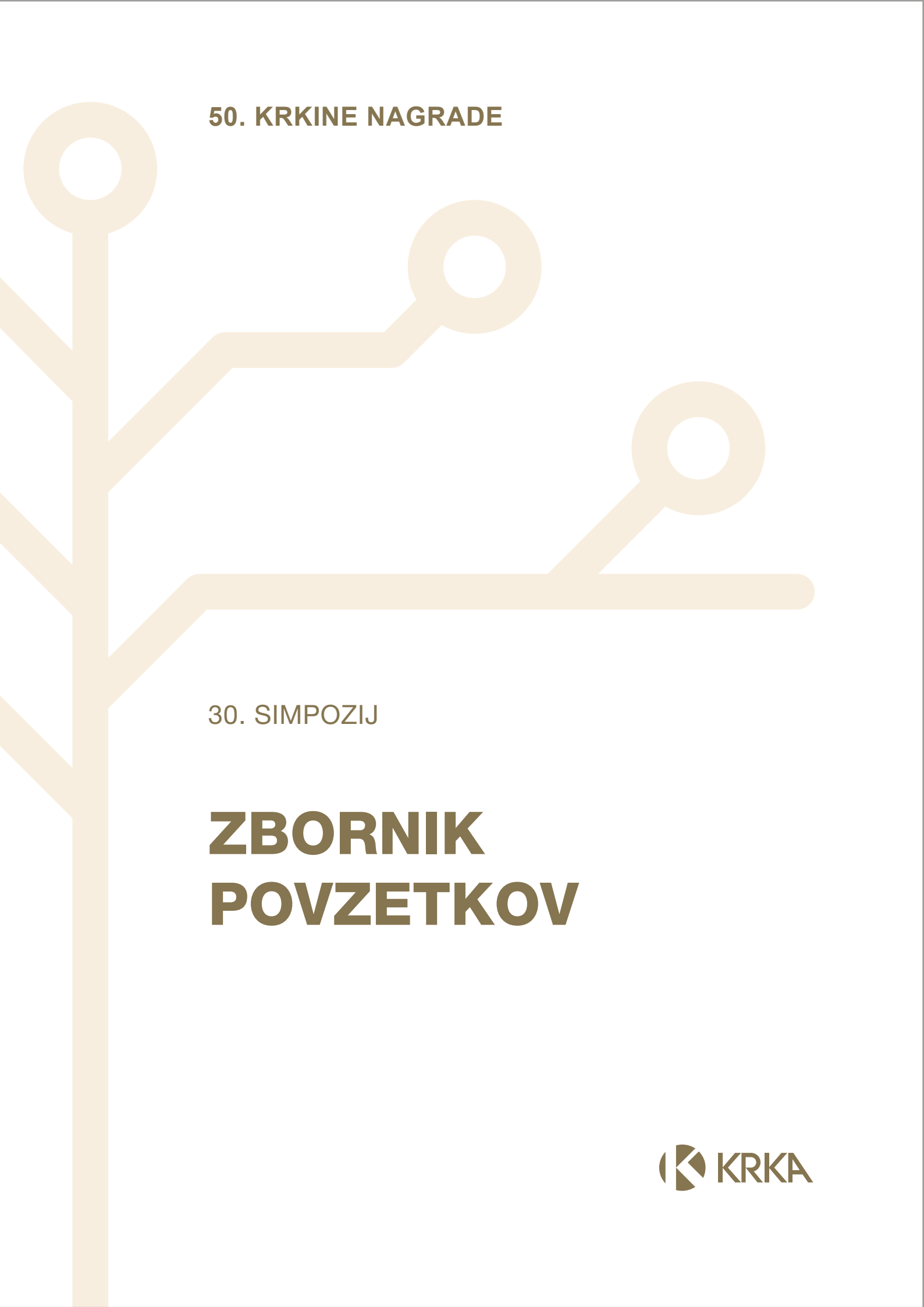


A stylized, light beige tree graphic is positioned on the left side of the page. It features a vertical trunk with several horizontal and diagonal branches. At the end of three of these branches are circular nodes, resembling fruit or leaves. The overall style is minimalist and modern.

50. KRKINE NAGRADE

30. SIMPOZIJ

**ZBORNIK
POVZETKOV**

50. KRKINE NAGRADE
50th KRKA PRIZES

30. SIMPOZIJ
30th 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

50. KRKINE NAGRADE | Zbornik povzetkov

Novo mesto, 16. oktober 2020

Izdajatelj

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

Glavni in odgovorni urednik

dr. Miha Plevnik

Predstavitev nagrajencev

Maja Oberstar Falkner, Simona Gorjup, Tanja Sluga Kobe

Jezikovni pregled (slovenski jezik)

Ksenija Kosem, Marta Anžlovar

Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik)

Mojca Ceferin, Meta Hauptman

Oblikovanje

Krka, d. d., Novo mesto

Produkcija

Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije

Andrej Križ

Tisk

PEAKPRINT d.o.o., natisnjeno v nakladi 700 izvodov

www.krkinenagrade.si

Častni odbor 50. Krkinih nagrad

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke
akad. prof. dr. **Peter Štih**, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. **Igor Papič**, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. **Zdravko Kačič**, rektor Univerze v Mariboru
mag. **Matjaž Tuš**, predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
dr. **Albin Pintar**, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. **Radko Komadina**, predsednik Slovenskega zdravniškega društva

Svet Sklada Krkinih nagrad

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

Znanstveni odbor

prof. dr. **Franč Vrečer**
doc. dr. **Aleš Gasparič**
dr. **Anita Mlakar**
Dušanka Oblak Božič
dr. **Leon Ščuka**
doc. dr. **Vida Škrabanja**
dr. **Silvo Zupančič**

Organizacijski odbor

Elvira Medved, predsednica
Simona Kastelic
mag. **Simona Torkar Flajnik**
dr. **Jernej Zadnik**

Glavni in odgovorni urednik

dr. **Miha Plevnik**

Recenzenti

mag. Sintija Antončič, Jože Arh, dr. Tina Bakarič, Breda Barbič Žagar, Matej Barič, Teja Barle Hus, Tea Bašin, mag. Alenka Beličič Kolšek, dr. Primož Benkič, dr. Tadeja Bevec, dr. Jure Bezenšek, dr. Marko Bitenc, Tanja Blatnik, dr. Sergeja Bombek, dr. Rok Borštnar, dr. Blaž Brulc, dr. Nina Brvar, Ilija Buzar, Nina Caglič, mag. Tatjana Cesar, Alenka Colarič Wala, dr. Aleš Curk, mag. Lea Cvitkovič Maričič, dr. Irena Čarman, dr. Katarina Černelič, Miro Dobravec, dr. Katarina Dobrovoljc, Aleša Dular Vovko, Tanja Erčulj, Vesna Flis, doc. dr. Aleš Gasparič, dr. Ivan Gobec, Jana Golob, mag. Mojca Golob, mag. Mateja Gorjup, Kaja Gosak, mag. Anica Grandovec, Vendi Grobelšek, Ema Guštin, Peter Hančič, Mojca Hiti, dr. Žiga Hodnik, Bor Hodžič, dr. Grega Hudovornik, Jernej Hvala, Tina Hvala, mag. Lucija Hvalec, mag. Miran Hvalec, dr. Gregor Ilc, dr. Sašo Jančič, Dušan Janežič, dr. Boštjan Jerman, Jernej Jerman, Urh Jevšovar, Aleš Judež, dr. Suzana Jus Kralj, dr. Jože Kastelic, dr. Davor Kidemet, Ksenija Kikelj, dr. Dejan Klement, dr. Slavko Klobčar, Filip Kolenc, dr. Tanja Koleša Dobravec, Nejc Koračin, dr. Klemen Korasa, Ina Kosmač, Primož Košir, mag. Berta Kotar Jordan, mag. Helena Kotnik, dr. Borut Kovačič, Irena Kovačič, Simon Kovačič, Irena Krajačič, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, dr. Zdenka Kranjc-Gregorčič, mag. Bojana Kržič, Andreja Kuhar, dr. Barbara Kunič Tešović, dr. Jernej Kužner, dr. Brigita Lapornik, dr. Roman Lenaršič, mag. Denise Leskovar, dr. Mateja Lumpert, mag. Matej Luštek, mag. Bronja Manček, Jelena Mandić, dr. Primož Meh, mag. Mateja Merslavič, Jasna Meško Obretan, dr. Špela Miklič, Mirjam Milharčič Simčič, Darja Milovanović Jarh, Urška Mohorič, Miha Mrzlikar, dr. Dominik Nabergoj, Dušanka Oblak Božič, mag. Irena Orel, dr. Renata Osolnik, mag. Vesna Pahor, dr. Anica Pečavar, dr. Lidija Pezdirc, Boštjan Piltaver, Jerneja Planinc, dr. Andreja Plaper, dr. Miha Plevnik, Aleš Polovič, dr. Anja Pucer Janež, Irena Pucihar, mag. Aleša Punčuh Kolar, dr. Eva Pušavec Kirar, dr. Katarina Rade, mag. Ivan Radež, Zdenka Ratajc, dr. Nataša Rebolj, Marjeta Redek, dr. Matej Repič, Jerca Resnik, dr. Aleš Rotar, Jasna Rozman Marčič, dr. Saša Rožman, Miloš Ružič, Robert Sekereš, Tanja Seničar, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, dr. Marko Slana, Matej Stergar, Tadej Stropnik, Katarina Svetičič Gobec, dr. Leon Ščuka, dr. Luka Šenica, doc. dr. Vida Škrabanja, dr. Natalija Škrbina Zajc, dr. Katja Škrlec, Vanja Škufca, Gabrijela Špelič, dr. Urša Štanfel, dr. Anton Štimac, dr. Jaroslav Tihi, dr. Tanja Trafela, dr. Elizabeta Tratar Pirc, dr. Katja Trontelj, Urška Turk, mag. Robert Učman, mag. Aleš Urbančič, mag. Anamarija Vajs, dr. Ana Vidmar, dr. Tina Virant Celestina, mag. Petra Vitežič, dr. Tanja Vnučec Popov, dr. Tomislav Vrbanc, dr. Miha Vrbinc, Tomaž Vrbinc, mag. Julija Vrbovšek, prof. dr. Franc Vrečer, Marina Vrzec, dr. Jernej Zadnik, Martina Zobarič, mag. Polonca Zupančič, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, mag. Vojko Zupančič, Saša Žikić, dr. Simon Žurga.

