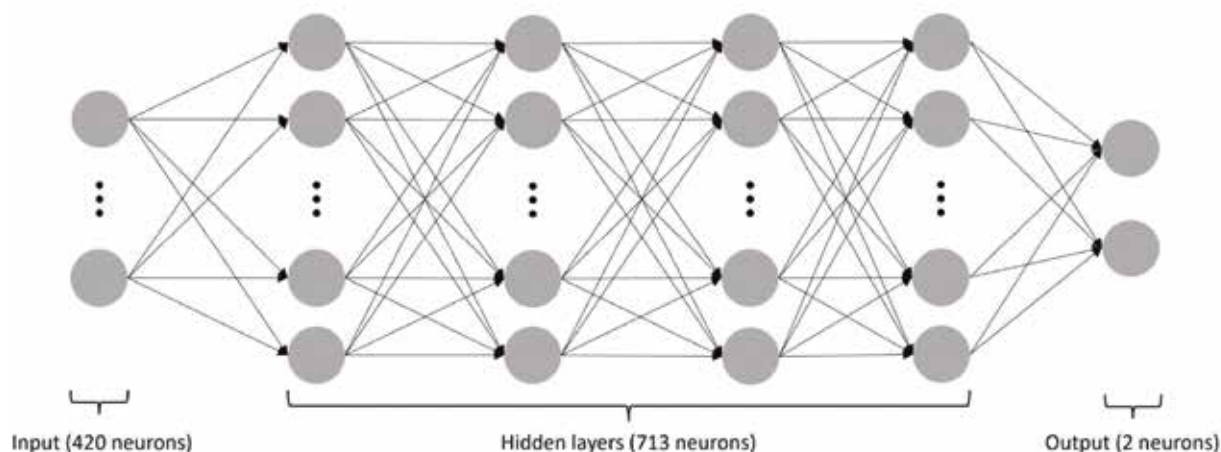


Figure 2. Schematic representation of the neural network architecture used for protein secondary structure prediction. Gray circles represent individual neurons, and arrows indicate connections between them.

We also systematically investigated the effect of microwave irradiation (in the frequency range from 300 MHz to 20 GHz) on the structure of 29 different proteins in an aqueous environment using nonequilibrium molecular dynamics. Results showed that microwaves through excited rotations of water molecules significantly hinder hydration of all investigated proteins. The proteins try to compensate for the lost interactions by interacting more potently with themselves leading to compacter protein structures with lower radii of gyration. This causes characteristic changes in the secondary and tertiary structures of proteins, affecting their physicochemical properties and biological activity. This finding has important implications for understanding the potential health effects of microwave radiation.

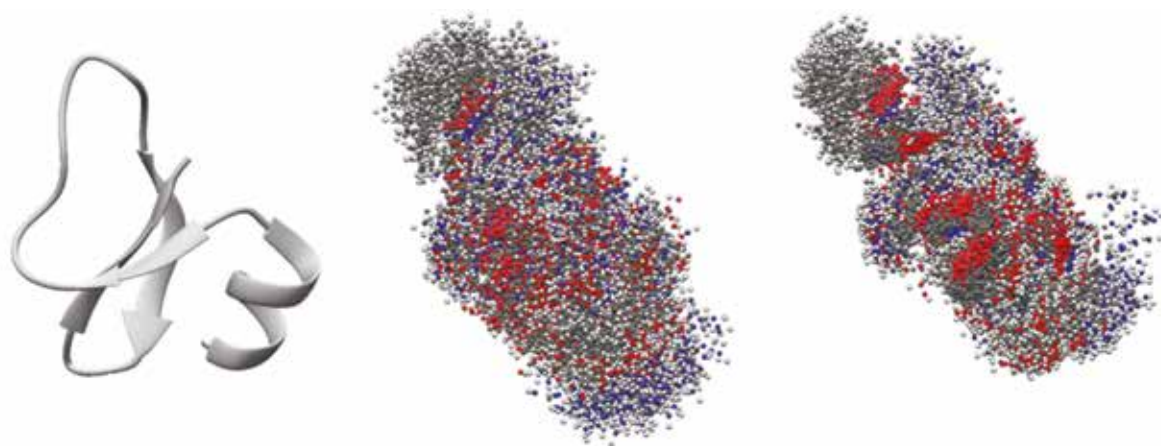


Figure 3. Comparison of the structure of human  $\beta$ -defensin-1 (PDB ID 2NLS) from experimental X-ray diffraction (left), from a 100 ns molecular dynamics simulation of the equilibrium state (middle), and from a 100 ns nonequilibrium molecular dynamics simulation of the microwave irradiation (right).

Finally, we conducted a thorough review of the role of neuropilins (NRP1 and NRP2) in various pathological conditions and investigated the potential of their modulators as therapeutic agents. The review included an analysis of neuropilin roles in cancer, viral infections (including SARS-CoV-2), cardiovascular diseases, and neuropathic pain. We identified promising modulators, such as peptidomimetics and small molecule antagonists, which represent potential drugs.



**KRKINE NAGRADE  
S PRIZNANJEM  
ZA IZSTOPAJOČE  
RAZISKOVALNO DELO**

---

KRKA SPECIAL RECOGNITION  
PRIZES FOR REMARKABLE  
RESEARCH WORK

**POVZETKI**  
ABSTRACTS

**Maja Sever, Dominik Škrinjar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Mentorica: **Tina Maver**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Somentorici: **Tanja Zidarič, Lidija Gradišnik**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

## Razvoj *in vitro* modela kože

3D-biotiskanje kože je revolucionaren pristop v regenerativni medicini ter pri testiranju farmacevtskih in kozmetičnih izdelkov. Ključni izziv ostaja razvoj hidrogela z optimalnimi mehanskimi lastnostmi, visoko biokompatibilnostjo in stopnjo ponovljivosti. V okviru naše raziskave smo analizirali vpliv temperature in trajanja zamrzovanja na fizikalno-kemijske lastnosti hidrogela, sestavljenega iz alginata, metilceluloze in nanofibrilirane celuloze, da bi zagotovili visoko stopnjo ponovljivosti med postopki biotiskanja. Rezultati so pokazali, da daljše zamrzovanje pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  povzroči izrazito prerazporeditev polimernih verig zaradi intenzivnejšega nastajanja ledenih kristalov. Posledično se znatno zmanjša viskoznost ter povečata makro- in mikroporoznost hidrogela, kar vpliva na njegovo iztisljivost, sposobnost za absorpcijo vode, nabrekanje in kinetiko degradacije. Ti učinki lahko ogrozijo strukturno stabilnost biotiskanih ogrodij. Nasprotno pa so bile spremembe pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  minimalne, kar kaže na boljše ohranjanje ključnih lastnosti materiala. Prvi smo sistematično ovrednotili vpliv zamrzovanja na hidrogelski sistem, namenjen biotiskanju kože, in pokazali, da je z natančno določenimi zamrzovalnimi pogoji mogoče doseči visoko stopnjo ponovljivosti in predvidljivosti lastnosti materiala. Naši izsledki predstavljajo pomembno osnovo za nadaljnjo optimizacijo shranjevanja hidrogelov in pomenijo pomemben korak k standardizaciji biotiskanih modelov kože *in vitro* za klinične in raziskovalne namene.

**Maja Sever, Dominik Škrinjar**, Faculty of Medicine, University of Maribor  
Supervisor: **Tina Maver**, Faculty of Medicine, University of Maribor  
Co-supervisor: **Tanja Zidarič, Lidija Gradišnik**, Faculty of Medicine, University of Maribor

## Development of *In Vitro* Skin Model

3D bioprinting of skin represents a revolutionary approach in regenerative medicine as well as in the testing of pharmaceutical and cosmetic products. A key challenge remains the development of a hydrogel with optimal mechanical properties, high biocompatibility, and reproducibility. In this study, we analysed the effects of temperature and freezing duration on the physicochemical properties of a hydrogel composed of alginate, methylcellulose, and nanofibrillated cellulose, with the aim of ensuring high consistency during the bioprinting process. The results showed that prolonged freezing at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  leads to significant rearrangement of polymer chains due to the intense formation of ice crystals. This results in a significant decrease in viscosity and an increase in both macro- and microporosity of the hydrogel, affecting its extrudability, water absorption, swelling, and degradation kinetics. These changes can compromise the structural stability of bioprinted scaffolds. In contrast, changes observed at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  were minimal, indicating better preservation of key material properties. To our knowledge, this is the first systematic evaluation of the effects of freezing on a hydrogel system designed for skin bioprinting. We demonstrated that carefully controlled freezing conditions can ensure a high degree of reproducibility and predictability of material properties. Our findings provide a valuable foundation for further optimisation of hydrogel storage and represent an important step toward the standardisation of bioprinted *in vitro* skin models for clinical and research applications.

**Taja Skube**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Robert Roškar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Timeja Planinšek Parfant**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Ugotavljanje vsebnosti nizkomolekularnih nitrozaminov v zdravilih s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo visoke ločljivosti

Nitrozamini so genotoksične nečistote, ki so vsepovsod okoli nas – v zraku, vodi, hrani, kozmetičnih izdelkih in ne nazadnje tudi v zdravilih. Od leta 2018, ko so bili potrebni obsežni odpoklici z nitrozaminskimi nečistotami onesnaženih zdravil, so nitrozamini eno pomembnejših področij delovanja regulativnih organov. Cilj magistrskega dela je bil tako razviti občutljivo, selektivno, natančno in robustno metodo za sočasno vrednotenje 13 nizkomolekularnih nitrozaminov v različnih zdravilih. Metoda temelji na predpripravi vzorca z ekstrakcijo na trdnem nosilcu, za kar smo proučili več kartuš za ekstrakcijo. Nato smo postopek ekstrakcije optimizirali. Pri tem smo se osredotočili na izbiro optimalne mase tabletne zmesi in volumna nanosa vzorca na kartušo ter na prilagajanje parametrov sušenja vzorca za koncentriranje analitov. Predpripravi vzorca je sledila analiza s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo visoke ločljivosti. Metodo smo uspešno validirali v skladu z USP-poglavjem o nitrozaminskih nečistotah, pri čemer smo potrdili njeno odlično linearnost, točnost, ponovljivost in občutljivost. Razvito analizo metodo smo uporabili za vrednotenje vsebnosti nitrozaminov v 16 farmacevtskih izdelkih z eno do tremi zdravilnimi učinkovinami in različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Dodatno smo tudi robustnost metode potrdili na več vzorcih zdravil. S tem smo dokazali primernost metode za rutinski nadzor kakovosti farmacevtskih izdelkov, s katerim bi zmanjšali tveganje za zdravje ljudi.

**Taja Skube**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Robert Roškar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Timeja Planinšek Parfant**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Determination of Low-Molecular-Weight Nitrosamines in Medicines by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry

Nitrosamines are genotoxic impurities present in our environment – in the air, water, food, cosmetics and, last but not least, in medicines. Since 2018, with the emergence of massive recalls of medicines contaminated with nitrosamine impurities, nitrosamines have become a major focus for regulatory authorities. The aim of this master's thesis was therefore to develop a sensitive, selective, accurate, and robust method for the simultaneous determination of 13 low-molecular-weight nitrosamines in different medicinal products. The method is based on sample pre-treatment by solid-phase extraction, where several extraction cartridges were considered. The extraction process was then optimised, with a focus on selecting the optimal tablet mass and sample loading volume on the cartridge, as well as adjusting the sample drying parameters to concentrate the analytes. Sample pre-treatment was followed by analysis using liquid chromatography coupled to high-performance mass spectrometry. The method was successfully validated according to the USP chapter on nitrosamine impurities, confirming its excellent linearity, accuracy, precision, and sensitivity. The developed analytical method was applied to determine the nitrosamine content in 16 pharmaceuticals containing one to three active pharmaceutical ingredients with varying physicochemical properties. The robustness of the method was further confirmed on several samples of medicines. This demonstrated the suitability of the method for routine quality control of pharmaceuticals, thereby reducing the risk to human health.

**Manca Bahor**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Jurij Svete**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Pretvorbe azakinolizinil diazonijevih tetrafluoroboratom s tioli

V okviru magistrskega dela je bil uspešno razvit in optimiziran fotoredoks kataliziran pristop sulfanilacije, s katerim je bilo sintetiziranih enajst 3-sulfanil-substituiranih (aza)kinolizinonskih produktov. Kot izhodne spojine so bile uporabljene 4-okso-4*H*-kinolizin-3- in 4-okso-4*H*-piridino[1,2-*a*]pirimidin-3-diazonijeve soli, ki so bile pripravljene po uveljavljenih postopkih iz literature. Ti diazonijevi intermediati so pod fotokemičnimi pogoji reagirali z difenil disulfidom, dimetil disulfidom ali *N,N'*-bis[(terc-butiloksi)karbonil]-L-cistin dimetil estrom, rezultat česar so bili zeleni sulfanilirani produkti. Po analogiji so bile izvedene tudi reakcije s tioli, pri čemer so nastali enaki produkti kot z disulfidnimi reagenti. Oba pristopa sta se izkazala za uspešna, vendar je bila metoda z uporabo disulfidov učinkovitejša, saj omogoča sintezo produktov z večjimi izkoristki. Reakcije z nekaterimi tioli so bile izvedene tudi pod termičnimi pogoji, pri čemer so tioli kot reagenti dosegli boljše rezultate kot pod fotokemičnimi pogoji. Glede na uspešne reakcije diazonijevih soli s cistinom in cisteinom je bila po analogiji izvedena še reakcija s 4-okso-4*H*-piridino[1,2-*a*]pirimidin-3-diazonijevim tetrafluoroboratom in beljakovino BSA.

**Manca Bahor**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Jurij Svete**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Transformations of Azaquinolizinyll Diazonium Tetrafluoroborates with Thiols

In this study, a photoredox-catalysed sulfanylation strategy was developed and optimised, resulting in the successful synthesis of eleven 3-sulfanyl-substituted (aza)quinolizinone products. The key precursors, 4-oxo-4*H*-quinolizin-3- and 4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-3-diazonium salts, were prepared following well-established literature protocols. These diazonium intermediates underwent photochemical reactions with diphenyl disulfide, dimethyl disulfide, or *N,N'*-bis[(tert-butoxy)carbonyl]-L-cystine dimethyl ester, leading to the desired sulfanylated products. Additionally, analogous reactions were carried out using thiols, yielding the same products as those obtained with disulfides. While both approaches proved effective, the disulfide-based approach demonstrated superior efficiency, resulting in products with higher overall yields. Further, thermal conditions were explored in reactions with certain thiols, where it was observed that thermal activation favoured better yields compared to the photochemical conditions. Based on the successful sulfanylation of diazonium salts with cystine and cysteine, the method was extended to include the reaction of 4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-3-diazonium tetrafluoroborate with the protein BSA.





# **KRKINE NAGRADE**

---

KRKA PRIZES

**POVZETKI**  
ABSTRACTS

## Preučevanje mehanizmov prenasičenja in obarjanja zdravilnih učinkovin *in vitro* v ponazorjenih *in vivo* pogojih

Vgradnja zdravilnih učinkovin (ZU) v napredne dostavne sisteme in spreminjanje fizioloških pogojev vzdolž prebavil lahko poleg raztapljanja ZU povzroči tudi njeno prenasičenje in obarjanje. V okviru doktorske naloge smo obarjanje, povzročeno s spremembo pH medija, spremljali z inovativnim pristopom s sočasn timerjenjem porazdelitve velikosti delcev in določenjem koncentracije raztopljene učinkovine v enostavnejšem *in vitro* modelu prenasičenja. Nadalje smo vzporedno razvijali biorelevantne modele *in vitro*, v katerih smo ločeno ponazarjali različne fiziološke parametre: *in vivo* profile pH vzdolž prebavil, kinetiko praznjenja sočasno zaužite vode iz želodca ter spreminjanje pH in koncentracije maščob. Tako smo ponazarjali pogoje v želodcu v različnih obdobjih po zaužitju obroka. Pri poskusih obarjanja v enostavnejšem modelu prenasičenja smo ugotovili značilno spreminjanje velikosti delcev, ki so glede na svojo velikost povzročili od valovne dolžine odvisno ali neodvisno zvišanje absorbanc. Posledično so delci vplivali tudi na izračunano koncentracijo raztopljene učinkovine. Ponazorjeni fiziološki parametri v biorelevantnih modelih pa so v različnem obsegu vplivali na obnašanje ZU, pri čemer je topnost ZU v testiranih medijih vplivala na izražanje drugih ponazorjenih parametrov. Ker je do prenasičenja in obarjanja prišlo tudi v biorelevantnih modelih, smo razlago mehanizmov obarjanja, ki smo jih opredelili v modelu prenasičenja, uspešno prenesli tudi na biorelevantne modele.

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

## Study of *In Vitro* Drug Supersaturation and Precipitation Mechanisms under Simulated *In Vivo* Conditions

The use of advanced drug delivery systems and changes in physiological conditions in the gastrointestinal (GI) tract not only enable drug dissolution but can also lead to supersaturation and precipitation. In this doctoral thesis, drug precipitation upon pH shift was studied using an innovative approach to simultaneously monitor the particle size distribution and the concentration of the dissolved drug in a simple *in vitro* precipitation model. Furthermore, we developed several biorelevant *in vitro* models with separately simulated selected GI tract parameters: *in vivo* pH profiles along the GI tract, gastric emptying kinetics of co-ingested water, and combinations of pH values and lipid concentrations representing the gastric conditions at different times after meal ingestion. Typical changes in particle size distribution were observed in the precipitation model, which induced an increase in measured absorbances in a wavelength-dependent or wavelength-independent way, depending on particle size. The increased absorbance values thus also affected the calculated concentration of the dissolved drug. A distinctive effect of the simulated physiological parameters in biorelevant models on drug behaviour was observed; however, drug solubility in the tested media determined the effect of other simulated parameters on drug behaviour. Since supersaturation and precipitation also occurred in biorelevant models, the precipitation mechanisms identified in the precipitation model were successfully translated into biorelevant models.

**Jernej Vajda**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Mentor: **Uroš Maver**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru  
Somentor: **Boštjan Vihar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

## Razvoj novih metod izdelave in karakterizacije mikrožilja v *in vitro* modelih

Doktorska disertacija obravnava optimizacijo postopkov, materialov in analiznih metod v tkivnem inženirstvu mikrožilja z večdisciplinarnim pristopom, ki poleg uveljavljenih bioloških in kemijskih metod vključuje računalniške simulacije, mehanske teste in nanotomografijo. V okviru raziskovalnega dela smo optimizirali linearnost ekstruzije mehanskih ekstruzijskih 3D-tiskalnikov, s čimer smo dosegli boljše in bolj ponovljive rezultate 3D-(bio)tiska vzorcev. Pri natisnjenih vzorcih smo primerjali uporabo  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{SrCl}_2$  kot ionskih zamreževalcev, pri čemer se je izkazalo, da je  $\text{SrCl}_2$  ob primerljivi celični presnovni aktivnosti izboljšal mehanske lastnosti materialov, kombinacija  $\text{Sr}^{2+}$  in  $\text{Ca}^{2+}$  pa bi lahko omogočila dodatno prilagoditev mehanskih lastnosti materialov.  $\text{Sr}^{2+}$  tudi zmanjša vpliv kalcijevih ionov na signalizacijo celic, kar je ključno za simuliranje biološkega okolja. Poleg tega smo s simulacijami računalniške dinamike tekočin določili mejne pogoje za razvoj peristaltične črpalke, s katero smo eksperimentalno ovrednotili vpliv strižnih napetosti na endotelijske celice in validirali simulirane rezultate. Ločeno smo na endotelijskih celicah iz različnih virov in na podpornih celicah – kožnih fibroblastih – preiskovali lastnosti materialov in njihov vpliv na viabilnost, ohranitev celičnega fenotipa in funkcionalnosti ter skupno presnovno aktivnost. Rezultati študij potrjujejo, da je z natančno optimizacijo procesov in materialov mogoče izboljšati funkcionalnost tkivnih modelov *in vitro*, kar odpira nove možnosti za napredek v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini.

**Jernej Vajda**, Faculty of Medicine, University of Maribor  
Supervisor: **Uroš Maver**, Faculty of Medicine, University of Maribor  
Co-supervisor: **Boštjan Vihar**, Faculty of Medicine, University of Maribor

## Development of New Fabrication and Characterisation Methods of Microvasculature in *In Vitro* Models

The doctoral dissertation addresses the optimisation of processes, materials, and analytical methods in tissue engineering of microvasculature using a multidisciplinary approach. This approach incorporates established biological and chemical methods as well as computational simulations, mechanical testing, and nanotomography. In the scope of this work, we optimised the linearity of extrusion in mechanical extrusion-based 3D printers, thereby achieving better and more reproducible results in 3D (bio)printing. For the printed samples, we compared the use of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{SrCl}_2$  as ionic crosslinkers, finding that the use of  $\text{SrCl}_2$  improved the mechanical properties of the materials while maintaining comparable cellular metabolic activity. Furthermore, the combination of  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions could allow for additional tailoring of the mechanical properties of the materials, while reducing the impact of calcium ions on cell signalling, the latter being crucial for simulating biological environments. Additionally, through computational fluid dynamics simulations, we determined the boundary conditions for developing a peristaltic pump, which was experimentally used to evaluate the effect of shear stress on endothelial cells and validate the simulated results. Separately, we investigated the properties of materials and their impact on cell viability, retention of cellular phenotype and functionality, as well as overall metabolic activity using endothelial cells from different sources and supportive cells, that is dermal fibroblasts. The research findings confirm that precise optimisation of processes and materials can improve functionality of *in vitro* tissue models, paving the way for advancements in tissue engineering and regenerative medicine.

**Barbara Herlah**, Kemijski inštitut Ljubljana  
Mentor: **Andrej Perdih**, Kemijski inštitut Ljubljana  
Somentor: **Izidor Sosič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Dinamični model DNA-topoizomeraze tipa II ter *in silico* načrtovanje novih katalitičnih zaviralcev kot potencialnih kemoterapevtikov

DNA-topoizomeraze tipa II so molekularni motorji, ki so ključni pri uravnavanju topoloških sprememb molekule DNA. Ker so bistveni za normalno delovanje celic, so pomembne tarče protirakavih učinkovin. Z uporabo molekularskih simulacij in dostopnih eksperimentalnih podatkov smo razvili dinamični model topoizomeraze tipa II in pokazali, da sta rotacijsko gibanje dimera in drsno gibanje znotraj DNA-vrat povezana s sposobnostjo prehoda T-segmenta skozi precepljen G-segment DNA. Raziskali smo tudi vlogo molekule ATP in ugotovili, da hidroliza ATP v ADP ali njegova odsotnost povečata širino N-vrat in njihovo konformacijsko aktivnost, kar kaže na njegovo alosterično vlogo. Razvili smo tudi več razredov katalitičnih zaviralcev človeške topoizomeraze tipa II, ki ciljajo na vezavno mesto za ATP, da bi obšli omejitve skupine topoizomeraznih strupov, ki se uporabljajo v kemoterapiji. Z molekularskimi simulacijami in metodami umetne inteligence smo optimizirali zaviralce iz skupine 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov ter pridobili analoge z dobro zaviralno aktivnostjo, nekoliko izboljšanimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in citotoksičnimi lastnostmi proti nekaterim rakavim celicam. Razvili smo novo metodo za načrtovanje učinkovin, ki temelji na dinamičnih farmakofornih modelih, in za validacijo uporabili vezavno mesto za ATP-topoizomeraze tipa II ter odkrili nove katalitične zaviralce naravnega izvora iz skupine flavonoidov. Tako razviti farmakoforni model smo uporabili še za odkritje substituiranih 3-(imidazol-2-il) morfolinov, ki delujejo kot katalitični zaviralci, se vežejo na ATPazno domeno in ne zavirajo protein kinaz. Predstavniki delujejo tudi citotoksično na več rakavih celičnih linij prek mehanizma, ki se razlikuje od mehanizmov kliničnih topoizomeraznih strupov.

**Barbara Herlah**, National Institute of Chemistry, Ljubljana  
Supervisor: **Andrej Perdih**, National Institute of Chemistry, Ljubljana  
Co-supervisor: **Izidor Sosič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Dynamical Model of Type II DNA Topoisomerase and *In Silico* Design of Novel Catalytic Inhibitors as Potential Chemotherapeutics

DNA topoisomerase II enzymes are molecular motors that play a crucial role in regulating topological changes in the DNA molecule. As they are essential for the normal functioning of cells, they are important targets for anticancer drugs used in chemotherapy. Using molecular simulations and available experimental data, we developed a dynamical model of topoisomerase II and showed that the rotational motion of the dimer and the sliding motion within the DNA gates are associated with the ability to pass the T-segment through the cleaved G-segment of DNA. We also investigated the role of the ATP molecule and found that hydrolysis of ATP to ADP – or its absence – increases the width of the N-gate and enhances its conformational activity, indicating an allosteric role. To overcome the limitations of topoisomerase poisons used in chemotherapy, we developed several classes of catalytic inhibitors of human topoisomerase II that target the ATP binding site. Using molecular simulations and artificial intelligence methods, we optimised 4,6-substituted 1,3,5-triazin-2(1H)-ones as catalytic inhibitors and obtained analogues with strong inhibitory activity, improved physicochemical properties as well as cytotoxic properties against certain cancer cells. We developed a new method of molecular design based on dynamic pharmacophore modelling, validated it using the ATP binding site of topoisomerase II, and discovered new catalytic inhibitors of natural origin from the flavonoid group. The developed pharmacophore model was further used to identify substituted 3-(imidazol-2-yl)morpholines, which act as catalytic inhibitors, bind to the ATPase domain, and do not inhibit protein kinases. Some analogues were cytotoxic against several cancer cell lines through a mechanism distinct from that of clinical topoisomerase poisons.

**Katja Schoss**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Nina Kočevar Glavač**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Samo Kreft**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Raziskave sestave in biološke učinkovitosti rastlinskih izvlečkov, pridobljenih s sub- in superkritičnimi fluidi

Trajnostni razvoj in krožno gospodarstvo optimizirata rabo virov, zmanjšujeta količino odpadkov in spodbujata ekološko ustrezne tehnologije. V skladu s cilji Agende za trajnostni razvoj do leta 2030 in evropskega zelenega dogovora smo v disertaciji raziskali uporabo naprednih metod zelene ekstrakcije bioaktivnih spojin iz rastlinskih virov s sub- in superkritičnimi fluidi. Proučili smo učinkovitost ekstrakcije s subkritično vodo pri izolaciji fenolnih spojin iz bele jelke in industrijske konoplje ter ovrednotili antioksidativni potencial teh izvlečkov. Analizirali smo vpliv različnih ekstrakcijskih parametrov na izkoristek, sestavo in stabilnost bioaktivnih spojin ter določili optimalne pogoje za pridobivanje fenolov z veliko biološko aktivnostjo. Ekstrakcijo s superkritičnim CO<sub>2</sub> smo uporabili za pridobivanje rastlinskih olj in protimikrobnih izvlečkov ter ocenili njihovo učinkovitost. Ugotovili smo, da ta metoda zagotavlja velik izkoristek olj, ki so bogata z bioaktivnimi spojinami, ter da določeni rastlinski izvlečki izkazujejo močno protiglivično delovanje proti pomembnim patogenom, ki povzročajo škodo v kmetijstvu. Rezultati potrjujejo, da zeleni ekstrakcijski tehniki zmanjšujeta okoljski odtis in omogočata pridobitev izvlečkov z večjo vsebnostjo bioaktivnih spojin. S tem prispevata k inovacijam v farmacevtski, kozmetični in prehrabni industriji ter k razvoju trajnostnih industrijskih procesov z večjo dodano vrednostjo.

**Katja Schoss**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Nina Kočevar Glavač**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Samo Kreft**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Research on Composition and Biological Efficacy of Plant Extracts Obtained with Sub- and Supercritical Fluids

Sustainable development and the transition to a circular economy are key goals of modern industry, optimising resource use, reducing waste, and promoting environmentally friendly technologies. In line with the goals of the Slovenian 2030 Agenda for Sustainable Development and the European Green Deal, this dissertation explores the application of advanced green extraction methods for recovering bioactive compounds from plant sources using subcritical and supercritical fluids. We examined the efficiency of subcritical water extraction for isolating phenolic compounds from silver fir and industrial hemp and evaluated the antioxidant potential of these extracts. We analysed the influence of different extraction parameters on the yield, composition, and stability of bioactive compounds, determining optimal conditions for obtaining phenols with high biological activity. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction was used to recover plant oils and antimicrobial extracts, whose effectiveness was assessed. We found that this method produces a high yield of oils rich in bioactive compounds and that certain plant extracts exhibit strong antifungal activity against key pathogens causing damage in agriculture. The results confirm that green extraction techniques reduce environmental impact while producing extracts with a higher bioactive compound content. This contributes to innovation in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries and supports the development of sustainable industrial processes with a higher added value.

**Blaž Grilc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Odon Planinšek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## **Razvoj bukalnih polimernih filmov za sistemsko dostavo zdravilnih učinkovin in diskriminatorne *in vitro* metode sproščanja**

Nenehen razvoj zdravil je ključen za spopadanje z boleznimi sodobnega sveta, k čemur malo prispeva tudi predstavljeno doktorsko delo. V njem so sistematično obravnavani bukalni filmi – mukoadhezivne farmacevtske oblike za lokalno ali sistemsko dostavo zdravilnih učinkovin (ZU). Njihovega razvoja smo se lotili večplastno. Sprva smo poiskali primerne ZU za bukalno dostavo. Osredotočili smo se na ZU z majhno biološko uporabnostjo in majhnimi odmerki. Pri formuliranju bukalnih filmov smo si pomagali s statističnimi pristopi načrtovanja eksperimentov. Posebna pozornost je bila namenjena formuliranju filmov z valsartanom in metoklopramidom. Filme smo pripravili z ZU v amorfnih in kristalnih oblikah ter ovrednotili njihove lastnosti. Med razvijanjem formulacij smo prepoznali pomembnost opazovanja videza filmov, saj je tako mogoče dobiti veliko informacij o njihovi kakovosti. Za kvantitativno oceno teh lastnosti smo uporabili strojno analizo slik z nevronske mreže. Na izziv sproščanja ZU iz bukalnih filmov smo odgovorili z razvojem metode dvostranskega sproščanja bukalnih filmov in potrdili, da je ta sposobna ponovljivo razlikovati med formulacijami z različno kvantitativno sestavo. To metodo smo primerjali z uveljavljenimi metodami sproščanja in ugotovili njeno nadpovprečno selektivnost. Naloga potrjuje potencial bukalnih filmov in odgovarja na izzive njihovega formuliranja.

**Blaž Grilc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Odon Planinšek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## **Development of Polymer Buccal Films for Systemic Administration of Active Pharmaceutical Ingredients and Discriminatory *In Vitro* Release Method**

The continuous development of pharmaceuticals is essential in addressing the diseases of the modern world, to which this doctoral dissertation makes a modest contribution. This work systematically explores the field of buccal films – mucoadhesive dosage forms intended for local or systemic delivery of active pharmaceutical ingredients (APIs). Their development was approached in a multifaceted manner. Suitable APIs for buccal delivery were identified, with a focus on compounds with low bioavailability and low dose requirements. Formulation was guided by statistical methods, particularly design-of-experiments approaches. Special attention was given to films containing valsartan and metoclopramide. These films were prepared using APIs in both amorphous and crystalline forms, and their properties were thoroughly evaluated. The visual appearance of films was recognised as an important indicator of quality. For quantitative evaluation, image analysis supported by neural networks was employed. The challenge of API release was addressed by developing a novel, bidirectional release testing method, capable of reproducibly distinguishing between formulations with varying compositions. The method demonstrated superior selectivity compared to established systems. The dissertation reinforces the potential of buccal films and addresses key formulation challenges of this promising drug delivery platform.