VSEBINA

CONTENT

50. KRKINE NAGRADE

12 | **Aleš Rotar**, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

14 | **Krkini nagrajenci 2020**

30. SIMPOZIJ

ZBORNİK POVZETKOV

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

VELIKE KRKINE NAGRADE

PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

28 | **Janja Mirtič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Neizkoriščen potencial polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike

34 | **Andreja Radman Kastelic**, Prirodoslovno-matematični fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Priprava in karakterizacija bioaktivnih derivatov 1-azabiciklo[2.2.2]oktana

40 | **Andraž Lamut**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje in sinteza novih protimikrobno delujočih zaviralcev DNA giraze in Hsp90

46 | **Miha Drev**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Katalitsko heteroariliranje kot sintezni pristop v pripravi polidentatnih ligandov

52 | **Miha Virant**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj homogenih paladijevih katalitskih sistemov za izbrane pretvorbe terminalnih acetenov

50. KRKINE NAGRADE

POVZETKI

- 60 | **Tine Tesovnik**, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Majhne nekodirajoče RNA zunajceličnih veziklov pri sladkorni bolezni tipa 1
- 61 | **Bojan Papić**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Ugotavljanje značilnosti in epidemioloških povezav med izolati bakterije *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije
- 62 | **Anita Kotar**, Kemijski inštitut Ljubljana
Strukturne študije z gvanini bogatih zaporedij v promotorskih regijah protoonkogenov
- 63 | **Andraž Mehle**, Sensum d.o.o
Analiza farmacevtskih kapsul in pelet s strojnim vidom
- 64 | **Klara Čebular**, Institut Jožef Stefan, Ljubljana
Pretvorbe kisikovih funkcionalnih skupin v organskih molekulah ob prisotnosti molekularnega joda ali/in *N*-halo spojin
- 65 | **Mateja Šenica**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Vsebnost in vrste fenolov in cianogenih glikozidov v različnih delih sadnih rastlin
- 66 | **Kristijan Skok**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru
Razvoj in testiranje celičnih linij z namenom proučevanja trojno negativnega raka dojke
- 67 | **Rok Marinič Podbršček**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija reakcijskih parametrov Suzuki-Miyaura reakcije
- 68 | **Sandi Svetič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Primerjava robustnosti postopka filmskega oblaganja pelet brez in z medprocesnim vrednotenjem debeline obloge
- 69 | **Taja Ložar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Predklinično in klinično testiranje protokola za izolacijo cirkulirajočih tumorskih celic
- 70 | **Eva Praunseis**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Raziskava in vrednotenje vpliva formaldehida na fizikalno-kemijske lastnosti trdih želatinskih kapsul
- 71 | **Eric Frančišković**, Department of Pharmacy, University of Copenhagen
Razvoj integriranega hidrodinamičnega in elektrokinetičnega injiciranja ter elektroforetske separacije v biofarmaciji
- 72 | **Urša Rozman**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Paladij/rutenij dvojno ariliranje heteroaril kinolinskih derivatov
- 73 | **Andreja Horvat**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj ekstrakcijskega postopka za določanje hidrofilnih in lipofilnih vitaminov iz multivitaminov izdelkov

- 74 | **Tjaša Pavčnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj metode za *gem*-dimerizacijo terminalnih acetilenov
- 75 | **Neja Kuret**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Delovanje lektina kokaprina na patogene in probiotične bakterije
- 76 | **Nina Krištofelc**, Institut Jožef Stefan, Ljubljana
Ocena učinkovitosti hidrodinamske kavitacije za odstranjevanje bisfenolov iz odpadnih vod
- 77 | **Svetlana Utroša**, Kemijski inštitut Ljubljana
Razvoj in validacija analiznega postopka za vrednotenje vsebnosti vitaminov B-kompleksa v okolju dobre proizvodne prakse
- 78 | **Barbara Vrečer**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Konstrukcija polšaržnega hidrotermalnega reaktorja z dodajanjem substrata za sintezo kristalnih dvojčkov rutila
- 79 | **Tina Pečarič Strnad**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Rutenij/paladij dvojno ariliranje 3-heteroarilizokinolinov
- 80 | **Črt Dragar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj, funkcionalizacija in vrednotenje nanodelcev na osnovi kopolimera mlečne in glikolne kisline
- 81 | **Jasmina Heric**, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru
Določanje molskih mas α -amilaze, β -glukozidaze, proteaze in lipaze z metodo gelske kromatografije
- 82 | **Klavdija Bastl**, IMC Fachhochschule Krems
Razjasnitev fiziologije KRAS-amplificiranega želodčnega raka
- 83 | **Uroš Vezonik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza in aplikacija tripropargilamina v pripravi novih ligandov za kovine prehoda
- 84 | **Žan Smrekar**, Kemijski inštitut Ljubljana
Računalniško načrtovanje terapevtskih proteinov
- 85 | **Gregor Kržmanc, Tadej Strah**, Gimnazija Vič
Ali lahko s pomočjo spektroskopije razložimo vpliv epigenetskih sprememb na potek bolezni?
- 86 | **Matic Jože Grdadolnik, Arne Klemen Marušič**, Gimnazija Vič
Analiza polietilena v kolenskih in kolčnih protezah z vibracijsko spektroskopijo
- 87 | **Vita Movrin**, II. gimnazija Maribor
Antikarcinogeni potencial karnozola iz rožmarina – računalniški pristop
- 88 | **Bert Kokovnik, Brina Predalič**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Ugotavljanje okuženosti navadne ali rdeče lisice (*Vulpes vulpes*) z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum* v slovenskem prostoru

- 89 | **Anja Sedušak Kljakič, Hana Remškar**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Protimikrobno delovanje macerata iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije *Legionella pneumophila*
- 90 | **Klemen Novak, Aleks Rutar**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Pridobivanje ekstraktov čilija in blaženje pekočega občutka
- 91 | **Metka Rus**, Gimnazija Kranj
Povprečna hitrost razpada antocianov v malinah v odvisnosti od temperature, pri katerih so le-te hranjene
- 92 | **Žiga Kovačič**, Il. gimnazija Maribor
Vpliv množinskega razmerja med metiltrimetoksisilanom in topilom na sintezo monolitnega fleksibilnega hidrofobnega aerogela pri normalnem zračnem tlaku
- 93 | **Miša Pintarič, Kaja Zupanič**, Il. gimnazija Maribor
Bakteriofagi v boju proti bakteriji *Serratia marcescens*
- 94 | **Neža Peternel**, Gimnazija Kranj
Preučevanje vpliva sode bikarbonate na Maillardovo reakcijo
- 95 | **Jernej Birk, Domen Hočevár, Kaja Rangus**, Gimnazija Novo mesto
Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2
- 96 | **Alja Petrovič, Urban Bauman**, Il. gimnazija Maribor
Primerjava vsebnosti antioksidantov in fenolnih spojin v različnih vrstah slovenskega medu in njihova antimikrobna učinkovitost na ustno mikrobioto
- 97 | **Jurij Malovrh, Andraž Rotar**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Huda gniloba čebelje zalege: štetje spor v medu ter tipizacija izolatov *Paenibacillus larvae*
- 98 | **Neža Perko, Maša Repinc, Lara Markelj**, Biotehniški center Naklo
Dokazovanje antimikotičnega delovanja vodnih ekstraktov na kvasovko *Candida albicans*
- 99 | **Urška Šumak**, Il. gimnazija Maribor
Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov različnih genotipov murve (*Morus alba L.*, *Morus nigra L.*, *Morus rubra L.*)
- 100 | **Špela Žunec**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana
Program Orange kot orodje za napoved lastnosti molekul
- 101 | **Arne Kolenc Šušterčič**, Gimnazija Poljane
Primerjava urejenosti dejavnikov tveganja pri pacientih po miokardnem infarktu in njihovih zdravih sovrstnikih
- 102 | **Ana Slomšek**, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo
Primerjava različnih metod izolacije evgenola iz klinčkov in analiza produktov
- 103 | **Daša Žuman, Ajda Ivezić**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Tehnologija pridelave in prehranska vrednost mlade listnate zelenjave, gojene na plavajočem sistemu

- 104 | **Mark David Longar**, Gimnazija Poljane
Umetna inteligenca v biologiji: globoki modeli za napovedovanje celičnih tipov iz podatkov o genskih izrazih
- 105 | **Julija Vodenik**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Vpliv dipeptidnih ponovitev gena C9orf72 na celične procese
- 106 | **Luka Irenej Pečan**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Kvantitativno določanje biološko aktivnih učinkovin v navadni konoplji (*Cannabis sativa subsp. sativa L.*) in njena mikrobiološka kakovost
- 107 | **Jerneja Marko**, II. gimnazija Maribor
Vpliv časa maceracije na vsebnost fenolnih spojin v vinu sorte sauvignon in modra frankinja
- 108 | **Aleš Poljanšek**, Gimnazija Ledina
Zelena ekstrakcija čebulnih listov za podaljševanje obstojnosti oljčnega olja
- 109 | **Aleksandra Vujanović**, II. gimnazija Maribor
Uporaba nanodelcev cinkovega oksida v gelskih strukturah
- 110 | **Mirjam Ogrinc, Nuša Pangerc, Eva Šubic**, Gimnazija Novo mesto
PCB ostaja, zavedanje pohaja – pomembnost zavedanja ekoloških nesreč
- 111 | **Ema Grmek**, Gimnazija Kranj
Vloga etanola in klorovodikove kisline pri ekstrakciji antocianov
- 112 | **Niko Mlinarič, Brina Poropat, Klar Daniel Opraus**, II. gimnazija Maribor
Določanje skupnih estrogenov v površinskih vodah in odpadnih vodah čistilnih naprav vzhodne in severovzhodne Slovenije
- 113 | **Goran Jocić**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Magnetni nanodelci na osnovi lizina kot potencialni dostavni sistem amoksicilina
- 114 | **Brina Godec, Timotej Pukšič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Oralno dovajanje inzulina – mit ali upanje za diabetike?
- 115 | **Klara Žos**, Biotehniški center Naklo
Obdelava mlekarских odpadnih vod z algami
- 116 | **Katja Pehlić, Kaja Vončina**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Genotipizacija gena za prionski protein pri ovcah
- 117 | **Helena Godina, Barbara Simonič**, II. gimnazija Maribor
Vsebnost težkih kovin v zemlji in rastlinah na poplavnem območju Drave v okolici Dupleka
- 118 | **Metka Rus**, Gimnazija Kranj
Vpliv polarosti topila na svetlobno degradacijo avobenzona merjeno z metodo spektroskopije
- 119 | **Karmen Rehar, Tinkara Rupnik**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Vpliv rožmarina na krompir in patogene mikroorganizme



Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!

Vloga in mesto znanja v družbah sta bila v različnih zgodovinskih obdobjih različno vrednotena, vendar vedno odločilna za nadaljnji razvoj. Obdobja blaginje so se vedno izmenjavala z bolj zapletenimi časi. Ker se svet vrti vedno hitreje, se tudi obdobja izmenjavajo s hitrostjo, ki je osupljiva, marsikomu tudi težko doumljiva. Na vrhuncu tehnoloških sprememb smo priča tudi enemu najtežjih preizkusov naših generacij. Znanost in tehnologija sta nam poleg boljšega življenja in številnih priložnosti prinesla tudi vrsto dilem, vprašanj in novih problemov, ki jih moramo rešiti. Čeprav se zdi, da je dvomov o sposobnosti in globini človeškega uma vedno več, ne moremo mimo odgovornosti, da je rešitve možno poiskati samo z več znanosti, več in bolj poglobljenimi raziskavami, več in bolj usmerjenim razvojem, več in bolj ustvarjalnim delovanjem. V središču tega pohoda v prihodnost je človek, raziskovalec in ustvarjalec. Taki se ne rodimo, taki postanemo, ko rastemo na temeljih dela in razmišljanja predhodnikov in ko stopamo na pot, ki jo tlakujemo s svojimi dosežki. Krkini nagrajenci ste že na tej poti, vaša nagrajena dela so kamni na njej in dokaz, da je vaša odločitev pravilna. Zato smo veseli in počaščeni, da ste se pridružili skoraj 3000 Krkinim nagrajencem. Tudi v prihodnje bomo podpirali in nagrajevali prizadevanja mladih raziskovalcev, kot smo svojo vlogo razumeli v preteklih petih desetletjih. Stotine uspešnih znanstvenikov in strokovnjakov potrjujejo pravilnost naše zaveze in nas hkrati zavezujejo za prihodnost.