**Nika Kučuk**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Mentorica: **Maja Leitgeb**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Somentorica: **Mateja Primožič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

## Napredni biološko aktivni transportni sistemi ekstraktov manga (*Mangifera indica*) za terapevtske aplikacije *in vitro*

Doktorska disertacija obravnava študijo biološke aktivnosti ekstraktov iz olupkov manga (MPE) in optimizacijo sinteznih metod transportnih sistemov, kot so alginatne kroglice, liposomi in micelarne membrane mikrobnega izvora, vključno s proučevanjem njihove funkcionalizacije z MPE za različne terapevtske aplikacije (*in vitro*). MPE, pridobljeni z različnimi ekstrakcijskimi metodami, so izkazali veliko vsebnost različnih pomembnih bioaktivnih spojin, antioksidativno aktivnost in protibakterijske lastnosti. Z ionotropskim geliranjem smo proizvedli alginatne kroglice, ki so izkazale odlično stabilnost v kislih želodčnih pogojih, kar omogoča ciljno dostavo v črevesje. Liposome smo sintetizirali z optimizirano hidratacijo tankega lipidnega filma z dodatkom 5-milimetrskih steklenih kroglic in 24-urnim stresanjem, s katero smo dobili zelo stabilno in monodisperzno formulacijo liposomov. Micelarne membrane smo dobili s submerzno kultivacijo terapevtskih gob *Ganoderma lucidum* in *Pleurotus ostreatus* v optimiziranih pogojih. Potrdili smo prisotnost širokega spektra funkcionalnih skupin ter vlaknasto in porozno strukturo nastalih micelarnih membran. Doktorska disertacija predstavlja trajnosten in ekonomičen pristop proizvodnje naprednih transportnih sistemov, uspešno funkcionaliziranih z MPE. Zagotovljeno je bilo enakomerno sproščanje MPE iz transportnih sistemov ter uspešno ohranjenost njegove protibakterijske delovanje na rast bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Ti transportni sistemi so obetavni nosilci za uporabo v farmacevtski, prehrabni in kozmetični industriji ter biomedicini. Uporaba MPE, pridobljenega iz odpadnega materiala, za funkcionalizacijo transportnih sistemov pomembno prispeva tudi h krožnemu gospodarstvu in zmanjšanju onesnaževanja okolja.

**Nika Kučuk**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Supervisor: **Maja Leitgeb**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Co-supervisor: **Mateja Primožič**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## Advanced Biologically Active Delivery Systems of Mango Extracts (*Mangifera Indica*) for *In Vitro* Therapeutic Applications

The dissertation investigates the biological activity of mango peel extracts (MPE) and optimises synthesis methods of delivery systems, such as alginate beads, liposomes, and micellar membranes of microbial origin. It also investigates their functionalisation with MPE for various therapeutic applications (*in vitro*). The MPEs, obtained through various extraction methods, exhibited a high content of various important bioactive compounds, antioxidant activity, and antibacterial properties. Alginate beads were produced using the ionotropic gelation method and demonstrated excellent stability under acidic gastric conditions, which enables targeted delivery to the intestine. Liposomes were synthesised using an optimised thin lipid film hydration method with the addition of 5 mm glass beads and 24-hour shaking, resulting in a highly stable and monodisperse liposome formulation. Micellar membranes were obtained under optimised submerged cultivation conditions of the medicinal mushrooms *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus*. The presence of a wide range of functional groups, as well as the fibrous and porous structure of the resulting micellar membranes, was confirmed. The dissertation presents a sustainable and cost-effective approach to the production of advanced delivery systems successfully functionalised with MPE. Controlled release of MPE from the delivery systems was achieved while preserving its antibacterial activity against the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. These delivery systems represent promising carriers for applications in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries, as well as in other biomedical fields. The use of MPE obtained from waste material for the functionalisation of delivery systems also significantly contributes to the circular economy and the reduction of environmental pollution.

**Nika Strašek Benedik**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Izidor Sosič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Matej Sova**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Razvoj zaviralcev imunoproteasoma in modulatorjev signalnih poti, udeleženih v imunskem odzivu, s protitumornim in protivnetnim delovanjem

Imunski sistem lahko v določenih okoliščinah postane čezmerno aktiven ali premalo odziven, kar vodi v razvoj kroničnih vnetij, avtoimunskih bolezni in rakavih obolenj. Z zaviranjem pretiranega imunskega odziva lahko zdravimo avtoimunske bolezni, medtem ko lahko z imunomodulatorji, ki dodatno aktivirajo imunski sistem, okrepimo odziv proti okužbam ali rakavim celicam. V našem delu smo se osredotočili na razvoj imunomodulatornih učinkovin, s katerimi smo ciljali različne farmakološke tarče, vključene v patogenezo omenjenih obolenj: TLR7 in 8, TAK1 in imunoproteasom. Načrtovanja in optimizacije novih učinkovin smo se lotili z različnimi pristopi. Sintetizirali in biološko ovrednotili smo nove visokopotentne in selektivne agoniste TLR7 in selektivne antagoniste TLR8. Z načrtovanjem na osnovi fragmentov smo pripravili obsežno knjižnico 2-cianobenzotiazolov, benzimidazolov in 1-metilbenzimidazolov, ki smo jim določili stabilnost in reaktivnost. Pripravljeni analogi so izkazali selektivno zaviralno aktivnost proti imunoproteasomu v nizkem mikromolarnem območju. Prvi smo načrtovali, sintetizirali in biološko ovrednotili himerne razgrajevalce TAK1, ki so povzročili razgradnjo TAK1 v s TNF- $\alpha$  stimuliranih celični linijah raka dojke in monocitni levkemični celični liniji. Selektivno delovanje spojin le pod vnetnimi pogoji pomeni velik potencial za nadaljnji razvoj selektivnega zdravljenja za različna obolenja, povezana z neustreznim imunskim odzivom.

**Nika Strašek Benedik**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Izidor Sosič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Matej Sova**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Development of Immunoproteasome Inhibitors and Modulators of Immune Signalling Pathways with Anti-Tumour and Anti-Inflammatory Activity

The immune system can become dysregulated, leading to chronic inflammation, autoimmune diseases, or cancer. Autoimmune diseases are treated by suppressing excessive immune response, while stimulating the immune system can enhance defence against infections or cancer. In our work, we focused on the development of new immunomodulatory agents for different pharmacological targets involved in the pathogenesis of autoimmune diseases and cancers: TLR7 and 8, TAK1 and immunoproteasome. We synthesised and biologically evaluated a new series of highly potent and selective TLR7 agonists and TLR8 antagonists. Using fragment-based design, we prepared a large library of 2-cyanobenzothiazoles, benzimidazoles, and 1-methylbenzimidazoles and determined the reactivity and stability of the synthesised derivatives. The prepared analogues showed selective inhibitory activity against the immunoproteasome in the low micromolar range. We were the first to develop, synthesise, and biologically study chimeric TAK1 degraders, which induced TAK1 degradation in a TNF- $\alpha$ -stimulated breast cancer cell line and a monocytic leukaemia cell line. The selective effect of our compounds under inflammatory conditions shows great potential for further development of targeted therapies for various conditions related to an improper immune response.

**Kaja Kupnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

Mentorica: **Maja Leitgeb**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Mateja Primožič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

## Sinteza funkcionaliziranih nanoceluloznih hibridov z ekstrakti avokada (*Persea americana*) s protibakterijskim delovanjem

Naraščajoč problem protimikrobne odpornosti zahteva iskanje novih in alternativnih varnih protimikrobnih sredstev, pridobljenih iz naravnih virov, ki bi z različnimi mehanizmi omogočila učinkovito zaviranje rasti mikroorganizmov. Zato smo se osredotočili na pridobivanje protimikrobno učinkovitih ekstraktov iz koščic avokada (ASE), ki niso užitne in jih obravnavamo kot odpadno biomaso, po drugi strani pa so bogat vir biološko aktivnih spojin. Primerjali smo učinkovitost različnih ekstrakcijskih metod in topil (ultrazvočne ekstrakcije, Soxhletove ekstrakcije, ekstrakcije s superkritičnimi fluidi), njihov vpliv na vsebnost biološko aktivnih spojin in fitokemikalij v ASE ter njihovo encimsko, antioksidativno in protimikrobno aktivnost. Za nadaljnjo uporabo ASE je pomembna tudi njihova vgradnja v biokompatibilen, netoksičen in mehansko primeren nosilec, ki omogoča nadzorovano in trajno sproščanje biološko aktivnih spojin. Sintetizirali smo funkcionalizirane nanocelulozne (NC) hibride, da bi proučili njihovo protibakterijsko delovanje in možnost uporabe kot obloge pri celjenju ran. V ta namen smo ASE vgradili v dva različna tipa NC-materialov – bakterijsko nanocelulozo in nanofibrilirano celulozo. Proučevali smo njihovo morfologijo, kemično sestavo ter sproščanje ASE iz NC-nosilcev. Izvedli smo tudi študijo učinkovitosti NC-hibridov z ASE proti bakterijama *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*, ki sta povezani s kožnimi boleznimi in protimikrobno odpornostjo. Določitev hidrodinamične velikosti delcev, zetapotenciala in indeksa polidisperznosti ASE je omogočila dodatno razlago možnih mehanizmov protibakterijske aktivnosti.

**Kaja Kupnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor

Supervisor: **Maja Leitgeb**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Co-supervisor: **Mateja Primožič**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## Synthesis of Functionalised Nanocellulose Hybrids with Avocado (*Persea Americana*) Extracts with Anti-bacterial Activity

The growing problem of antimicrobial resistance calls for the search for new, alternative, and safe antimicrobial agents derived from natural sources, capable of effectively inhibiting the growth of microorganisms through different mechanisms. Therefore, our study focused on the production of antimicrobial extracts from avocado seeds (ASE), which are inedible and treated as waste biomass, but represent a rich source of biologically active compounds. The efficiency of different extraction methods and solvents (ultrasonic, Soxhlet, supercritical fluid extraction) and their effect on the content of biologically active compounds and phytochemicals in ASEs, as well as on their enzymatic, antioxidant, and antimicrobial activities were determined. For the further use of ASEs, it is also important to incorporate them into a biocompatible, non-toxic, and mechanically suitable carrier that allows a controlled and sustained release of biologically active compounds. Functionalised nanocellulose (NC) hybrids were synthesised for their potential use as wound healing dressings. For this purpose, ASEs were incorporated into two different types of NC materials: bacterial nanocellulose (BNC) and nanofibrillated cellulose (CNF). Their morphology, chemical composition, and release of ASEs from the NC carriers were studied. A study was also conducted on the antibacterial efficacy of NC hybrids with ASE against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, bacteria associated with skin diseases and antimicrobial resistance. The determination of hydrodynamic particle size, zeta potential, and polydispersity index of ASE enabled further elucidation of possible mechanisms of antibacterial activity.

**Aljaž Škrjanc**, Kemijski inštitut Ljubljana  
Mentorica: **Nataša Zabukovec Logar**, Kemijski inštitut Ljubljana

## **Zelena sinteza zeolitnih imidazolatnih ogrodij in njihovo ovrednotenje za zajem CO<sub>2</sub> v vlažnih pogojih**

Zeolitna imidazolatna ogrodja (Zeolitic imidazolate framework, ZIF) so kovinsko-organski porozni materiali, ki se v zadnjih letih temeljito proučujejo za sorpcijske aplikacije, tudi CO<sub>2</sub>, predvsem zaradi hidrotermične stabilnosti in primerne kinetike za adsorpcijo plinov. Pregled člankov je pokazal, da je večina raziskav omejena na majhno skupino ZIF, pri čemer je v več kot polovici primerov uporabljen ZIF-8. Čeprav je bil ZIF-8 uspešno pripravljen v vodi in celo v pogojih brez topila, se priprava drugih ZIF še vedno močno opira na solvotermalno sintezo s topili na osnovi formamida, ki obremenjujejo okolje. Cilj disertacije je bil razviti zelene solvotermalne in mehanokemijske sintezne pristope za znane ZIF in nato razširiti raziskavo za pripravo novih ZIF-materialov za izboljšanje sorpcijskih lastnosti. Cilj v zvezi z njimi je bil eksperimentalno določiti optimalno topologijo in funkcionalnost ZIF za adsorpcijo CO<sub>2</sub> v vlažnih pogojih. Razviti so bili modeli vlažnih plinskih izoterm, in te so bile izmerjene za serijo uspešno pripravljenih produktov, večinoma s topologijami SOD (sodalit) in RHO ter cinkom in nikljem kot kovinskimi vozlišči. Nazadnje so bili nekateri novi vezni materiali iz bioloških virov testirani za uporabo z ZIF.

**Aljaž Škrjanc**, National Institute of Chemistry, Ljubljana  
Supervisor: **Nataša Zabukovec Logar**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

## **Green Synthesis of Zeolitic Imidazolate Frameworks and Their Evaluation for CO<sub>2</sub> Capture in Humid Conditions**

Zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs), a subgroup of metal-organic frameworks, have recently been extensively studied for sorption applications, also CO<sub>2</sub>, due to their superior stability and kinetics in vapour/gas adsorption. An overview of articles shows that research is mostly limited to a small group of frameworks, with ZIF-8 being used in more than half of ZIF-related papers. While ZIF-8 has successfully been prepared in water and even in solvent-free conditions, the remaining ZIF syntheses still heavily rely on the solvothermal synthesis, which involves environmentally harmful formamide-based solvent systems and multi-day synthesis times. The goal of this thesis was to develop green synthesis approaches, both solvothermal and mechanochemical, for known ZIFs and then extend the scope to the preparation of new ZIF materials. The aim was to experimentally determine the optimal topology and functionality of ZIFs for CO<sub>2</sub> adsorption in humid conditions. Model humid gas isotherms were developed and measured for a series of successfully prepared ZIFs, mostly with SOD (sodalite) and RHO framework topologies and Zn and Ni as metal nodes. Finally, certain novel bio-based binder materials were tested for their use with ZIFs.

**Lucija Ana Vrščaj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Janja Marc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Barbara Ostanek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Vloga nekodirajočih RNA pri anabolem zdravljenju osteoporoze s teriparatidom

Osteoporoza je najpogostejša presnovna bolezen kosti. Zanja sta značilni zmanjšana kostna masa in porušena mikroarhitektura, kar povečuje tveganje za zlome. Zdravimo jo predvsem z antiresorptivnimi zdravilnimi učinkovinami, kot so bisfosfonati in denosumab. Ti zavirajo resorpcijo kostnine, vendar ne spodbujajo njene tvorbe. Teriparatid (TPTD) je prva registrirana osteoanabolna učinkovina, ki spodbuja kostno tvorbo, odzivi na zdravljenje pa se med posamezniki razlikujejo. V doktorskem delu smo se z raziskavo *in vitro* in klinično raziskavo osredotočili na vlogo nekodirajočih RNA (ncRNA) – mikroRNA (miRNA), dolgih nekodirajočih RNA (lncRNA) in krožnih RNA (circRNA) – pri uravnavanju osteoanabolnega odgovora na TPTD. Transkriptomska analiza mezenhimskih matičnih celic po izpostavitvi TPTD je razkrila razlike v izražanju ncRNA. Bioinformacijska analiza je pokazala ključne miRNA in tri osrednje signalne poti – pluripotentnost matičnih celic, Hippo in TGF- $\beta$ , ki so vključene v delovanje TPTD. Za izbrane miRNA smo na serumskih vzorcih bolnic potrdili potencial, ki ga imajo kot zgodnji biološki označevalci (ne)odziva na zdravljenje s TPTD. Nazadnje smo s funkcijsko analizo na novo potrdili miRNA, ki spodbujajo osteogenezo (npr. hsa-miR-375-3p, hsa-miR-20b-5p) in zavirajo adipogenezo (npr. hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-363-3p) ter tako lahko prispevajo k močnejšemu učinku TPTD pri zdravljenju osteoporoze. Naši rezultati prispevajo k boljšemu razumevanju delovanja TPTD in razvoju prilagojenega zdravljenja osteoporoze.

**Lucija Ana Vrščaj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Janja Marc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Barbara Ostanek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Role of Non-Coding RNAs in Anabolic Treatment of Osteoporosis with Teriparatide

Osteoporosis is the most prevalent metabolic bone disorder, characterised by reduced bone mass and disrupted microarchitecture, leading to increased fracture risk. It is primarily treated with antiresorptive agents, such as bisphosphonates and denosumab, which inhibit bone resorption, but do not promote bone formation. Teriparatide (TPTD) is the first registered osteoanabolic agent that stimulates bone formation; however, treatment responses vary among individuals. In this doctoral research, we focused on the role of non-coding RNAs (ncRNAs) – including microRNAs (miRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs), and circular RNAs (circRNAs) – in regulating the osteoanabolic response to TPTD through both *in vitro* and clinical investigations. Transcriptomic analysis of mesenchymal stem cells (MSCs) post-TPTD treatment revealed differential expression of ncRNAs. Bioinformatic analysis identified key miRNAs and three major signalling pathways – stem cell pluripotency, Hippo, and TGF- $\beta$  – as central to TPTD-mediated bone formation. Selected miRNAs demonstrated potential as early biomarkers of therapeutic (non)response to TPTD therapy using serum samples from female patients. Through functional analysis, we highlighted miRNAs that promote osteogenesis (e.g. hsa-miR-375-3p, hsa-miR-20b-5p) and inhibit adipogenesis (e.g. hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-363-3p), thereby potentially enhancing the therapeutic effect of TPTD in the treatment of osteoporosis. These findings advance the mechanistic understanding of TPTD action and support the development of personalised osteoporosis therapies.

## Mehanizmi elektroporacije in fizikalno-kemijski dejavniki, pomembni pri terapijah z elektroporacijo

Elektroporacija je biofizikalni pojav, ki ga povzroči dovajanje kratkih visokonapetostnih električnih impulzov biološkemu tkivu. Ti impulzi začasno povečajo prepustnost celične membrane, kar omogoči prehod ionov in molekul, ki sicer ne bi mogli skozi. Elektroporacija se široko uporablja v biomedicini, biotehnologiji, pri ablaciji tumorjev, genski terapiji, elektrokemoterapiji, zdravljenju srčnih aritmij ter v različnih postopkih v živilski industriji. Kljub razširjeni uporabi ostajajo slabo raziskani številni pomembni dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost elektroporacije. Ta doktorska disertacija obravnava tri takšne dejavnike (anizotropijo skeletne mišice, elektrokemično povzročene spremembe pH in elektroosmozni tok) ter proučuje njihov pomen za zdravljenje, temelječe na elektroporaciji. Najprej smo podrobno raziskali anizotropno električno obnašanje skeletne mišice. Razvili smo večstopenjske numerične modele, ki predstavljajo skeletno mišico na različnih ravneh od posameznih celic do celotnega tkiva in zajemajo vpliv mikroskopske strukture na makroskopske električne lastnosti. Modele in izsledke smo potrdili z ablacijskimi poskusi *in vivo*, MRI-slikanjem gostote toka in impedančno spektroskopijo *ex vivo*. Ti pristopi so pokazali, da anizotropija skeletne mišice pomembno vpliva na porazdelitev električnega polja, geometrijo lezij in poti toka, izvira pa predvsem iz neprepustnosti plazemske celične membrane. V nadaljevanju smo razvili mehanistični numerični model za napovedovanje dinamike pH, povezane z elektroporacijskimi impulzi. Model je upošteval elektrokemične reakcije na elektrodah in bil potrjen z agaroznimi geli z dodanimi pH-indikatorji in kalibriranim sistemom za slikanje. Zanesljivo je zajel prostorsko in časovno evolucijo kislih in bazičnih območij. Nazadnje smo eksperimentalno ovrednotili elektroosmozni tok v krompirju, skeletni mišici in agaroznih fantomih. Rezultati so pokazali njegov pomembni prispevek k deformaciji tkiva in gibanju tekočin, zlasti pri manjših jakostih toka.

**Rok Šmerc**, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: **Samo Mahnič-Kalamiza**, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

## Mechanisms of Electroporation and Physicochemical Factors of Importance to Electroporation-Based Therapies

Electroporation is a biophysical phenomenon induced by applying short electrical high-voltage pulses to biological tissue. These pulses temporarily increase the permeability of the cell membrane, allowing ions and molecules to which the membrane is otherwise impermeable to pass through. Electroporation is widely used in biomedicine, biotechnology, and food processing, in applications such as tumour ablation, gene therapy, electrochemotherapy, cardiac ablation, and various applications in the food industry. Despite its widespread use, several important factors influencing electroporation efficacy remain poorly understood. This doctoral dissertation investigated three such factors, namely skeletal muscle anisotropy, electrochemically induced pH changes, and electroosmotic flow, and explored their implications for electroporation-based treatments. Firstly, the anisotropic electrical behaviour of skeletal muscle tissue was investigated in detail. Multiscale numerical models were developed to represent skeletal muscle from the level of individual cells to the tissue level, capturing how microscale structure influences macroscopic electrical properties. The models and findings were validated by *in vivo* ablation experiments, and *ex vivo* MRI-based current density imaging and impedance spectroscopy. These approaches demonstrated that skeletal muscle anisotropy significantly influences electric field distribution, lesion geometry, and current pathways, originating primarily from the cell plasma membrane. Secondly, a mechanistic numerical model was developed to predict pH dynamics associated with electroporation pulses. It accounted for electrochemical reactions at the electrodes and was validated using agarose gels with embedded pH indicators and a calibrated imaging system. The model reliably captured the spatial and temporal evolution of acidic and alkaline zones. Thirdly, electroosmotic flow was experimentally characterised in potato, skeletal muscle, and agarose. The results revealed a significant electroosmotically-driven tissue deformation and fluid movement, especially at lower current amplitudes.

**Nina Zupan**, Fakulteta za zdravstvene vede in šport (UFR3S), Oddelek za farmacijo, Univerza v Lillu  
Mentorica: **Susanne Florin-Muschert**, UFR3S, Oddelek za farmacijo, Univerza v Lillu  
Somentorica: **Emeline Dudognon**, Fakulteta za znanost in tehnologijo, Univerza v Lillu

## Izdelava polimernih zmesi z glibenklamidom z iztiskanjem v talini: povezava med procesnimi pogoji, fizikalno obliko in raztapljanjem

Slabo vodotopne zdravilne učinkovine (ZU) za peroralno uporabo so velik izziv v farmacevtskem razvoju. Učinkovita strategija za izboljšanje topnosti je priprava amorfnih trdnih disperzij, ki omogočajo povečanje Gibbsove proste energije in hitrosti raztapljanja, zlasti pri ZU razredov BCS II in IV. Vendar je amorfn oblika termodinamsko manj stabilna od kristalne. Iztiskanje v talini (HME) je neprekinjen, prilagodljiv postopek brez uporabe topil, ki omogoča pretvorbo kristalnih ZU v amorfn disperzije. V tem raziskovalnem delu je bilo 30 % glibenklamida (GLB), slabo topne ZU, s HME vgrajenega v polimerno matriko. Kot nosilci, ki so omogočili izvedbo procesa, so bile uporabljene termoplastne zmesi polimerov. Cilj raziskave je bil razviti in opredeliti ternarne zmesi, pridobljene s HME, ter oceniti njihovo fizikalno stabilnost in profil raztapljanja glede na procesne pogoje in sestavo formulacije. Drugi cilj je bil oceniti vpliv postopka HME na izkoristek ZU, da bi bolje razumeli toplotno razgradnjo toplotno občutljivih učinkovin. S spreminjanjem temperature procesa, hitrosti vrtenja ter zasnove in konfiguracije vijakov so bile pripravljene različne formulacije. Poleg tega je bil uporabljen pristop načrtovanja eksperimentov za prepoznavanje ključnih procesnih parametrov, ki vplivajo na formulacijo ternarnih zmesi. Rezultati so pokazali, da je pri višji temperaturi iztiskanja in večji hitrosti vrtenja vijaka amorfizacija zaradi večjega toplotnega in strižnega vpliva boljša. Pretvorbo v amorfn obliko sta dodatno spodbudili geometrija vijaka (trojni vijačnik v primerjavi z dvojnim) in uporaba več gnetilnih elementov v konfiguraciji. Pri določenih pogojih shranjevanja so nastale formulacije ostale kinetično stabilne (amorfne) še šest mesecev. Raziskave raztapljanja so pokazale, da je sproščanje zdravila odvisno predvsem od pH in polimerne matrike, manj pa od fizikalnega stanja GLB.

**Nina Zupan**, Department of Pharmacy, Faculty of Health and Sport Sciences (UFR3S), University of Lille  
Supervisor: **Susanne Florin-Muschert**, Department of Pharmacy, UFR3S, University of Lille  
Co-supervisor: **Emeline Dudognon**, Faculty of Science and Technology, University of Lille

## Glibenclamide-Loaded Polymer Blends Produced by Hot-Melt Extrusion: Process Parameters, Physical State, and Dissolution Properties

Poorly water-soluble drugs for oral administration pose a significant challenge in pharmaceutical development. An effective strategy to improve solubility is the preparation of amorphous solid dispersions (ASDs), which allow the increase in Gibbs free energy and dissolution rates, particularly in BCS class II and IV drugs. However, the amorphous state is thermodynamically less stable than the crystalline form. Hot-melt extrusion (HME), a continuous, scalable and solvent-free process, enables the conversion of crystalline drugs into amorphous dispersions. In this study, 30% glibenclamide (GLB), a poorly soluble drug, was incorporated into a polymer matrix using HME. Thermoplastic polymer-polymer blends served as carriers to facilitate extrusion. The aim was to develop and characterise ternary blends produced by HME, assessing their physical stability and dissolution profiles based on process conditions and formulation variables. Another aim was to evaluate the impact of HME process on drug recovery to better understand thermal degradation of heat-sensitive active pharmaceutical ingredients. Different formulations were produced by varying extrusion temperature, rotation speed, and the configuration and design of the screw elements. Furthermore, a design-of-experiments approach was applied to identify the key process parameters impacting ternary blend formulation. The results indicated that higher extrusion temperatures and higher screw speed improved amorphisation, likely due to greater thermal and shear input. Moreover, screw geometry (triple flighted compared to double flighted) and screw configurations with more kneading elements further promoted amorphisation of the drug. The resulting ASD formulations remained kinetically stable (amorphous) for six months under defined storage conditions. Finally, dissolution studies revealed that drug release depends primarily on pH and polymeric matrix, rather than the physical state of GLB.

**Matevž Turk**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Ksenija Kogej**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Per Hansson**, Oddelek za medicinsko kemijo, Univerza v Uppsali

## Interakcija perfluoriranih ionskih surfaktantov s polielektroliti

Sistemi polielektrolitov in surfaktantov predstavljajo atraktivno raziskovalno področje, saj bi bili v farmacevtski industriji in medicini lahko uporabni kot sistemi za tarčno dostavljanje zdravilnih učinkovin. Cilj te magistrske naloge je bil raziskati pojav, opažen v sistemu natrijevega polistirensulfonata (NaPSS) in 1H,1H,2H,2H-perfluorodecilpiridinijevega klorida (HFDePC). Vezavna izoterma tega sistema, določena z metodo potenciometrične titracije, kaže negativen naklon v kooperativni vezavi surfaktanta. Izmerili smo vezavne izoterme HFDePC in dodecilpiridinijevega klorida (DPC) na natrijev poliakrilat (NaPA) in NaPSS, ki sta bila prisotna bodisi kot linearne verige v raztopini bodisi kot kovalentno zamreženi hidrogeli. Poleg določanja vezavnih izoterm smo vzorce NaPSS hidrogelov analizirali z ozkokotnim rentgenskim sipanjem (SAXS), s čimer smo pridobili podatke o strukturi agregatov, ki jih v teh sistemih tvorijo surfaktanti s polielektroliti. Na koncu smo razvili teoretična termodinamska modela za sistema NaPSS-DPC in NaPSS-HFDePC. Z njima smo negativni naklon vezavne izoterme, opažen pri sistemu NaPSS-HFDePC, pripisali postopni relaksaciji verig PSS ob vezavi surfaktanta, ki je posledica cilindrične geometrije HFDePC micel, in faznemu prehodu verig PSS, ki nastopi, ko se nanje veže kritična količina surfaktanta.

**Matevž Turk**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Ksenija Kogej**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Per Hansson**, Department of Medicinal Chemistry, Uppsala University

## Interaction of Perfluorinated Ionic Surfactants with Polyelectrolytes

Polyelectrolyte-surfactant systems are an active field of research due to their potential applications in pharmacy and medicine, particularly as drug delivery systems. The aim of this thesis was to investigate a specific polyelectrolyte-surfactant system comprised of sodium polystyrene sulfonate (NaPSS) and 1H,1H,2H,2H-perfluorodecylpyridinium chloride (HFDePC). The potentiometrically determined binding isotherm of this system displays a negative slope in the cooperative binding region. Within the scope of this thesis, we measured binding isotherms of the perfluorinated HFDePC and of dodecylpyridinium chloride (DPC) to sodium polyacrylate (NaPA) and NaPSS, present either as linear polyion chains in solution or as covalently crosslinked hydrogels. Furthermore, NaPSS hydrogel pieces were studied using small-angle X-ray scattering (SAXS) to obtain structural information about the polyelectrolyte-surfactant aggregates. Finally, thermodynamic models of NaPSS-DPC and NaPSS-HFDePC systems were developed. Using these models, the negative slope observed in the NaPSS-HFDePC binding isotherm was attributed to a gradual relaxation of the PSS chains as surfactant binding progresses, which is a consequence of the cylindrical geometry of HFDePC micelles, as well as a phase transition of the PSS chains that occurs once a critical amount of surfactant is bound to them.

**Barbara Šernek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Miran Šebešljen**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Klinični oddelek za kardiologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Somentorica: **Tina Levstek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

## Vpliv zdravljenja z zaviralci proprotein konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 na biokemične označevalce vnetja žilne stene

Ateroskleroza je kronična vnetna bolezen arterij globalne razsežnosti. S sedanjimi terapevtskimi pristopi so tradicionalni dejavniki tveganja dobro nadzorovani, ostaja pa drugo tveganje. Tarčo za njegovo zmanjševanje morda predstavlja proprotein konvertaza subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9), skupni imenovalec hiperlipidemije in vnetja. Z raziskavo smo želeli ugotoviti, kakšne so razlike v koncentraciji plazemskih biokemičnih označevalcev vnetja žilne stene med zdravimi preiskovanci in bolniki, ter opredeliti vpliv zdravljenja z zaviralci PCSK9 na njihovo koncentracijo. V prospektivno raziskavo smo vključili 64 bolnikov po prebolelem miokardnem infarktu s povečanimi vrednostmi lipoproteina(a). Ena skupina bolnikov je prejela placebo, druga zaviralec PCSK9. V raziskavo smo vključili tudi 16 kontrolnih preiskovancev. Vsem udeležencem smo ob vključitvi in po šestih mesecih odvzeli kri za laboratorijske preiskave. V plazmi smo s paneloma BioLegend LEGENDplex™ na pretočnem citometru določili 20 označevalcev vnetja žilne stene. Dokazali smo, da se kontrolni preiskovanci in bolniki razlikujejo glede koncentracije označevalcev vnetja žilne stene ter da zaviralci PCSK9 vplivajo na nekatere označevalce, neodvisno od svojega učinka na lipoproteine.

**Barbara Šernek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Supervisor: **Miran Šebešljen**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Department of Cardiology, University Medical Centre Ljubljana

Co-supervisor: **Tina Levstek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Division of Paediatrics, University Medical Centre Ljubljana

## Effect of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitors on Vascular Wall Inflammation Parameters

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arteries with global prevalence. With current therapeutic approaches, traditional risk factors are well controlled. Nevertheless, a residual risk remains in patients. A potential target for reducing this residual risk is proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a common denominator of hyperlipidaemia and inflammation. The aim of our study was to determine the differences in the concentrations of plasma biochemical markers of vascular wall inflammation between healthy subjects and patients, and to identify the effect of PCSK9 inhibitor treatment on these concentrations. Our prospective study included 64 patients after myocardial infarction, who had elevated levels of lipoprotein(a). One group of patients received a placebo, while the other received a PCSK9 inhibitor. We also included 16 healthy control subjects. Blood samples for laboratory tests were taken from all participants at the beginning of the study and after six months. Using BioLegend LEGENDplex™ panels on a flow cytometer, we measured 20 markers of vascular wall inflammation in plasma. We proved that healthy individuals and patients differ in the concentrations of biochemical markers of vascular wall inflammation. Furthermore, we showed that PCSK9 inhibitors affect certain markers independently of their effect on lipoproteins.

**Eva Rotar Pucko**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Rok Dreu**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Zoran Lavrič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Študij vpliva procesnih parametrov kontinuiranega vlažnega granuliranja v dvopolžni napravi na lastnosti zrn in primerjava s šaržnimi procesi granuliranja

V farmacevtski industriji prevladujejo klasični šaržni proizvodni procesi, zaradi naraščajočih potreb po večji časovni in stroškovni učinkovitosti ter prilagodljivosti potrebam trga pa se uveljavlja tudi kontinuirana proizvodnja. Podprta je z regulatornimi smernicami in izsledki izčrpnih raziskav v preteklem desetletju, njen nadaljnji intenzivni razvoj pa lahko pričakujemo tudi v prihodnje. V raziskovalnem delu smo podrobno proučili proces kontinuiranega vlažnega granuliranja, saj je v proizvodnji trdnih farmacevtskih oblik granulacija nemalokrat kritična in nujno potrebna faza. Primerjali smo se zrnca z enako sestavo, proizvedena v kontinuiranem procesu na dvopolžnem granulatorju ter v šaržnih procesih na vrtninoslojnim in hitro vrtečem se granulatorju. Z variiranjem ključnih procesnih parametrov smo ovrednotili njihov vpliv na kritične lastnosti zrn, ki vplivajo na nadaljnji proces tabletiranja in kakovost tablet. Potrdili smo, da izbrana tehnologija pomembno vpliva na lastnosti zrn. Pokazali smo tudi, da bi še bolj optimizirano kontinuirano dvopolžno granuliranje lahko bilo alternativa klasičnima šaržnima procesoma, lastnosti tako proizvedenih zrn pa so kompromis med stisljivostjo in pretočnostjo, kot ju zagotavljata klasični šaržni tehnologiji granuliranja.