Dr. Aleš Rotar

predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

KRKINI NAGRAJENCI 2020

KRKA PRIZE WINNERS 2020

VELIKE KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Janja Mirtič	doktorica znanosti s področja farmacije	Julijana Kristl	2826
Andreja Radman Kastelic	doktorica znanosti s področja kemije	Ines Primožič	2827
Andraž Lamut	doktor znanosti s področja farmacije	Tihomir Tomašič Danijel Kikelj	2828
Miha Drev	doktor znanosti s področja kemije	Franc Požgan Franc Perdih	2829
Miha Virant	doktor znanosti s področja kemije	Janez Košmrlj	2830

KRKINE NAGRADE NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Tine Tesovnik	doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Tadej Battelino Katarina Trebušak Podkrajšek	2831
Bojan Papić	doktor znanosti s področja medicinskih ved	Mateja Pate Darja Kušar	2832
Anita Kotar	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Janez Plavec	2833
Andraž Mehle	doktor znanosti s področja elektrotehnike	Dejan Tomažević	2834
Klara Čebular	doktorica znanosti s področja kemije	Stojan Stavber	2835



Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Mateja Šenica	doktorica bioznanosti	Franci Štampar Maja Mikulič Petkovšek	2836
Kristijan Skok	doktor medicine	Iztok Takač Uroš Maver	2837
Rok Marinič Podbršček	univerzitetni diplomirani kemik	Martin Gazvoda	2838
Sandi Svetič	magister farmacije	Rok Dreu Teja Brezovar	2839
Taja Ložar	študentka medicine	Cvetka Grašič Kuhar Tanja Jesenko	2840
Eva Praunseis	magistrica farmacije	Janez Mravljak Jure Hren	2841
Eric Frančišković	magister farmacije	Jörg P. Kutter Drago Sticker	2842
Urša Rozman	magistrica kemije	Bogdan Štefane	2843
Andreja Horvat	magistrica industrijske farmacije	Robert Roškar Žane Temova Rakuša	2844
Tjaša Pavčnik	magistrica kemije	Janez Košmrlj	2845
Neja Kuret	magistrica biotehnologije	Anja Klančnik Jerica Sabotič	2846
Nina Krištofelc	magistrica farmacije	Marija Sollner Dolenc Ester Heath	2847
Svetlana Utroša	magistrica industrijske farmacije	Robert Roškar Samo Andrenšek	2848
Barbara Vrečer	magistrica inženirka kemijskega inženirstva	Aleš Podgornik Matejka Podlogar	2849
Tina Pečarič Strnad	magistrica kemije	Bogdan Štefane	2850
Črt Dragar	magister farmacije	Petra Kocbek Eva Robbleg	2851
Jasmina Heric	magistrica profesorica biologije in magistrica profesorica kemije	Maja Leitgeb Maja Čolnik	2852
Klavdija Bastl	Bachelor of Science in Engineering (BSc)	Adam Bass Rita Seeböck	2853



Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Uroš Vezonik	univerzitetni diplomirani kemik	Janez Košmrlj	2854
Žan Smrekar	visokošolski diplomirani kemijski tehnolog	Urban Bren Janez Konc	2855

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Gregor Kržmanc	dijak	Uroš Javornik	2856
Tadej Strah	dijak	Janez Plavec Alenka Mozer	2857
Matic Jože Grdadolnik	dijak	Alenka Mozer	2858
Arne Klemen Marušič	dijak	Urban Novak	2859
Vita Movrin	dijakinja	Urban Bren Veronika Furlan	2860
Bert Kokovnik	dijak	Katja Strašek Smrdel	2861
Brina Predalič	dijakinja	Tatjana Avšič Županc Gašper Jan Simon	2862
Anja Sedušak Kljakič	dijakinja	Marko Jeran	2863
Hana Remškar	dijakinja	Martina Oder	2864
Klemen Novak	dijak	Mateja Godec	2865
Aleks Rautar	dijak		2866
Metka Rus	dijakinja	Petra Flajnik	2867
Žiga Kovačič	dijak	Zdenka Keuc	2868
Kaja Zupanič	dijakinja	Jure Škraban	2869
Miša Pintarič	dijakinja	Sandra Janežič	2870
Neža Peternel	dijakinja	Petra Flajnik	2871
Jernej Birk	dijak	Janja Pust	2872
Domen Hočevan	dijak	Jerica Sabotič	2873
Kaja Rangus	dijakinja	Ana Mitrovič	2874
Alja Petrovič	dijakinja	Tamara Šiško	2875
Urban Bauman	dijak	Anita Mustač	2876
Jurij Malovrh	dijak	Majda Golob	2877
Andraž Rotar	dijak	Darja Kušar Gašper Jan Simon	2878

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Neža Perko	dijakinja	Marjetka Kastelic Švab	2879
Maša Repinc	dijakinja		2880
Lara Markelj	dijakinja		2881
Urška Šumak	dijakinja	Katja Holnthaner Zorec Petra Kotnik Eneko Jose Madorran Esteiro	2882
Špela Žunec	dijakinja	Mojca Podlipnik Črtomir Podlipnik	2883
Arne Kolenc	dijak	Maruša Sotler Wedam	2884
Šušterčič		Miran Šebeštjen	
Ana Slomšek	dijakinja	Mojca Drofenik Čerček	2885
Daša Žuman	dijakinja	Nina Žuman	2886
Ajda Ivezić	dijakinja	Vesna Vrhovski Nina Kacjan Maršič	2887
Mark David Longar	dijak	Blaž Zupan Boštjan Žnidaršič	2888
Julija Vodenik	dijakinja	Darja Rizmal Janja Božič	2889
Luka Irenej Pečan	dijak	Marko Jeran Karmen Godič Torkar Roman Štukelj	2890
Jerneja Marko	dijakinja	Anita Mustač	2891
Aleš Poljanšek	dijak	Mihaela Skrt Ilja Gasan Osojnik Črnivec Nika Cebin	2892
Aleksandra Vujanović	dijakinja	Gregor Kravanja Darja Kravanja	2893
Mirjam Ogrinc	dijakinja	Janja Pust	2894
Nuša Pangerc	dijakinja	Dušan Harlander	2895
Eva Šubic	dijakinja	Damjan Jan Pavlica	2896
Ema Grmek	dijakinja	Petra Flajnik	2897
Niko Mlinarič	dijak	Zdenka Keuc	2898
Brina Poropat	dijakinja		2899
Klar Daniel Opraus	dijak		2900
Goran Jocić	dijak	Mateja Godec Olivija Plohl	2901



Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Brina Godec	dijakinja	Mateja Godec	2902
Timotej Pukšič	dijak	Milica Pantič Gabrijela Horvat	2903
Klara Žos	dijakinja	Borut Lazar	2904
Katja Pehlić	dijakinja	Jelka Zabavnik Piano	2905
Kaja Vončina	dijakinja	Lidija Gnidovec	2906
Helena Godina	dijakinja	Katja Holnthaner Zorec	2907
Barbara Simonič	dijakinja	Pija Rep	2908
Metka Rus	dijakinja	Petra Flajnik	2909
Karmen Rehar	dijakinja	Lidija Gnidovec	2910
Tinkara Rupnik	dijakinja	Metod Kovačič	2911

KRKINA PRIZNANJA S POSEBNO POHVALO PREJEMNIKI

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Katarina Žnidar	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Maja Čemažar
Marko Trampuž	doktor znanosti s področja kemije	Blaž Likozar
Sara Redenšek	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Vita Dolžan Maja Trošt
Eva Jarc Jovičič	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Toni Petan
Mateja Rebernik	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Marko Novinec
Zorica Latinović	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Igor Križaj Adrijana Leonardi
Jernej Bobnar	doktor znanosti s področja kemije	Boštjan Genorio Robert Dominko
Katja Murnc	magistrica farmacije	Petra Kocbek Tanja Potrč

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Barbara Hrastar	magistrica molekulske in funkcionalne biologije	Tamara Lah Turnšek Metka Novak
Nina Katarina Grilc	magistrica farmacije	Julijana Kristl Janja Mirtič
Maša Kastner	magistrica kemije	Bogdan Štefane
Sara Tekavec	magistrica industrijske farmacije	Matej Sova Ana Dolšak
Katja Schoss	magistrica industrijske farmacije	Nina Kočevlar Glavač
Luka Ciber	magister kemije	Uroš Grošelj
Tomaž Kotnik	magister kemije	Jurij Svete
Ines Kulašič	univerzitetna diplomirana kemičarka	Janez Košmrlj
Jan Meh	višji diplomirani fizioterapevt	Miroljub Jakovljevič Nataša Bizovičar Nataša Kos

KRKINA PRIZNANJA PREJEMNIKI

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Peter Grdešič	doktor znanosti s področja farmacije	Ilija German Ilić
Gregor Podrekar	doktor znanosti s področja elektrotehnike	Dejan Tomažević
Tanja Belčič Mikič	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Matjaž Sever
Luka Žnideršič	doktor znanosti s področja kemije	Helena Prosen Anita Mlakar
Katarina Kouter	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Alja Videtič Paska Tomaž Zupanc
Andreja Kežar	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Marjetka Podobnik
Tamara Serdinšek	doktorica znanosti s področja medicinskih ved	Igor But Jurij Dolenshek Andraž Stožer



Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Barbara Petovar	doktorica znanosti s področja kemije	Matjaž Finšgar
Karmen Mirtič Nina Rešetič Janja Skok	študentka veterine študentka veterine magistrica molekulske in funkcionalne biologije	Jožica Ježek Aleksandra Vergles Rataj Maja Čemažar Simona Kranjc Brezar
Tilen Urbančič	magister farmacije	Rok Frlan
Ana Lisac	magistrica kemijskega inženirstva	Aleš Podgornik
Larisa Janžič	magistrica molekulske in funkcionalne biologije	Gregor Serša Maša Bošnjak
Tisa Ževart	magistrica kemije	Martin Gazvoda
Špela Bohinec	magistrica farmacije	Zdenko Časar Andrej Šterman
Marko Kočevár	magister farmacije	Jurij Trontelj
Vita Čivnik	doktorica veterinarske medicine	Urška Jamnikar Ciglencečki Urška Kuhar
Urša Čerček	magistrica industrijske farmacije	Boris Rogelj
Metka Kovac Nina Kokalj	študentka medicine študentka medicine	Dušanka Mičetić Turk Uroš Maver
Jan Kejžar	magister inženir živilstva	Nataša Poklar Ulrih Nives Ogrinc
Tjaša Podlogar	magistrica kemije	Martin Gazvoda
Stanko Kramer	magister kemije	Peter Krajnc Muzafera Paljevac
Lea Kastelec	magistrica kemije	Mitja Kolar Gregor Novljan
Karmen Pogačar	magistrica biotehnologije	Kristina Gruden Anna Coll Rius
Simona Gričar	magistrica kemije	Iztok Turel
May Žitnik	magister farmacije	Mitja Kos Milena Radoha Bergoč
Katja Malenšek	univerzitetna diplomirana biokemičarka	Martin Gazvoda

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Anja Vombergar	študentka medicine	Petra Hudler Pia Pužar Dominkuš
Jan Hočevar	univerzitetni diplomirani kemik	Jernej Iskra Janja Zule
Jakob Jeriha	magister molekularne in funkcionalne biologije	Vita Dolžan Nikola Bešič
Gaja Markovič	študentka medicine	Mateja Erdani Kreft Nataša Resnik
Jaka Kranjc	magister industrijske farmacije	Janez Ilaš Remy Loris
Katja Krivic	magistrica farmacije	Joško Osredkar Hugon Možina
Tim Hropot Matic Kolar	študent medicine študent medicine	Sergej Pirkmajer Klemen Dolinar
Aljaž Pirnat	magister laboratorijske biomedicine	Katarina Trebušak Podkrajšek Maruša Debeljak
Maša Štraki	magistrica sanitarnega inženirstva	Mojca Jevšnik Urška Jamnikar Ciglencečki
Mitja Lindič	magister farmacije	Joško Osredkar Janez Vodičar
Marko Gabrovšek	univerzitetni diplomirani kemik	Janez Košmrlj
Mišel Hozjan	univerzitetni diplomirani kemik	Uroš Grošelj
Teo Makoter	univerzitetni diplomirani inženir kemijske tehnologije	Petra Kotnik Maša Knez Hrnčič
Neža Drofenik	univerzitetna diplomirana kemičarka	Krištof Kranjc
Danijel Lavrič	diplomiran inženir kemijske tehnologije	Petra Kotnik Maša Knez Hrnčič
Polona Klemenčič	diplomirana inženirka kemijske tehnologije	Marina Klemenčič
Jernej Nezman	dijak	Valerija Tkalec
Melanie Tavčar Lana Kocuvan	dijakinja dijakinja	Mateja Godec Barbara Petovar

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Nika Drinovec Maruša Godler Lara Ropič Bizjak	dijakinja dijakinja dijakinja	Marjetka Kastelic Švab
Luka Skeledžija Kris Flajs	dijak dijak	Alenka Mozer David Kocman
Brina Manfreda Golob Teja Okorn	dijakinja dijakinja	Darja Rizmal Miha Slapničar
Špela Popovič	dijakinja	Irena Drogenik
Iva Baša Teja Zajc Manca Luštek	dijakinja dijakinja dijakinja	Goran Pešič Kostja Makarovič
Neja Rečnik Katarina Perc	dijakinja dijakinja	Uroš Mikolič
Lan Patrick Pal Eva Pešti	dijak dijakinja	Nina Žuman
Laura Žajdela Lana Bajec	dijakinja dijakinja	Rok Demič Katarina Rudolf Pilih
Julija Wegener	dijakinja	Erika Cvetko Nejc Umek
Luka Špec	dijak	Mojca Višček
Ana Breznik	dijakinja	Petra Žigert Pleteršek Zdenka Keuc
Adis Škrijelj Vital Škof Luka Žgajnar	dijak dijak dijak	Franja Prosenc Tjaša Klemen
Vid Nemec Luka Čiča	dijak dijak	Marko Jeran Mitja Drab
Lejla Denša Mia Hozjan	dijakinja dijakinja	Mateja Godec Darija Cör
Brina Godec	dijakinja	Jernej Jakelj
Zala Božanić Jana Ušen	dijakinja dijakinja	Mojca Alif Jurij Stojan

Prejemnik	Naziv	Mentor, somentor
Karolina Mulec Anika Sedmak	dijakinja dijakinja	Magdalena Klasinc Zala Zorenč Tatjana Košmerl
Anja Mihalič Nika Petrovčič	dijakinja dijakinja	Tjaša Klemen Matejka Podlogar Anja Černoša
Kaja Žučko	dijakinja	Helena Kregar Rajko Slapnik
Andraž Levstek	dijak	Darja Silan Aljoša Vodopija
Nuša Jurkovič	dijakinja	Marija Meznarič Tatjana Gregorc
Urban Malavašič Marin Gazvoda de Reggi	dijak dijak	Nika Lovšin Branka Klemenčič
Nina Knoll Ajda Turk Maša Mesojedec	dijakinja dijakinja dijakinja	Janja Pust Darko Siuka
Neža Peternel	dijakinja	Petra Košir



Razpis za jubilejne 50. Krkine nagrade je sovpadel z izzivi, ki jih je pred vse, še posebej pa pred učence, dijake in študente, postavila epidemija koronavirusa. Kljub vsemu pa je bil odziv mladih raziskovalcev za vse člane Sveta Sklada Krkinih nagrad navdušujoč. Bil je rekorden v skoraj vseh pogledih, hkrati s kvantitativnimi presežki pa se je spet pokazala rastoča kakovost nalog.

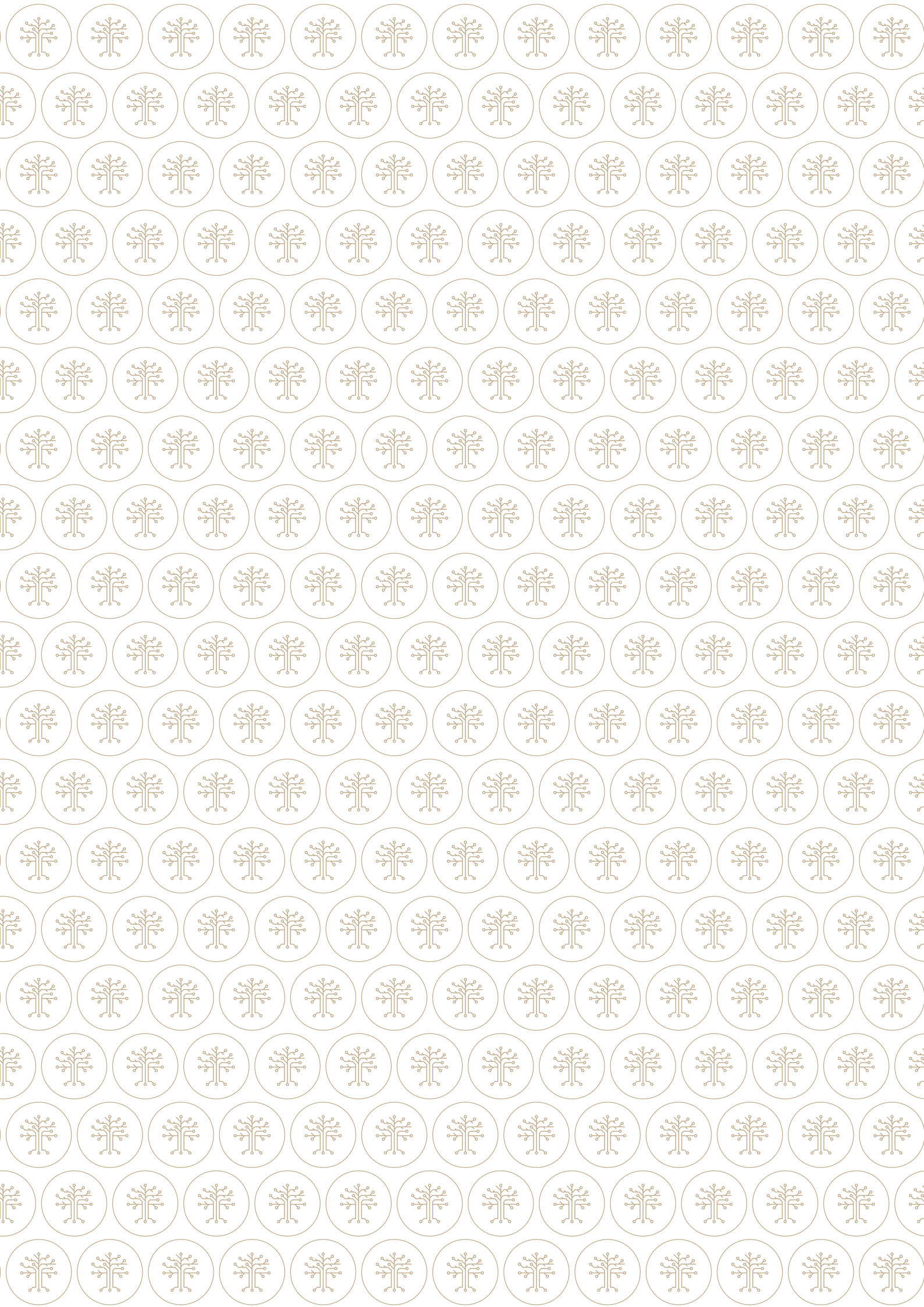
Vsem mladim raziskovalcem, tako dijakom srednjih strokovnih šol in gimnazij kot študentom vseh študijskih stopenj, se iskreno zahvaljujem. Prav tako se zahvaljujem mentorjem, somentorjem in vsem ostalim, ki so mladim raziskovalcem pomagali uresničiti njihove visoko postavljene cilje in želje in jim omogočili raziskovalno delo ter pripravo nalog.

Mladi raziskovalci s svojo predanostjo zastavljenim ciljem, delovnim entuziazmom in znanjem ob pomoči mentorjev in raziskovalnega okolja vztrajno dokazujejo, da lahko dosežejo zvezde. Vsem mladim, ki ste se prijavili na letošnji jubilejni razpis, želim, da svoj raziskovalni zanos negujete in ga nadgrajujete tudi v prihodnje na vaši nadaljnji življenjski poti in s tem prispevate k napredovanju družbe in svoji osebni rasti.

Ker bo tudi novo šolsko oziroma študijsko leto polno izzivov za vse, tako pedagoge kot dijake oziroma študente, prosim vse pedagoge in mentorje ter vodstva šol in raziskovalnih institucij, da s še večjim entuziazmom pomagata mladim razvijati in udeležati njihove raziskovalne potenciale. Z ustvarjalnostjo in v pozitivnem vzdušju bodo mladi raziskovalci s svojimi dosežki postavili zgled in luč na obzorju, ki ji bodo drugi mladi lahko sledili.

Vsem letošnjim prejemnicam in prejemnikom Krkinih nagrad in priznanj čestitam tako v svojem imenu kot tudi v imenu Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad in jim želim obilo raziskovalnih, študijskih in osebnih uspehov tudi v prihodnje.

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



50. KRKINE NAGRADE

50th KRKA PRIZES

VELIKE KRKINE NAGRADE

KRKA GRAND PRIZES

PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

PRIZE WINNERS

DR. JANJA MIRTič

Dr. Janja Mirtič je že od otroštva naravoslovka in raziskovalka. Vedno jo je zanimalo, kako in zakaj stvari delujejo, pa naj gre za človeško telo ali tekoče stopnice. Navdušenost nad biologijo, kemijo in fiziko jo je iz okolice Trebnjega pripeljala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Po zaključku magistrskega študija farmacije se je na Katedri za farmacevtsko tehnologijo sprva zaposlila kot asistentka, nato pa kot mlada raziskovalka. Tam je izvajala svoje raziskovalno delo v okviru doktorskega študija Biomedicina, smer Farmacija. Zlasti dragocene so bile izkušnje iz laboratorijev v tujini in pri domačih partnerskih ustanovah, kjer je pridobila znanje s širokega interdisciplinarnega področja farmacije. Svoje akademsko znanje, izkušnje in kompetence je prenesla v industrijsko okolje, saj je kot razvojna tehnologinja zaposlena v Krkinem farmacevtskem razvoju.



Naklonjenost interdisciplinarnosti

Za raziskovanje farmacevtske tehnologije me je navdušila mentorica na magistrskem študiju prof. dr. Saša Baumgartner, ki mi je pokazala, da zdravila niso samo učinkovine, ampak je za njihovo delovanje ključna končna farmacevtska oblika. Prek mentorice na doktorskem študiju prof. dr. Julijane Kristl sem spoznala še farmacevtsko nanotehnologijo, ki se ukvarja z dostavo učinkovin, le da so dostavni sistemi na nanometrski ravni. Moje raziskovalno delo je prispevek k znanju o uporabnosti polielektrolitov (polimerov z nabojem), predvsem iz skupine biopolimerov (polimerov naravnega izvora), za izdelavo dostavnih sistemov in tudi širše. Doktorat se dotika še zdravljenja parodontalne bolezni, kjer si raziskovalna skupina prizadeva za vpeljavo dodatne probiotične in regenerativne terapije kot komplementarne standardnemu zdravljenju.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovanju me navdušuje dejstvo, da ga ni nikoli konec. Vedno znova se pojavljajo nove informacije in zastavljajo nova vprašanja. Najboljše zamisli se mi po navadi porodijo med premlevanjem o problemu ali pa v pogovorih z drugimi raziskovalci, strokovnjaki drugih strok ali operaterji na napravah. Če si pripravljen poslušati in »sintetizirati« znanje, lahko tudi na drugih področjih hitro najdeš rešitve za svoje izzive.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor z vizijo, sredstvi in povezavami lahko omogoči raziskovanje na visoki ravni. Moja mentorica mi je utrla številne poti, ki bi mi bile sicer nedostopne. Še posebej cenim, da mi je omogočila dodatno strokovno in osebno izpopolnjevanje, tako da sem imela ob zaključku doktorata občutek, da imam v žepu veliko uporabnih kompetenc.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Med nastajanjem doktorskega dela sem bila še posebej hvaležna za mesto mlade raziskovalke, saj sem se lahko v celoti posvetila raziskovalnemu delu. Res pa je, da raziskovalnega dela težko ne nosiš domov. Ugotovila sem, da mi dejavni odmori v hribih, na smučeh, pri plesu ali drugje najbolj pomagajo premagovati miselne blokade. Možgani potrebujejo malo počitka, da lahko na kakšen problem pogledamo z drugega zornega kota.