**Eva Rotar Pucko**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Rok Dreu**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Zoran Lavrič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Study of Impact of Process Parameters in Continuous Twin-Screw Wet Granulation on Granule Properties and Comparison with Batch Granulation Processes

Batch manufacturing has traditionally been the standard method in the pharmaceutical industry. However, due to the increasing need for improved time and cost efficiency, as well as fast adaptability to market demands, continuous manufacturing has recently gained importance. In this work, we focused on continuous wet granulation because the granulation process is often a necessary and critical step in the production of solid dosage forms. We compared granules of the same composition produced in a continuous twin-screw granulator with those produced in a batch fluidised bed and high-shear granulator. By varying key process parameters, we evaluated their impact on critical granule properties, which in turn directly affect the subsequent tabletting process and the overall quality of the resulting tablets. We confirmed that the selected method of granulation affected the properties of the produced granules. Additionally, we showed that, with further optimisation, continuous twin-screw granulation is a potential alternative to conventional batch processes, with the properties of the granules produced representing a reasonable compromise between compressibility and flowability.

**Vid Kermelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Jernej Iskra**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Burkhard König**, Fakulteta za kemijo in farmacijo, Univerza v Regensburgu

## Radikalno-polarni preklap v bizmutovi LMCT-fotokatalizi

Prenos elektrona z liganda na kovino (LMCT) je fotokemijski pojav, ki je vse bolj priljubljen. LMCT-lastnosti bizmuta – elementa, ki ni zelo toksičen in okolju škodljiv – vzbujajo veliko zanimanja. Njegova zmožnost, da prevzame več oksidacijskih stanj, kaže na radikalno-polarni preklap kot možno reakcijsko pot. Ta je v magistrskem delu raziskana, da bi odklenili novo reaktivnost in uporabo v zeleni kemiji. Dokazana je bila sposobnost bizmuta, da z LMCT-aktivacijo omogoči dekarboksilacijo benzičnih karboksilnih kislin. Rezultati so v skladu z literaturo o radikalnem spajanju bizmutovih(II) zvrsti z ogljikovimi radikali. Ionska narava sistema je bila potrjena z lovljenjem karbokationov z elektronsko revnimi dušikovimi nukleofili. Bizmutov(III) triflat je bil prepoznan kot optimalen vir bizmuta. Ugotovitve kažejo, da je koordinacija nukleofila na bizmutov center ključna za tvorbo produkta prek reduktivne eliminacije. Pomembna stranska reakcija je radikalno sspajanje ogljikovih radikalov. pH sistema je ključen – presežek baze vodi do tvorbe dimernih produktov. Razlog je večkratna koordinacija karboksilnih kislin na bizmut, kar pospeši sspajanje in ovira koordinacijo nukleofila. Sproščanje protonov reakcijo upočasni. Diklorometan se je pokazal kot optimalno topilo. Sistem je katalitičen, persulfatne soli pa najučinkovitejši oksidant. DFT-izračuni za bizmutove komplekse z aril očetnimi kislinami kažejo, da je HOMO-orbitala LMCT-aktivnih kompleksov na  $\pi$ -sistemu arilnega obroča. DFT-napovedani UV-Vis-spektri kažejo odvisnost od ligandov. UV-Vis-meritve so potrdile premik LMCT-absorpcije proti daljšim valovnim dolžinam z večjo elektronsko gostoto arilnega obroča v kompleksih z bizmutovim(III) triflatom.

**Vid Kermelj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Jernej Iskra**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Burkhard König**, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Regensburg

## Radical-Polar Crossover in Bismuth LMCT Photocatalysis

Ligand-to-metal charge transfer (LMCT) is a photochemical process that has recently gained popularity in organic transformations. The LMCT properties of bismuth – a low-toxicity and environmentally friendly element – have attracted significant attention. Bismuth's ability to adopt multiple oxidation states suggests the viability of a radical-polar crossover pathway. This thesis explores such a mechanism to unlock new reactivity and applications in green chemistry. Bismuth-mediated LMCT decarboxylation of benzylic carboxylic acids was demonstrated. The results aligned with existing reports on radical coupling between bismuth(II) species and carbon radicals. The ionic nature of the system was confirmed by successful trapping of carbocations with electron-poor nitrogen nucleophiles. Bismuth(III) triflate proved optimal. Findings suggest that nucleophile coordination to the bismuth centre is crucial, leading to product formation via reductive elimination. A competing pathway is the radical homocoupling of carbon radicals. System pH plays a key role: excess base promotes dimer formation through multiple carboxylic acid coordination to a single bismuth centre, facilitating coupling and hindering nucleophile binding. In contrast, proton release during oxidative coupling slows the reaction. Dichloromethane was identified as the ideal solvent. The system was rendered catalytic, with persulfate salts as the most effective oxidants. DFT calculations on bismuth complexes with aryl acetic acids showed that the HOMO orbital of LMCT-active complexes is localised on the  $\pi$ -system of the aryl ring. UV-Vis predictions and measurements revealed ligand-dependent absorption shifts, with redshifted LMCT bands in more electron-rich aryl systems complexed with bismuth(III) triflate.

**Juš Navratil**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Damijan Knez**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Anže Meden**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Načrtovanje, sinteza in vrednotenje analogov belnakasana z novimi elektrofilnimi bojnimi glavami kot kovalentnih zaviralcev kaspaze 1

Kronično nevrovnetje je osrednji mehanizem, ki povezuje različne oblike neurodegenerativnih bolezni. V kaskadi vnetja ima pomembno vlogo kaspaza 1. Njen zaviralec, VX-765 oziroma belnacasan, je v številnih testiranjih *in vivo* na mišjih modelih Alzheimerjeve bolezni uspešno zmanjšal nevrovnetje, izboljšal epizodični in prostorski spomin ter preprečil nalaganje amiloida  $\beta$  v možganih. V magistrski nalogi smo pripravili analoge belnakasana, pri čemer smo aldehidno bojno glavo nadomestili z drugimi elektrofilni – oksiranom, karbamoil fluoridom, terminalnim alkinom, propargilaminom in 3-bromo-4,5-dihidroizoksazolom. Z rekombinantno človeško kaspazo 1 smo nato določili zaviralno aktivnost sintetiziranih analogov. Spojini 42a in 42b sta pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  uspešno zavrla delovanje kaspaze 1. Razlog za neaktivnost drugih spojin bi lahko bila odsotnost karboksilata – aspartilnega ostanka na položaju zaviralca  $P_1$ . Pri načrtovanju novih analogov bi bilo zato smiselno bolj poudariti vezavo v žep  $S_1$ . Z različnimi bioizosternimi zamenjavami karboksilne skupine bi lahko izboljšali vezavo in s tem zaviralno aktivnost.

**Juš Navratil**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Damijan Knez**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Anže Meden**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Design, Synthesis and Evaluation of Belnacasan Analogues with Novel Electrophilic Warheads as Covalent Caspase-1 Inhibitors

Chronic neuroinflammation is a key mechanism underlying various neurodegenerative diseases. Caspase-1 plays a critical role in the inflammatory cascade. The caspase-1 inhibitor VX-765, also known as belnacasan, has demonstrated efficacy in numerous *in vivo* studies on Alzheimer's disease mouse models by reducing neuroinflammation, improving episodic and spatial memory, and preventing  $\beta$ -amyloid deposition in the brain. In this master's thesis, we synthesised analogues of belnacasan by substituting its aldehyde warhead with different electrophilic groups, including oxirane, carbamoyl fluoride, terminal alkyne, propargylamine, and 3-bromo-4,5-dihydroisoxazole. The inhibitory activity of the synthesised analogues was evaluated using recombinant human caspase-1. Among the tested compounds, only analogues 42a and 42b showed significant inhibition of caspase-1 at 100  $\mu\text{M}$  concentration. The lack of activity observed in other analogues is likely due to the absence of carboxylate moiety, specifically the aspartate residue at the  $P_1$  position, which is critical for effective binding. Therefore, future analogue design should prioritise enhancing interactions within the  $S_1$  pocket, potentially through bioisosteric substitutions of the carboxyl group to improve binding affinity and inhibitory potency.

**Sergej Praček**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Kristina Sepčič**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Jerica Sabotič**, Institut Jožef Stefan

## Določanje molekularnega mehanizma bioinsekticiznega delovanja novih glivnih lektinov na invazivne škodljivce

Intenzifikacija kmetijstva kot odgovor na naraščajoče svetovno prebivalstvo, podnebne spremembe in globalizacija so omogočile idealne razmere za širjenje invazivnih insektov. Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata* Say), koruzni hrošč (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) in plodova vinska mušica (*Drosophila suzukii*) so visoko specializirane žuželke, ki so se sposobne hitro prilagajati fitofarmacevtskim sredstvom in ogrožajo trajnostno pridelavo krompirja, koruze in sadja. S predhodnim širokim presejalnim testom glivnih lektinov so bili odkriti novi bioinsekticidi: galektin *Agrocybe aegerita* in aglutinin *Sclerotinia sclerotiorum* s toksičnim delovanjem proti plodovi vinski mušici ter aglutinin *Marasmius oreades* (MOA) s toksičnim delovanjem proti koloradskemu hrošču. S testom *in vivo* na žuželah, določanjem glikozilacijskega profila proteinskih tarč žuželk *in vitro* ter masno spektrometrijo vezanih proteinov črevesja žuželk smo pridobili potencialne proteinske tarče novih bioinsekticidov. Kljub veliki evolucijski podobnosti med koloradskim in koruznim hroščem MOA ni kazal toksičnega učinka proti koruznemu hrošču. Primerjalna analiza s koloradskim hroščem je omogočila odkritje mehanizma toksičnosti MOA proti temu škodljivcu. Potrditev molekularnih tarč omogoča nadaljnji razvoj novih fitofarmacevtskih sredstev.

**Sergej Praček**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana  
Supervisor: **Kristina Sepčič**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Jerica Sabotič**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

## Determination of Molecular Mode of Action of Novel Fungal Lectins as Bioinsecticides on Invasive Pests

Agricultural intensification in response to a growing world population, climate change, and globalisation have created ideal conditions for the spread of invasive insects. The Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say), the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), and the spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*) are highly specialised insects that can quickly adapt to insecticides and threaten the sustainable production of potatoes, maize, and fruit. A preliminary broad screening test of fungal lectins has led to the discovery of novel bioinsecticides: *Agrocybe aegerita* galectin and *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin, which are toxic to the spotted wing drosophila, and *Marasmius oreades* agglutinin (MOA), which is toxic to the Colorado potato beetle. Using an *in vivo* test on insects, *in vitro* determination of the glycosylation profile of insect proteins, and mass spectrometry of lectin-bound proteins in the insect gut, I have identified potential protein targets for novel bioinsecticides. MOA showed no toxic effect against the western corn rootworm despite its close evolutionary similarity to the Colorado potato beetle. A comparative analysis with the Colorado potato beetle allowed the discovery of MOA's toxic mode of action against the Colorado potato beetle. The confirmation of the molecular targets enables further development of new plant protection products.

**Žiga Gerdina**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Polona Žnidaršič Plazl**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Imobilizacija glukoza oksidaze v zamrežene encimske agregate z uporabo mikropretočnega sistema

Biokataliza omogoča potek kemičnih reakcij pri blagih pogojih ter zagotavlja visoko selektivnost in dobre izkoristke, zato ima ključno vlogo pri razvoju trajnostnih kemičnih procesov. Industrijska uporaba encimov je pogosto omejena zaradi njihove nestabilnosti med delovanjem in visoke cene. Imobilizacija encimov predstavlja uveljavljeno metodo za izboljšanje njihove strukturne stabilnosti in omogočanje ponovne uporabe v biokatalitskih procesih. V magistrski nalogi je bil razvit in optimiziran mikropretočni sistem za pripravo zamreženih encimskih agregatov (cross-linked enzyme aggregates, CLEA) z glukozo oksidazo, ki ima široko industrijsko uporabnost, vključno z živilsko, kemično, farmacevtsko in biotehnološko industrijo ter klinično kemijo. Pomemben je tudi v glukoznih senzorjih in se proučuje kot potencialna komponenta v gorivnih celicah. Z Box-Behnkenovim načrtovanjem eksperimentov je bil proučen vpliv koncentracij encima, obarjalnega sredstva in zamreževalnega sredstva na velikost delcev in zadržano encimsko aktivnost. Pripravljeni delci so dosegli povprečni hidrodinamski polmer  $113 \pm 1,37$  nm, 100-odstotni izkoristek imobilizacije in  $91,39 \pm 1,68$  % zadržane encimske aktivnosti. Rezultati potrjujejo, da je mikropretočna sinteza delcev CLEA obetavna in učinkovita strategija za vključevanje encimov v sodobne kontinuirane biokatalitske procese.

**Žiga Gerdina**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Polona Žnidaršič Plazl**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Immobilisation of Glucose Oxidase into Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Microfluidic System

Biocatalysis enables chemical reactions to proceed under mild conditions, with high selectivity and good yields, and therefore plays an important role in the development of sustainable chemical processes. Industrial application of enzymes is often limited by their instability during operation and high cost. Immobilisation is a commonly used technique to stabilise enzymes, allowing for their repeated use. In this master's thesis, a microfluidic system was developed and optimised for the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) using glucose oxidase, which has many industrial applications, including in food, chemical, pharmaceutical and biotechnology industries, as well as clinical chemistry. It is also important in glucose sensors and is being studied as a potential component in fuel cells. The influence of enzyme, precipitant, and cross-linker concentrations on particle size and retained enzymatic activity was investigated using Box-Behnken experimental design. The resulting particles had an average hydrodynamic radius of  $113 \pm 1.37$  nm, a 100% immobilisation yield, and retained enzymatic activity of  $91.39 \pm 1.68\%$ . The findings demonstrate that microfluidic CLEA synthesis offers a promising approach to the efficient implementation of enzymes in continuous biocatalytic processes.

**Jakob Kolar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Lovro Žiberna**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Klemen Kirbus**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Razvoj in optimizacija mikrofluidnega sistema endotelija na čipu

Organi na čipu so mikrofluidne naprave, ki imajo v kapilarah celice, skozi katere neprekinjeno teče celični medij. Z uravnavanjem koncentracijskih gradientov, strižnih sil in posnemanjem bioloških pregrad lahko *in vitro* pustvarijo fiziološke razmere ter s tem predstavljajo etično sprejemljivo alternativo živalskim modelom. Namen naloge je bil vzpostaviti in optimizirati model endotelija na čipu ter proučiti vpliv inducirane oksidativnega stresa na humane endotelijske celice EA.hy926. Pred poskusi na čipu smo ovrednotili vpliv različnih medijev na viabilnost celic v atmosferi brez CO<sub>2</sub>. Analizirali smo hitrost pritrdjevanja celic na kolagensko prevleko kapilare čipa in ob naraščajočem pretoku medija ovrednotili trdnost njihove vezave nanjo. Primerjali smo viabilnost celic po indukciji oksidativnega stresa z vodikovim peroksidom v statičnih in pretočnih pogojih. V atmosferi brez CO<sub>2</sub> je viabilnost celic zagotavljal le medij, ki ni odvisen od CO<sub>2</sub>. Takojšnjo konfluentnost v kapilari čipa smo dosegli s celično suspenzijo koncentracije približno  $3,5 \times 10^6$  celic/ml. Poskuse smo izvajali pri pretokih, ki so posnemali fiziološke razmere arterij in arteriol. Kolagenska prevleka je pospešila pritrdjevanje celic in zagotovila močnejšo vezavo celic na čip. Oksidativni stres je bil v pretočnih pogojih bolj toksičen kot v statičnih. Vzpostavljeni model endotelija na čipu tako omogoča proučevanje odzivov endotelijskih celic v dinamičnih pogojih in s tem izboljšuje raziskave v žilni farmakologiji.

**Jakob Kolar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Lovro Žiberna**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Klemen Kirbus**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Development and Optimisation of Microfluidic System for Endothelium-on-a-Chip

Organs-on-chips are microfluidic devices that contain cells in capillaries through which a cell culture medium is continuously perfused. By regulating concentration gradients, shear stress, and mimicking barriers, these systems enable the *in vitro* simulation of physiological conditions and thus represent an ethically acceptable alternative to animal models. The aim of this study was to develop and optimise an endothelium-on-a-chip and to investigate the effects of induced oxidative stress on human endothelial cells EA.hy926. Prior to the on-chip experiments, the effect of different culture media on cell viability was analysed in a CO<sub>2</sub>-free atmosphere. In addition, the influence of collagen coating on the speed of cell attachment was analysed, and the adhesion strength was evaluated at increasing flow rates. Cell viability was compared under static and flow conditions after inducing oxidative stress with hydrogen peroxide. The CO<sub>2</sub>-independent medium was the only one among those tested that ensured cell viability in the absence of CO<sub>2</sub>. To achieve immediate confluence within the chip, a cell suspension with a concentration of about  $3.5 \times 10^6$  cells/ml was used, and the applied flow rates corresponded to physiological conditions in arteries and arterioles. The collagen coating accelerated cell attachment and increased the adhesion force to the chip. Oxidative stress was found to have greater toxic effects under flow conditions than under static conditions. The developed endothelium-on-a-chip enables the characterisation of endothelial cell responses under flow conditions, thus advancing research in the field of vascular pharmacology.

**Tilen Zorko**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Bogdan Štefane**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Fotoredoks katalitske pretvorbe triklorometan-sulfenil klorida

Fotoredoks katalizirane reakcije izkoriščajo energijo vidne svetlobe za poganjanje redoks ciklov, pri čemer absorpcija svetlobe v fotokatalizatorju omogoči nastanek reaktivnih vzbujenih stanj. Ena od učinkovitih aplikacij takšnega pristopa je z bakrom katalizirana adicija radikalov s prenosom naboja (ATRA), s katero nam je uspelo v skelete organskih molekul uvesti triklorometilsulfenilno skupino (-SCCl<sub>3</sub>). ATRA omogoča uvajanje različnih funkcionalnih skupin, med njimi tudi trifluorometilsulfenilne skupine (-SCF<sub>3</sub>). Ta povečuje lipofilnost spojin in izboljšuje njihovo prepustnost skozi celične membrane, kar je ključnega pomena pri razvoju farmacevtskih učinkovin. V primerjavi s tem je triklorometilsulfenilna skupina zelo slabo raziskana, predvsem zaradi pomanjkanja učinkovitih metod za njeno uvajanje. V magistrski nalogi smo razvili učinkovit postopek, pri katerem smo to skupino uvedli z uporabo komercialno dostopnega reagenta triklorometansulfenil klorida (ClSCCl<sub>3</sub>). Reakcija poteka hitro, z dobrimi izkoristki, mehanistične študije pa so kot prevladujoč mehanizem potrdile radikalsko propagacijo, kar omogoča reakcijo že z minimalno količino bakrovega katalizatorja.

**Tilen Zorko**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Bogdan Štefane**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Photoredox-Catalysed Transformations of Trichloromethanesulfenyl Chloride

Photoredox-catalysed reactions harness the energy of visible light to drive redox cycles, where light absorption by the photocatalyst leads to the formation of reactive excited states. One of the effective applications of this approach is copper-catalysed atom transfer radical addition (ATRA), which we used to successfully introduce the trichloromethylsulfenyl group (-SCCl<sub>3</sub>) into the skeletons of organic molecules. ATRA enables the incorporation of various functional groups, including the trifluoromethylsulfenyl group (-SCF<sub>3</sub>), which enhances the lipophilicity of compounds and improves their permeability across cell membranes. This presents an important feature in drug development. In contrast, the trichloromethylsulfenyl group is much less explored, mainly due to the lack of efficient methods for its introduction. In this work, we developed an effective procedure for introducing this group using the commercially available reagent trichloromethanesulfenyl chloride (ClSCCl<sub>3</sub>). The reaction proceeds rapidly and with good yields. Mechanistic studies confirmed radical propagation as the predominant pathway, allowing the reaction to be carried out with minimal amounts of copper catalyst.

**Pia Hrovat**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Ester Heath**, Institut Jožef Stefan

Somentorica: **Urška Lavrenčič Štangar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Odstranjevanje bisfenolov iz pitne in odpadne vode s fotokatalizo in hidrodinamsko kavitacijo

Naraščajoče potrebe po pitni vodi spodbujajo iskanje alternativnih vodnih virov, predvsem za uporabo v industriji in kmetijstvu. Ena od možnosti je prečiščena odpadna voda, ki pa je lahko vir mikroonesnaževal, pri odstranjevanju katerih konvencionalne metode čiščenja niso dovolj učinkovite. V raziskavi smo proučevali učinkovitost dveh naprednih oksidacijskih procesov – hidrodinamske kavitacije in fotokatalize – za odstranjevanje petih modelnih mikroonesnaževal (bisfenola A, bisfenola S, bisfenola F, bisfenol AF in tetrametil bisfenola F) iz pitne vode (200 ng/L) in prečiščene odpadne vode (1,0 µg/L). Za kvantifikacijo smo razvili in validirali analizni metodi, ki temeljita na ekstrakciji na trdno fazo in analizi s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom. Najboljše rezultate odstranjevanja iz pitne vode smo dosegli z zaporedno 15-minutno hidrodinamsko kavitacijo in 15-minutno fotokatalizo, pri čemer je bil tetrametil bisfenol F edina spojina, pri kateri smo dosegli več kot 80-odstotno odstranitev. Pri prečiščeni odpadni vodi nam v nobenem primeru ni uspelo doseči  $\geq 80$ -odstotne odstranitve, kar potrjuje večjo kompleksnost matrike in kaže potrebo po nadaljnjem razvoju kombiniranih naprednih oksidacijskih procesov za učinkovito odstranjevanje mikroonesnaževal iz odpadne vode.

**Pia Hrovat**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: **Ester Heath**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Co-supervisor: **Urška Lavrenčič Štangar**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Novel Approaches for Synthesis of $\alpha$ -Aminoboronic Acids as Key Building Blocks for Proteasome Inhibitors

Increasing demands for drinking water necessitate exploring alternative water sources, especially for industrial and agricultural applications. Treated wastewater presents a viable option, yet it contains micro-pollutants that conventional treatment methods fail to remove efficiently. This study evaluates the effectiveness of two advanced oxidation processes - hydrodynamic cavitation and photocatalysis - in removing five model micro-pollutants (bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F, bisphenol AF, and tetramethyl bisphenol F) from drinking water (200 ng/l) and treated wastewater (1.0 µg/l). Analytical methods based on solid-phase extraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry were developed and validated for quantification. Optimal removal from drinking water was achieved through sequential application of hydrodynamic cavitation for 15 minutes, followed by photocatalysis for 15 minutes, with tetramethyl bisphenol F being the only compound to exceed 80% removal. Removal efficiencies of  $\geq 80\%$  were not attained in treated wastewater under any tested conditions, confirming its greater matrix complexity and underscoring the need for further investigation and development of combined advanced oxidation processes for effective micro-pollutant removal from wastewater.

**Benjamin Poljanc**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Iztok Turel**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Recikliranje plemenitih kovin s selektivnim obarjanjem z uporabo izbranih derivatov piritiona

Odpadna elektronika je vse večji okoljski problem in hkrati premalo izkoriščen vir kritičnih surovin. Metode recikliranja pogosto temeljijo na energijsko zahtevnih hidrometalurških postopkih, ki vključujejo toksične reagente in neselektivne procese, zato je razvoj trajnostnih in selektivnih metod recikliranja kovin izredno pomemben. Za selektivno recikliranje zlata in bakra smo razvili novo trajnostno metodo, ki temelji na selektivnem obarjanju iz etanolnih lužnin z uporabo derivatov piritiona kot ligandov. Piritioni in njihovi kovinski kompleksi so običajno slabo topni. Uporabljali so se za zdravljenje seboroičnega dermatitisa. Sintetizirali smo serijo analogov piritionov in preizkusili njihovo sposobnost selektivnega obarjanja ionov  $\text{Cu}^{2+}$  ali  $\text{Au}^{3+}$  iz etanolnih raztopin. Zasnovano metodo ločevanja smo preizkusili za pridobivanje zlata in bakra iz pozlačenih konektorskih prstov na tiskanih vezjih, za oksidativno raztapljanje pa smo uporabili evtektično topilo. Po razredčenju z etanolom smo z zaporednim selektivnim obarjanjem učinkovito ločili in izolirali obe kovini. Postopek je zelo selektiven, izvedba je enostavna, topilo pa se lahko reciklira, zato gre za obetavno alternativo za pridobivanje kovin iz kompleksnih zmesi. To je prva metoda, ki temelji na selektivnem obarjanju iz reciklabilnih organskih topil, s čimer se odpira novo področje v kemiji trajnostnega ločevanja kovin. Ta naloga je inovativen prikaz alternativne uporabe farmacevtsko relevantnih spojin v drugih industrijskih panogah.

**Benjamin Poljanc**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Iztok Turel**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Recycling Noble Metals with Selective Precipitation Using Selected Pyrithione Derivatives

Electronic waste represents a rapidly growing environmental concern and an underutilised source of critical raw materials. Existing recycling methods often rely on energy-intensive hydrometallurgical approaches involving toxic reagents and non-selective processes, making the development of sustainable and selective recovery methods crucial. In this work, we have developed a novel sustainable method for the selective recovery of gold and copper, based on selective precipitation from ethanol leachates using pyrithione derivatives as ligands. Pyrithiones and their metal complexes often exhibit poor solubility and have been used to treat seborrheic dermatitis. A series of pyrithione analogues were synthesised and screened for their ability to selectively precipitate either  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Au}^{3+}$  from ethanol leachates. The developed method was used for the recovery of gold and copper from printed circuit board gold-plated connection fingers, using a deep eutectic solvent system for initial oxidative dissolution. After dilution with ethanol, a stepwise selective precipitation approach enabled the efficient recovery of both metals. The process demonstrates high selectivity, operational simplicity and solvent recyclability, making it a promising alternative for metal recovery from complex mixtures. This is the first method based on selective precipitation of metals from recyclable organic media, opening a new field in sustainable metal separation chemistry. This work illustrates an innovative repurposing of pharmaceutically relevant compounds for the alternative application in other industrial sectors.

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

## Oksidativno jodiranje fenolov in spajanje jodofenolov v odsotnosti prehodnih kovin

Jodofenoli so pomembna skupina organskih spojin za medicinske in sintezne aplikacije. V prvem delu magistrske naloge smo raziskali neposredno sintezo mono- in diiodofenolov s kemoselektivnim jodiranjem fenolov. Sistem  $I_2/H_2O_2/H_2SO_4$  omogoči učinkovito uvedbo jodovega atoma na fenolni obroč. Kemoselektivnost kontroliramo z izbiro topila – v MeCN poteče monojodiranje, v EtOH pa diiodiranje fenolov. Uporabnost metode smo prikazali s kemoselektivnim jodiranjem 15 fenolov, med drugim za sintezo biološko relevantnih jodotirozinov in jodotiraminov, katerih uporaba je pomembna v proteomiki, raziskavah ADMET, sintezni organski kemiji in radiologiji. V drugem delu magistrske naloge smo raziskali možnost uporabe jodofenolov v reakciji spajanja aril elektrofilov v odsotnosti prehodnih kovin. Ugotovili smo, da homospajanje poteka v prisotnosti  $K_2CO_3$  v THF/ $H_2O$ . Reakcija poteka po verižnem radikalskem mehanizmu z blago iniciacijo (35 °C ali substehiometrična količina  $I_2$ ). Z razvito metodo smo v odsotnosti prehodnih kovin z izkoristki do 79 % sintetizirali pet produktov z biarilno  $C(sp^2)-C(sp^2)$  vezjo. Mehanistični eksperimenti ujetja radikalov so potrdili tvorbo ključnega aril radikalskega intermediata. Reakcija je prvi primer spajanja C–C elektrofilov Ar–X v odsotnosti prehodnih kovin pri sobni temperaturi.

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

## Oxidative Iodination of Phenols and Transition-Metal-Free Coupling of Iodophenols

Iodophenols are an invaluable class of organic compounds for medical and synthetic applications. In the first part of the master's thesis, direct synthesis of mono- and diiodophenols by chemoselective iodination of phenols was explored. The  $I_2/H_2O_2/H_2SO_4$  system readily introduced iodine atom(s) onto phenols. Chemoselectivity was achieved through solvent choice – the use of MeCN resulted in moniodination, whereas EtOH affected diiodination. Using our method, 15 phenols were chemoselectively iodinated, including biologically relevant tyrosine and tyramine with valuable applications in proteomics, ADMET studies, synthetic organic chemistry, and radiology. In the second part, we investigated the possibility of utilising iodophenols in transition-metal-free coupling of aryl electrophiles. We found that homocoupling occurs in the presence of  $K_2CO_3$  in THF/ $H_2O$ . The reaction proceeds via a radical chain mechanism with mild initiation (35 °C or substoichiometric  $I_2$ ). Radical trapping experiments confirmed the formation of the key aryl radical intermediate. The discovered reaction is the first example of transition-metal-free C–C coupling of Ar–X electrophiles at room temperature.

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

## Sinteza in uporaba iridijevih katalizatorjev za izotopsko izmenjavo vodika na osnovi dendrimernih nosilcev

V magistrskem delu smo s preoblikovanjem fosfinskega liganda Kerrovega tipa katalizatorja pripravili štiri različne iridijeve komplekse za izotopsko izmenjavo vodika. Glavni cilj je bil pritrditi kompleks na dendrimerne nosilce prek amidne vezi. Pripravljene iridijeve zvrsti smo preizkusili v modelni reakciji, devteriranju acetofenona, in rezultate primerjali z učinkovitostjo komercialno dostopnega Kerrovega katalizatorja. Ugotovili smo, da so sintetizirani iridijevi kompleksi aktivni kot izvirna spojina. Preverili smo tudi možnost ponovne uporabe katalizatorjev po končani reakciji. V ta namen smo z eksperimentom NMR proučevali porazdelitev funkcionaliziranih poli(propilenimin) (PPI) dendrimerov med organsko in vodno fazo.

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

## Synthesis and Application of Dendrimer-Supported Iridium Catalysts for Hydrogen Isotope Exchange

In the scope of the master's thesis, four unique iridium catalysts for hydrogen isotope exchange were prepared by modifying the phosphine ligand of the Kerr's catalyst. Attaching the complex to dendrimer supports via an amide bond was of particular interest. The synthesised iridium species were tested in a model reaction – deuteration of acetophenone – and the obtained results were compared to the activity of the commercially available catalyst. It was found that the activity of prepared iridium complexes was comparable to that of the parent catalyst. Upon completion of the reaction, recycling of the catalytic species was investigated. In a series of NMR experiments, the distribution of functionalised poly(propylene imine) (PPI) dendrimers between organic and aqueous layers was also examined.

**Urh Bertoncelj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Iztok Turel**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Poskus vezave piritionskih derivatov in njihovih kovinskih kompleksov na izbrane nanonosilce

Kemoterapije pogosto spremljajo izraziti neželeni učinki zaradi pomanjkanja selektivne dostave učinkovin do tarčnih rakavih celic. Posledično prihaja do poškodb zdravih celic in zmanjšane terapevtske učinkovitosti. V magistrski nalogi smo zato želeli razviti in ovrednotiti sistem, ki združuje kemijske, biološke in nanotehnološke pristope za učinkovit prenos zdravil. K razvoju potencialne protirakave učinkovine smo pristopili celovito – s sintezo organskega liganda, tvorbo njegovega kovinskega kompleksa, pripravo primerne nanonosilca in njuno medsebojno vezavo. Pripravili smo kislinke in estrske derivate piritionskega liganda ter z njimi tvorili rutenijeve(II) komplekse. Te smo nato vezali na mezoporožne silicijeve nanodelce MCM-41 in SBA-15, ki smo jih pripravili po modificiranem postopku sol-gel. Gre za sodobna in obsežno raziskana nanonosilna sistema, ki zaradi velike specifične površine, enotne velikosti por in možnosti funkcionalizacije omogočata učinkovito inkorporacijo in sproščanje zdravilnih učinkovin. Vmesne in končne produkte smo podrobno okarakterizirali, slednje pa nato pripravili za načrtovane biološke teste njihove protirakave aktivnosti.