OSEBNE LASTNOSTI

V zasebnem in poklicnem okolju me poznajo kot organizatorko oziroma povezovalko. Rada svetujem,

če prepoznam rešitev, ki sem jo morda videla v kakšnem drugem okolju in jo je mogoče vpeljati v problematično nalogo. Moja dobra in včasih slaba lastnost je vztrajnost, ki lahko preraste v trmoglavost. Tako tudi v težkih okoliščinah vztrajam toliko časa, da stvari rešim po svojih najboljših močeh.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade so še posebej pomembne za mlajše raziskovalce na začetku poti, saj jim pomenijo dodatno vzpodbudo in zagon za raziskovanje. Vse pohvale je vredno dejstvo, da Krkine nagrade obstajajo že pol stoletja. Zame je nagrada predvsem potrditev kakovosti večletnega raziskovalnega dela, hkrati pa prinaša tudi določeno mero prepoznavnosti. Vesela sem, da sem se pridružila vrsti Krkinih nagrajencev, med katerimi so tudi moji sodelavci.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Raziskovalci moramo biti vztrajni in potrpežljivi. Sprejeti moramo, da večina stvari ne gre po načrtih in da so negativni rezultati del raziskovanja. Iz vsakega neuspelega eksperimenta se lahko naučimo nekaj novega. To pa je temelj za resnično dobre raziskave.

NAJBOLJŠI NASVET

Nikoli ne veš vsega o okoliščinah, projektu, raziskovalni tematiki ..., zato moraš biti vedno pripravljen poslušati, se učiti ter sprejemati nove informacije in zamisli.

ŽIVLJENJSKO VODILO

Ničesar v življenju se ni treba bati, treba je samo razumeti.

(Marie Curie)

Neizkoriščen potencial polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike

Polielektroliti so polimeri, katerih monomerne enote nosijo skupine, ki jih je mogoče pri določenem pH ionizirati, zaradi česar imajo naboj. Glavni cilj doktorske disertacije je bil raziskati nove možnosti uporabe polielektrolitov pri razvoju naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotične bakterije. Poudarek je bil na polielektrolitih, ki izvirajo iz narave (na polisaharidih, kot sta alginat in hitosan) in so biokompatibilni ter biorazgradljivi, primarni cilj pa zdravljenje parodontalne bolezni. To je vnetna bolezen, katere primarni vzrok je mikrobnó neravnovesje. Trenutni terapevtski pristopi ne vodijo do popolne ozdravitve, zato obstaja potreba po razvoju novih načinov zdravljenja, ki bi zmanjšali bakterijske zobne obloge, v ustih ponovno vzpostavili mikrobnó ravnovesje, modulirali imunski odziv in obnovili parodontalna tkiva.

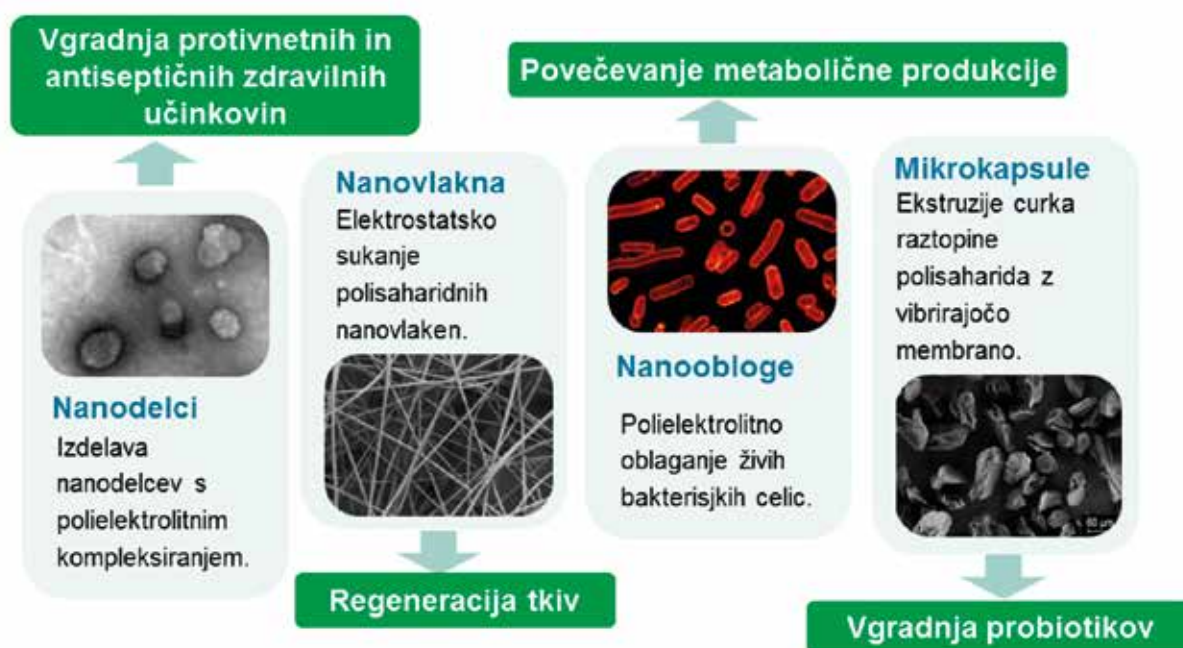
V prvem delu naloge smo raziskali in opisali polielektrolitno kompleksiranje alginata z različnimi vrstami premreževal kot metodo za tvorbo nanodelcev. Ne glede na vrsto premreževala vse polielektrolitne kompleksacije vodijo v nastanek nanodelcev ob upoštevanju ustreznega molarne razmerja med komponentama. Nanodelci pa imajo glede na uporabljeno premreževalo različne lastnosti, kot so hidrodinamska velikost, površinski naboj in stabilnost. S termodinamskega vidika je nastanek nanodelcev s polielektrolitno kompleksacijo vedno spontan, neodvisno od uporabljenega premreževala. Tako smo pokazali, da je polielektrolitno kompleksiranje preprosto in blag postopek za tvorbo nanodelcev, ki je zanimiv za vgrajevanje zdravilnih učinkovin ali celic, od bioloških zdravil in matičnih celic do slabo topnih zdravilnih učinkovin, pri katerih lahko značilnosti strukture kompleksa omogočajo večjo topnost. V nadaljevanju smo razvili inovativne nanodelce, izdelane s kompleksiranjem površinsko aktivne snovi, ki je hkrati antiseptik – cetilpiridinijevega klorida in polielektrolita alginata. Kompleksacija polielektrolitov z nasprotno nabitimi površinsko aktivnimi snovmi je kooperativen proces, saj se molekule površinsko aktivnih snovi najprej samozdružujejo v micelle, ki nato premrežijo verige polielektrolita. Izdelani cetilpiridin-alginatni nanodelci so imeli hidrodinamski premer med 140 nm in 200 nm, negativen zeta potencial in sferično morfologijo. Te nanodelce smo uporabili za povečanje topnosti ibuprofena, nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine, ki je slabo topna v vodi. Zaradi narave nastanka micelov cetilpiridina v prisotnosti alginata smo povečano topnost ibuprofena dosegli pri končni koncentraciji površinsko aktivne snovi, ki je manjša od kritične micelarne koncentracije. Z uporabo transmisijske elektronske mikroskopije smo tudi pokazali, da kljub vgradnji slabo topne učinkovine micelarne strukture, premrežene v alginatu, niso porušene, saj so bili nanodelci videti kot sestavljeni iz manjših podenot (pribl. 17 nm). Tako smo razvili inovativne nanodelce s kombinacijo antiseptične in protivnetne zdravilne učinkovine, ki jih lahko apliciramo v obzobni žep na mestu okužbe in vnetja, kar zagotavlja možnost boljšega lokalnega zdravljenja parodontalne bolezni.

V drugem delu smo z metodo elektrostatskega sukanja uspešno izdelali nanovlakna z visokim deležem alginata (> 85 % m/m). Prevelika prevodnost polimerne raztopine onemogoča elektrostatsko sukanje, kar je eden od glavnih razlogov, da ne moremo izdelati samo alginatnih nanovlaken. Z uporabo fleksibilnega in elektronevtralnega polietilen oksida v polimerni zmesi zmanjšamo prevodnost raztopine alginata in s tem naredimo raztopino dveh polimerov primerno za elektrostatsko sukanje. Z dodajanjem že manjših količin polietilen oksida z visoko molekulsko maso smo pripravili mešanice polimernih raztopin z ustreznimi reološkimi in prevodnimi lastnostmi, ki so omogočile elektrostatsko sukanje. Z multivariatno analizo in spreminjanjem parametrov raztopine smo lahko natančno prilagajali premer izdelanih nanovlaken. Tako smo uspešno izdelali nanovlakna z visoko vsebnostjo biorazgradljivega polisaharida alginata, ki predstavljajo učinkovit ogrodni material za uporabo v regenerativni medicini.

Zadnji del je bil usmerjen v vgrajevanje bakterijskih celic. Z metodo nanooblaganja oziroma plastenja smo obložili posamezne žive bakterijske celice. Večje količine probiotičnih bakterij pa smo vgradili v alginatne mikrokapsule. V prvem primeru smo preizkusili različne polielektrolite in proučili njihove učinke na celice. Prvi smo pri preiskovanju polielektrolitnega nanooblaganja uporabili mikroskopijo z vzbujenim praznjenjem emisije ter pokazali njeno

prednost pred običajno fluorescentno mikroskopijo in uporabnost za opazovanje nanooblog na živih bakterijskih celicah. Uspešnost polielektrolitnega oblaganja posameznih bakterijskih celic je bila močno odvisna od uporabljenega celičnega seva. Zdi se, da je *E. coli* odporna proti polielektrolitnemu oblaganju in omogoča nastanek tankega sloja na površini bakterijske celice. Nasprotno pa *P. stutzeri* internalizira polielektrolit (ne glede na njegovo molekulsko maso, vrsto ali koncentracijo), kar ima za posledico toksičnost celic te vrste. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da je učinek polielektrolitnega oblaganja odvisen predvsem od uporabljenega seva bakterijskih celic in ne od lastnosti uporabljenega polielektrolita.

Alginate mikro kapsule za vgradnjo probiotikov smo pripravili z ekstruzijo curka alginatne disperzije s probiotiki ter razbijanjem v kapljice z membransko vibracijsko tehnologijo. Ta tehnika omogoča vgrajevanje dodatnih pomožnih snovi (tj. krio- in lioprotektantov), potrebnih za naknadno liofilizacijo proizvedenih mikrokapsul, kar omogoča njihovo dolgoročno stabilnost v posušeni obliki. Dodatno smo izdelane mikrokapsule polielektrolitno obložili s hitosanom, kar je vodilo v nastanek bolj nagubane in povečane površine mikrokapsul ter spremembo njihovega površinskega naboja. Na ta način se je povečal tudi mukoadhezivni potencial s hitosanom obloženih mikrokapsul. Razvite mikrokapsule predstavljajo nov dostavni sistem za probiotike, ki omogoča preživetje bakterij med izdelavo in shranjevanjem, zadostno rehidracijo mikrokapsul v stiku z medijem, kar omogoči izmenjavo hranil, kisika in presnovnih produktov, in s tem uspešno oživitev probiotikov, rekolonizacijo okoliških površin in kompeticijo s parodontopatogenimi bakterijami. Izdelane mikrokapsule so učinkovit dostavni sistem za dostavo probiotikov v parodontalne žepce.



Slika 1. Shema glavnih področij raziskovalnega dela, namenjenega uporabi polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike.

Rezultati doktorske disertacije prispevajo k boljšemu razumevanju polielektrolitov in njihovih prednosti za razvoj dostavnih sistemov. Alginat kot osrednji polielektrolit je prepoznan kot pomožna snov, ki ima s funkcionalnostjo povezane lastnosti, ki so uporabne za razvoj polielektrolitnih nanodelcev, nanovlaken in mikrokapsul. Takšni dostavni sistemi imajo tudi lastnosti, ki izhajajo iz alginata, kot so biorazgradljivost, biokompatibilnost, mukoadhezivnost ali prirejeno sproščanje, kar vse prispeva k dodani vrednosti izdelanega dostavnega sistema in zdravila kot celote. Doktorska disertacija opredeljuje novo znanje s področja polielektrolitnega kompleksiranja, elektrostatskega sukanja polisaharidov in vgrajevanja bakterij, ki bo omogočilo širšo uporabo polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike.

Unexploited Potential of Polyelectrolytes for Development of Advanced Delivery Systems of Drugs and Probiotics

Polyelectrolytes are polymers whose repeating units carry functional groups that can be ionized at a certain pH, making the polymers charged. The main objective of this doctoral dissertation was to resolve the challenges of utilizing polyelectrolytes in the development of advanced delivery systems for drugs and probiotic bacteria. The focus was on polyelectrolytes that originate from nature (i.e. polysaccharides, such as alginate and chitosan) that are biocompatible and biodegradable, with a primary objective of periodontal disease treatment. Periodontal disease is an inflammatory disease primarily caused by microbial imbalance. Current therapeutic approaches lead only to short-term recovery, thus there is a need for the development of novel treatments that would reduce the periodontal plaques, re-establish oral microbial balance, modulate the immune response, and regenerate the periodontal tissues.

In the first part, polyelectrolyte complexation of alginate with different classes of crosslinkers as a method of nanoparticle formation was thoroughly investigated and described. The formation of nanoparticles was shown over limited ranges of molar ratios that were specific for each crosslinker. Different crosslinkers led to the formation of alginate nanoparticles with different hydrodynamic size, stability and structure. We thermodynamically showed that nanoparticle formation is spontaneous, led by entropy, even when different classes of crosslinkers are used. We proved that polyelectrolyte complexation is a simple and mild procedure for nanoparticle formation, which is of great interest for drug or cell incorporation – from the biopharmaceutical drugs and stem cells where the mildness of the procedure is beneficiary, to the poorly soluble drugs where the characteristics of the complex structure enable increased solubility. Furthermore, completely novel surfactant-polyelectrolyte-complex nanoparticles were developed. We showed that the surfactant and antiseptic cetylpyridinium chloride is bound to the polyelectrolyte – alginate in a cooperative interaction. This cooperativity signifies that cetylpyridinium ions bind to the alginate polyanion in the form of micelle-like aggregates that are threaded on a polymer chain like pearls on a string. Thus, cetylpyridinium-alginate nanoparticles were formed in the water with hydrodynamic diameter from 140 nm to 200 nm, negative zeta potential and spherical morphology. These cetylpyridinium-alginate nanoparticles were further utilised for increasing water solubility of ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, at final surfactant concentration lower than the critical micellar concentration. At first, we showed using transmission electron microscopy that the micellar structures enveloped in alginate still exist, even when ibuprofen is incorporated since the nanoparticles looked like being composed of smaller (~17 nm) subunits. We developed innovative nanoparticles with the combination of an antiseptic and anti-inflammatory drug that could be administered into the periodontal pocket at the site of infection and inflammation, providing a better local treatment option.

In the second part, nanofibers with a high proportion of alginate (> 85% w/w) in composition were successfully electrospun. Too high conductivity of a polymer solution can inhibit nanofiber formation, and this is one of the reasons that alginate alone cannot be electrospun. However, the shielding effect of highly flexible, neutral poly(ethylene oxide) can sufficiently lower the conductivity and make the polymer blend solution electrospinnable. Thus, with the addition of high molecular weight poly(ethylene oxide), blend solutions of appropriate rheological and conductometric properties were made, which enabled electrospinning of alginate. Moreover, using multivariate analysis and by varying different solution parameters the nanofiber diameter could be finely tuned. As such, nanofibers with a high content of a biodegradable ionogenic polysaccharide that can provide an efficient scaffold material for the use in regenerative medicine were successfully made.

The last part focused on bacterial cell entrapment. The bacteria were physically entrapped as single cells using a layer-by-layer deposition method. Microcolonies were inserted into alginate microcapsules as a probiotic delivery system. In the first case, the effects of different polyelectrolytes on living cells were tested. First, we applied the

stimulated emission depletion microscopy to the investigation of polyelectrolyte coating, and we showed its supremacy against conventional fluorescent microscopy and usefulness for observation of nanocoatings on live bacterial cells. The successfulness of the layer-by-layer polyelectrolyte coating of single bacterial cells was mainly dependent on the cell strain used. *E. coli* seems to be resistant to such coating and a thin layer on the surface of the bacterial cell can be formed, whereas *P. stutzeri* engulf the polyelectrolyte (regardless of the molecular weight, type or concentration) that results in cell toxicity. Contrary to the expectation, the effects of polyelectrolyte coating are mainly dependent on the bacterial strain used, and not on the polyelectrolyte properties.

Alginate microcapsules for probiotic incorporation were innovatively prepared by prilling of alginate dispersion with probiotics with membrane vibration technology into a calcium solution followed by lyophilisation to produce dry and thus more stable microcapsules. We also applied additional chitosan coating on alginate microcapsules that led to rougher microcapsule surfaces, their higher surface area, and charge reversal. Consequently, the microcapsules' mucoadhesion potential was increased. Such microcapsules presented a novel probiotic delivery system that enabled their survival during processing and storage, quick and sufficient rehydration of microcapsules that allow an exchange of nutrients, oxygen and metabolic products to support successful probiotic revival, recolonization of surrounding surfaces and competition with periodontopathogenic bacteria. Thus, such microcapsules could serve as an efficient probiotic delivery system into the periodontal pockets.

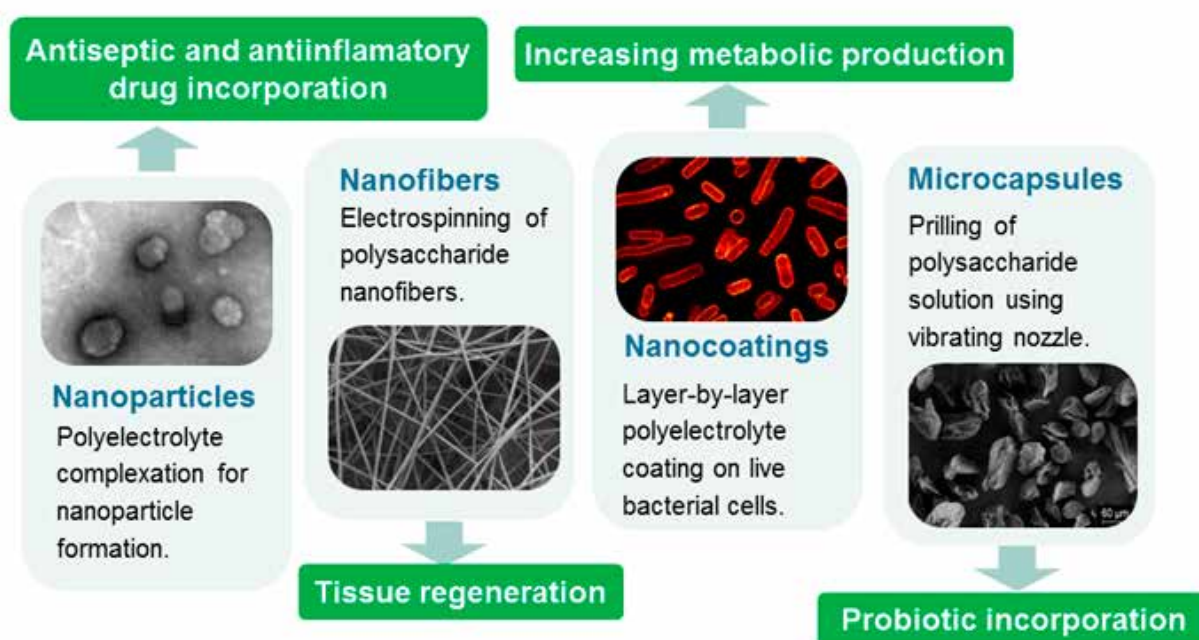


Figure 1: Scheme of the main research topics in the field of utilisation of polyelectrolytes for the development of advanced delivery systems for active pharmaceutical ingredients and probiotics

Overall, these results have contributed to a better understanding of polyelectrolytes and their use in the development of drug delivery systems. Alginate as the main polyelectrolyte of interest was recognized as an excipient with functionality-related characteristics useful in the development of nanoparticles, nanofibers or microcapsules. Such delivery systems also carry characteristics that are brought by alginate in the composition, such as biodegradability, biocompatibility, mucoadhesiveness, or modified release, all of which add value to the delivery system and the final medicine made. This doctoral dissertation defines new knowledge on the topics of polyelectrolyte complexation, electrospinning of polysaccharides and encapsulation of bacterial cells that will enable wider use of polyelectrolytes for the development of advanced delivery systems for drugs and probiotics.

DR. ANDREJA RADMAN KASTELIC

Andreja Radman Kastelic je pokazala zanimanje za naravoslovje že v osnovni šoli, ki jo je obiskovala v Žakanju na Hrvaškem. Pozneje sta jo na Splošni gimnaziji v Karlovcu navdušili dve mogočni znanstveni veji – farmacija in kemija. Odločila se je za kemijo in se vpisala na Naravoslovno-matematično fakulteto v Zagrebu. »Pravi občutek, kaj je kemija, sem dobila na fakulteti,« pravi. »Takrat se ti odprejo oči in na kemijo in življenje začneš gledati s povsem drugega zornega kota. Že na vsakdanje stvari, kot je kuhanje čaja, gledaš na bolj znanstven način.« Zaposlena je v Krki, v Razvoju in raziskavah učinkovin, kjer v enoti Kemija opravlja delo, ki ga ima rada. Skupaj s sodelavci se vsak dan sooča z novimi izzivi, ki jih pripeljejo do novih inovativnih ugotovitev in rešitev.