**Urh Bertoncelj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Iztok Turel**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Attempt of Binding Pyrithione Derivatives and Their Metal Complexes onto Selected Nanocarriers

Chemotherapies are often accompanied by pronounced side effects due to the lack of selective delivery of active substances to target cancer cells. This results in damage to healthy cells and reduced therapeutic efficacy. Therefore, as part of my master's thesis, I aimed to develop and evaluate a system that combines chemical, biological and nanotechnological approaches to ensure efficient drug delivery. I implemented an integrated approach to the development of a potential anticancer agent, which included the synthesis of an organic ligand, the formation of its metal complex, the preparation of a suitable nanocarrier, and their subsequent binding. I prepared acid and ester derivatives of the pyrithione ligand and formed ruthenium(II) complexes with them. These were then bound to MCM-41 and SBA-15 mesoporous silica nanoparticles, which were prepared in a modified sol-gel process. These are modern and extensively researched nanocarrier systems that enable efficient drug loading and controlled release due to their high specific surface area, uniform pore size and functionalisation potential. I characterised the intermediate and final products in detail and then prepared the final products for the planned biological testing of their anticancer activity.

**Lovro Klenovšek**, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Jure Žabkar**, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani

## Analiza slik vrstičnega elektronskega mikroskopa z metodami strojnega učenja

V magistrski nalogi je obravnavana problematika morfološke analize farmacevtskih kristalov, pri kateri sta natančna določitev velikosti in oblike delcev ključnega pomena za kakovost izdelkov. Tradicionalne metode z ročno analizo SEM-slik so pogosto počasne, subjektivne in manj zanesljive zaradi možnosti napak. Glavni cilj naloge je razviti avtomatizirano rešitev, ki bi nadomestila ročne metode ter izboljšala natančnost in hitrost prepoznavanja in merjenja delcev. Pri tem so bili uporabljeni napredni modeli globokega učenja, kot sta LOCA in EfficientSAM, ki omogočata učinkovito segmentacijo in prepoznavanje delcev tudi ob pomanjkanju učnih podatkov. Rezultati poskusov so pokazali veliko natančnost algoritma in bistveno manj napak kot pri ročni analizi. Algoritem deluje skoraj v realnem času, kar omogoča hitro obdelavo večje količine slik. Ugotovitve kažejo, da sodobne metode umetne inteligence omogočajo zanesljivo in učinkovito analizo SEM-slik ter odpirajo nove možnosti za avtomatizacijo procesov v farmacevtski industriji.

**Lovro Klenovšek**, Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana  
Supervisor: **Jure Žabkar**, Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana

## Scanning Electron Microscope Image Analysis Using Machine Learning Methods

The thesis addresses the challenges in morphological analysis of pharmaceutical crystals, where accurate particle size and shape determination is essential for product quality. Traditional manual analysis of SEM images is often slow, subjective, and error-prone. The aim was to develop an automated solution to improve the accuracy and speed of particle detection and measurement. To achieve this, advanced deep learning models such as LOCA and EfficientSAM were implemented. These models enable precise segmentation and recognition, even with limited training data. Experimental results demonstrated high accuracy, with the algorithm outperforming manual methods, especially in difficult cases. The average measurement error was minimal, and the algorithm operated nearly in real time, significantly increasing processing speed. Findings confirm that modern deep learning techniques can greatly enhance SEM image analysis, offering reliable, fast, and scalable solutions for use in the pharmaceutical industry.

**Lara Plohl**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Mentor: **Zoran Novak**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Somentorica: **Milica Pantić**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

## Impregnacija biokompozitnih aerogelov za biomedicinske aplikacije

V magistrski nalogi smo predstavili pripravo biokompozitnih aerogelov iz pektina, naravnega polisaharida, in polimera polikaprolaktona (PCL). S postopkom sol-gel smo pripravili hidrogelne materiale z različnimi masnimi in volumskimi razmerji pektina, raztopljenega v vodi, ter PCL, raztopljenega v etil laktatu (EL). Tako pripravljene hidrogele in kasneje alkogele smo s superkritičnim sušenjem pretvorili v aerogele. Njihova karakterizacija je vključevala določitev specifične površine z Brunauer-Emmett-Tellerjevo (BET) metodo, pri čemer je bila največja izmerjena specifična površina  $309 \text{ m}^2/\text{g}$ . Z Barrett-Joyner-Halendovo (BJH) metodo smo določili velikost in porazdelitev por biokompozitnih aerogelov. Ugotovili smo, da pripravljene aerogeli spadajo v mezoporozne materiale. Aerogeli, ki so se po plinski adsorpciji pokazali kot najobetavnejši, so bili izbrani za nadaljnja testiranja. Morfologijo aerogelov smo proučili z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), medtem ko smo termično analizo izvedli s termogravimetrično analizo (TGA) in diferencialno skenirno kalorimetrijo (DSC). Testirali smo nabrekanje aerogelov in ugotovili, da vsi vzorci nabreknejo v manj kot eni uri, kar kaže na možnost za njihovo uporabo pri dostavi zdravil. S testom sproščanja natrijevega diklofenaka (DCF) v raztopini fosfatnega pufra (PBS) smo ugotavljali hitrost sproščanja te učinkovine. Ugotovili smo, da vzorec z najmanjšim deležem PCL doseže 100-odstotno sproščanje DCF v eni uri, kar je primernejše, kadar je zaželeno hitro sproščanje zdravila. Vzorec z največjim deležem PCL kaže počasnejše in bolj nadzorovano sproščanje učinkovine, 100-odstotno sproščanje je doseženo po šestih dneh. Vsi vzorci so pokazali uspešno impregnacijo z DCF in potencial kot sistemi za dostavo zdravil.

**Lara Plohl**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Supervisor: **Zoran Novak**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Co-supervisor: **Milica Pantić**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## Impregnation of Biocomposite Aerogels for Biomedical Applications

The master's thesis presents the preparation of biocomposite aerogels from pectin, a natural polysaccharide, and the polymer polycaprolactone (PCL). Hydrogel materials with different mass and volume ratios of pectin dissolved in water and PCL dissolved in ethyl-lactate (EL) were prepared by using the sol-gel process. The prepared hydrogels and later on alcogels were converted into aerogels using supercritical drying. The characterisation of the aerogels included the determination of the specific surface area by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, with a maximum specific surface area measured at  $309 \text{ m}^2/\text{g}$ . The Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method was used to analyse the pore size and pore size distribution of biocomposite aerogels, classifying them into the mesoporous range. Based on the  $\text{N}_2$  adsorption-desorption analysis, the aerogels with the best performance were selected for further tests. The morphology of the aerogels was examined using the scanning electron microscope (SEM), followed by a thermal analysis using thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermal calorimetry (DSC). The swelling tests of the aerogels were performed, and results showed that all samples swelled in less than one hour, indicating their potential use as drug delivery systems. The diclofenac sodium (DCF) release rate in phosphate buffered solution (PBS) was monitored using a diclofenac sodium release assay. It was found that the sample with the lowest PCL content achieved 100% release in one hour, which is more suitable for therapies where rapid drug release is required. The sample with the highest PCL content showed much slower and controlled drug release, reaching 100% release after six days. All selected samples showed successful DCF impregnation and potential as promising drug delivery systems.

## **Spremljanje preoblikovanja citoskeleta glioblastomskih celic v prisotnosti nanoteles, usmerjenih proti transmembranskemu proteinu FREM2**

Glioblastomi so najpogostejša oblika primarnih malignih tumorjev osrednjega živčevja. Zaradi agresivnosti in invazivnosti se vse pogosteje uporabljajo kot model za iskanje novih tarč za učinkovitejše zdravljenje in izboljšanje možnosti preživetja. Ena novejših tarč je transmembranski protein FREM2 (FRAS1-related extracellular matrix protein 2), ki ima pomembno vlogo pri gibljivosti celic glioblastoma. Raziskovali smo povezavo med tem proteinom in reorganizacijo celičnega citoskeleta ter njegov vpliv na migracijo in invazijo celičnih linij glioblastomov U87MG in U251MG. Vpliv FREM2 na remodeliranje citoskeleta ter migracijo in invazijo celic smo proučevali z dvema pristopoma: utišanjem gena FREM2 s siRNA in uporabo nanoprotiliteles NB3F18, ki se vežejo na protein FREM2, spremenijo njegovo konformacijo in s tem njegovo funkcijo. Pri opazovanju migracije celic z utišanim genom in celic, obdelanih z nanoprotilitelesi, smo potrdili, da so se spremenjene celice brez funkcionalnega proteina FREM2 gibale počasneje, kar potrjuje hipotezo, da raven izražanja gena in proteina FREM2 vpliva na celično motiliteto. Z imunofluorescenčno mikroskopijo smo proučevali tudi tri različne komponente citoskeleta: vimentina,  $\beta$ -aktina in F-aktina. Želeli smo ugotoviti, ali obdelava z nanoprotilitelesi vpliva na organizacijo citoskeleta enako kot utišanje gena FREM2 s siRNA. Pri vimentinu nismo opazili razlik, predvidevali pa smo, da bo vpliv na aktinski citoskelet večji, saj je aktin eden najpogostejših proteinov v celicah in ima pomembno vlogo v številnih celičnih procesih. Proučevali smo  $\beta$ -aktin in F-aktin, vendar nismo dokazali očitnega remodeliranja aktinskega citoskeleta. Kljub temu pa so rezultati lahko izhodišče za nadaljnje optimizacije in raziskave.

**Špela Kladnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Ivana Jovčevska**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

## **Monitoring Reorganisation of Glioblastoma Cell Cytoskeleton in Presence of Nanobodies Targeting Transmembrane Protein FREM2**

Glioblastomas are the most common form of primary malignant tumours of the central nervous system. Due to their aggressiveness and invasiveness, they are increasingly used as a model for identifying new targets for more effective treatments and improved survival prospects. One of the newer targets is the transmembrane protein FREM2 (FRAS1-related extracellular matrix protein 2), which plays an important role in glioblastoma cell motility. We investigated the relationship between this protein and the reorganisation of the cell cytoskeleton, and consequently its impact on the migration and invasion of glioblastoma cell lines U87MG and U251MG. We examined the influence of FREM2 on cytoskeletal remodelling and cell migration and invasion using two approaches: gene silencing of FREM2 with siRNA and the use of nanobody NB3F18, which binds to the FREM2 protein and alters its conformation and, consequently, its function. When observing cell migration in cells with a silenced gene and in cells treated with nanobodies, we confirmed that the modified cells lacking functional FREM2 protein moved more slowly, thus supporting the hypothesis that the level of FREM2 gene and protein expression affects cell motility. Using immunofluorescence microscopy, we also examined three different components of the cytoskeleton: vimentin,  $\beta$ -actin, and F-actin. We aimed to determine whether treatment with nanobodies affects cytoskeletal organisation in the same way as FREM2 gene silencing with siRNA. We did not observe a noticeable difference in vimentin, but we assumed that the impact on the actin cytoskeleton would be greater, as actin is one of the most abundant proteins in cells and plays an important role in many cellular processes. We investigated  $\beta$ -actin and F-actin, but did not detect obvious remodelling of the actin cytoskeleton. Nevertheless, the results provide a motivation for further optimisations and research.

**Neža Štrukelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Lovro Žiberna**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Mojca Lunder**, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana

## Analiza učinkovitosti peroralnega in injekcijskega semaglutida pri osebah s sladkorno boleznijo tipa 2

Semaglutid je edini agonist receptorjev GLP-1, ki je poleg podkožne injekcije na voljo tudi v peroralni obliki in se uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Namen raziskovalne naloge je bil analizirati vpliv maksimalnega odmerka semaglutida na različne klinične parametre v vsakdanji klinični praksi in medsebojno primerjati učinkovitost obeh farmacevtskih oblik. Zdravljenje s peroralnim in injekcijskim semaglutidom je privedlo do statistično značilnega znižanja glikemičnih parametrov, telesne mase, indeksa telesne mase in sistoličnega krvnega tlaka ter do zvišanja srčne frekvenca. Pri primerjavi obeh farmacevtskih oblik smo ugotovili, da je bila učinkovitost peroralnega semaglutida večinoma primerljiva z injekcijsko obliko, pri čemer je injekcijski semaglutid statistično značilno bolj zmanjšal vrednosti glikiranega hemoglobina (HbA1c); pri ostalih parametrih nismo zaznali statistično značilnih razlik med oblikama. Zaključimo lahko, da primerljiva učinkovitost obeh oblik semaglutida v vsakdanji klinični praksi omogoča individualno uvajanje glede na prioritete osebe s sladkorno boleznijo tipa 2.

**Neža Štrukelj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Lovro Žiberna**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Mojca Lunder**, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, University Medical Centre Ljubljana

## Efficacy Analysis of Oral and Injectable Semaglutide in Persons with Type 2 Diabetes

Semaglutide is currently the only GLP-1 receptor agonist available in both oral and subcutaneous injectable form, primarily used for the treatment of type 2 diabetes. The aim of this research was to analyse the effect of the maximum dose of semaglutide on various clinical parameters in everyday clinical practice and to compare the efficacy of both pharmaceutical forms. Treatment with both oral and injectable semaglutide led to a statistically significant reduction in glycaemic parameters, body weight, body mass index, and systolic blood pressure, as well as an increase in heart rate. When comparing the two pharmaceutical forms, we found that the efficacy of oral semaglutide was largely comparable to that of the injectable form. However, injectable semaglutide resulted in a statistically significantly greater reduction in glycated haemoglobin (HbA1c) levels. No statistically significant differences were observed between the two forms for the other parameters. In conclusion, the comparable efficacy of both forms of semaglutide in everyday clinical practice allows for individualised prescriptions based on the priorities of persons with type 2 diabetes.

**Žiga Petančič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Pegi Ahlin Grabnar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Monika Prašnikar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Vpliv kombinacij pomožnih snovi na znižanje viskoznosti visokokoncentriranih formulacij monoklonskih protiteles za subkutano aplikacijo

Subkutana biološka zdravila z monoklonskimi protitelesi so zaradi potrebe po velikem enkratnem odmerku v omejenem volumnu oblikovana kot visokokoncentrirane formulacije. Posledica je velika viskoznost takšnih formulacij, kar tehnološko nadzorujemo s pomožnimi snovmi, ki vplivajo na medmolekulske interakcije protiteles in posledično zmanjšujejo viskoznost zdravil. Dodane pomožne snovi pa lahko vplivajo tudi na fizikalno stabilnost protiteles. V magistrski nalogi smo proučevali vpliv novih, še neraziskanih pomožnih snovi na zmanjšanje viskoznosti visokokoncentrirane formulacije monoklonskega protitelesa IgG in stabilnost protitelesa v pripravljenih vzorcih. Formulacije smo pripravili z dializiranim proteinom, histidinskim pufrom, polisorbatom 80 in preiskovanimi pomožnimi snovmi. Tako pripravljenim vzorcem smo izmerili koncentracijo protitelesa in določili viskoznost z viskozimetrom na čipu. Alikvote vzorcev smo shranili pri različnih pogojih in spremljali vpliv pomožnih snovi na fizikalno stabilnost protitelesa. Z meritvami smo pokazali, da se pri nekaterih pomožnih snoveh kaže od koncentracije odvisno zmanjšanje viskoznosti visokokoncentriranih raztopin monoklonskih protiteles in da lahko ustrezno zmanjšanje dosežemo tudi s kombinacijo dveh pomožnih snovi v nizkih, ekvivalentnih koncentracijah. Ugotovili smo tudi, da dodatek ene od preiskovanih pomožnih snovi ali njihove kombinacije poveča fizikalno stabilnost protitelesa v formulaciji. Vpliv na stabilnost pa je med preiskovanimi snovmi ali njihovimi kombinacijami primerljiv.

**Žiga Petančič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Pegi Ahlin Grabnar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Monika Prašnikar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Influence of Excipient Combinations on Viscosity Reduction of Highly Concentrated Monoclonal Antibody Formulations for Subcutaneous Administration

The high viscosity of highly concentrated monoclonal antibody formulations in a limited volume that can be administered subcutaneously poses a technological challenge in developing such medicines. One strategy to mitigate the effect of intermolecular interactions is the addition of excipients with viscosity-reducing properties. However, adding such excipients may also impact the stability and safety of the product. The objective of the master's thesis was to investigate the impact of novel excipients on the viscosity reduction in highly concentrated formulations of IgG monoclonal antibodies, and to assess their effect on monomer stability in the prepared samples. The formulations were prepared using a dialysed monoclonal antibody, histidine buffer, polysorbate 80, and tested novel excipients. The antibody concentration was determined and viscosity measurements were conducted using a viscometer-on-a-chip. Aliquots of samples were stored under different conditions to assess the impact of the excipients on the stability of the antibody. Our study demonstrated that the viscosity of highly concentrated solutions of monoclonal antibodies can be reduced to levels suitable for subcutaneous drug delivery using one or a combination of tested excipients. Furthermore, we demonstrated that the addition of one of the tested excipients or their combination increases the physical stability of the monoclonal antibody in the formulation, but the effect is comparable between the excipients added.

**Zala Čuk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Petra Kocbek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Črt Dragar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Razvoj trdnih lipidnih nanodelcev za dostavo učinkovine z delovanjem na mitohondrije

V zadnjih desetletjih se zaradi neugodnih lastnosti novoodkritih zdravilnih učinkovin vedno bolj uveljavljajo in raziskujejo nanodostavni sistemi, ki imajo številne prednosti. Med drugim omogočajo izboljšanje biološke uporabnosti, stabilnosti zdravilnih učinkovin in različne možnosti ciljne dostave zdravilnih učinkovin celo v posamezne znotrajcelične strukture. Tako lahko izboljšamo terapevtski učinek številnih zdravilnih učinkovin in se izognemo neželenim učinkom. V magistrski nalogi smo razvili dve formulaciji trdnih lipidnih nanodelcev, pri čemer smo za osnovni gradnik uporabili gliceril behenat, nanodelce v vodni disperziji pa smo stabilizirali z dodatkom nenabitih (poloksamer 188, polisorbitat 80) ali pozitivno nabitih (N-[1-(2,3- dioleoiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonijev klorid) površinsko aktivnih snovi. Povprečna hidrodinamska velikost negativno nabitih nanodelcev (pribl. -7 mV) je znašala približno 190 nm. Pozitivno nabiti nanodelci (pribl. +25 mV) so bili v povprečju manjši (pribl. 105 nm) in stabilnejši, saj so med shranjevanjem pri 4 °C podobno hidrodinamsko velikost brez vizualnih sprememb disperzije ohranili bistveno dlje kot negativno nabiti nanodelci. V obe formulaciji nanodelcev smo uspešno vgradili modelno zdravilno učinkovino – njena vsebnost je znašala približno 5 %, učinkovitost vgrajevanja pa je bila približno 40-odstotna.

**Zala Čuk**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Petra Kocbek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Črt Dragar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Development of Solid Lipid Nanoparticles for Delivery of Mitochondria-Targeting Drug

In recent decades, nanodelivery systems, including solid lipid nanoparticles (SLN), have emerged as promising drug carriers to overcome unfavourable drug properties. They enhance drug bioavailability, stability, and enable targeted delivery, including at the subcellular level, thereby improving therapeutic effects and reducing side effects. The aim of this master's thesis was to develop a sonication-based method for preparing SLNs containing a model mitochondria-targeting drug. Glyceryl behenate served as the lipid core, while stabilisation was achieved using neutral (poloxamer 188, polysorbate 80) or a combination of neutral and positively charged (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) surfactants. The average hydrodynamic size of negatively charged nanoparticles (~ -7 mV) was ~190 nm, while the positively charged nanoparticles (~ +25 mV) were smaller (~105 nm). The latter proved to be more stable during storage at 4 °C, maintaining a similar hydrodynamic size without visual changes significantly longer than negatively charged nanoparticles. We successfully incorporated the model mitochondria-targeting drug into both types of nanoparticles, achieving the drug content of ~5% and the encapsulation efficiency slightly over 40% for both types of nanoparticles.

**Larisa Knap**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Marija Sollner Dolenc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Tijana Markovič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Proučevanje imunomodulatornega delovanja zmesi bisfenola A in njegovih nadomestkov v limfoblastoidnih celičnih linijah

V raziskovalni nalogi smo proučevali citotoksično in imunomodulatorno delovanje nadomestkov bisfenola A (BPA) v primerjavi s samim BPA ter imunomodulatorne lastnosti zmesi BPA z njegovimi nadomestki. Učinke spojin na imunske celice smo vrednotili na limfoblastoidnih celičnih linijah, ki so model za vrednotenje imunomodulatornih lastnosti spojin *in vitro*. 16 nadomestkom BPA smo najprej določili srednjo inhibitorno koncentracijo ( $IC_{50}$ ) in ugotovili, da je šest nadomestkov manj citotoksičnih od BPA, 10 pa bolj. Nadalje smo ugotovili, da  $IC_{50}$  spojin korelira z logaritmom porazdelitvenega koeficienta, pri čemer je večja citotoksičnost bolj lipofilnih spojin predvidoma povezana z boljšim in lažjim prehajanjem spojin prek celičnih membran. Proučevali smo tudi vpliv nadomestkov in binarnih zmesi BPA s petimi nadomestki na modulacijo izločanja citokinov. Pri koncentraciji 10  $\mu$ M so binarne zmesi bolj vplivale na izločanje citokinov kot posamezni bisfenoli. Najbolj je izstopala zmes BPA in BPAP, ki je močno zmanjšala izločanje interleukinov 2, 6, 10 in dejavnika tumorske nekroze alfa. V zadnjem delu smo na celični liniji Ramos-Blue potrdili nemonotono delovanje bisfenolov. Ti so pri koncentraciji 10  $\mu$ M zmanjšali aktivnost signalne poti jedrnega dejavnika kapa B/proteinskega aktivatorja 1, pri koncentraciji 100 nM pa so jo povečali.

**Larisa Knap**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Marija Sollner Dolenc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Tijana Markovič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Immunomodulatory Activity Evaluation of Mixtures of Bisphenol A and Its Substitutes in Human Lymphoblastoid Cell Lines

In this research, we investigated the cytotoxic and immunomodulatory properties of bisphenol A (BPA) substitutes compared to BPA itself, as well as the immunomodulatory properties of mixtures of BPA with its substitutes. The effects of the compounds on immune cells were evaluated on lymphoblastoid cell lines, which represent an *in vitro* model for assessing the immunomodulatory properties of compounds. We first determined the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for 16 BPA substitutes and found that six substitutes were less, while ten were more cytotoxic than BPA. We determined that  $IC_{50}$  correlates with the logarithm of the partition coefficient, suggesting that higher cytotoxicity of more lipophilic compounds is likely related to better and easier membrane permeability. We also studied effects of individual BPA substitutes and binary mixtures of BPA with five substitutes on the modulation of cytokine release. Binary mixtures had stronger impact on the modulation of cytokine release than individual bisphenols at 10  $\mu$ M concentration. The BPA/BPAP mixture stood out the most, significantly inhibiting the secretion of interleukine 2, 6, 10, and tumour necrosis factor alpha. In the last part, we found a non-monotonic effect of bisphenols on the Ramos-Blue cell line. The 10  $\mu$ M concentration decreased the activity of nuclear factor  $\kappa$ B/activator protein 1, while the 100 nM concentration increased it.

**Zala Stopar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Gašper Tavčar**, Institut Jožef Stefan

Somentor: **Andrej Pevec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Sinteza in reaktivnost koordinacijskih spojin kovinskih karbonilov s karbenskimi ligandi

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali karbenske ligande, in sicer *N*-heterociklične (IMes in IPr) in ciklično (alkil)(aminskega) (cAAC), ki so bili nato uporabljeni za sintezo različnih koordinacijskih spojin s kovinskimi karbonili. Uporabili smo kovinske karbonile treh različnih tipov, kovinska heksakarbonila (Mo in W), kovinska bromopentakarbonila (Mn in Re) in dvojedra kovinska (deka)karbonila (Mn in Re). Pri sintezi koordinacijskih spojin smo preizkusili različne reakcijske pogoje. Uspešno smo sintetizirali tri že znane in osem novih koordinacijskih spojin. Poleg tega smo s fluoriranjem izhodnega karbonila pripravili nov manganov fluorokarbonil. Nastanek spojin smo potrdili z NMR-spektroskopijo, novonastale spojine pa hkrati okarakterizirali z rentgensko strukturno analizo.

**Zala Stopar**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: **Gašper Tavčar**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Co-supervisor: **Andrej Pevec**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Synthesis and Reactivity of Coordination Compounds of Metal Carbonyls with Carbene Ligands

As part of my master's thesis, I synthesised carbene ligands, including *N*-heterocyclic (IMes and IPr) and cyclic (alkyl)(amino) (cAAC) carbenes, which were then used to prepare various coordination compounds with metal carbonyls. I used three types of metal carbonyls: metal hexacarbonyl (Mo and W), metal bromopentacarbonyl (Mn and Re), and binuclear metal (deka)carbonyl (Mn and Re). During the synthesis of the coordination compounds, I experimented with different reaction conditions. I successfully synthesised three already known and eight new coordination compounds. Additionally, I synthesised a new manganese fluorocarbonyl by fluorinating the corresponding dimanganese decacarbonyl. The formation of all compounds was confirmed by NMR spectroscopy, while all newly synthesised compounds were also characterised by X-ray structural analysis.

**Anja Šenk**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Stanislav Gobec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Alen Krajnc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Razvoj in optimizacija večstopenjske kemijske sinteze desmetoksisulfazecina

Okužbe so vodilni vzrok smrti po vsem svetu, samo v letu 2019 je vsaj 1,27 milijona ljudi umrlo neposredno zaradi okužb z bakterijami, ki so odporne proti antibiotikom. Najučinkovitejše orožje proti bakterijskim okužbam so  $\beta$ -laktamski antibiotiki, a so zaradi (pre)pogoste in nepravilne rabe bakterije proti njim postale odporne. Klinično najbolj relevanten mehanizem odpornosti proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom je inaktivacija z  $\beta$ -laktamazami. Proti serinskim  $\beta$ -laktamazam imamo učinkovite zaviralce, proti bakterijam, ki so razvile metalo  $\beta$ -laktamaze, pa so učinkoviti samo še monobaktami. V magistrski nalogi smo zato razvili in optimizirali večstopenjsko kemijsko sintezo desmetoksisulfazecina, ki je prekurzor sulfazecina – edinega naravnega monobaktama s protibakterijskim delovanjem. Desmetoksisulfazecin smo s 14-stopenjsko asimetrično sintezo sintetizirali iz L-serina in 2-pirolidon-5-karboksilne kisline. Vse pridobljene spojine smo ovrednotili z jedrsko magnetno resonanco, nove spojine pa tudi z visokoločljivostno masno spektrometrijo. Z optimizirano sintezno potjo smo skupni izkoristek večstopenjske sinteze v primerjavi z izkoristkom, navedenim v literaturi, izboljšali za več kot dvakrat, kar bo omogočilo pripravo desmetoksisulfazecina v večjih količinah. Tega bo v prihodnosti mogoče uporabiti za pripravo novih kemijskih analogov z morebitnim protibakterijskim delovanjem.

**Anja Šenk**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Stanislav Gobec**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Alen Krajnc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Development and Optimisation of Multistep Desmethoxysulfazecin Synthesis

Infections are becoming the leading cause of death worldwide. In 2019 alone, at least 1.27 million deaths were directly linked to infections with antibiotic-resistant bacteria.  $\beta$ -Lactams remain the most effective weapon against bacterial infections, but due to their frequent and often improper use, bacteria are increasingly becoming resistant to them. Arguably, the most clinically relevant mechanism of resistance to  $\beta$ -lactams is inactivation by  $\beta$ -lactamases. While effective inhibitors exist for serine  $\beta$ -lactamases, only monobactams remain effective against bacteria that (co)-express metallo- $\beta$ -lactamases. Therefore, in this master's thesis, we developed and optimised a multi-step synthetic route to desmethoxysulfazecin, a precursor to the only naturally occurring monobactam with antibacterial activity (i.e. sulfazecin). Desmethoxysulfazecin was synthesised from L-serine and 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid via a 14-step asymmetric synthetic route. All compounds obtained during the synthesis were evaluated using nuclear magnetic resonance (NMR), and new compounds were further analysed using high-resolution mass spectrometry (HRMS). Synthetic optimisation led to over 2-fold improvement in overall yield compared to previously reported methodology, enabling the preparation of desmethoxysulfazecin on a significantly larger scale. This is crucial for future studies and syntheses of new chemical analogues with potential antibacterial properties.

## Kvantifikacija bakterij *Campylobacter jejuni* v biofilmih s kapljično digitalno verižno reakcijo s polimerazo ob uporabi propidijevega monoazida

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so glavne povzročiteljice gastroenteritisov pri ljudeh. V naravi so v biofilmih, kar jim omogoča preživetje v neugodnih okoljskih razmerah. V stresnih razmerah preidejo v živo, vendar nekultivabilno stanje (VBNC), kar onemogoča njihovo kvantifikacijo s klasičnimi metodami. Celice v stanju VBNC ohranijo virulentni potencial, zato je pomembno razviti metodo, ki bo omogočala hitro in zanesljivo kvantifikacijo vseh živih celic *C. jejuni* v vzorcu biofilma. Namen raziskave je bil vpeljati in optimizirati metodo kvantifikacije bakterij *C. jejuni* v eno- in večvrstnih biofilmih z uporabo ddPCR v kombinaciji z reagentom PMA, ki selektivno prehaja skozi membrane poškodovanih celic, se kovalentno veže na DNA in preprečuje pomnoževanje med reakcijo PCR s poudarkom na optimizaciji tretiranja z reagentom PMA. Pokazalo se je, da pufer PBS ni primeren za uporabo v kombinaciji z reagentom PMA in da dvakratno tretiranje z reagentom PMA izboljša njegovo delovanje. Dvakratno tretiranje s 25  $\mu$ M reagentom PMA zagotavlja najboljše rezultate pri zniževanju signala mrtvih celic, ne da bi pri tem vplivali na signal živih celic, kar je bilo potrjeno z metodama qPCR in ddPCR. Z molekularno metodo ddPCR smo zaznali več *C. jejuni* kot z metodo štetja CFU. S primerjavo metod ddPCR-PMA in CFU smo pokazali, da se sposobnost tvorjenja biofilma *C. jejuni* izboljša v mešanih biofilmih s *Pseudomonas fragi*. Glavna težava je bila kontaminacija z DNA *C. jejuni*, za katero smo ugotovili, da je prisotna na površinah v laboratoriju in pipetah ter se pojavlja kot ozadje pri kvantifikaciji vzorcev.

**Polona Kalan**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana  
Supervisor: **Anja Klančnik**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

## Quantification of *Campylobacter Jejuni* in Biofilms Using ddPCR and PMA

*Campylobacter jejuni* are known as the main cause of gastroenteritis in humans. In nature, they are predominantly found in biofilms, allowing them to survive in unfavourable conditions. Under stress, they enter a viable but non-culturable (VBNC) state, which prevents their accurate quantification using classical methods. In the VBNC state, they retain their virulent potential so it is essential to develop a method that enables rapid and reliable quantification of all living *C. jejuni* cells in a biofilm sample. The aim of the study was to establish and optimise a method for quantifying *C. jejuni* bacteria in single- and multi-species biofilms using ddPCR in combination with the reagent PMA, which selectively penetrates damaged cell membranes, covalently binds to DNA, and prevents its amplification during PCR. Special emphasis was placed on optimising PMA treatment. It was found that PBS buffer is not suitable in combination with PMA. The results showed that double treatment improves PMA efficiency. Double treatment with 25  $\mu$ M PMA provides the best results in reducing dead cell signals without affecting the signal of live cells, as confirmed by qPCR and ddPCR methods. In general, more *C. jejuni* are detected with the ddPCR method than with the CFU method. Using ddPCR-PMA and CFU methods, we demonstrated that the ability of *C. jejuni* to form biofilms improves in mixed biofilms with *Pseudomonas fragi*. A major issue in interpreting the results was contamination with *C. jejuni* DNA, which was found to be present on laboratory surfaces and in pipettes, and appeared as background during sample quantification.

**Lucija Rus**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Lea Knez**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Urška Janžič**, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

## Vzorci predpisovanja antibiotikov in njihov vpliv na izide zdravljenja z imunoterapijo z zaviralci imunskih kontrolnih točk pri bolnikih z napredujočim nedrobnoceličnim rakom pljuč

Na zdravljenje napredujočega nedrobnoceličnega pljučnega raka (NDPR) z zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) lahko vpliva več dejavnikov, med drugim črevesna mikrobiota. Antibiotiki porušijo njeno ravnovesje ter lahko posredno vplivajo na imunski sistem in na učinkovitost zdravljenja z imunoterapijo. V nalogi smo pregledali predpisovanje antibiotikov pri bolnikih z NDPR, ki so se zdravili z ZIKT na Kliniki Golnik. Proučili smo vzorce predpisovanja in ugotovili, da je imela večina bolnikov v obdobju enega leta pred začetkom zdravljenja z ZIKT predpisan vsaj en antibiotik, najpogosteje penicilinskega. Ugotovili smo tudi, da obstaja potencialna povezava med jemanjem antibiotika v tem obdobju in slabšim izidom zdravljenja z ZIKT.

**Lucija Rus**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Lea Knez**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Urška Janžič**, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik

## Antibiotic Prescription Patterns and Their Impact on Outcomes of Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer

The efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in treating advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) may be influenced by various factors, including the composition of the gut microbiota. Antibiotics can disrupt microbial balance, potentially affecting the immune system and the efficacy of immunotherapy. In this study, we reviewed antibiotic prescriptions among NSCLC patients treated with ICIs at University Clinic Golnik. We analysed antibiotic prescription patterns and found that the majority of patients had at least one course of antibiotics prescribed within one year prior to the initiation of ICI therapy, with penicillin antibiotics being the most frequently prescribed group. Our findings also suggest a potential association between prior antibiotic exposure and poorer clinical outcomes of ICI therapy.

**Janja Zabukovnik**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Igor Loccatelli**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Grzegorz Garbacz**, Physiolution Polska Sp. z o.o., Wrocław

## Majhne sile, velik vpliv: kvantifikacija gastro-intestinalnih mehanskih obremenitev v pogojih s hrano za izgradnjo biorelevantnih modelov sproščanja

Celovito razumevanje prebavnega sistema je ključno za razvoj novih farmacevtskih izdelkov. Gastrointestinalni trakt (GIT) je organ v stalnem gibanju in z značilnimi razlikami med posamezniki. Telemetrične kapsule so neprecenljivo orodje za pridobivanje fizioloških podatkov, ki so ključnega pomena pri razvoju farmacevtskih izdelkov. Večina takšnih senzorjev meri pH, tlak in temperaturo. Prav tako je pomembno proučiti minimalni vpliv kontrakcij v GIT na trdne farmacevtske oblike (FO). Tradicionalni biorelevantni testi raztapljanja pri testiranju kontrakcij proučujejo vplive visokih tlakov na FO v določenem časovnem obdobju. V magistrski nalogi smo proučevali vpliv kontrakcij v GIT, zbranih s telemetrično kapsulo SmartPill® pri 19 bolnikih. Kontrakcije smo analizirali glede na 7 velikostnih kategorij (15–300 mbar in več). Glavni rezultati kažejo, da so manjše kontrakcije v GIT (do 100 mbar) znatno pogostejše od večjih (nad 100 mbar), najpogostejše pa so bile v območju od 15 do 50 mbar. Največjo intenzivnost, od 15 do 25 mbar, smo opazili v želodcu. V tankem črevesu so bile najpogostejše kontrakcije v območju od 25 do 50 mbar, nad 50 mbar pa so bile redke. Podobno so v debelem črevesu najpogostejše kontrakcije od 25 do 50 mbar. Krčenja nad 150 mbar so redka v celotnem prebavnem traktu, čeprav so izrazitejša v pilorusu. Naša ocena pogostosti manjših krčenj v prebavnem traktu zagotavlja trdno podlago za prihodnji razvoj bolj reprezentativnih biorelevantnih naprav za preizkušanje raztapljanja zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik.

**Janja Zabukovnik**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Igor Locatelli**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Grzegorz Garbacz**, Physiolution Polska, Sp. z o.o., Wrocław

## Small Pressure, Big Impact: Quantification of Gastrointestinal Motility Forces in Fed State for Biorelevant Dissolution Tests

A comprehensive understanding of the digestive system is crucial for the development of new pharmaceutical products. The gastrointestinal tract (GIT) is an organ in constant motion, with characteristic differences between individuals. Telemetric capsules are an invaluable tool for obtaining physiological data crucial for the development of pharmaceutical products. Most such sensors measure pH, pressure, and temperature. It is also important to study the minimal impact of contractions in the GIT on solid pharmaceutical forms. Traditional biorelevant dissolution tests in contraction testing examine the effects of high pressures on pharmaceutical forms over a specific period of time. In our master's thesis, we studied the impact of contractions in the GIT, collected with the SmartPill® telemetric capsule in 19 patients. We analysed contractions according to seven size categories (classes from 15 mbar to 300 mbar and above). The main results show that smaller contractions in the GIT (up to 100 mbar) are significantly more frequent than larger ones (above 100 mbar). The most frequent contractions were observed between 15 and 50 mbar. The highest intensity was observed in the stomach, ranging from 15 to 25 mbar. In the small intestine, the most frequent contractions were in the range from 25 to 50 mbar, while those above 50 mbar were rare. Similarly, contractions between 25 and 50 mbar are most common in the large intestine. Contractions above 150 mbar are rare throughout the digestive tract, although they are more pronounced in the pylorus. Our assessment of the frequency of minor contractions in the digestive tract provides a solid basis for the future development of more representative biorelevant devices for testing the dissolution of active pharmaceutical ingredients from pharmaceutical forms.

**Maja Cvetanoska**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentor: **Aleš Berlec**, Institut Jožef Stefan  
Somentor: **Spase Stojanov**, Institut Jožef Stefan

## Karakterizacija različnih sevov vaginalnih laktobacilov in njihovo vključevanje v nanovlakna

Vaginalna mikrobiota vključuje številne mikroorganizme, med katerimi prevladujejo laktobacili vrst *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* in *L. iners*. S tvorbo mlečne kisline, vodikovega peroksida in bakteriocinov zavirajo rast patogenov ter vzdržujejo zdravo vaginalno okolje. Neravnovesje zaradi zmanjšane števila laktobacilov lahko vodi do vaginalnih okužb. Uporaba laktobacilov kot probiotikov lahko omogoči obnovo normalne vaginalne mikrobiote in posledično tudi zdravljenje okužb, vendar pomanjkanje ustreznih načinov prenosa ovira njihovo širšo uporabo. V magistrski nalogi smo ovrednotili 77 sevov vaginalnih laktobacilov vrst *L. crispatus*, *L. jensenii* in *L. gasseri* glede rasti, preživetja v fosfatnem pufu, znižanja pH, agregacije in površinske hidrofobnosti. Na podlagi teh lastnosti smo seve razvrstili v skupine in izbrali tri z najboljšimi karakteristikami (*L. crispatus* 6, *L. jensenii* 6 in *L. gasseri* 35), ki smo jih z elektrostatskim sukanjem vključili v nanovlakna ter ovrednotili njihovo viabilnost. Najmanjši upad viabilnosti (0,1 log CFU/g) je bil pri sevu *L. gasseri* 35, medtem ko je bil pri *L. crispatus* 6 in *L. jensenii* 6 upad nekoliko večji (1,8 oz. 2,2 log CFU/g). S tem smo dokazali, da so izbrani sevi ustrezni za vgradnjo v nanovlakna.

**Maja Cvetanoska**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Aleš Berlec**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana  
Co-supervisor: **Spase Stojanov**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

## Characterisation of Different Vaginal *Lactobacillus* Strains and Their Incorporation into Nanofibers

The vaginal microbiota includes various microorganisms, predominantly lactobacilli of the species *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, and *L. iners*, which help maintain a healthy vaginal environment by producing lactic acid, hydrogen peroxide, and bacteriocins that inhibit the growth of pathogens. An imbalance caused by a reduced number of lactobacilli can lead to vaginal infections. The use of lactobacilli as probiotics can help restore the normal vaginal microbiota and thereby treat infections; however, the lack of an appropriate delivery system limits their broader application. In this master's thesis, we evaluated 77 vaginal lactobacillus strains of the species *L. crispatus*, *L. jensenii*, and *L. gasseri* with respect to growth, survival in phosphate buffer, pH reduction, aggregation, and surface hydrophobicity. Based on these properties, the strains were grouped, and three with the most promising characteristics (*L. crispatus* 6, *L. jensenii* 6, and *L. gasseri* 35) were selected for incorporation into nanofibers using the electrospinning method, and their viability was assessed. The smallest loss of viability (0.1 log CFU/g) was observed in *L. gasseri* 35, while *L. crispatus* 6 and *L. jensenii* 6 showed slightly higher losses (1.8 and 2.2 log CFU/g, respectively). These results demonstrate that the selected strains are suitable candidates for incorporation into nanofibers.

**Eva Ravnikar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Nina Kočevar Glavač**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Katja Schoss**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Testiranje stabilnosti hidrolatov poprove mete (*Mentha × piperita*) in pelargonije (*Pelargonium graveolens*)

Hidrolati so vodne raztopine hlapnih vodotopnih komponent (približno 0,1 %), ki poleg eteričnega olja nastanejo pri destilaciji in zaradi prijetnega vonja postajajo vse bolj privlačne kozmetične surovine, ki se v izdelke vgrajujejo v velikih koncentracijah ali pa se uporabljajo kot samostojni kozmetični izdelki. Za razliko od eteričnih olj se pri njih ne preverja vsebnost potencialnih alergenov niti se ne ocenjuje njihova stabilnost, kar je ključno za varnost in učinkovitost kozmetičnih izdelkov. V magistrski nalogi smo podrobno raziskali sestavo in stabilnost hidrolatov dveh zdravilnih rastlin, poprove mete (*Mentha × piperita*) in pelargonije (*Pelargonium graveolens*). Pri poprovi meti smo v hidrolatu zaznali dva alergena, linalol in  $\alpha$ -terpineol, oba v majhnih koncentracijah. V hidrolatu iz pelargonije pa so alergeni predstavljali glavnino hlapnih spojin, zaznali smo citronelol, linalol in  $\alpha$ -terpineol. V obeh hidrolatih so prevladovali oksigenirani monoterpeni, ki so zaradi nenasičenosti in prisotnosti kisika podvrženi kemičnim reakcijam, kot so oksidacija, izomerizacija, polimerizacija in hidroliza. Hitrost teh procesov je močno odvisna od zunanjih dejavnikov – od temperature, izpostavljenosti svetlobi in prisotnosti kisika iz zraka. S plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS), smo spremljali spremembe v sestavi hlapnih spojin pri različnih pogojih shranjevanja (2–8 °C, 25 °C, 40 °C, izpostavljenost svetlobi). Ugotovili smo, da je kakovost hidrolatov najbolj ohranjena, če jih shranjujemo v hladilniku v steklenih vsebnikih in zaščitene pred svetlobo. Podobno stabilnost so pokazali vzorci, shranjeni pri sobni temperaturi in zaščiteni pred svetlobo. Preverili smo tudi vpliv različnih materialov vsebnikov (steklo, aluminij, polietilen, polietilen visoke gostote) in ugotovili, da sta se hidrolata obeh proučevanih rastlin najslabše ohranila v plastični embalaži. Raziskava je pomembna, ker opozarja na potrebo po ustrezni regulaciji hidrolatov, predvsem z vidika prisotnosti alergenov in zagotavljanja stabilnosti, saj je to lahko povezano s tveganjem za končne uporabnike kozmetičnih izdelkov, ki jih vsebujejo.

**Eva Ravnikar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Nina Kočevar Glavač**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Katja Schoss**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Stability Testing of Hydrolates of Peppermint (*Mentha × Piperita*) and Rose Geranium (*Pelargonium Graveolens*)

Hydrolates are aqueous solutions containing volatile water-soluble components (approximately 0.1%) that are formed alongside essential oils during the distillation process. Due to their pleasant fragrance, they are increasingly used as cosmetic raw materials, either in high concentrations in cosmetic formulations or as standalone cosmetic products. In contrast to essential oils, the content of potential allergens in hydrolates is not typically assessed, nor is their stability evaluated – both of which are crucial for the safety and efficacy of cosmetic products. In this master's thesis, we thoroughly investigated the composition and stability of hydrolates from two medicinal plants: peppermint (*Mentha × piperita*) and rose geranium (*Pelargonium graveolens*). In peppermint hydrolate, we detected two allergens, linalool and  $\alpha$ -terpineol, in low concentrations, whereas in the case of rose geranium, the allergens made up the majority of the volatile compounds, namely citronellol, linalool, and  $\alpha$ -terpineol. In both hydrolates, oxygenated monoterpenes predominated. Due to their unsaturation and the presence of oxygen, these compounds are prone to chemical reactions such as oxidation, isomerisation, polymerisation, and hydrolysis. The rate of these processes depends heavily on external factors: temperature, light exposure, and the presence of atmospheric oxygen. Using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), we monitored changes in the composition of volatile compounds under various storage conditions (2–8 °C, 25 °C, 40 °C, and light exposure). We found that the quality of hydrolates was best preserved when stored in a refrigerator, in glass containers, and protected from light. Similar stability was observed in samples stored at room temperature, provided they were protected from light. We also examined the influence of different container materials (glass, aluminium, polyethylene, and high-density polyethylene) and found that hydrolates from both plants deteriorated the most when stored in plastic packaging. This research is important as it highlights the need for proper regulation of hydrolates, particularly in terms of allergen presence and stability assurance, as their use in cosmetic products may pose potential risks to end users.

## Optimizacija priprave sferoidov tumorskih celic raka dojke in fibroblastov

Razumevanje biologije tumorjev je spremenilo pogled nanje, saj jih ne obravnavamo več kot izolirane mase, temveč kot del kompleksnega tumorskega mikrookolja. V nalogi smo zato pripravili 3D-sferoide sokultur tumorskih celic raka dojke MCF7 in MDA-MB-231 ter fibroblastov MRC-5. Za pripravo enotnih in ponovljivih sferoidov smo testirali različni metodi priprave sferoidov: metodo tekočinskega prekrivanja in metodo viseče kapljice. Ovrednotili smo primernost izbranih celičnih linij za tvorbo 3D-sferoidov, potrebo po uporabi ogrodja za njihovo tvorbo, pogoje tvorbe večceličnih sferoidov za posamezen tip celic in njihovo ustreznost za vrednotenje učinka zaviralcev katepsinov. V sferoidih sokultur smo različne populacije celic ločili s fluorescenčnimi sondami. Na koncu smo potrdili, da so pripravljene sferoidi primeren model za vrednotenje zaviralcev katepsinov, saj je zaviralec katepsina B nitroksolin upočasnil rast sferoidov. V okviru naloge smo tako pripravili celične 3D-modele, ki bolje posnemajo tumorsko mikrookolje in so primerni, da bi z njimi lahko izboljšali vrednotenje novih protitumornih terapij.

**Blažka Štefin**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Jožef Stefan Institute, Ljubljana  
Supervisor: **Ana Mitrović**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

## Optimisation of Preparation of Spheroids from Breast Cancer Cells and Fibroblasts

A better understanding of tumour biology has changed the perception of tumours, as they are no longer considered isolated masses, but rather part of a complex tumour microenvironment. In this research, we prepared 3D spheroids from co-cultures of breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231, and MRC-5 fibroblasts. To achieve uniform and reproducible spheroids, we tested two different methods of spheroid formation: the liquid overlay method and the hanging drop method. We investigated the suitability of the selected cell lines for the formation of 3D spheroids, the need for scaffolds for their formation, the conditions required for generating multicellular spheroids for each cell type, and their suitability for evaluating the effect of cathepsin inhibitors. In the co-culture spheroids, we distinguished different cell populations using fluorescent probes. Finally, we confirmed that the prepared spheroids are a suitable model for evaluating cathepsin inhibitors, as the cathepsin B inhibitor nitroxoline decreases spheroid growth. In this research, we have developed 3D cell models that better mimic the tumour microenvironment and serve as a suitable model for the improved evaluation of new anti-tumour therapies.

**Adela Avdičević**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Mentor: **Urban Bren**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru  
Somentor: **Samo Lešnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

## Uporaba modernih računalniških pristopov za iskanje novih protivirusnih zdravil

Proteaza HIV-1 je ključni encim v replikacijskem ciklu virusa HIV-1, saj omogoča cepitev virusnih poliproteinov v strukturne in funkcionalne komponente, nujne za nastanek zrelih virusnih delcev. Zaradi svoje osrednje vloge je pomembna tarča pri razvoju protivirusnih zdravil. Vendar velika mutabilnost virusa pogosto vodi do odpornih sevov, kar zmanjšuje učinkovitost terapij. Peptidomimetični inhibitorji, ki se uporabljajo, so omejeni zaradi majhne peroralne biološke uporabnosti, kratke razpolovne dobe in slabe prepustnosti skozi krvno-možgansko pregrado. Zaradi teh pomanjkljivosti se kot obetavna alternativa uveljavljajo naravne spojine, ki so pogosto ugodno biokompatibilne, strukturno raznolike in imajo nizko stopnjo toksičnosti. Med njimi smo kot izhodišče raziskave izbrali rozmanol, ki je bil v preteklih študijah že prepoznan kot potencialni zaviralec proteaze HIV-1. Z računalniško podprtim pristopom, ki je vključeval virtualno reševanje za identifikacijo strukturno sorodnih molekul, molekulske sidranje za analizo njihove vezave in simulacije molekulske dinamike za oceno stabilnosti tvorjenih kompleksov, smo ugotovili, da imajo nekatere rozmanolu podobne spojine primerljive ali celo boljše vezavne lastnosti. Dobljeni rezultati tako potrjujejo potencial rozmanola in njegovih derivatov kot stabilnih in učinkovitih inhibitorjev proteaze HIV-1.

**Adela Avdičević**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Supervisor: **Urban Bren**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Co-supervisor: **Samo Lešnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## Use of Modern Computational Methods in Search for Novel Antiviral Drugs

HIV-1 protease represents a key enzyme in the replication cycle of the HIV-1 virus, as it facilitates the cleavage of viral polyproteins into structural and functional components essential for the formation of mature viral particles. Owing to this central role, it remains a critical target in the development of antiviral therapies. However, the high mutability of the virus often leads to the emergence of resistant strains, reducing the efficacy of current treatments. Currently applied peptidomimetic inhibitors are limited by low oral bioavailability, short half-life, and limited ability to cross the blood-brain barrier. Due to these limitations, natural compounds have emerged as promising alternatives, often exhibiting favourable biocompatibility, structural diversity, and low toxicity. Among them, rosmannol was selected as the starting point of our study, having previously been identified as a potential HIV-1 protease inhibitor. Using a computational approach involving virtual screening to identify structurally related molecules, molecular docking to evaluate their binding affinities, and molecular dynamics simulations to assess complex stability, we found that some compounds structurally similar to rosmannol exhibited similar or even better binding properties. These results support the potential of rosmannol and its derivatives as stable and potent HIV-1 protease inhibitors.

**Tinara Šušтариč**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Špela Zupančič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Igor Locatelli**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Sistematični pregled raziskav o liofilizaciji laktobacilov in preizkus uporabnosti velikega jezikovnega modela pri zbiranju in vrednotenju podatkov

Probiotične bakterije, zlasti laktobacili, imajo ključno vlogo pri ravnesju črevesne mikrobiote, uporabljajo pa se v zdravih, prehranskih dopolnilih in živilih. Za izboljšanje njihovega preživetja med shranjevanjem in s tem tudi učinkovitosti se pogosto uporablja liofilizacija. Magistrska naloga predstavlja sistematičen pregled raziskav o liofilizaciji laktobacilov in analizira možnosti za uporabo umetne inteligence pri raziskovanju. Za ekstrakcijo podatkov smo poleg klasičnega ročnega pregleda uporabili tudi veliki jezikovni model (large language model, LLM), s katerim smo analizirali metodološke vidike raziskav. Pregledali smo 272 znanstvenih člankov, iz katerih smo pridobili podatke o najpogostejše uporabljenih pogojih liofilizacije, ter analizirali različne pomožne snovi, kar je pomembna osnova za nadaljnje raziskave in razvoj probiotičnih formulacij. Najpogostejše proučevani sevi v raziskavah so bili *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* in *L. casei*. Običajni pogoji liofilizacije so vključevali zamrzovanje pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , primarno sušenje pri  $-50^{\circ}\text{C}$  ter sekundarno sušenje med  $20$  in  $25^{\circ}\text{C}$  ter trajanje cikla od  $24$  do  $48$  ur. Najpogostejše uporabljena stabilizatorja sta bila saharoza in trehaloza, pogosto pa tudi posneto mleko. Pri mikroenkapsulaciji so prevladovali alginat in sirotkine beljakovine, najpogostejši tip formulacije pa so bile mikrokapsule. Shranjevanje probiotikov se je najpogostejše izvajalo pri  $4^{\circ}\text{C}$ , trajalo pa je od enega do šestih mesecev. Uporaba umetne inteligence pri raziskovanju se je pokazala kot učinkovita podpora, zlasti za sistematično analizo večjega števila virov.

**Tinara Šušтариč**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Supervisor: **Špela Zupančič**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Igor Locatelli**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Systematic Review of Lactobacilli Lyophilisation Research and Evaluation of Applicability of Large Language Model in Data Collection and Assessment

Probiotic bacteria, especially lactobacilli, play a key role in maintaining the balance of the gut microbiota and are used in medicines, dietary supplements, and food products. To enhance their survival during storage and consequently their effectiveness, the lyophilisation process is often used. This master's thesis presents a systematic review of studies on the lyophilisation of lactobacilli and analyses the potential use of artificial intelligence (AI) in the research process. In addition to traditional manual review, we used a large language model (LLM) to extract data and analyse the methodological aspects of the studies. A total of 272 scientific articles were reviewed to extract data on the most commonly used lyophilisation conditions and to analyse various excipients, providing a valuable foundation for further research and the development of probiotic formulations. The most frequently studied strains were *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, and *L. casei*. Common lyophilisation conditions included freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ , primary drying at  $-50^{\circ}\text{C}$ , and secondary drying between  $20$  and  $25^{\circ}\text{C}$ , with the cycle duration ranging from  $24$  to  $48$  hours. The most commonly used stabilisers were sucrose and trehalose, with skim milk also frequently applied. In microencapsulation, alginate and whey proteins were predominant, and the most common formulation type was microcapsules. Probiotics were most often stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for a period of one to six months. The use of AI in the research process proved to be an effective support tool, particularly for the systematic analysis of a large number of sources.

**Pia Žižek**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Marija Sollner Dolenc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Nina Franko**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

## Vpliv bisfenola A in njegovih izbranih analogov na izločanje citokinov v monocitni celični liniji THP-1

Bisfenol A (BPA) je najprepoznavnejši bisfenol, ki ga med drugim najdemo v različnih potrošniških izdelkih, farmacevtski obojnini, zraku, pitni vodi in bioloških vzorcih ljudi. Zaradi skrb vzbujajočih učinkov tega motilca endokrinega sistema na zdravje ljudi je njegova uporaba regulirana in omejena, zato se je povečala uporaba njegovih strukturnih analogov. Čeprav učinki in mehanizmi delovanja teh analogov niso dovolj raziskani, jih je že mogoče zaznati v okolju in bioloških vzorcih. Da bi pridobili nove podatke o analogih BPA, smo v magistrski nalogi proučevali njihov vpliv na imunske celice. Uporabili smo monocitno celično linijo THP-1, diferencirano v makrofage, ki smo jo izpostavili BPA oz. analogom BPAP, BPE, BPP, BPS-MAE, BPZ in TCBPA. Njihov vpliv na metabolno aktivnost smo določali s testom z resazurinom, s čimer smo določili srednjo inhibitorno koncentracijo ( $IC_{50}$ ) posameznega bisfenola. Najnižjo  $IC_{50}$  smo določili BPP, ki je bil med proučevanimi spojinami najbolj citotoksičen (kar šestkrat bolj od BPA). Ugotovili smo tudi, da obstaja korelacija med lipofilnostjo ( $\log P$ ) in citotoksičnostjo. Nato smo s pretočno citometrijo proučevali vpliv bisfenolov na modulacijo izločanja citokinov iz makrofagov, aktiviranih z lipopolisaharidom. Vsi proučevani bisfenoli so imeli v toksikološko relevantnih nanomolarnih koncentracijah imunomodulatorne učinke, saj so povečali sproščanje proinflammatory citokinov (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8). Dokazali smo, da je citotoksičnost analogov BPA odvisna od njihove kemične sestave in lipofilnosti ter da imajo imunomodulatorne učinke na makrofage, diferencirane iz THP-1.

**Pia Žižek**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Nina Franko**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

## Effect of Bisphenol A and Its Selected Analogues on Cytokine Secretion in Monocytic Cell Line THP-1

Bisphenol A (BPA) is the most recognised bisphenol, found in consumer products, pharmaceutical packaging, air, drinking water, and human biological samples. Due to the concerning effects of this endocrine disruptor on human health, its use has been regulated and limited. As a result, the use of its structural analogues has increased. Although the effects and mechanisms of action of these analogues have not yet been sufficiently studied, they can already be detected in the environment and in biological samples. To fill in the data gaps regarding their safety, we studied their effect on immune cells. In this master's thesis, we used the monocytic cell line THP-1, differentiated into macrophages, which was exposed to BPA or the analogues BPAP, BPE, BPP, BPS-MAE, BPZ, and TCBPA. Their effect on metabolic activity was determined using the resazurin test, allowing us to determine the mean inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of each bisphenol. The lowest  $IC_{50}$  was determined for BPP, which is therefore the most cytotoxic (six times more than BPA). A correlation between lipophilicity ( $\log P$ ) and cytotoxicity was also observed. The effect of bisphenols on the modulation of cytokine secretion from lipopolysaccharide-activated macrophages was assessed using flow cytometry. Bisphenols showed immunomodulatory effects at toxicologically relevant nanomolar concentrations, since they increased the release of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8). Our study demonstrated that the cytotoxicity of BPA analogues depends on their chemical structure and lipophilicity, and that they have immunomodulatory effects on THP-1 macrophages.

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

## Računalniško modeliranje antikarcinogenih učinkov naringenina

Naringenin je biološko aktiven polifenol iz citrusov z različnimi koristnimi učinki za človeško zdravje. V literaturi je navedeno, da lahko zavira razvoj in napredovanje tumorjev, kar kaže na njegov potencial za zdravljenje različnih vrst raka. Raziskava je bila osredotočena na njegovo vlogo kot polifenolnega lovilca devetih končnih kemijskih karcinogenov: aflatoksin B1 ekso-8,9-epoksida, 2-cianoetilen oksida, etilen oksida, glicidamida, kloroetilen oksida, vinilkarbamat epoksida, stiren oksida, propilen oksida in  $\beta$ -propiolaktona. S Hartree-Fockovo kvantnomehansko metodo ter baznima setoma 6-31G(d) in 6-311++G(d,p) so bile izračunane aktivacijske proste energije in razjasnjeni molekularni mehanizmi reakcij alkilacije naringenina s karcinogeni. Izračuni so bili izvedeni na gruči VRANA s programom Gaussian 09, v vakuumu in ob uporabi dveh implicitnih modelov topil: polarizabilnega kontinuuma in Langevinovih dipolov. Rezultati so pokazali, da je naringenin učinkovit lovilec šestih končnih kemijskih karcinogenov, med katerimi najbolj izstopajo  $\beta$ -propiolakton, vinilkarbamat epoksid in propilen oksid. Potencial se je potrdil tudi pri kloroetilen oksidu, aflatoksin B1 ekso-8,9-epoksidu in etilen oksidu. Pri 2-cianoetilen oksidu, glicidamidu in stiren oksidu zaščitni učinek ni bil tako izrazit. Raziskava prispeva k razumevanju molekularnih mehanizmov delovanja naringenina in je podlaga za nadaljnje računalniške in eksperimentalne študije njegovih antikarcinogenih učinkov.

**Lamija Ahmetović**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Supervisor: **Urban Bren**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Co-supervisor: **Veronika Furlan**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## Computational Modelling of Anticarcinogenic Effects of Naringenin

Naringenin is a biologically active polyphenol from citrus fruits with various beneficial effects on human health. Recent literature suggests that it can inhibit tumour development and progression, indicating its potential for treating various types of cancer. The research focused on its role as a polyphenolic scavenger of nine ultimate chemical carcinogens: aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide, 2-cyanoethylene oxide, ethylene oxide, glycidamide, chloroethylene oxide, vinyl carbamate epoxide, styrene oxide, propylene oxide, and  $\beta$ -propiolactone. Using the Hartree-Fock quantum-mechanical method and the 6-31G(d) and 6-311++G(d,p) basis sets, activation free energies were calculated, and the molecular mechanisms of alkylation reactions of naringenin with the carcinogens were elucidated. The calculations were performed on the VRANA cluster using the Gaussian 09 program, both in vacuum and with two implicit solvation models: the polarisable continuum model and Langevin dipoles. The results showed that naringenin is an effective scavenger of six ultimate chemical carcinogens, with  $\beta$ -propiolactone, vinyl carbamate epoxide, and propylene oxide standing out the most. Significant potential was also confirmed for chloroethylene oxide, aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide, and ethylene oxide. In the case of 2-cyanoethylene oxide, glycidamide, and styrene oxide, the protective effect was less pronounced. The research contributes to the understanding of the molecular mechanisms of naringenin's action and provides a basis for further computational and experimental studies of its anticarcinogenic effects.

**Špela Žunec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Mentorica: **Helena Prosen**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani  
Somentorica: **Ida Kraševac**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Razvoj ekstrakcijske metode za perfluoroalkilna onesnaževala v vodi

Per- in polifuoroalkilne snovi (PFAS) so spojine, ki so v našem vsakodnevnem življenju prisotne v različnih izdelkih, saj jih s svojimi fizikalno-kemičnimi lastnostmi izboljšujejo. Na človeka in okolje pa vplivajo tudi negativno, zato jih je treba regulirati, za kar uporabljamo analitske metode. V okviru diplomske naloge smo optimizirali metodo ekstrakcije PFAS na trdno fazo. Rezultate smo ovrednotili z že razvito metodo LC-MS/MS. Ekstrakcijsko metodo smo optimizirali z ustrezno ekstrakcijsko kolono in elucijskim topilom. Proučili smo tudi vpliv pH in deleža soli v raztopini, iz katere so bili ekstrahirani analiti, na izkoristek ekstrakcije. Določili smo prebojni volumen ekstrakcijske metode in ustrezno topilo za analizo LC-MS/MS. Preverili smo stabilnost PFAS, shranjenih v vodi MiliQ na hladnem. Za ekstrakcijo PFAS sta bila najprimernejša ekstrakcijska kolona Oasis WAX (Waters) in elucijsko topilo s 5-odstotno raztopino amonijaka v metanolu, najboljši izkoristki pa so bili pri pH 2–3 in 3,5-odstotnem deležu soli v raztopini vzorca. Za metodo smo določili prebojni volumen več kot 500 mL. Najboljše topilo za analizo LC-MS/MS je bila voda MiliQ; PFAS so v njej in na hladnem obstojni vsaj en mesec. Analizirali smo tudi realni vzorec iz okolja, v katerem je bilo manj kot 6 ng/L PFAS.

**Špela Žunec**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Supervisor: **Helena Prosen**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Ida Kraševac**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Development of Extraction Method for Perfluoroalkyl Pollutants in Water

PFAS are present in everyday products due to their exceptional physicochemical properties. However, they also have harmful effects on humans and the environment, which is why their regulation is necessary, requiring the use of analytical methods. In this research, I optimised a solid-phase extraction (SPE) method for PFAS and evaluated it using an established LC-MS/MS method. I selected a suitable SPE cartridge and elution solvent, and examined the effects of pH and salt concentration on extraction efficiency. I determined the breakthrough volume and a suitable LC-MS/MS solvent. I also assessed PFAS stability in samples stored in Milli-Q water under refrigerated conditions. The best results were achieved using the Oasis WAX (Waters) cartridge and 5% ammonia in methanol. Optimal extraction occurred at pH 2–3 and 3.5% salt in the sample. The breakthrough volume exceeded 500 mL. Milli-Q water was the most suitable LC-MS/MS solvent. PFAS remained stable for at least one month in Mili-Q water under refrigerated conditions. In the analysed environmental sample, PFAS concentrations were below 6 ng/L.

**Živa Anderluh, Jošt Dolinar**, Gimnazija Vič

Mentor: **Janez Mravljak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

## pH-občutljivi fluorescenčni označevalci za odkrivanje okužb sečil

Med najpogostejše bakterijske okužbe prištevamo okužbe urinarnega trakta, ki jih najpogosteje povzroča uropatogena *Escherichia coli*. Bakterije se na površino uroepiteljskih celic vežejo z lektinom FimH, ki prepozna glikoproteine gostiteljske celice. To jim omogoča, da se zoperstavijo toku urina in s tem podaljšajo trajanje okužbe. FimH je adhezin, ki veže manozo in je na vrhu pilusov tipa 1. Za zdravljenje tovrstnih okužb se danes uporabljajo predvsem antibiotiki, ki pa pogosto vodijo v razvoj sevov, odpornih proti številnim antimikrobnim učinkovinam. Med alternativnimi pristopi, ki se raziskujejo, je zelo obetavna antiadhezijska terapija. Obenem se razvijajo tudi nove diagnostične metode. V raziskovalni nalogi smo sintetizirali antagoniste FimH, ki temeljijo na manozih. D-manoza ima naravno precej šibko afiniteto za FimH, zato smo njeno vezavno sposobnost izboljšali z dodajanjem različnih aglikonov prek  $\alpha$ -glikozidne vezi na D-manopiranozo. S tem namenom smo na D-manozo vezali fluorescenčne sonde – rodamin B, rodamin 6G in 5-karboksifluorescein. Vsa omenjena barvila so pH-občutljiva, saj v različnih okoljih spreminjajo svojo konfiguracijo. V naših spojinah so aglikoni vezani prek N-glikozidne vezi, ki velja za stabilnejšo v fizioloških pogojih. Pri različnih pH-vrednostih smo merili absorpcijo in fluorescenco končnih produktov ter rezultate grafično prikazali in analizirali. Na podlagi titracijskih krivulj smo določili pKa-vrednosti. Dve končni spojini sta pokazali maksimalno fluorescenco v kislem okolju, ena pa pri pH, značilnem za citosol. Vse končne spojine so imele majhen Stokesov premik (22–28 nm). Spojini, sintetizirani iz 5-karboksifluoresceina in rodamina 6G, smo poslali na testiranje na bakterijah. Spojino z rodaminom B smo izločili zaradi relativno nizke fluorescence. Testiranje je pokazalo, da se preostali spojini uspešno vežeta na bakterijske piluse, pri čemer je del spojin ostal vezan tudi po izpiranju.