Uživam v razgibanosti, ki mi jo ponuja raziskovanje

Primarno področje mojega raziskovanja je organska sintezna kemija. To smer sem izbrala že v zgodnjem študijskem obdobju in z njo nadaljevala tudi na poklicni poti. Organska sinteza se prepleta z različnimi vejami kemije, tudi z analizo in fizikalno kemijo, ki mi prav tako nista tuji. Pri doktorskem delu sem se osredotočila na pripravo spojin derivatov kinuklidina. Te so pokazale velik potencial za nadaljnje raziskave tako na področju protimikrobnega delovanja kot zaviranja tarčnih encimov, saj se v zadnjem času vse več govori o odpornosti bakterij proti antibiotikom, hkrati pa uporaba zdravil močno narašča. Vse bolj se povečuje tudi ekološka osveščenost, saj stremimo k minimizaciji porabe energije in proizvodnje odpadkov. Tudi v svojih raziskavah sem uporabila mehanokemijski pristop, ki je v primerjavi s klasično organsko kemijo v bučki bolj ekološki. Cilj je namreč zmanjšati količine topila, temelji pa na izrabljanju mehanske energije, kar ni le bolj ekološko, ampak tudi bolj ekonomično.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Raziskovalno delo mi je zelo všeč, saj sem že po naravi radovedna in ne maram monotonosti. Uživam v razgibanosti in svobodi, ki mi jo ponuja moje delo. Pri raziskovanju je vedno tako, da ko se ena vrata zaprejo, se druga odprejo. Vedno naletiš na težavo, za katero poiščeš rešitev in s tem dobiš širino.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor ima vlogo koordinatorja. Na začetku je on tisti, ki skrbi, da delo poteka v pravo smer, dokler se tega ne naučimo sami. Moja mentorica je bila prof. dr. Ines Primožič. Zelo sem ji hvaležna, da sem lahko med izrednim podiplomskim študijem eksperimentalno delo opravljala zunaj delovnega časa. Skupaj z mano je tako tudi ona žrtvovala precej svojega prostega časa ob popoldnevih in vikendih, za kar bi se ji rada še enkrat zahvalila.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Poskušam najti ravnovesje med osebnim in profesionalnim življenjem. Ne uspe mi vsakič, a se trudim. Vsi imamo dobre in slabe dneve. Najpomembnejše je, da imamo ob sebi ljudi, ki nas imajo radi in nam dajejo podporo. Profesionalno se ukvarjam s kemijskim razvojem učinkovin in tako svoj znanstveni potencial usmerjam v raziskovanje novih sinteznih poti in pristopov.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Pridevniki, ki bi me po mojem mnenju najbolj opisali, so vztrajna, ambiciozna, odločna, radovedna, spoštljiva in odgovorna. Verjamem vase, zato sem tukaj, kjer sem.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Treba je iti v korak s časom ter slediti trendom in inovacijam. Krka tako s štipendijami kot z nagradami podpira in opogumlja mlade ljudi. Daje jim priložnost, da predstavijo svoje delo, hkrati pa podpira raziskovanje, ki je zelo pomembno za napredek. Svojo doktorsko disertacijo sem prijavila na jubilejni razpis, ker sem verjela, da bodo prepoznali trud, kakovost in količino dela, ki sem ga vložila v njeno pripravo. To je nagrada za moje delo, moj prosti čas, ki sem ga vložila v študij, in za vsak delovni vikend.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Če si nekaj močno želite in v to močno verjamete, se bo tudi uresničilo. Na poti k svojemu cilju boste naleteli na ovire, ki naj vam predstavljajo izzive in ne težave, saj se na porazih učimo zmagovati. Lepota raziskovanja je ravno v tem, da se od raziskovalca pričakujejo inovativnost, prilagodljivost in iskanje najboljših rešitev.

NAJBOLJŠI NASVET

List papirja nič ne stane, naj bo to prošnja za službo, vloga za štipendijo ali prijava za nagrado. Pomemben je pogum!

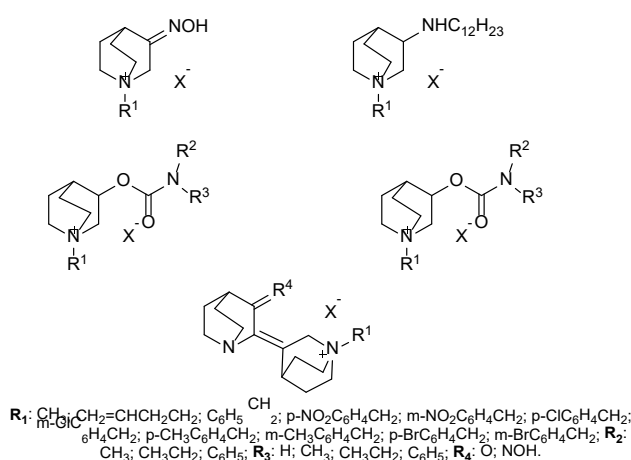
ŽIVLJENJSKO VODILO

Kakršne so naše misli, takšno je naše življenje. Pozitivne namere vedno zasnujejo dobra dejanja. Bodimo POZITIVNI!



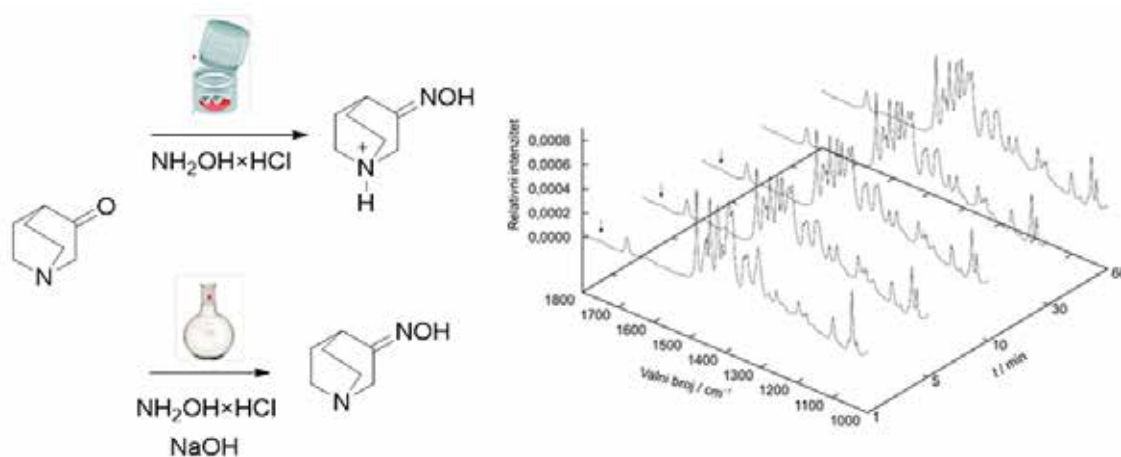
Priprava in karakterizacija bioaktivnih derivatov 1-azabicyklo[2.2.2]oktana

1-azabicyklo[2.2.2]oktan ali kinuklidin je alifatska bicyklična spojina, ki vsebuje terciarni dušikov atom. Kinuklidin je sestavni del mnogih naravnih in sintetičnih biološko aktivnih spojin. Namen naloge je bil pripraviti knjižnico 3-substituiranih derivatov kinuklidina za raziskovanje njihovih bioloških lastnosti, kot so interakcije s holinesterazami in antimikrobni potencial (Shema 1). Pripravili smo 42 spojin, od kateri jih je bilo 37 sintetiziranih prvič. Vse spojine smo pripravili z zadovoljivim izkoristkom in jih okarakterizirali s standardnimi analiznimi metodami.



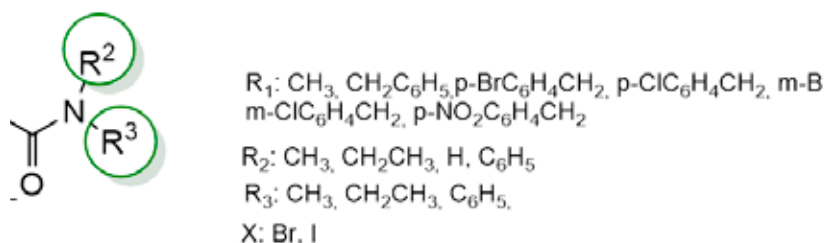
Shema 1. Splošne strukturne formule pripravljenih spojin.

V prvem delu naloge smo pripravili 3-hidroksiiminokinuklidin in njegove kvarterne derivate, ki doslej še niso bili opisani v literaturi. Raziskali smo možnosti uporabe za okolje neškodljive mehanokemijske sinteze oksima karbonilnih spojin, ki vsebujejo dušikov atom različne bazičnosti. Reakcijo smo spremljali s FTIR-spektroskopijo (Slika 1). Reakcije smo izvedli s hidroksilam-nijevim kloridom brez dodatka ali z dodatkom katalitske količine topila in brez dodatka baze. Dokazali smo, da do reakcije prihaja tudi v primeru, ko so bazični dušikovi atomi karbonilnih spojin protonirani, vendar je počasnejša kot ob pretvorbi nevtralnih spojin. Oksime karbonilnih spojin z dušikovim atomom manjše bazičnosti smo pripravili z mehanokemijskim pristopom z dodatkom piridina kot baze. Na ta način smo razvili za okolje primernejšo metodo sinteze oksima.

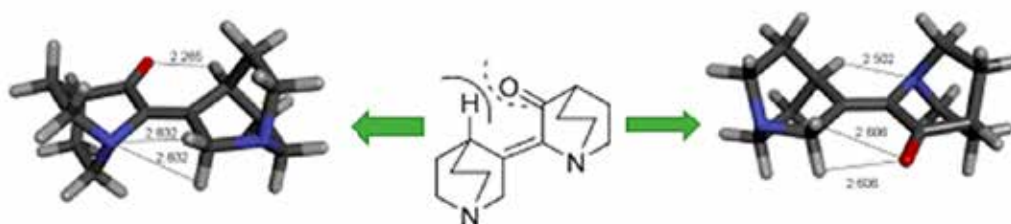


Slika 1. Sinteza oksima 3-hidroksiiminokinuklidina in spremljanje reakcije s FTIR-jem.

Pripravili smo štiri karbamate kinuklidin-3-ola in njihove kvarterne derivate (Shema 3). Kiralni (*R*)-alkohol smo pridobili z resolucijo racemata z uporabo *L*-vinske kisline. Za določanje geometrije posameznih enantiomerov spojin v aktivnem mestu acetil- in butirilholinesteraze smo uporabili molekulsko modeliranje. Dokazali smo, da je od vseh sintetiziranih karbamatov najboljši inhibitor holinesteraz *N,N*-dietilni derivat z benzilnim substituentom na kinuklidinskem obroču. Ugotovili smo, da velikost substituentov na dušikovem atomu karbamata ne vpliva na hitrost karbamilacije encima.

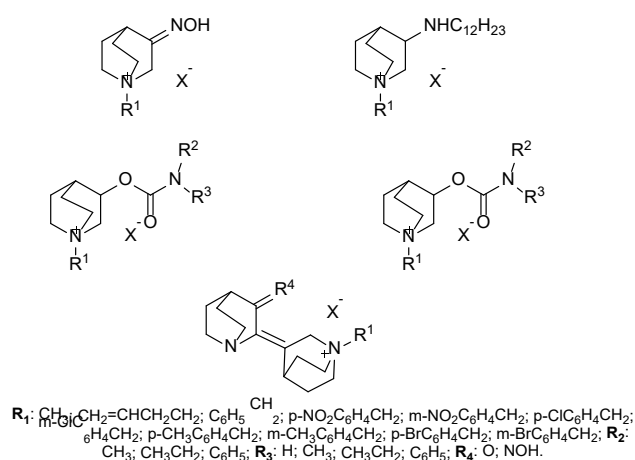


V zadnjem delu naloge smo pripravili kondenzacijske produkte kinuklidin-3-ona. Strukturni parametri, pridobljeni s pomočjo molekulskega modeliranja, potrjujejo nastanek obeh izomer, pri čemer je večji delež *E*-izomere (Slika 3). Pripravljena sta dva kvarterna derivata in ketoksim.