**Živa Anderluh, Jošt Dolinar**, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: **Janez Mravljak**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

## pH-Sensitive Fluorescent Probes for Detecting Urinary Tract Infections

Urinary tract infections are among the most common bacterial infections, with uropathogenic *Escherichia coli* being the most frequent causative agent. Pathogens bind to glycoproteins on the surface of uroepithelial cells with their lectin FimH. This leads to their ability to resist the urinary flow and thus prolong the infection time. FimH is a mannose-binding adhesin located at the tip of type 1 pili. Current treatment approach involves the usage of antibiotics. This method leads to the development of strains resistant to most of the currently available antimicrobials. New treatment strategies are being developed, among which antiadhesion therapy represents an attractive alternative. New diagnostic therapies are also emerging. In this research project, mannose-based FimH antagonists were synthesised. D-mannose's relatively weak affinity for FimH can be improved by incorporating various aglycones to the D-mannopyranose via  $\alpha$ -glycosidic bond. Therefore, fluorescent probes (rhodamine B, rhodamine 6G and 5-carboxyfluorescein) were attached to D-mannose. All the fluorescent dyes are pH-sensitive, changing the shape of the molecule in different environments. Compounds synthesised in the research project have an aglycon attached via an N-glycosidic bond, which is known to be more stable in a physiological environment. Absorbance and fluorescence of final fluorescently labelled compounds were measured at different pH values. Results were graphically displayed and evaluated. The pKa values were determined by analysing titration curves. Two final compounds displayed maximum fluorescence in an acidic environment, and one had the fluorescence maximum at cytosolic pH. All final compounds had a small Stokes shift (22–28 nm). The final compounds synthesised from 5-carboxyfluorescein and rhodamine 6G were sent for bacterial testing, while the compound from rhodamine B was eliminated due to its relatively low fluorescence. The two compounds tested were able to bind to the bacterial pili. Even after washing, a portion of the compounds remained bound to them.

**Neža Kuhar**, II. gimnazija Maribor

Mentor: **Mitja Kranjc**, Univerzitetni klinični center Maribor

Somentorica: **Helena Bajec**, II. gimnazija Maribor

## Semaglutid kot zdravilo za debelost pri odraslih

Klinična debelost je razširjena kronična bolezen, ki pomembno povečuje obolevnost in umrljivost ter poslabšuje kakovost življenja. Ker so spremembe prehrane in telesne dejavnosti dolgoročno pogosto neučinkovite, se vse pogostejše uporablja farmakoterapija, pri čemer pa sta izziv pomanjkanje zdravil in odpor do injiciranja. Vloga peroralnega semaglutida v odmerku po 14 mg (registriranega za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2) za zdravljenje debelosti pri bolnikih brez sladkorne bolezni ostaja nejasna. V retrospektivni raziskavi iz vsakodnevne klinične prakse, v katero je bilo vključenih 93 odraslih brez sladkorne bolezni (57 % žensk, povprečna starost 52 let), smo ocenili, ali je enoletno zdravljenje s peroralnim semaglutidom v odmerku po 14 mg povezano z zmanjšanjem telesne mase, indeksa telesne mase (ITM), obsega pasu ter znižanjem krvnega tlaka, srčnega utripa in stopnje debelosti po lestvici EOSS. Od 93 vključenih oseb jih je po enem letu 82 (88 %) še vedno jemalo peroralni semaglutid v enakem odmerku. Po enem letu zdravljenja se je pri tistih, ki so zdravljenje končali, telesna masa statistično značilno zmanjšala za 5,7 % (5,9 kg), ITM pa se je povprečno zmanjšal za 2 kg/m<sup>2</sup>. Obseg pasu se je pomembno zmanjšal, in sicer za 5,5 cm, ocena EOSS pa se je znižala za 0,1. Klinično pomembno izgubo telesne mase je doseglo 46 % vseh udeležencev, le redki pa so izgubili ≥ 15 % telesne mase. Neželeni učinki so bili večinoma blagi; o slabosti je poročalo 23 %, o bruhanju in driski pa 12 % udeležencev. Zdravljenje debelosti s peroralnim semaglutidom v odmerku po 14 mg je pokazalo izrazito variabilnost med osebami, pri čemer je približno polovica dosegla klinično pomembno zmanjšanje telesne mase – večinoma pod 10 %. Čeprav je peroralni semaglutid v tem odmerku manj učinkovit kot injekcijska terapija, je imel ugoden varnostni profil in je v izbranih kliničnih primerih lahko primeren.

**Neža Kuhar**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Mitja Kranjc**, University Medical Centre Maribor

Co-supervisor: **Helena Bajec**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

## Semaglutide as Treatment for Obesity in Adults

Clinical obesity is a prevalent chronic disease, significantly increasing morbidity and mortality while impairing quality of life. As diet and physical activity interventions often prove ineffective in the long term, pharmacotherapy is increasingly being used, with drug shortages and injection aversion presenting a challenge. The role of oral semaglutide at a dose of 14 mg (registered for type 2 diabetes) as a treatment for obesity in patients without diabetes remains undefined. In the retrospective real-world study, which included 93 adults without diabetes (57% women, average age 52 years), we assessed whether one-year treatment with 14 mg oral semaglutide was associated with lower body weight, body mass index (BMI), waist circumference, blood pressure, heart rate, and obesity stage according to EOSS. Of 93 subjects recruited, 82 (88%) were receiving 14 mg oral semaglutide after one year. In those who completed the one-year treatment, body weight significantly decreased by 5.7% (5.9 kg), and BMI decreased by an average of 2 kg/m<sup>2</sup>. There was also a significant reduction in waist circumference by 5.5 cm and a decrease in EOSS score by 0.1. Clinically significant weight loss was achieved in 46% of all participants, with a small proportion experiencing a reduction of ≥15%. Adverse effects were mostly mild, with nausea reported by 23%, and vomiting and diarrhoea by 12% of participants. Obesity treatment with 14 mg oral semaglutide showed marked interindividual variability, with approximately half of the participants achieving clinically significant reductions – mostly under 10%. Although less effective than injectable therapy, oral semaglutide at this dose demonstrated a favourable safety profile and may be suitable in selected clinical scenarios.

**Maša Pelan**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Marko Jeran**, Institut Jožef Stefan

Somentor: **Tomaž Prelog**, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Somentorica: **Tanja Jesenko**, Onkološki inštitut Ljubljana

Somentorica: **Lidija Zavasnik**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

## Vrednotenje delovanja lipofilnih in vodotopnih fluorescenčnih učinkovin s ksantenskim tricikličnim strukturnim motivom na celično linijo Burkittovega limfoma

Burkittov limfom je zelo agresivna oblika neHodgkinovega limfoma, ki lahko prizadene ljudi vseh starosti, najpogosteje pa otroke in mladostnike. Ob sumu, da gre za Burkittov limfom ali Burkittovo levkemijo, o kateri govorimo, ko so maligne celice razširjene v kostnem mozgu (levkemična oblika), je ključen takojšen začetek zdravljenja. V okviru interdisciplinarnega sodelovanja raziskujemo možnosti uporabe komercialno dostopnejših fluorescenčnih barvil za učinkovitejše odkrivanje Burkittovega limfoma. V tej raziskovalni nalogi smo obravnavali apliciranje dveh fluorescenčnih barvil na zrele celice Burkittovega limfoma in vrednotenje njune citotoksičnosti. Prvič se je pokazalo, da učinkovina z lipofilnim značajem zaradi edinstvenih kemičnih lastnosti učinkovito vstopa v nepolarno celično membrano celic Burkittovega limfoma, kar se v primerjavi s celicami, izpostavljenimi vodotopni učinkovini, odraža v intenzivnejši fluorescenci. Rezultati so pokazali, da je za proučevanje levkemičnih celičnih linij smiselno uporabiti majhne odmerke fluorescenčne učinkovine, izpostavljenost pa omejiti na 24 ur oz. največ 48 ur. V skladu z viabilnostjo je treba pozornost nameniti tudi morfološkim analizam heterogenih celičnih oblik in struktur različnih arhitektur.

**Maša Pelan**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Marko Jeran**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Co-supervisors: **Tomaž Prelog**, Division of Paediatrics, University Medical Centre Ljubljana,

**Tanja Jesenko**, Institute of Oncology Ljubljana, University of Ljubljana, Faculty of Medicine,

Department of Oncology, Ljubljana, **Lidija Zavasnik**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana,

General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

## Evaluation of Effect of Lipophilic and Water-Soluble Fluorescent Agents with Tricyclic Xanthene Structural Motif on Burkitt Lymphoma Cell Line

Burkitt lymphoma is a very aggressive form of non-Hodgkins lymphoma that can affect people of any age, but is most common in children and adolescents. If Burkitt lymphoma or Burkitt leukaemia is suspected, i.e. in cases where malignant cells have spread to the bone marrow (leukemic form), treatment must be initiated immediately. As part of an interdisciplinary collaboration, we are investigating the possibilities of using commercially available fluorescent dyes for more efficient detection of Burkitt lymphoma. For this reason, the present research focused on the application of two fluorescent molecules to mature Burkitt lymphoma cells and the evaluation of their cytotoxicity. For the first time, it has been shown that a molecule with lipophilic character can effectively penetrate the non-polar cell membrane of Burkitt lymphoma cells due to its unique chemical properties, resulting in more intense fluorescence compared to cells exposed to a water-soluble molecule. Based on the research results, the use of low doses of the fluorescent agent with exposure limited to 24 or maximum 48 hours appears to be a reasonable strategy to study leukemic cell lines. In line with viability, the study should also include the morphological analysis of heterogeneous cell shapes and structures with diverse architectures.

**Vinko Kosten**, Gimnazija Ledina

Mentorica: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina

Somentor: **Boštjan Genorio**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

## Sinteza in optimizacija procesa pridobivanja grafenskih materialov iz odpadnih ogljikovih kompozitov

Kompoziti iz ogljikovih vlaken so zaradi izjemnih mehanskih lastnosti vse bolj prisotni v industriji, njihova nerekiclabilnost pa je breme za okolje. V raziskavi smo z metodo bliskovitega Joulovega segrevanja (FJH) preverili možnost trajnostne predelave teh odpadkov v turbostratični grafen. Metoda FJH omogoča hitro segrevanje zdrobljenih kompozitov na temperaturo nad 3000 K v milisekundah, kar povzroči razplastitev ogljikovih vlaken v enoslojne in večslojne grafenske strukture. Cilj raziskave je bil optimizirati ključne parametre postopka (predgretje, upor, napetost, čas pulza) za čim večji izkoristek materiala in energije. Optimalni pogoji (200 ms impulz pri 150–175 V na predhodno segretyh vzorcih z maso 40 mg in upornostjo 120  $\Omega$ ) so zagotovili skoraj popolno izrabo energije iz kondenzatorskega sistema. Analize z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) so potrdile tvorbo turbostratičnega grafena z značilno plastovito morfologijo in povečano površino. Grafen je imel obetavne elektrokatalitske lastnosti, zlasti za reakcijo redukcije kisika (ORR) pri proizvodnji vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ). Z raziskavo smo dokazali, da je metoda FJH tehnično izvedljiva, energetska učinkovita ter okoljsko in ekonomsko smiselna za recikliranje ogljikovih kompozitov v visokovredne nanomateriale, kar pomembno prispeva k načelom krožnega gospodarstva in razvoju trajnostnih tehnologij.

**Vinko Kosten**, Gimnazija Ledina Grammar School

Supervisor: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina Grammar School

Co-supervisor: **Boštjan Genorio**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

## Sustainable Synthesis of Turbostratic Graphene from Waste Carbon Fibre Composites via Flash Joule Heating

Carbon fibre composites are increasingly used across industries due to their outstanding mechanical properties, yet their limited recyclability poses a growing environmental challenge. This study investigated the sustainable conversion of such waste into turbostratic graphene using the Flash Joule Heating (FJH) method. FJH enables rapid heating of crushed carbon fibre composites to temperatures above 3000 K within milliseconds, causing the exfoliation of fibres into mono- and multi-layer graphene structures. The aim was to optimise key process parameters (preheating, resistance, voltage, and pulse duration) to achieve maximum material yield with minimal energy loss. Optimal conditions (200 ms pulse at 150–175 V applied to preheated 40 mg samples with an initial resistance of 120  $\Omega$ ) contributed to a nearly complete utilisation of the capacitor bank's energy. Scanning electron microscopy (SEM) confirmed the formation of turbostratic graphene with its characteristic layered morphology and increased surface area. The synthesised graphene demonstrated promising electrocatalytic properties, particularly for oxygen reduction reaction (ORR) in sustainable hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production. The results confirm that FJH is a technically feasible, energy-efficient and environmentally viable approach for upcycling carbon-rich waste into high-value graphene-based nanomaterials, supporting the principles of the circular economy and the development of sustainable electrochemical technologies.

**Ajk Kalaba, Luka Tomažin**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje

**Aljaž Maraž**, Gimnazija Ledina

Mentor: **Uroš Ocepek**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje

Somentorici: **Stana Kovač Hace**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje, **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina

## Mr-Pingvini vs. Pasožavri: igra z mešano resničnostjo za boj proti PAS

Tehnologija in umetna inteligenca se hitro razvijata in postajata vse pomembnejši del sodobne družbe, zato smo se odločili ustvariti igro, ki združuje obe področji, obenem pa ohranja klasični slog kart. Naš cilj je bil preveriti, kako učinkovito lahko umetno inteligenco uporabimo pri razvoju takšne igre. Želeli smo, da igra nosi globlji ozaveševalni pomen, zato smo vsako pošast oblikovali po videzu in učinkih določene psihoaktivne snovi. S tem smo ustvarili edinstven preplet vizualne umetnosti, znanosti in zabave. Ker se odstotek mladih, ki uporabljajo nove tobačne in nikotinske izdelke, nenehno povečuje, smo želeli raziskati razloge za ta trend. Izvedli smo anketo med dijaki STPŠ Trbovlje in Gimnazije Ledina. Rezultati so pokazali, da mladostnike k uporabi teh izdelkov najpogosteje vodita radovednost in zanimanje. Med mladimi so večji bolj priljubljeni kot klasične cigarete, kar kaže na spreminjanje vzorcev uporabe tobačnih in nikotinskih izdelkov. Da bi prispevali k ozaveščanju, smo razvili interaktivno igro, ki mladostnike na zanimiv in sodoben način spodbuja k razvoju kritičnega mišljenja ter jih usmerja k premišljenim odločitvam. Uporabniki se prek igranja seznajajo s tveganji uporabe tobačnih in nikotinskih izdelkov, kar jih spodbuja k zavračanju tovrstnih snovi že v začetni fazi. Ugotovili smo, da je umetna inteligenca izjemno uporaben pripomoček pri generiranju slik, pisanju programske kode in pretvarjanju slik v 3D-modele. Ob koncu projekta smo odkrili, da lahko umetna inteligenca animira tudi 3D-modele, vendar te funkcionalnosti v igri nismo uporabili.

**Ajk Kalaba, Luka Tomažin**, Secondary Technical and Vocational School Trbovlje, **Aljaž Maraž**, Gimnazija Ledina Grammar School

Supervisor: **Uroš Ocepek**, Secondary Technical and Vocational School Trbovlje

Co-supervisors: **Stana Kovač Hace**, Secondary Technical and Vocational School Trbovlje, **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina Grammar School

## MR-Penguins vs. Pasosaurs: Mixed Reality Game to Combat PAS

Technology and artificial intelligence are evolving rapidly and becoming an increasingly important part of modern society, so we decided to create a game that combines both fields while retaining the classic card game format. Our goal was to test how effectively artificial intelligence can be used in the development of such a game. We aimed to give the game a deeper, awareness-raising dimension by designing each monster to reflect the appearance and effects of a specific psychoactive substance (PAS). This approach created a unique interplay between visual art, science, and entertainment. Because the percentage of young people using new tobacco and nicotine products is constantly increasing, we sought to investigate the reasons behind this trend. We conducted a survey among students at the Secondary Technical and Vocational School Trbovlje and Gimnazija Ledina Grammar School. The results showed that adolescents are most often driven to use these products by their own curiosity and interest. Vapes are more popular than traditional cigarettes among young people, indicating changing patterns in the use of tobacco and nicotine products. To raise awareness, we developed an interactive game that encourages adolescents to think critically in an engaging, modern way and guides them toward prudent decisions. Through gameplay, users learn about the risks associated with tobacco and nicotine products, which encourages them to reject these substances at an early stage. In our research, we found that artificial intelligence is an extremely useful tool for generating images, coding, and converting images into 3D models. By the end of the project, we also discovered that AI can animate 3D models, though we did not use this functionality in the game.

**Jon Milič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorici: **Marija Meznarič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer, **Martina Oder**, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

## Protimikrobno in protibiofilmsko delovanje naravnih snovi proti bakterijam *Escherichia coli*

Ljudje smo vse bolj izpostavljeni mikroorganizmom, ki različno vplivajo na naše zdravje. Zaradi vse večje uporabe antibiotikov, čistil in drugih sintetičnih snovi prihaja do rezistence patogenih mikroorganizmov. To otežuje njihovo odstranjevanje, kar posledično lahko pripelje do vedno več bakterijskih obolenj. Zaradi tega smo se v raziskavi odločili proučiti alternative sodobnim čistilom. Preverjali smo učinkovitost eteričnih olj sivke, ingverja in smrekovih vršičkov pri odstranjevanju bakterije *Escherichia coli* ter učinkovitost eteričnega olja sivke pri odstranjevanju biofilmov. Uporabljali smo 100-odstotno koncentracijo vseh ekstraktov, pri eteričnih oljih sivke pa smo uporabljali tudi olja, razredčena na 50 % in 25 %. Pri eteričnih oljih sivke smo preverjali tudi, ali so učinkovita tudi tista, ki so bila iz rastlin pridobljena v letih 2022, 2023 in 2024. Na hranljivem mikrobiološkem gojišču smo najprej pripravili čeznočno kulturo bakterij *E. coli*, ki smo jo kasneje uporabljali v eksperimentalnem delu. Na gojišča smo nanašali diske, prepojene z eteričnimi olji, in na podlagi inhibicijskih con ugotavljali protimikrobno učinkovitost posamezne snovi. V drugem delu poskusov smo bakterije prenesli v mikrotitrne plošče, v katerih smo vzgojili biofilm, ki smo ga v naslednjih korakih tretirali z eteričnimi olji. Po izpostavitvi biofilma eteričnim oljem smo s čitalnikom mikrotitrskih plošč izmerili optično gostoto barvila kristal vijolično, ki smo ga ekstrahirali iz prej obarvanih celic, in ugotavljali učinkovitost olj pri odstranjevanju biofilmov. Dokazali smo, da so proučevana eterična olja učinkovita pri uničevanju *E. coli* in odstranjevanju biofilma. Na količino aktivnih snovi v rastlinah lahko vplivajo tudi okoljski dejavniki, saj smo med posameznimi eteričnimi olji zaznali razlike, povezane z letom, ko so bile rastline nabrane.

**Jon Milič**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

Supervisors: **Marija Meznarič**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School, **Martina Oder**, Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana

## Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Natural Compounds against *Escherichia Coli*

Nowadays, people are increasingly exposed to microorganisms that have various effects on their health. Due to the increasing use of antibiotics, cleaning agents, and other synthetic substances, pathogenic microorganisms are developing resistance. This makes them difficult to remove, which in turn can lead to more and more bacterial infections. For this reason, we decided to explore alternatives to modern cleaning agents in our research by using essential oils. We evaluated the effectiveness of lavender, ginger, and spruce tip essential oils to remove *Escherichia coli*, and the ability of lavender essential oil to remove biofilms. We used 100% concentrations of all extracts. For lavender essential oil, we also used 50% and 25% dilutions at. Additionally, we evaluated the effectiveness of lavender essential oils obtained from plants harvested in 2022, 2023, and 2024. We first prepared an overnight culture of *E. coli* bacteria on a nutrient-rich microbiological medium, which we later used in the experimental work. Discs soaked with essential oils were applied to the cultures, and the antimicrobial activity of each substance was determined based on the inhibition zones. In the second part of the experiment, we transferred the bacteria to microtiter plates, in which we grew a biofilm. In the next steps, this biofilm was treated with essential oils. After exposing the biofilm to essential oils, we measured the optical density of crystal violet dye – extracted from transiently coloured cells – using a microtiter plate reader, and evaluated the activity of the oils in biofilm removal. For the essential oils studied, we demonstrated their effectiveness in eliminating *E. coli* and removing biofilms. The amount of active substances in plants can also be influenced by environmental factors, as we observed differences between individual essential oils, depending on the year the plants were harvested.



**Emilija Rojnik, Mija Kapun**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Mentorica: **Darja Silan**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Somentorici: **Polona Zalar, Martina Turk**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

## Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana

V raziskavi smo proučevali prisotnost in potencialni vpliv mikroorganizmov na beton. Osredotočili smo se na njihovo rast, presnovne lastnosti ter sposobnost raztapljanja in tvorbe mineralov. Vzorčili smo na različnih mestih betonske ograje na terasi Gimnazije Jožeta Plečnika ter na izbranih vzorčnih mestih odvzeli tudi betonske okruške. Pri opazovanju rasti mikroorganizmov smo ugotovili, da se na bolj vlažnih površinah pojavljata večja mikrobna pestrost in številčnost. Z analizo betonskih okruškov pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) smo zaznali biološke ostanke in nanos kalcijevega karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ). Največji nanos je bil zaznan na vzorcu z večjo vlažnostjo, ki je imel tudi največjo rast in biodiverzitet, kar kaže, da je  $\text{CaCO}_3$  posledica aktivnosti mikroorganizmov. Nadaljnje analize so pokazale, da imajo izolirani mikroorganizmi lahko pozitivne in negativne učinke na beton. Nekateri izolati tvorijo pigmente, ki lahko povzročajo neželene estetske spremembe betonskih površin, medtem ko so drugi sposobni raztapljanja  $\text{CaCO}_3$ , kar lahko vodi v degradacijo materiala. Identificirali smo tudi mikroorganizme s pozitivnimi lastnostmi za beton, kot je sposobnost biomineraliziranja, kar betonu omogoči t. i. samoceljenje. Vsi glivni in dva izbrana bakterijska izolata so bili ureazno pozitivni, kar pomeni, da z ureolizo tvorijo minerale. Rezultati lahko prispevajo k oblikovanju načinov za zaščito betonske dediščine ter k razvoju ideje biomineralizacije in samoobnovljivih materialov za trajnostno gradbeništvo.

**Emilija Rojnik, Mija Kapun**, Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School

Supervisor: **Darja Silan**, Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School

Co-supervisors: **Polona Zalar, Martina Turk**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

## Microbiological Analysis of Concrete Surfaces at Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School

In this study, we investigated the presence and potential impact of microorganisms on concrete, focusing on their growth, metabolic properties, and ability to dissolve and form minerals. We collected samples from several points on the concrete fence of the terrace at Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School and also took concrete fragments at selected sampling points. When observing the growth of microorganisms, we found that higher microbial diversity and abundance occur on wetter surfaces. By analysing the concrete samples under a scanning electron microscope (SEM), we detected biological debris and calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) deposition. The highest deposition was observed in the sample with the highest moisture content, which also exhibited the highest growth and biodiversity, indicating that  $\text{CaCO}_3$  is formed due to microorganism activity. Further analysis showed that the isolated microorganisms can have both positive and negative effects on concrete. Some isolates form pigments that can cause undesirable aesthetic changes to concrete surfaces, while others are capable of dissolving  $\text{CaCO}_3$ , potentially leading to material degradation. We also identified microorganisms that exhibit positive properties for concrete, such as the ability to biomineralise, which allows the concrete to self-heal. All fungi and two selected bacterial isolates are urease-positive, which means that they form minerals through ureolysis. The results of our research also suggest ways to protect the concrete heritage and support the development of the idea of biomineralisation and self-renewing materials for sustainable construction.

**Teja Kljun**, Gimnazija Bežigrad

Mentorica: **Špela Tršek**, Gimnazija Bežigrad

Somentorici: **Martina Štampar**, **Katja Kološa**, Nacionalni inštitut za biologijo

## Vpliv umetnih sladil na jetrne celice sferoidov in oksidativen stres ter ozaveščenost mladih

Umetna sladila, kot so acesulfam-K, aspartam, ciklambat, sukraloza in saharin, se pogosto uporabljajo kot nadomestki saharoze za uravnavanje vnosa kalorij in nadzor ravni krvnega sladkorja. Raziskave pa kažejo na njihove možne škodljive učinke, kot so motnje ravnovesja črevesne mikrobiote, inzulinska rezistenca in povečano tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2. Povezujejo jih tudi z vplivom na apetit in telesno maso ter s povečanim tveganjem za razvoj bolezni srca in žilja ter raka. Raziskovalna naloga je sestavljena iz dveh delov – ankete in laboratorijskih poskusov. Cilj prvega dela je bil ugotoviti, koliko so gimnazijski dijaki ozaveščeni o morebitnih škodljivih učinkih umetnih sladil. Cilj drugega dela pa je bil na tridimenzionalnem celičnem modelu (sferoidu) jetrnega hepatocelularnega karcinoma (celice HepG2) *in vitro* proučiti vpliv dveh umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama, na živost celic in oksidativni stres. Rezultati ankete so pokazali, da so umetna sladila del vsakodnevne prehrane dijakov. Kljub prepričanju, da negativno vplivajo na zdravje, odgovori niso pokazali poglobljenega razumevanja problematike. Drugi del raziskave je pokazal, da acesulfam-K zmanjša velikost sferoidov HepG2 ter zviša raven ATP, aspartam pa zmanjša vsebnost ATP. Nobeno od proučevanih umetnih sladil ni povzročilo oksidativnega stresa. Za boljše razumevanje njihovega vpliva in dolgoročne varnosti so potrebne nadaljnje raziskave.

**Teja Kljun**, Gimnazija Bežigrad Grammar School

Supervisor: **Špela Tršek**, Gimnazija Bežigrad Grammar School

Co-supervisors: **Martina Štampar**, **Katja Kološa**, National Institute of Biology, Ljubljana

## Impact of Artificial Sweeteners on Liver Cell Spheroids and Oxidative Stress, and Youth Awareness

Artificial sweeteners (AS), such as acesulfame-K, aspartame, cyclamate, sucralose, and saccharin, are commonly used as substitutes for sucrose to regulate calorie intake and control blood sugar levels. However, research suggests their potential harmful effects, including disruption of gut microbiota balance, insulin resistance, and an increased risk of developing type 2 diabetes. They are associated with changes in appetite and body weight, and an increased risk of cardiovascular diseases and cancer. The research project consists of two parts: a survey and laboratory experiments. The first part aimed to assess high school students' awareness of the potential harmful effects of ASs. The goal of the second part was to investigate the effects of two ASs, acesulfame-K and aspartame, on cell viability and oxidative stress using an *in vitro* three-dimensional liver cancer cell model (HepG2 spheroids). The survey results showed that ASs are part of students' daily diet. Despite the belief that these sweeteners negatively affect health, the responses did not reflect a deep understanding of the issue. The second part revealed that acesulfame-K reduced the size of HepG2 spheroids and increased ATP levels, whereas aspartame decreased ATP content. Neither of the tested sweeteners induced oxidative stress. Further research is needed to better understand their impact and long-term safety.

**Neža Botica, Vesna Potočnik**, Gimnazija Kranj

Mentorica: Katarina Frelih, Gimnazija Kranj

Mentor: Rok Bavdek, Gimnazija Kranj

## Ugotavljanje vpliva sindroma relativnega energijskega primanjkljaja na telesno sestavo športnikov z namenom določanja smernic za diagnostiko

V raziskavi smo ugotavljali vpliv sindroma relativnega energijskega primanjkljaja (sindrom REDs) na telesno sestavo športnikov, da bi lahko oblikovali smernice za diagnostiko sindroma na podlagi meritev telesne sestave. Sindrom REDs se razvije, kadar je energijski vnos športnika premajhen glede na njegove energijske potrebe. Energijski primanjkljaj povzroči različne motnje v zdravju in vpliva na telesno sestavo. Namen te raziskave je bil natančneje opredeliti vpliv sindroma REDs na tri parametre telesne sestave: fazni kot (PhA), razmerje med znotraj- in zunajcelično vodo (ICW : ECW) ter razmerje med mišično in maščobno maso (PFI). Raziskovanje smo začeli z validiranim presejalnim vprašalnikom za sindrom REDs, ki omogoča ugotovitev stopnje ogroženosti. Odzvalo se je 910 oseb, od teh jih je 320 opravilo tudi bioimpedančno meritev telesne sestave. Na podlagi rezultatov je bilo 20 zelo ogroženih uvrščenih v eksperimentalno skupino, 20 manj ogroženih pa v kontrolno. Ugotovili smo, da so imeli zelo ogroženi športniki manjše vrednosti razmerja ICW : ECW ( $p < 0,01$ ). Te so znašale  $1,23 \pm 0,16$ , v kontrolni skupini pa  $1,51 \pm 0,28$ . Zelo ogroženi športniki so imeli tudi manjše vrednosti razmerja PFI ( $p < 0,02$ ), ki je znašal  $1,13 \pm 0,32$ , v kontrolni skupini pa  $1,44 \pm 0,62$ . Vrednosti Pha so bile v eksperimentalni skupini manjše ( $5,58^\circ \pm 0,44^\circ$ ) kot v kontrolni skupini ( $6,88^\circ \pm 0,74^\circ$ ) ( $p < 0,01$ ).

**Neža Botica, Vesna Potočnik**, Gimnazija Kranj Grammar School

Supervisors: Katarina Frelih, Rok Bavdek, Gimnazija Kranj Grammar School

## Determining the Impact of Relative Energy Deficiency Syndrome on Athletes' Body Composition to Establish Diagnostic Guidelines

In this study, we determined the impact of relative energy deficit syndrome (REDs syndrome) on the body composition of athletes to establish guidelines for diagnosing the syndrome using body composition measurements. REDs syndrome develops when an athlete's energy intake is too low compared to their energy needs. Energy deficit has various health implications and also affects body composition. The purpose of this study was to more precisely define how REDs syndrome affects three body composition parameters: phase angle (PhA), the ratio of intracellular water to extracellular water (ICW:ECW) and the ratio of muscle mass to fat mass (PFI). We began the study by distributing a validated screening questionnaire for REDs syndrome, which allows to determine the syndrome risk level. In total, 910 persons completed the questionnaire, and 320 respondents also participated in bioimpedance measurement of body composition, of which 20 high-risk athletes were assigned to the experimental group and 20 low-risk athletes to the control group. We found that high-risk athletes had lower ICW:ECW ratios ( $p < 0.01$ ), namely  $1.23 \pm 0.16$ , compared to  $1.51 \pm 0.28$  in the control group. High-risk athletes also had lower PFI ratios ( $p < 0.02$ ), that is  $1.13 \pm 0.32$ , compared to  $1.44 \pm 0.62$  in the control group. Phase angle values were lower in the experimental group ( $5.58^\circ \pm 0.44$ ) than in the control group ( $6.88^\circ \pm 0.74$ ) ( $p < 0.01$ ).

**Maja Klun, Iza Levstek**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
Mentorica: **Barbara Pipan**, Kmetijski inštitut Slovenije  
Somentorici: **Živa Jurič, Zala Bohar**, Kmetijski inštitut Slovenije  
Somentor: **Metod Kovačič**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

## Analiza alelnih profilov sortno izvornih in brezvirusnih genotipov česna (*Allium sativum* L.) sorte ptujski spomladanski

Sortna pristnost in kakovostno seme sort, ki so prilagojene slovenskim pridelovalnim razmeram, sta ključna za uspešno kmetijsko pridelavo in prehransko varnost. Certifikacijske organizacije si prizadevajo, da bi imela vsaka sorta ob opisu tudi metodiko genetske identifikacije in genetski profil lokusov, na podlagi katerih bi se sorte zanesljivo ločevale. Namen raziskovalne naloge je bila primerjava alelnih profilov izvornih in brezvirusnih genotipov česna (*Allium sativum* L.) sorte ptujski spomladanski, ki se fenotipsko razlikujejo po prisotnosti cvetnega stebela. Kljub opisu sorte, da ne oblikuje cvetnega stebela, se pri brezvirusnih genotipih ta lastnost pojavlja približno v 20 % primerov. Za genetsko primerjavo obeh skupin, razdeljenih v pet podskupin, smo uporabili 12 markerjev gSSR. Rezultate smo vrednotili z algoritmi v programih MStoolkit, GenAlEx, Populations in Treview. Ugotovljene so bile pomembne razlike v alelnih profilih in povezava prisotnosti cvetnega stebela s specifičnimi aleli. Povprečna heterozigotnost je bila 0,629, informacijska vrednost polimorfizma pa 0,565, pri čemer sta bila izpostavljena lokusa ASA8 in ASA16. AMOVA je pokazala 2 % variabilnosti med izvori in 98 % znotraj genotipov. PCoA in Neijeva razdalja sta potrdili visoko stopnjo sorodnosti. Na podlagi rezultatov predlagamo dopolnitev opisa sorte z možnostjo prisotnosti rastlin, ki oblikujejo cvetno steblo.

**Maja Klun, Iza Levstek**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School  
Supervisor: **Barbara Pipan**, Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana  
Co-supervisors: **Živa Jurič, Zala Bohar**, Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana  
Co-supervisor: **Metod Kovačič**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

## Analysis of Allelic Profiles of Variety-Origin and Virus-Free Genotypes of Garlic (*Allium Sativum* L.) of 'Ptujski spomladanski' Variety

Varietal authenticity and high-quality seed of varieties adapted to Slovenian growing conditions are crucial for successful agricultural production and food security. Certification organisations are striving to ensure that each variety, in addition to its description, includes a methodology for genetic identification and a genetic profile of loci used to reliably distinguish varieties. The aim of the project was to compare the allelic profiles of original and virus-free genotypes of the 'Ptujski spomladanski' garlic (*Allium sativum* L.) variety, which differ phenotypically as regards the presence of a flowering stalk. The variety description states that it does not form a flowering stalk, yet in virus-free genotypes this trait appears in ~20% of cases. For genetic comparison of the two groups, divided into five subgroups, 12 gSSR markers were used. Results were evaluated using algorithms implemented in MStoolkit, GenAlEx, Populations, and Treview software. Significant differences in allelic profiles were observed, with a link between the presence of a flowering stalk and specific alleles. The average expected heterozygosity was 0.629, and the polymorphism information content was 0.565; loci ASA8 and ASA16 were highlighted. AMOVA revealed 2% variability among sources and 98% within genotypes. High genetic relatedness was confirmed by PCoA and Nei's genetic distance. Based on the results, we propose updating the variety description to include the possibility of plants forming a flowering stalk.

**Sibila Mežnar**, Škofijska klasična gimnazija, Zavod sv. Stanislava

Mentor: **Martin Tine Perger**, Škofijska klasična gimnazija, Zavod sv. Stanislava

Somentor: **Anže Martinčič Celjar**, Sartorius BIA Separations, separacijske tehnologije, d. o. o.

## Določevanje koncentracije mRNK

V raziskovalni nalogi smo proučevali točnost ekstinkcijskega koeficienta za mRNK, ki je naveden v literaturi. Ekstinkcijski koeficient je ključni parameter pri kvantifikaciji nukleinskih kislin z UV-spektrofotometrijo, saj omogoča izračun koncentracije na podlagi absorbance pri določeni valovni dolžini. Kljub široki uporabi standardnih vrednosti v znanstveni literaturi se pojavljajo pomisleki glede njihove zanesljivosti in ponovljivosti v različnih eksperimentalnih pogojih. V raziskavi smo analizirali literaturo in primerjali eksperimentalno izmerjene ekstinkcijske koeficiente s teoretično pričakovanimi vrednostmi. Za oceno odstopanj smo uporabili spektrofotometrične meritve in statistične metode. Poseben poudarek je bil na vplivu sekundarne strukture mRNK na optične lastnosti vzorcev. V zadnjih letih je mRNK postala ključna molekula v biomedicinskih raziskavah, predvsem zaradi uporabe v cepivih in genski terapiji. Zaradi vse širše uporabe je natančna kvantifikacija mRNK nujna za zagotavljanje zanesljivih rezultatov v znanstvenih in medicinskih aplikacijah. Rezultati raziskave so pokazali, da lahko ekstinkcijski koeficient mRNK v nekaterih eksperimentalnih pogojih odstopa od referenčnih vrednosti v literaturi, zato sta potrebni skrbna kalibracija in prilagoditev koeficienta specifičnim eksperimentalnim pogojem.

**Sibila Mežnar**, Diocesan Classical Grammar School, St. Stanislav's Institution

Supervisor: **Martin Tine Perger**, Diocesan Classical Grammar School, St. Stanislav's Institution

Co-supervisor: **Anže Martinčič Celjar**, Sartorius BIA Separations, Ajdovščina

## Determination of mRNA Concentration

In this research thesis, I investigated the accuracy of the extinction coefficient for mRNAs reported in the literature. The extinction coefficient is a key parameter in the quantification of nucleic acids by UV spectrophotometry, as it allows the calculation of the concentration based on the absorbance at a given wavelength. Despite the widespread use of standard values in the scientific literature, concerns have been raised about their reliability and reproducibility under different experimental conditions. In the study, I analysed the literature and compared experimentally measured extinction coefficients with theoretically expected values. I used spectrophotometric measurements and statistical methods to estimate the deviations. Particular emphasis was placed on the influence of the secondary structure of the mRNA on the optical properties of the samples. In recent years, mRNA has become a key molecule in biomedical research, mainly due to its use in vaccines and gene therapy. Due to its increasing use, accurate quantification of mRNA is essential to ensure reliable results in scientific and medical applications. The results of the study showed that the mRNA extinction coefficient may deviate from reference values stated in the literature under certain experimental conditions, highlighting the need for careful calibration and adaptation of the coefficient to specific experimental conditions.

**Vida Markovič, Zoja Štrubelj**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Metod Kovačič**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Somentorica: **Simona Kralj Fišer**, Biološki inštitut Jovana Hadžija, ZRC SAZU

Somentor: **Tim Prezelj**, Biološki inštitut Jovana Hadžija, ZRC SAZU

## Feromoni pri pajkih: ali samci zaznajo paritveni status samice?

V nalogi smo raziskovali, ali samci pajkov vrste *Nephilengis cruentata* prek feromonov lahko zaznajo, ali se je samica že parila. Ta sposobnost je za samce te vrste izredno pomembna, saj se lahko parijo le enkrat ali dvakrat v življenju. Poleg tega samice pogosto kanibalizirajo samce, ki jim dvorijo. Če imajo samci sposobnost prepoznati paritveni status samice že na daljavo, tj. prek samičinih feromonov, lahko izboljšajo svoje možnosti za uspešno paritev in/ali se izognejo spolnemu kanibalizmu. Dobro poznavanje vedenja pajkov in njihovih medsebojnih odnosov je ključno za razumevanje njihove reprodukcije in uspešnosti pri tem. Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali samci na podlagi feromonov lahko prednostno izberejo samice, ki se še niso parile. Pri poskusu izbiranja z Y-labirintom smo samca postavili v stičišče krakov in ga izpostavili feromonom samice, ki se je parila (en krak Y-labirinta), in feromonom samice, ki se še ni parila (drug krak Y-labirinta). Izvedli smo 18 poskusov (izbira med samicama) in 20 kontrolnih poskusov. Samčevo prednostno izbiro smo določili glede na njegovo prvo orientacijo proti samici določenega paritvenega statusa, čas zadrževanja v njeni bližini in njegovo končno izbiro. Raziskava prispeva k razumevanju komunikacijskih mehanizmov med spoloma pri pajkih ter poudarja pomen kemične signalizacije v njihovih razmnoževalnih strategijah in vedenju.

**Vida Markovič, Zoja Štrubelj**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Metod Kovačič**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Co-supervisors: **Simona Kralj Fišer, Tim Prezelj**, ZRC SAZU Jovan Hadži Institute of Biology

## Pheromones in Spiders: Can Males Detect Mating Status of Female?

In this study, we investigated whether male spiders of the species *Nephilengis cruentata* can detect, through pheromones, whether a female has already mated. This ability is extremely important for males of this species, as they can only mate once or twice in their lifetime. In addition, females often cannibalise males that court them. If males have the ability to recognise the mating status of a female from a distance, i.e. through the female's pheromones, they can improve their chances of successful mating and/or avoid sexual cannibalism. A good understanding of spider behaviour and their mutual dynamics is crucial for understanding their reproductive dynamics and success. The goal of our project was to determine whether males can preferentially select females that have not yet mated based on pheromones. In the 'Y maze' choice experiment, we placed a male at the junction of the arms and simultaneously exposed him to the pheromones of a mated female (one arm of the Y maze) and the pheromones of an unmated female (the other arm of the Y maze). We performed 18 trials (choice between a mated and unmated female) and 20 control trials. We measured the male's preference for mated or unmated females as the male's 1st orientation towards a female of a given mating status, the time spent near a female of a given mating status, and the male's final choice for a female of a given mating status. Our research contributes to the understanding of communication mechanisms between the sexes in spiders and reveals the importance of chemical signalling in spider reproductive strategies and behaviour.

**Vid Kodrič, Matic Izak, Anika Gregori Kmecl**, Gimnazija Vič

Mentorica: **Helena Potočnik Vičar**, Gimnazija Vič

Somentorici: **Jerica Sabotič, Nika Zaveršek**, Institut Jožef Stefan

## Vpliv lektina CnGL iz glive poprhnjene livke na rast bakterij *Escherichia coli* in *Listeria innocua*

Zaradi pretirane rabe antibiotikov v preteklosti se danes soočamo z eno največjih groženj javnemu zdravju – odpornostjo bakterij proti antibiotikom. Zato je ključno poiskati nove protibakterijske snovi, njihov pomemben vir pa so dokaj neraziskane glive. Iz glive poprhnjene livke (*Clitocybe nebularis*) so že bili izolirani različni proteini s citotoksičnimi učinki. Gre za lektine, ki se lahko reverzibilno vežejo na sladkorje. V raziskovalni nalogi smo iz poprhnjene livke z afinitetno kromatografijo izolirali lektin, ki se veže na glukozo (CnGL), njegovo prisotnost pa smo potrdili z gelsko elektroforezo v vzorcu glive. Raziskovali smo vpliv izoliranega lektina na rast bakterij *Listeria innocua* in *Escherichia coli*. Proučevali smo tudi vpliv soka glive *C. nebularis* na bakterije in ga primerjali z učinkom antibiotika ampicilina. Bakterijsko rast smo spremljali s spektrofotometričnim merjenjem optične gostote bakterijskih kultur in ugotovili, da lektin CnGL na vrsto *L. innocua* vpliva zelo malo, lahko pa bi na bakterije vplival med prilagajanjem rasti, kar bi bilo smiselno raziskati v prihodnje. Na bakterije *E. coli* je lektin bolj vplival in je spodbujal njihovo rast. Pri večji koncentraciji lektina smo opazili manjšo rast, zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskati vpliv večjih količin lektina CnGL na bakterije. Poprhnjena livka se je pokazala kot zanimiv vir snovi, ki vplivajo na bakterijsko rast.

**Vid Kodrič, Matic Izak, Anika Gregori Kmecl**, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: **Helena Potočnik Vičar**, Gimnazija Vič Grammar School

Co-supervisors: **Jerica Sabotič, Nika Zaveršek**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

## Effect of CnGL Lectin from Clouded Funnel Mushroom on Growth of *Escherichia Coli* and *Listeria Innocua*

Due to the overuse of antibiotics in the past, we are now facing one of the greatest threats to public health, antibiotic resistance in bacteria. Therefore, it is crucial to find new antibacterial substances, and relatively unexplored fungi are an important source of such compounds. Various proteins with cytotoxic effects have already been isolated from the clouded funnel mushroom (*Clitocybe nebularis*). These are lectins, which can bind reversibly to sugars. Using affinity chromatography, we isolated a lectin that binds to glucose (CnGL) from *C. nebularis*. Our assumption that the glucose-binding lectin would be present in our sample was confirmed by gel electrophoresis. We investigated how the isolated lectin affects the growth of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. We also analysed the effect of *C. nebularis* extract on bacteria and compared this effect with that of the antibiotic ampicillin. By measuring the optical density of the bacterial cultures using spectrophotometry, we monitored bacterial growth and found that CnGL lectin had a marginal effect on *L. innocua*. Yet, it could affect the bacteria during the lag phase, which would need to be investigated further. The lectin had a greater growth-promoting effect on *E. coli*. However, bacterial growth was lower at a higher lectin concentration, suggesting that further studies on the effects of higher CnGL lectin concentrations on bacteria would be worthwhile. *C. nebularis* proved to be an interesting source of substances influencing bacterial growth.

**Saša Stanić Mencin, Nika Srdarev**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
Mentor: **Miha Slapničar**, Pedagoška fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Somentor: **Nejc Umek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

## Aerobna in glikolitična kapaciteta različnih tipov mišičnih vlaken mišic vitkih in debelih miši

Debelost je kompleksno patološko stanje, ki nastane zaradi prepleta genetskih in okoljskih dejavnikov. V raziskavah pogosto uporabljamo živalske modele, predvsem miši in podgane. Kljub uporabnosti teh modelov je treba upoštevati, da je debelost pri ljudeh poligensko in večfaktorsko stanje, pri katerem imajo pomembno vlogo tudi okoljski dejavniki, predvsem prehrana. Cilj te raziskave je bil proučiti vpliv genetske predispozicije za debelost na glikolitično in aerobno kapaciteto mišičnih vlaken skeletnih mišic. Ugotovili smo, da spremembe v oksidativni in glikolitični kapaciteti pri debelih miših kažejo na prilagoditve v energijski presnovi, ki bi lahko vplivale na telesno zmogljivost in metabolizem. Raziskava ponuja pomemben vpogled v vpliv debelosti na skeletne mišice, kar lahko prispeva k razvoju novih strategij za preprečevanje in zdravljenje te bolezni.

**Saša Stanić Mencin, Nika Srdarev**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School  
Supervisor: **Miha Slapničar**, Faculty of Education, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Nejc Umek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

## Aerobic and Glycolytic Capacity of Different Muscle Fibre Types in Lean and Obese Mice

Obesity is a complex pathological condition resulting from the interplay between genetic and environmental factors. Animal models, particularly mice and rats, are often used in obesity research. As much as these models are useful, it should be noted that obesity in humans is a polygenic and multifactorial condition, in which environmental factors, especially diet, also play an important role. The aim of this study was to examine the influence of genetic predisposition to obesity on the glycolytic and aerobic capacity of skeletal muscle fibres. We found that changes in oxidative and glycolytic capacity in obese mice indicate adaptations in energy metabolism that could affect physical performance and metabolism. The study provides valuable insights into the impact of obesity on skeletal muscles, which may contribute to the development of new strategies for the prevention and treatment of this disease.

**Nuša Gorišek, Stela Maček**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola  
Mentor: **Marko Jeran**, Institut Jožef Stefan  
Somentor: **Luka Irenej Pečan**, Oddelek za življenjske vede, Univerza v Trstu  
Somentorice: **Minja Zorc, Anja Tanšek**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani,  
**Lidija Zavasnik**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

## Repozicioniranje terapevtskih učinkovin kot interdisciplinarni pristop k obravnavi in zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojk

HER2-pozitivni rak dojk je agresivna in invazivna oblika raka, za katero sta značilni hitra rast tumorja in povečana možnost metastaziranja. Čeprav so že na voljo ciljno usmerjena zdravila, kot sta trastuzumab in lapatinib, se zaradi razvoja odpornosti tumorjev nenehno iščejo nove strategije zdravljenja. Ena od njih je repozicioniranje zdravil, pri katerem se že odobrena zdravila, prvotno namenjena zdravljenju drugih bolezni, uporabijo za zdravljenje HER2-pozitivnega raka. Ta pristop omogoča hitrejši prehod zdravil v klinično uporabo, saj so njihovi varnostni profili in farmakološke lastnosti že dobro poznani, kar bistveno skrajša čas razvoja in zmanjša stroške. V raziskovalni nalogi so predstavljeni biološko ozadje HER2-pozitivnega raka dojk, klinični izzivi zdravljenja in možnost repozicioniranja zdravil kot rešitve. Opravili smo bioinformacijsko analizo za identifikacijo novih kandidatov za repozicioniranje in ekonomsko analizo, s katero smo ocenili stroškovno učinkovitost tega pristopa v primerjavi s tradicionalnimi metodami razvoja zdravil. Repozicioniranje zdravil je obetavna strategija, ki lahko pripomore k izboljšanju zdravljenja, povečanju dostopnosti zdravljenja in premagovanju odpornosti tumorjev, kar bi lahko dolgoročno izboljšalo izide zdravljenja bolnic s HER2-pozitivnim rakom dojk.

**Nuša Gorišek, Stela Maček**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School  
Supervisor: **Marko Jeran**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana  
Co-supervisor: **Luka Irenej Pečan**, Department of Life Sciences, University of Trieste  
Co-supervisors: **Minja Zorc, Anja Tanšek**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana  
Co-supervisor: **Lidija Zavasnik**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

## Repositioning Therapeutics as Interdisciplinary Approach to Treatment of HER2-Positive Breast Cancer

HER2-positive breast cancer is an aggressive and invasive form of cancer, characterised by rapid tumour growth and an increased risk of metastasis. Although targeted therapies such as trastuzumab and lapatinib are already available, new therapeutic strategies are continuously being explored due to the development of tumour resistance. One innovative method to improve treatment is drug repositioning, where already approved drugs originally intended for the treatment of other diseases are used to treat HER2-positive breast cancer. This approach allows drugs to enter clinical use more quickly as their safety profiles and pharmacological properties are already well known. This in turn significantly reduces development time and costs compared to the development of new drugs. The biological background of HER2-positive breast cancer, clinical treatment challenges, and drug repositioning potential as a solution are presented in this research. A bioinformatics analysis was performed to identify new repositioning candidates and an economic analysis to assess the cost-effectiveness of this approach compared to traditional drug development methods. Drug repositioning thus appears to be a promising strategy that may help to improve therapies, increase access to treatment, and overcome tumour resistance, which could improve long-term treatment outcomes for patients with HER2-positive breast cancer.

**Monika Minjovič**, Gimnazija Bežigrad

Mentor: **Gregor Križ**, Gimnazija Bežigrad

Somentorici: **Metka Novak**, **Martina Štampar**, Nacionalni inštitut za biologijo

## **Vejp: nedolžen trend ali zdravstvena grožnja prihodnosti?**

Namen raziskovalne naloge je bil raziskati ozaveščenost in navade mladih v povezavi z uporabo vejnov ter ugotoviti, ali izbrane tekočine in posamezne komponente v njih vplivajo na morfolgijo, delitev in živost celic v različnih humanih 2D-modelih *in vitro*. Izvedli smo anketo, v kateri je sodelovalo 713 mladih med 11. in 20. letom. Ugotovili smo, da večina pozna vejpe in jih zaznava kot zdravju škodljive. Kljub temu jih je 33 % uporabilo vsaj enkrat ali pa jih redno uporabljajo, večinoma za zabavo. Mladi do njih dostopajo razmeroma enostavno. V laboratorijskem delu raziskave smo ugotovili, da vejpi, arome, nikotinski pospeševalci oz. tekočine za vejpe in njihove komponente citotoksično vplivajo na vse tri testirane celične linije – pljučne MRC5, jetrne HepG2 in možganske NHA. Viden je toksičen vpliv na živost celic vseh treh organov (pljuč, jeter, možganov). V pogojih *in vitro* je bil že pri najnižji testirani koncentraciji, ki ustreza 100 vdihom vejpa, viden negativen učinek na naš celični sistem. Zato so nujne nadaljnje raziskave dolgoročnih učinkov uporabe vejnov, potrebna pa sta tudi strožja regulativa in ozaveščanje mladih o tveganjih, povezanih z njihovo uporabo.

**Monika Minjovič**, Gimnazija Bežigrad Grammar School

Supervisor: **Gregor Križ**, Gimnazija Bežigrad Grammar School

Co-supervisors: **Metka Novak**, **Martina Štampar**, National Institute of Biology, Ljubljana

## **Vaping: Innocent Trend or Future Health Threat?**

The aim of this research project was to investigate young people's awareness and habits related to vaping, and to determine whether selected e-liquids and their individual components affect cell morphology, division, and viability in human 2D *in vitro* models. A survey of 713 respondents aged 11 to 20 showed that most youths are familiar with vaping and perceive it as harmful to health. Nevertheless, 33% had tried it at least once or vape regularly, primarily for recreational purposes. However, access to vaping devices among youth remains largely unregulated. In the laboratory, I demonstrated that e-liquids and their components (flavourings, nicotine boosters) exert cytotoxic effects on all three tested cell lines – pulmonary MRC-5, hepatic HepG2, and brain-derived NHA cells. A clear toxic impact on the *in vitro* cellular systems of all three organ models was evident even at the lowest concentration tested, equivalent to approximately 100 inhalations of vapour. The study's conclusion emphasises the urgent need for further investigation into the long-term health effects of vaping, the implementation of stricter regulations on vapes, and enhanced efforts to raise awareness among young people about the risks associated with their use.

**Vita Žigart Rubelj**, Il. gimnazija Maribor  
Mentorica: **Sanja Cvar**, Il. gimnazija Maribor

## Vpliv organskih kislin na hidrolizo škroba

Organske kisline, med katere spada tudi očetna kislina v jedilnem kislu, imajo v kulinariki dolgo tradicijo. V zadnjem času se povečuje zanimanje za njihove morebitne pozitivne vplive na zdravje. Raziskave kažejo, da kis lahko zavira delovanje encima  $\alpha$ -amilaza, upočasni hidrolizo škroba in posledično zmanjša hitrost sproščanja glukoze v krvni obtok. Ta pojav je še posebno pomemben za sladkorne bolnike. V raziskovalni nalogi smo tako proučevali vpliv pH sline na hidrolizo škroba. Ugotovitve, pridobljene z raziskavo *in vitro*, smo prenesli tudi v okolje *in vivo* ter s senzorjem za neprekinjeno merjenje glukoze v medceličnini primerjali raven glukoze po škrobnem obroku z dodatkom kisline in brez njega. Pokazalo se je, da je kis pri uravnavanju glikemije po škrobnih obrokih učinkovit. Zato menimo, da bi bilo smiselno razmisliti o vključitvi kisa kot enega od ukrepov za izboljšanje glikemije pri sladkorni bolezni, ob tem pa zagotoviti ustrezno izobraževanje o njegovi uporabi.

**Vita Žigart Rubelj**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School  
Supervisor: **Sanja Cvar**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

## Effect of Organic Acids on Starch Hydrolysis

Organic acids, including acetic acid found in culinary vinegar, have a long-standing tradition of use in gastronomy. In recent years, increasing attention has been directed toward their potential beneficial effects on human health. Research indicates that vinegar may inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase, thereby slowing the hydrolysis of starch and subsequently reducing the rate of glucose release into the bloodstream. This mechanism is particularly relevant for individuals with diabetes. The influence of salivary pH on starch hydrolysis was examined through *in vitro* experiments, with the findings subsequently translated into *in vivo* conditions. Using continuous glucose monitoring, interstitial glucose levels were compared following the consumption of a starchy meal with and without the addition of acid. As vinegar intake proved to be an effective strategy for moderating postprandial glycaemic responses to starchy meals, its inclusion could be considered as a complementary approach to improving glycaemic control in diabetes management. However, such approach should be supported by appropriate education to ensure its safe and effective use.

**Kristina Golja**, Gimnazija Tolmin  
Mentor: **Milan Ambrožič**, Gimnazija Tolmin  
Somentor: **Jan Damjan Pavlica**, Gimnazija Tolmin

## Prevodnost por v kromatografskih nosilcih

V raziskovalni nalogi smo obravnavali perkolacijsko teorijo, ki se ukvarja s prehodnostjo skozi različne sisteme in je uporabna na številnih področjih – od širjenja bolezni do paroprepustnosti embalaže. Poudarek je bil na numeričnem modeliranju perkolacije prek simulacij Monte Carlo. Obravnavali smo mrežne modele (2D- in 3D-pravokotne mreže) in na kratko omenili kontinuumske modele z geometrijskimi objekti, kot so krogle in sferocilindri. Osrednja količina, ki smo jo proučevali, je perkolacijski prag – minimalna verjetnost ali delež manjšinske komponente, pri katerem sistem postane makroskopsko povezan oz. prevoden. Naredili smo eksperimentalno analizo, s katero smo ugotavljali, kako se z večanjem mreže spreminja verjetnost prehodnosti. Ugotovili smo, da je pri večjih mrežah prehod strmejši in da se prag ustali pri določeni velikosti mreže. Določena vrednost perkolacijskega praga v 2D-mreži (59,26 %) se zelo dobro ujema s teoretično vrednostjo iz literature (59,275 %), kar potrjuje veliko zanesljivost izvedenih simulacij Monte Carlo in ustreznost uporabljenega modela. Na koncu smo predstavili možnost nadaljevanja raziskav s sferocilindri, ki so primernejši za modeliranje realnih poroznih materialov, zanje pa so tudi že pripravljeni računalniški programi.

**Kristina Golja**, Gimnazija Tolmin Grammar School  
Supervisor: **Milan Ambrožič**, Gimnazija Tolmin Grammar School  
Co-supervisor: **Jan Damjan Pavlica**, Gimnazija Tolmin Grammar School

## Conductivity of Pores in Chromatography Resins

The study explored percolation theory, which examines the connectivity and transport through various systems and has wide-ranging applications, from disease spreading to water vapour permeability of packaging. The study focused on numerical modelling of percolation using Monte Carlo simulations. Both lattice models (2D and 3D orthogonal grids) were examined, while continuum models with geometric objects such as spheres and spherocylinders were briefly mentioned. The central quantity studied was the percolation threshold, that is the minimum probability or volume fraction of minority component at which the system becomes connected or conductive. We experimentally analysed how the increase in system size changes the probability of connectivity changes. It was found that as the lattice size increases, the transition becomes steeper, and that the threshold stabilises at a specific lattice size. The determined percolation threshold in the 2D lattice (59.26%) closely matched the theoretical value from literature (59.275%), confirming the high reliability of Monte Carlo simulations and the adequacy of the applied model. Finally, the study presents the possibility of continuing the research with spherocylinders, as they are more suitable for modelling real porous materials; computer programs for these models have already been put in place.

**Klara Grantaša, Brina Zver**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer  
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer  
Somentorica: **Manca Kovač Viršek**, Nacionalni inštitut za biologijo

## Rezalne deske kot vir mikroplastike

Vsakodnevno smo izpostavljeni velikim količinam mikroplastike, ki različno vpliva na naše zdravje. V raziskavi smo proučevali, ali se ob rezanju živil na plastičnih deskah izloča mikroplastika in ali se nato prenaša v živilo oz. na njegovo površino. Ugotavljali smo razlike v količini in velikosti delcev mikroplastike glede na obrabljenost in kemično sestavo rezalnih desk. Primerjali smo polipropilen, zmes polipropilena in polietilena ter zmes polipropilena in akrilne kisline. Na teh deskah smo na manjše koščke narezali različne vrste mehkih in trdih živil. Koščke smo nato opazovali pod stereomikroskopom in določili število plastičnih delcev. Deske smo potem sprali z destilirano vodo in iz nje vzeli vzorce za mikroskopiranje s svetlobnim mikroskopom. Tako smo izračunali velikosti delcev mikroplastike in določili njihovo obliko. Podatke smo nato statistično obdelali. V zadnji fazi eksperimentalnega dela smo vodo toplotno obdelali in analizirali spremembe v obnašanju plastičnih delcev. Dokazali smo prisotnost mikroplastike v živilih, največ delcev pa se je preneslo z obrabljenih plastičnih desk. Poleg obrabljenosti je na količino in obliko delcev vplival še material rezalne deske, ne pa tudi vrsta živila. Delci mikroplastike so bili dovolj majhni, da bi lahko vstopili v človeško telo in povzročili zdravstvene težave.

**Klara Grantaša, Brina Zver**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School  
Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School  
Co-supervisor: **Manca Kovač Viršek**, National Institute of Biology, Ljubljana

## Cutting Boards as Source of Microplastics

We are daily exposed to large amounts of microplastics, which have various health implications. In this study, we decided to investigate whether microplastics are released when certain food is cut on a plastic board and whether they are transferred onto/into the food itself. We studied the differences in the amount and size of shed microplastic particles depending on the wear and chemical composition of plastic cutting boards. We compared polypropylene, the mixture of polypropylene and polyethylene, and the mixture of polypropylene and acrylic acids. Samples of soft and hard foodstuffs were cut into small pieces on plastic cutting boards made of these materials. We then observed the sliced pieces of food under a stereo microscope and counted the microplastic particles found. After that, we washed the boards with distilled water and took samples for light microscopy, which allowed us to calculate the size of the microplastic particles and determine their shape. The data obtained were statistically processed. In the final stage of the experimental work, the collected water was thermally treated to find differences in the behaviour of the plastic particles. The presence of microplastics was demonstrated on the foodstuffs studied, mainly on worn-out plastic boards. In addition to wear, the material of the cutting board, but not the foodstuff cut, influenced the amount and shape of the particles. The microplastic particles were small enough to enter the human body and cause potential problems.

**Ela Marčič**, II. gimnazija Maribor

Mentorica: **Natalija Jančič**, II. gimnazija Maribor

Somentorica: **Muzafera Paljevac**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

## Od vanilije do plastike: sinteza biopolimera iz vanilin metakrilata

V raziskavi smo z esterifikacijo med vanilinom in anhidridom metakrilne kisline ob prisotnosti katalizatorja 4-(dimetilamino)piridina sintetizirali biomonomer vanilin metakrilat (VMA). Reakcijo smo izvajali pri 50 °C v dušikovi atmosferi z različnimi reakcijskimi časi (24 ur, 72 ur, 120 ur). Največji izkoristek, to je 89,9 %, smo dosegli po 72 urah. Strukturo sintetiziranega VMA smo potrdili s spektroskopijo FTIR in NMR. Nadalje smo VMA uporabili za sintezo poroznih poli(VMA-ko-EGDMA) monolitov s polimerizacijo v masi in polimerizacijo emulzije z velikim deležem notranje faze (emulzija HIP). Pri polimerizaciji v masi smo proučevali vpliv različnih porogenih topil (metanola, etanola, propan-2-ola, toluena) na morfologijo ter ugotovili, da izbira topila močno vpliva na morfologijo in mehanske lastnosti materiala. Polimerizacija emulzije HIP pa je omogočila sintezo poroznih monolitov s prilagodljivo vsebnostjo VMA (30–80 mol%). Kemično sestavo in strukturo sintetiziranih materialov smo potrdili s spektroskopijo FTIR, elementno analizo in vrstično elektronsko mikroskopijo. Za ovrednotenje adsorpcijskih lastnosti smo sintetizirane monolite testirali pri odstranjevanju paracetamola iz vodne raztopine. Rezultati so pokazali, da so imeli porozni monoliti boljše adsorpcijske lastnosti kot neporozni, kar potrjuje pomembnost nadzorovane morfologije pri optimizaciji funkcionalnih materialov.

**Ela Marčič**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Natalija Jančič**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisor: **Muzafera Paljevac**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

## From Vanilla to Plastic: Synthesis of Bio-Polymer from Vanillin Methacrylate

In this study, we synthesised the bio-monomer vanillin methacrylate (VMA) in an esterification reaction between vanillin and methacrylic anhydride in the presence of the catalyst 4-(dimethylamino)pyridine. The reaction was carried out at 50 °C under nitrogen atmosphere at different reaction times (24 h, 72 h, 120 h). The highest yield of 89.9% was obtained after 72 h. The structure of the synthesised VMA was confirmed by FTIR and NMR spectroscopy. In addition, VMA was used for the synthesis of porous poly(VMA-co-EGDMA) monoliths by bulk polymerisation and high internal phase emulsion (HIPE) polymerisation techniques. In bulk polymerisation, we investigated the influence of different porogenic solvents (methanol, ethanol, propan-2-ol, toluene) on the morphology and found that the choice of solvent significantly influenced both the morphology and the mechanical properties of the material. HIPE polymerisation enabled the synthesis of porous monoliths with adjustable VMA content (30–80 mol%). The chemical composition and structure of the synthesised materials were confirmed by FTIR spectroscopy, elemental analysis, and scanning electron microscopy. To evaluate the adsorption properties, the synthesised monoliths were tested for the removal of paracetamol from an aqueous solution. The results showed that porous monoliths exhibited better adsorption properties compared to their non-porous counterparts, underlining the importance of controlled morphology in the optimisation of functional materials.

**Zoja Verbič, Žana Nemec**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Rok Mihelič**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Metod Kovačič**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Somentorici: **Ana Schwarzmanna, Sara Mavsar**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

## CO<sub>2</sub> iz tal – skriti vpliv kmetijstva na podnebje

V raziskovalni nalogi smo obravnavali vlogo kmetijskih tal kot enega ključnih, a pogosto spregledanih dejavnikov v mehanizmi podnebnih sprememb. V središču je bilo vprašanje, kako različne kmetijske prakse, zlasti obdelava tal in gnojenje, vplivajo na sproščanje ogljikovega dioksida (CO<sub>2</sub>), ki nastaja kot posledica mikrobni procesov v tleh. V literaturi se vse pogosteje poudarja, da tla niso zgolj substrat za rast rastlin, temveč tudi dinamičen ekosistem, ki ima potencial bodisi za vezavo bodisi za sproščanje ogljika. Cilj naloge je bil oblikovati eksperimentalni okvir za spremljanje CO<sub>2</sub> iz tal ter prispevati k razumevanju kompleksne povezanosti fizikalnih, kemijskih in bioloških dejavnikov v agroekosistemi. Z nalogo smo odprli pomembna vprašanja o trajnostnosti kmetijskih praks in spodbudili k razmisleku o prehodu v kmetijstvo, ki bi manj vplivalo na podnebje, kar je v skladu z mednarodnimi podnebnimi zavezami.

**Zoja Verbič, Žana Nemec**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Rok Mihelič**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Metod Kovačič**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Co-supervisors: **Ana Schwarzmanna, Sara Mavsar**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

## Soil CO<sub>2</sub> – Hidden Impact of Agriculture on Climate Change

This research project addresses the role of agricultural soils as a critical, yet often overlooked component in the mechanisms driving climate change. Central to the inquiry is the question of how various agricultural practices – particularly soil tillage and fertilisation – affect the release of carbon dioxide resulting from microbial processes within the soil matrix. Recent scientific discourse increasingly recognises that soil is not merely a passive substrate for plant growth but a dynamic ecosystem capable of acting either as a carbon sink or a carbon source. The aim of this work was to establish an experimental framework for monitoring CO<sub>2</sub> fluxes from soil and to contribute to a more comprehensive understanding of the intricate interplay between physical, chemical, and biological parameters in agroecosystems. The study raises critical questions about the sustainability of prevailing agricultural practices and advocates for a transition toward climate-resilient farming systems, in line with international climate commitments.

**Lan Dular, Aljaž Maraž**, Gimnazija Ledina

**Nejc Murn Blažič**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje

Mentorica: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina

Somentorja: **Stana Kovač Hace, Uroš Ocepek**, Srednja tehniška in poklicna šola Trbovlje

Somentorica: **Ana Kroflič**, Kemijski inštitut Ljubljana

## Voda ne laže: skriti vzorci uporabe psihoaktivnih snovi

V raziskovalni nalogi smo analizirali psihoaktivne snovi (v nadaljevanju PAS) v odpadnih vodah v Sloveniji in proučevali vzorce uporabe teh snovi med mladimi. Analiza odpadnih voda je razkrila uporabo PAS v dveh slovenskih mestih. Rezultati ankete, čeprav subjektivni, dopolnjujejo podatke kemičnih analiz in prispevajo k celovitemu razumevanju problematike. Namen raziskovalne naloge je bil raziskati prisotnost različnih vrst PAS v odpadnih vodah v Ljubljani in Trbovljah ter ugotoviti, kakšni so vzorci uporabe teh snovi med dijaki iz obeh mest. Naloga obsega dva dela, in sicer teoretičnega, v katerem smo ugotavljali, kakšni so razlogi za uporabo PAS med mladimi, ter eksperimentalnega, ki je vključeval zbiranje vzorcev odpadnih voda iz čistilnih naprav v Ljubljani in Trbovljah, njihovo obdelavo in analizo s hitrimi urinskimi testi.

**Lan Dular, Aljaž Maraž**, Gimnazija Ledina Grammar School

**Nejc Murn Blažič**, Secondary Technical and Vocational School Trbovlje

Supervisor: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina Grammar School

Co-supervisors: **Stana Kovač Hace, Uroš Ocepek**, Secondary Technical and Vocational School Trbovlje,

Co-supervisor: **Ana Kroflič**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

## Water Does Not Lie: Hidden Patterns of Substance Use

The research work focuses on the analysis of psychoactive substances (hereafter referred to as PAS) in wastewater in Slovenia and examines the patterns of their use among young people. Wastewater analysis provides a clear picture of the use of psychoactive substances in two Slovenian cities. Survey questionnaires, although subjective, supplement data from chemical analyses and contribute to a comprehensive understanding of the research question. The purpose of the research was to investigate the presence of various types of PAS in wastewater in Ljubljana and Trbovlje, and to determine the patterns of use of these substances among students from the two cities. The research work is divided into two parts. The theoretical part aims to identify the reasons behind the use of psychoactive substances among young people, while the experimental part involves collecting wastewater samples from sewage treatment plants in Ljubljana and Trbovlje, their processing, and analysis using rapid urine tests.

**Živa Avdičaušević**, II. gimnazija Maribor  
Mentorica: **Natalija Jančič**, II. gimnazija Maribor  
Somentorica: **Mojca Poberžnik**, Inštitut za okoljevarstvo in senzorje

## Recikliranje odpadnega celuloznega tekstila z encimsko hidrolizo

Tekstilna industrija precej vpliva na okolje predvsem zaradi velikih količin odpadnega tekstila, ki so posledica hitre mode. Ker so metode recikliranja tekstila omejene, se razvijajo novi, za okolje neškodljivi pristopi, s katerimi lahko pridobimo uporabne in dragocene izdelke. V raziskovalni nalogi smo preverjali učinkovitost biokemijske metode – encimske hidrolize, ki temelji na razgradnji tekstilnega substrata z encimi. Izvedli smo šest ločenih eksperimentov na bombažnih substratih popotrošniškega in industrijskega odpadka. Proučevali smo vpliv oblike celuloznega substrata, predobdelave z alkalizacijo in prisotnosti tekstilnih barvil na koncentracijo nastale glukoze. Rezultati eksperimentov so pokazali, da predhodna alkalizacija bistveno poveča učinkovitost encimske hidrolize, medtem ko prisotnost tekstilnih barvil nanjo ne vpliva negativno. Najvišjo koncentracijo glukoze smo izmerili pri eksperimentih z alkaliziranim vlaknatim substratom in alkalizirano obarvano pletenino. S tem smo potrdili potencial encimske hidrolize kot trajnostno rešitev za recikliranje tekstilnih odpadkov in predelavo proizvedene glukoze v platformne kemikalije (kot je 5-hidroksimetilfurfural), ki se uporabljajo za proizvodnjo raznih kemikalij, bioplastike in farmacevtskih izdelkov.

**Živa Avdičaušević**, II. Gimnazija Maribor Grammar School  
Supervisor: **Natalija Jančič**, II. Gimnazija Maribor Grammar School  
Co-supervisor: **Mojca Poberžnik**, Institute of Environmental Protection and Sensors, Maribor

## Recycling Cellulose-Based Textile Waste through Enzymatic Hydrolysis

The textile industry has a significant impact on the environment, especially due to the large amounts of textile waste resulting from fast fashion. Since existing textile recycling methods are limited, new, more environmentally friendly approaches are being developed that can be used to manufacture useful and valuable products. In our research work, we investigated the efficiency of enzymatic hydrolysis, a biochemical method based on the degradation of the textile substrate by enzymes. For this purpose, six separate experiments were performed on cotton substrates from post-consumer and industrial waste. We analysed the influence of different structures of cellulose substrate, alkali pre-treatment and textile dyes on the concentration of produced glucose. The results revealed that the alkali pre-treatment significantly enhanced enzymatic hydrolysis efficiency, while the presence of textile dyes had no negative effect. The highest measured glucose concentrations were obtained in experiments with an alkalinised fibrous substrate and an alkalinised dyed knitted fabric. This confirmed the potential of enzymatic hydrolysis as a sustainable solution for recycling textile waste and the conversion of the produced glucose into platform chemicals (such as 5-hydroxymethylfurfural) used in the production of a broad range of chemicals, bioplastics, and pharmaceuticals.

## Antibiotično in antimikotično delovanje rastlinskih ekstraktov invazivk na povzročitelje bolezni krompirja

Krompir je ena pomembnejših kulturnih rastlin, ki se med rastjo in skladiščenjem lahko okuži z različnimi bakterijami in glivami ali pa ga napadejo škodljivci. Glavni namen naloge je bil raziskati, ali lahko najpogostejši bolezni krompirja, krompirjevo plesen in krastavost, zatiramo z ekstrakti, pripravljenimi iz invazivnih tujerodnih rastlin. Pri raziskovanju smo uporabili ambrozijo, japonski dresnik, kanadsko zlato rozgo in žlezavo nedotiko. Praktični del smo začeli z nabiranjem invazivnih tujerodnih rastlin v naši okolici. Potem ko smo jih posušili, smo zmleli njihove posamezne dele oz. rastlinske droge (liste, cvetove, korenine, stebila). Pripravili smo ekstrakte z uporabo etanola in hladne destilirane vode. Z okuženega krompirjevega gomolja s krompirjevo krastavostjo in krompirjevo plesnijo smo odvzeli brise in jih dali na primerno gojišče. Krastavost povzroča bakterija *Streptomyces scabies* (*S. scabies*), zato smo jo nacepljali na gojišče PCA. Povzročiteljica krompirjeve plesni pa je oomiceta *Phytophthora infestans* (*P. infestans*), ki smo jo nacepljali na krompirjev agar. Glede na morfološke lastnosti kultur in z opazovanjem pod mikroskopom smo potrdili, da delamo z želenima kulturama. Z difuzijskim antibiogramom smo opazovali antibiotične in antimikotične učinke ekstraktov izbranih invazivnih rastlin na izbrani povzročiteljici bolezni pri krompirju. Izvedli smo difuzijske antibiogramе s 25 različno pripravljenimi ekstrakti rastlinskih drog invazivnih rastlin. Dokazali smo, da na bakterijo *S. scabies*, povzročiteljico krastavosti pri krompirju, enako učinkovito zaviralno delujejo etanolni in vodni ekstrakti iz korenin japonskega dresnika, iz listov japonskega dresnika ter iz korenin žlezave nedotike in ambrozije. Na oomiceto *P. infestans*, povzročiteljico krompirjeve plesni, pa najbolj zaviralno delujejo etanolni ekstrakti stebila ambrozije, korenin japonskega dresnika, korenin žlezave nedotike ter stebila žlezave nedotike. Zaviralni učinki ekstraktov na *S. scabies* so bili vidni pri vodnih in etanolnih ekstraktih, medtem ko na *P. infestans* vodni ekstrakti niso imeli zaviralnega učinka.

**Rika Dolžan, Klara Dolar, Vida Žemlja**, Biotechnical Centre Naklo  
Supervisor: Marjetka Kastelic Švab, Biotechnical Centre Naklo

## Antibiotic and Antifungal Activity of Invasive Plant Extracts on Potato Disease Pathogens

Potatoes are one of our most important crops. However, during growth and storage, they are susceptible to infections by various bacteria, fungi, and pests. The main objective of the research was to investigate whether the most important potato diseases, potato blight and potato scab, can be controlled using extracts prepared from invasive non-native plants. In our research, we used ragweed, Japanese knotweed, Canadian goldenrod, and *Impatiens glandulifera*. We began the practical part by collecting invasive non-native plants in our surroundings. The plants were dried, and the individual plant parts (leaves, flowers, roots, stems) were ground. Extracts were prepared using ethanol and cold distilled water. Potato tubers infected with potato scab and potato blight were swabbed and placed on a suitable medium. The scab disease, caused by *Streptomyces scabies* (*S. scabies*), was inoculated on PCA medium. Potato blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (*P. infestans*), was inoculated on potato agar. Based on the morphological characteristics of the cultures and by observation under a microscope, we confirmed that we were indeed working with the desired cultures. The antibiotic and antimycotic effects of the extracts from the selected invasive plants were observed using the diffusion antibiogram method. The entire study was carried out in the school's microbiology laboratory. In the research work, diffusion antibiograms were performed using twenty-five differently prepared extracts from plant drugs of ragweed, Japanese knotweed, *Solidago canadensis* and *Impatiens glandulifera*. We showed that ethanol and aqueous extracts of Japanese knotweed roots, followed by Japanese knotweed leaves and glandular ryegrass roots, have equally effective inhibitory effects on *S. scabies*, the causal agent of potato scab. In contrast, the strongest inhibitory effects on the oomycete *P. infestans*, the causal agent of potato blight, were observed with ethanolic extracts of ragweed stems, Japanese knotweed roots, glandular ryegrass roots, and glandular ryegrass stems. The inhibitory effects on *S. scabies* were observed with both aqueous and ethanolic extracts, in contrast to *P. infestans*, where aqueous extracts showed no inhibitory effect.

**Jan Luka Fatur**, Gimnazija Koper

Mentorica: **Nina Križaj Kosi**, Institut Jožef Stefan

Mentor: **Sebastjan Nemec**, Institut Jožef Stefan, Laboratorij za raziskave materialov, Univerza v Novi Gorici

## Sinteza in vrednotenje magnetnih mikropalčk železovega oksida s prevleko iz silicijevega dioksida in nanodelci cerijevega dioksida za potencialno uporabo v katalizi

V raziskovalni nalogi smo predstavili sintezo in vrednotenje magnetnih mikropalčk železovega oksida s prevleko iz silicijevega dioksida (silike) in nanosenimi nanodelci cerijevega dioksida ( $\text{CeO}_2$ ) za potencialno uporabo v katalizi. Sintetizirane mikropalčke smo ovrednotili s številnimi analitskimi tehnikami. Ustrezno kristalno strukturo mikropalčk smo potrdili z rentgensko praškovno difrakcijo in elektronsko difrakcijo izbranega območja. Velikost in morfologijo mikropalčk ter uspešnost tvorbe plasti silike in homogenost nanosa  $\text{CeO}_2$  smo ovrednotili z optično in elektronsko mikroskopijo. Specifično površino in skupni volumen por mikropalčk smo določili s plinsko porozimetrijo z dušikom. Sintetizirane mikropalčke so bile v povprečju dolge 23  $\mu\text{m}$  in prevlečene s plastjo kompaktne silike debeline 10 nm oz. porozne silike debeline 70 nm in s premerom por 15 nm. Specifična površina mikropalčk je znašala do 570  $\text{m}^2/\text{g}$ . Uspešno smo sintetizirali mikropalčke s homogeno nanosenim  $\text{CeO}_2$  v obliki nanodelcev velikosti 2 do 4 nm, ki jim bomo v nadaljnjih študijah določali katalitsko učinkovitost.

**Jan Luka Fatur**, Gimnazija Koper Grammar School

Supervisor: **Nina Križaj Kosi**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Co-supervisor: **Sebastjan Nemec**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Materials Research Laboratory, University of Nova Gorica

## Synthesis and Characterisation of Magnetic Iron Oxide Microrods with Silica Coatings and Ceria Nanoparticles for Potential Use in Catalysis

The study presents the synthesis and characterisation of magnetic iron oxide microrods coated with silicon dioxide (silica) and cerium dioxide ( $\text{CeO}_2$ ) for potential application in catalysis. The synthesised microrods were evaluated using various analytical techniques. The appropriate crystal structure of the microrods was confirmed using X-ray powder diffraction and selected area electron diffraction. The size and morphology of microrods, successful formation of silica layers, and  $\text{CeO}_2$  deposition were assessed using optical and electron microscopy. The specific surface area and total pore volume of the microrods were determined using nitrogen gas porosimetry. The synthesised microrods were 23  $\mu\text{m}$  long in average and had a compact and porous silica coating thickness of 10 nm and 70 nm, respectively. The pores in porous silica had a diameter of 15 nm. The specific surface area of the microrods was up to 570  $\text{m}^2/\text{g}$ . We successfully synthesised microrods with deposited  $\text{CeO}_2$  in the form of 2–4 nm nanoparticles for future studies of catalytic efficiency.

**Lara Marzidovšek, Katarina Šela**, Srednja šola Slovenska Bistrica  
Mentorica: **Damijana Gregorič**, Srednja šola Slovenska Bistrica  
Somentorici: **Kristina Žagar Soderžnik, Neža Sodnik**, Institut Jožef Stefan

## Elektrokemijska določitev bisfenola S v termo papirju

Bisfenoli so skupina industrijsko pomembnih organskih spojin. Med najprepoznavnejše spadajo bisfenoli A, S in F. Več predstavnikov te skupine je hormonskih (endokrinih) motilcev – to so snovi, ki pod nekaterimi pogoji vplivajo na hormonski sistem ljudi in živali. Proučevali smo prisotnost bisfenola S (BPS) v termo papirju, ki se pogosto uporablja predvsem v trgovinah, restavracijah in drogerijah. Cilj naloge je bil preveriti prisotnost BPS v večini vzorcev in odsotnost bisfenola A (BPA), ki je v Evropski uniji prepovedan. S ciklično voltametrijjo smo analizirali 26 vzorcev termo papirja in pripravili standardne raztopine različnih koncentracij BPS, kar je omogočilo izračun koncentracij BPS v realnih vzorcih. Z analizo smo ugotovili, da BPS vsebuje 62 % vzorcev. Ti so bili večinoma pridobljeni iz restavracij in živilskih trgovin, kar kaže na veliko razširjenost te spojine v vsakdanjem življenju. V treh vzorcih smo predvidoma zaznali tudi bisfenol F (BPF), sedem pa jih ni vsebovalo niti BPS niti BPF. Ugotavljali smo tudi dnevni vnos BPS v telo zaradi uporabe termo papirja. Rezultati so pokazali, da dnevni vnos BPS pri splošni populaciji znaša 0,0000003 ng/dan, medtem ko pri poklicno izpostavljenih ljudeh, kot so trgovci in gostinski delavci, vrednost presega 0,00002 ng/dan. V Evropski uniji je dopustni dnevni vnos (Tolerable Daily Intake, TDI) BPA 0,2 ng/kg telesne mase na dan. Vnos dovoljene količine BPS še ni določen. Če bi bila vrednost TDI enaka kot pri BPA, bi poklicno izpostavljeni ljudje lahko presegli to mejo že zgolj zaradi stika s termo papirjem, pri čemer je treba upoštevati, da to ne vključuje drugih virov izpostavljenosti.

**Lara Marzidovšek, Katarina Šela**, Slovenska Bistrica Secondary School  
Supervisor: **Damijana Gregorič**, Slovenska Bistrica Secondary School  
Co-supervisors: **Kristina Žagar Soderžnik, Neža Sodnik**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

## Electrochemical Determination of Bisphenol S in Thermal Paper

Bisphenols are a group of industrially important organic compounds. The most common are bisphenols A, S and F. Several representatives of this group are identified as endocrine disruptors, that is substances that under certain conditions affect the hormonal system of both humans and animals. The purpose of the research work was to study the presence of bisphenol S (BPS) in thermal paper, which is commonly used in shops, restaurants, drugstores and other everyday settings. The aim was to determine whether BPS is present in most samples and to check the absence of bisphenol A, which is banned in the European Union. Using cyclic voltammetry, we analysed 26 thermal paper samples and prepared BPS standard solutions of different concentrations, allowing us to calculate BPS concentrations in real samples. During the analysis, we found that 62% of the samples contained BPS, and these samples were mostly obtained from restaurants and grocery stores, indicating a wide presence of this compound in everyday settings. The presence of bisphenol F (BPF) was observed in three samples, while seven samples contained neither BPS nor BPF. We also estimated the daily intake of BPS in the body due to handling thermal paper. Estimates show that for the general population, the daily value of BPS is 0.0000003 ng/day, while for occupationally exposed people such as merchants and food service workers, the value is greater than 0.00002 ng/day. In the EU, the Tolerable Daily Intake (TDI) for BPS has not yet been determined. If the TDI limit were set the same as for BPA (0.2 ng/kg body weight/day), occupationally exposed people could exceed this limit just from contact with thermal paper, disregarding other possible sources of exposure.

**Tajda Adrovič Flisar, Brina Vita Mauhar, Žan Hace**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik  
Mentorica: **Cirila Jeras**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik  
Somentor: **Andraž Dolar**, Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik

## Vpliv delcev asfalta na rastline graha in kopenske rake mokrice

Sodobni okoljski izzivi vključujejo vpliv različnih antropogenih onesnažil, kot so plastika in težke kovine, ter posledice podnebnih sprememb. Pogosto spregledamo materiale, ki jih množično uporabljamo že dolgo – med njimi je tudi asfalt, katerega uporaba v cestni infrastrukturi narašča. Zaradi prometa, obnove cest in okoljskih vplivov se asfalt drobi v manjše delce, ki se kopičijo v tleh. Njihova usoda v okolju in vpliv na žive organizme pa ostajata slabo raziskana. V tej študiji smo proučevali vpliv asfaltnih delcev v zemlji na rast graha (*Pisum sativum*) ter na vedenje in fiziologijo mokric (*Porcellio laevis*). Uporabili smo 60 semen graha in 120 mokric, ki smo jih izpostavili različnim koncentracijam asfaltnih delcev. Rezultati so pokazali, da asfalt negativno vpliva na kalitev graha, spremeni rast korenin, število in velikost listnih rež ter pH tal. Pri mokricah smo zaznali spremembe v prehranjevanju in krvni sliki.

**Tajda Adrovič Flisar, Brina Vita Mauhar, Žan Hace**, Rudolf Maister Grammar and Secondary School Kamnik  
Supervisor: **Cirila Jeras**, Rudolf Maister Grammar and Secondary School Kamnik  
Co-supervisor: **Andraž Dolar**, Rudolf Maister Grammar and Secondary School Kamnik

## Impact of Asphalt Particles on Pea Plants and Terrestrial Isopods Woodlice

Contemporary environmental challenges include the impact of various anthropogenic pollutants such as plastics, heavy metals, and climate change. However, materials that have long been in widespread use – like asphalt – are often overlooked. Asphalt use in road infrastructure is increasing. Due to traffic, road maintenance, and environmental factors, asphalt breaks down into smaller particles that accumulate in the soil. The fate of these particles in the environment and their effects on living organisms remain poorly understood. In this study, we examined the impact of asphalt particles in the soil on pea plants (*Pisum sativum*) and the terrestrial isopod (*Porcellio laevis*). We used 60 pea seeds and 120 isopods, exposing them to different concentrations of asphalt particles in the soil. The results showed that asphalt negatively affects pea germination, alters root growth, changes the number and size of stomata, and affects soil pH. In isopods, we observed changes in feeding behaviour and blood parameters.



# KAZALO

## INDEX

### KAZALO AVTORJEV

|     |                      |          |                   |
|-----|----------------------|----------|-------------------|
| 142 | Tajda Adrovič Flisar | 94       | Jakob Höfferle    |
| 114 | Lamija Ahmetović     | 91       | Pia Hrovat        |
| 116 | Živa Anderluh        | 128      | Matic Izak        |
| 138 | Živa Avdičaušević    | 32       | Dominik Jankovič  |
| 111 | Adela Avdičević      | 120      | Ajk Kalaba        |
| 66  | Manca Babor          | 105      | Polona Kalan      |
| 44  | Ana Baumgartner      | 122      | Mija Kapun        |
| 95  | Urh Bertonecl        | 54       | Vid Kermelj       |
| 124 | Neža Botica          | 98       | Špela Kladnik     |
| 56  | Matic Broz           | 96       | Lovro Klenovšek   |
| 108 | Maja Cvetanoska      | 123      | Teja Kljun        |
| 101 | Zala Čuk             | 125      | Maja Klun         |
| 50  | Jaka Dernovšek       | 102      | Larisa Knap       |
| 139 | Klara Dolar          | 128      | Vid Kodrič        |
| 116 | Jošt Dolinar         | 89       | Jakob Kolar       |
| 139 | Rika Dolžan          | 119      | Vinko Kosten      |
| 137 | Lan Dular            | 75       | Nika Kučuk        |
| 140 | Jan Luka Fatur       | 117      | Neža Kuhar        |
| 70  | Tjaša Felicijan      | 77       | Kaja Kupnik       |
| 88  | Žiga Gerdina         | 125      | Iza Levstek       |
| 133 | Kristina Golja       | 130      | Stela Maček       |
| 130 | Nuša Gorišek         | 120, 137 | Aljaž Maraž       |
| 134 | Klara Grantaša       | 135      | Ela Marčič        |
| 128 | Anika Gregori Kmecl  | 127      | Vida Markovič     |
| 74  | Blaž Grilc           | 141      | Lara Marzidovšek  |
| 142 | Žan Hace             | 142      | Brina Vita Mauhar |
| 72  | Barbara Herlah       | 126      | Sibila Mežnar     |

## KAZALO AVTORJEV

|     |                      |     |                    |
|-----|----------------------|-----|--------------------|
| 121 | Jon Milič            | 112 | Tinara Šušтариč    |
| 132 | Monika Minjovič      | 120 | Luka Tomažin       |
| 137 | Nejc Murn Blažič     | 82  | Matevž Turk        |
| 86  | Juš Navratil         | 71  | Jernej Vajda       |
| 136 | Žana Nemec           | 136 | Zoja Verbič        |
| 118 | Maša Pelan           | 79  | Lucija Ana Vrščaj  |
| 100 | Žiga Petančič        | 107 | Janja Zabukovnik   |
| 97  | Lara Plohl           | 38  | Anže Zidar         |
| 92  | Benjamin Poljanc     | 90  | Tilen Zorko        |
| 124 | Vesna Potočnik       | 81  | Nina Zupan         |
| 87  | Sergej Praček        | 134 | Brina Zver         |
| 109 | Eva Ravnikar         | 139 | Vida Žemlja        |
| 93  | Martin Rihtaršič     | 132 | Vita Žigart Rubelj |
| 122 | Emilija Rojnik       | 113 | Pia Žižek          |
| 84  | Eva Rotar Pucko      | 115 | Špela Žunec        |
| 106 | Lucija Rus           |     |                    |
| 73  | Katja Schoss         |     |                    |
| 64  | Maja Sever           |     |                    |
| 65  | Taja Skube           |     |                    |
| 129 | Nika Srdarev         |     |                    |
| 129 | Saša Stanić Mencin   |     |                    |
| 103 | Zala Stopar          |     |                    |
| 76  | Nika Strašek Benedik |     |                    |
| 141 | Katarina Šela        |     |                    |
| 104 | Anja Šenk            |     |                    |
| 83  | Barbara Šernek       |     |                    |
| 65  | Dominik Škrinjar     |     |                    |
| 78  | Aljaž Škrjanc        |     |                    |
| 80  | Rok Šmerc            |     |                    |
| 110 | Blažka Štefin        |     |                    |
| 127 | Zoja Štrubelj        |     |                    |
| 99  | Neža Štrukelj        |     |                    |



## KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

|               |                       |               |                        |
|---------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| 133           | Milan Ambrožič        | 118, 130      | Marko Jeran            |
| 117           | Helena Bajec          | 142           | Cirila Jeras           |
| 124           | Rok Bavdek            | 40            | Matjaž Jeras           |
| 108           | Aleš Berlec           | 118           | Tanja Jesenko          |
| 70            | Marija Bogataj        | 97            | Ivana Jovčevska        |
| 125           | Zala Bohar            | 125           | Živa Jurič             |
| 58, 111, 114  | Urban Bren            | 89            | Klemen Kirbus          |
| 119, 120, 137 | Nika Cebin            | 105           | Anja Klančnik          |
| 126           | Anže Martinčič Celjar | 106           | Lea Knez               |
| 132           | Sanja Cvar            | 86            | Damijan Knez           |
| 115           | Andraž Dolar          | 101           | Petra Kocbek           |
| 102, 113      | Marija Sollner Dolenc | 82            | Ksenija Kogej          |
| 101           | Črt Dragar            | 123           | Katja Kološa           |
| 84            | Rok Dreu              | 110           | Nina Križaj Kosi       |
| 81            | Emeline Dudognon      | 125, 127, 136 | Metod Kovačič          |
| 127           | Simona Kralj Fišer    | 96            | Janez Košmrlj          |
| 113           | Nina Franko           | 104           | Alen Krajnc            |
| 124           | Katarina Frelih       | 117           | Mitja Krajnc           |
| 114           | Veronika Furlan       | 115           | Ida Kraševac           |
| 107           | Grzegorz Garbacz      | 73            | Samo Kreft             |
| 36            | Martin Gazvoda        | 40            | Julijana Kristl        |
| 119           | Boštjan Genorio       | 131           | Gregor Križ            |
| 73, 109       | Nina Kočever Glavač   | 137           | Ana Kroflič            |
| 104           | Stanislav Gobec       | 85            | Burkhard König         |
| 100           | Pegi Ahlin Grabnar    | 84            | Zoran Lavrič           |
| 64            | Lidija Gradišnik      | 75, 77        | Maja Leitgeb           |
| 141           | Damijana Gregorič     | 83            | Tina Levstek           |
| 120, 137      | Stana Kovač Hace      | 111           | Samo Lešnik            |
| 82            | Per Hansson           | 107, 112      | Igor Locatelli         |
| 91            | Ester Heath           | 78            | Nataša Zabukovec Logar |
| 86, 93        | Jernej Iskra          | 99            | Mojca Lunder           |
| 135, 138      | Natalija Jančič       | 80            | Samo Mahnič-Kalamiza   |
| 106           | Urška Janžič          | 79            | Janja Marc             |

## KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

|          |                          |          |                          |
|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| 102      | Tijana Markovič          | 75, 77   | Mateja Primožič          |
| 71       | Uroš Maver               | 115      | Helena Prosen            |
| 64       | Tina Maver               | 65       | Robert Roškar            |
| 136      | Sara Mavsar              | 87, 128  | Jerica Sabotič           |
| 86       | Anže Meden               | 73       | Katja Schoss             |
| 121      | Marija Meznarič          | 136      | Ana Schwarzmann          |
| 136      | Rok Mihelič              | 87       | Kristina Sepčič          |
| 110      | Ana Mitrović             | 122      | Darja Silan              |
| 116      | Alenka Mozer             | 129      | Miha Slapničar           |
| 116      | Janez Mravljak           | 141      | Kristina Žagar Soderžnik |
| 81       | Susanne Florin Muschert  | 140      | Neža Sodnik              |
| 140      | Sebastjan Nemec          | 72, 76   | Izidor Sosič             |
| 97       | Zoran Novak              | 76       | Matej Sova               |
| 131      | Metka Novak              | 108      | Spase Stojanov           |
| 120, 137 | Uroš Ocepek              | 66       | Jurij Svete              |
| 121      | Martina Oder             | 130      | Anja Tanšek              |
| 79       | Barbara Ostanek          | 103      | Gapšer Tavčar            |
| 135      | Muzafera Paljevac        | 52       | Tihomir Tomašič          |
| 97       | Milica Pantić            | 123      | Špela Tršek              |
| 65       | Timeja Planinšek Parfant | 92, 95   | Iztok Turel              |
| 133      | Jan Damjan Pavlica       | 122      | Martina Turk             |
| 72       | Andrej Perdih            | 129      | Nejc Umek                |
| 126      | Martin Tine Perger       | 71       | Boštjan Vihar            |
| 103      | Andrej Pevec             | 134      | Manca Kovač Viršek       |
| 130      | Luka Irenej Pečan        | 128      | Helena Potočnik Vičar    |
| 125      | Barbara Pipan            | 122      | Polona Zalar             |
| 46, 74   | Odon Planinšek           | 130, 118 | Lidija Zavasnik          |
| 88       | Polona Žnidaršič Plazl   | 128      | Nika Zaveršek            |
| 138      | Mojca Poberžnik          | 52       | Nace Zidar               |
| 100      | Monika Prašnikar         | 64       | Tanja Zidarič            |
| 118      | Tomaž Prelog             | 130      | Minja Zorc               |
| 126      | Tim Prezelj              | 112      | Špela Zupančič           |



## KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

|          |                         |
|----------|-------------------------|
| 83       | Miran Šebeštjen         |
| 123, 131 | Martina Štampar         |
| 91       | Urška Lavrenčič Štangar |
| 90       | Bogdan Štefane          |
| 139      | Marjetka Kastelic Švab  |
| 96       | Jure Žabkar             |
| 89, 99   | Lovro Žiberna           |



| #krkinenagrade

| [www.krkinenagrade.si](http://www.krkinenagrade.si)