Synthesis and Characterization of Bioactive Compounds Based on 1-Azabicyclo[2.2.2]octane

1-Azabicyclo[2.2.2]octane, also known as quinuclidine, is a saturated bicyclic system with a bridgehead nitrogen atom. It is a structural feature of several natural and synthetic physiologically active compounds. The main purpose of this thesis was the preparation of a series of 3-substituted derivatives of quinuclidine and determination of their biological properties: interactions with cholinesterases and antimicrobial potential (Scheme 1). In total, 42 compounds were prepared, among which 37 for the first time. All compounds were prepared in satisfactory yields and were characterized by standard analytical methods.



Scheme 1. General structural formula of prepared compounds

In the first part of the thesis, 3-hydroxyiminoquinuclidine and its quaternized derivatives were prepared. Furthermore, the possibility of mechanochemical synthesis of oximes (without the addition of external base and with catalytic amount of solvent) using carbonyl compounds that have nitrogen atom of various basicity was determined. FTIR spectroscopy was used for the reaction monitoring (Figure 1). Reaction rate for the synthesis of oximes from the starting compounds that had protonated basic nitrogen atom was much slower than in ones with neutral nitrogen. For the preparation of oximes with less basic nitrogen atom, pyridine was successfully used as a base for the mechanochemical reaction. Thus, a rapid, solventless green approach for the synthesis of amino oximes using mechanochemistry was developed.

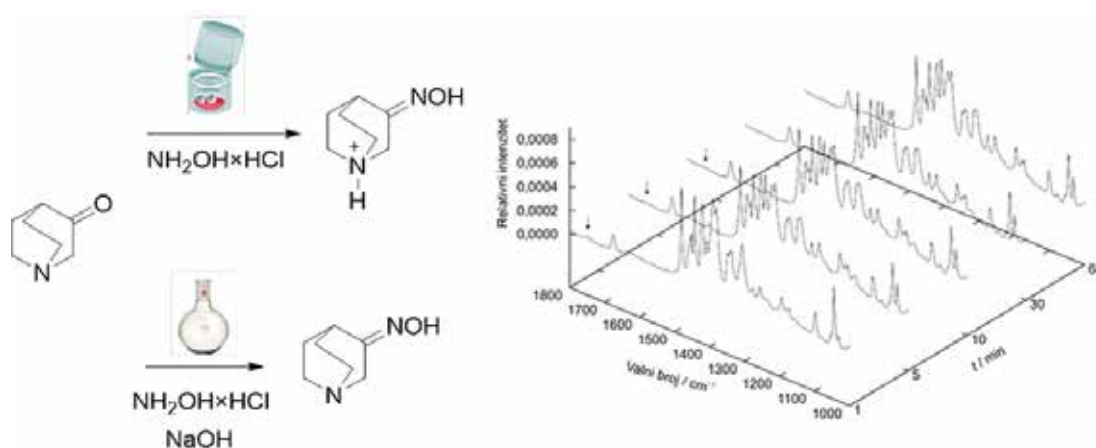
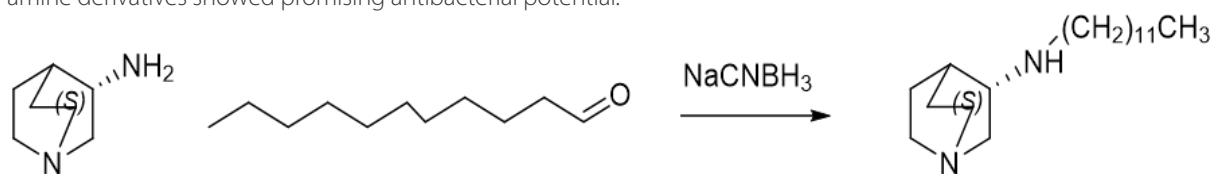


Figure 1. Preparation of 3-hydroxyiminoquinuclidine and FTIR reaction monitoring

The second part of this thesis includes the preparation of racemic 3-dodecylaminoquinuclidine, its (*S*)-enantiomer (Scheme 2), and a series of their quaternized derivatives. ¹H NMR spectroscopy was tested as a tool for the determination of enantiomeric purity of amines by addition of the chiral solvating agent: (*R*)-1,1'-bi-2-naphthol (Figure 2). The prepared amine derivatives showed promising antibacterial potential.



Scheme 2. Preparation of (*S*)-3-dodecylaminoquinuclidine

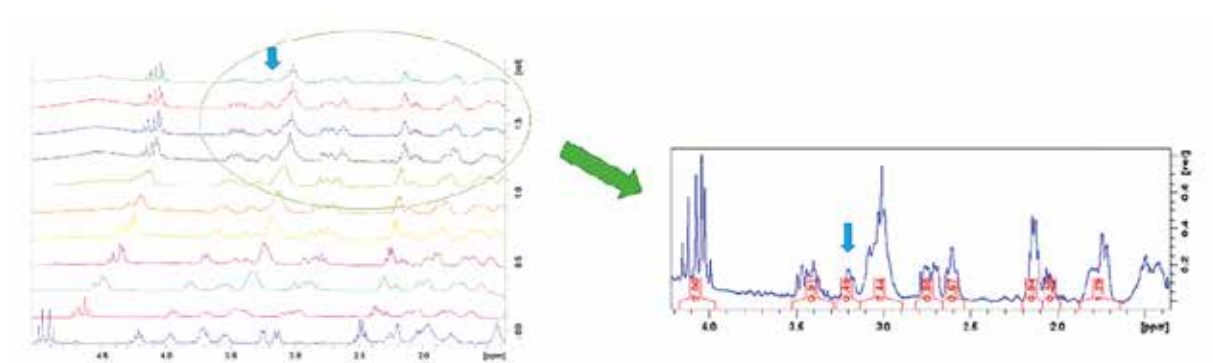
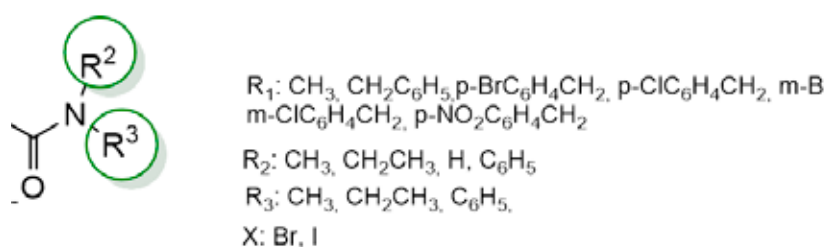


Figure 2. ¹H NMR titration of racemic *N*-benzyl-3-dodecylaminoquinuclidinium bromide with (*R*)-BINOL in CDCl₃

In the third part of the thesis, the preparation of four different carbamoyloxyquinuclidines and its quaternized derivatives was described (Scheme 3). (*R*)-3-Quinuclidinol was obtained by resolution of the racemic mixture via diastereomeric salt formation of prepared racemic acetate with *L*-(+)-tartaric acid. Molecular modelling was used to determine the geometry of each enantiomer in active site of acetyl- and butyrylcholinesterase. The best inhibition of enzymes was achieved with the *N*-benzyl diethyl carbamate derivative. It was shown that an increase in the size of substituents on the carbamate nitrogen atom does not have an impact on the carbamylation rate of the enzymes.



Scheme 3. General structural formula of prepared carbamates

Finally, the condensation product of quinuclidine-3-on was prepared. Structural parameters calculated by molecular modelling showed that both isomers *E* and *Z* were obtained. However, isomer *E* was obtained in the higher ratio (Figure 3). Two quaternary derivatives and ketoxime were prepared as well.

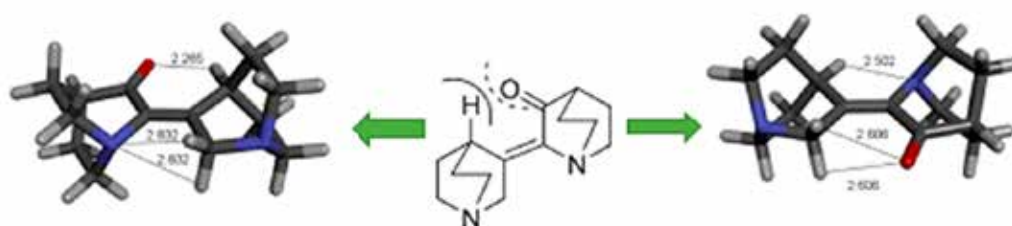


Figure 3. (*E*) and (*Z*) isomers aldol of quinuclidin-3-on

DR. ANDRAŽ LAMUT

Andraža Lamuta je že kot otroka zanimal globlji pomen stvari. V osnovni šoli so mu bili posebej blizu naravoslovni predmeti. Zanje ga je navdušila mama, ki ga je naučila osnov kemije in biologije. Pod njenim mentorstvom je med drugim postal državni prvak v znanju kemije in osvojil zlato Preglovo priznanje. Po maturi, ki jo je opravil z odličnim uspehom, se je vpisal na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani in izobraževanje nadaljeval na podiplomskem doktorskem študiju Biomedicina, smer Farmacija. Na Katedri za farmacevtsko kemijo je bil zaposlen kot mladi raziskovalec. Svoje raziskovalno delo je zaokrožil z doktorsko disertacijo s področja protimikrobnih učinkovin, v kateri se je posvetil problematiki velike odpornosti mikroorganizmov proti obstoječim načinom zdravljenja.



Najbolj me navdihuje narava in njeno delovanje

Proučeval sem mehanizme bakterijske odpornosti in možne rešitve za zmanjšanje in omejevanje pojava odpornih sevov patogenih mikroorganizmov. Ena ključnih ugotovitev mojega raziskovalnega dela je, da lahko s specifičnim delovanjem proti mehanizmu bakterijske odpornosti, kot so efluks črpalke ali slaba prepustnost membran nekaterih bakterij, zmanjšamo odpornost teh bakterij in povzročimo, da so zdravila, proti katerim so bili tovrstni mikrobi prej odporni, spet učinkovita.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu me najbolj navdihuje narava in njeno delovanje. Najboljše ideje se mi porodijo med sprehodom ali meditacijo v gozdu.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Vloga mojega mentorja izr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča je bila vsekakor ključna, ko sem se znašel pred navidezno nerešljivim problemom, za katerega tisti trenutek nisem našel ustrezne rešitve. Mentor z izkušnjami in strokovnim znanjem deli svoj pogled z raziskovalcem in ga usmerja k cilju. To se mi zdi zelo pomembno, saj tako ne izgubiš preveč dragocenega časa in se lahko osredotočiš na rdečo nit svojega raziskovanja. Za bogate izkušnje in pomoč, še posebej pri objavi znanstvenih člankov, sem hvaležen tudi somentorju prof. dr. Danijelu Kiklju.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

V mojem življenju se prepletajo tri velika področja – znanost, šport in zasebno življenje. Med njimi ni velike ločnice. Živim to, kar delam. Delo in šport sta hkrati moj prosti čas in hobi. Že od malega se ukvarjam s športno gimnastiko. Sem večkratni državni in pokalni prvak v mnogoboju, kot član državne reprezentance sem Slovenijo zastopal na številnih tekmovanjih – od svetovnega in evropskega prvenstva do sredozemskih iger ter na univerzijadi. Šport mi je pomagal tudi pri premagovanju znanstvenih izzivov. Zaradi pridobljenega strokovnega znanja sem uspešneje načrtoval tudi treninge in telesno pripravo. Vse to ne bi šlo brez podpore moje partnerke Petre. Najbolj pomembno pa je, da tisto, kar delaš, delaš z veseljem.

V prihodnosti se bom usmeril v raziskave o delovanju človekovega imunskega sistema v povezavi z obram-

bo pred patogenimi mikroorganizmi in proučevanje mehanizmov nastanka rakavih celic v povezavi s prehrano ter avtofagije kot procesa čiščenja in obnove telesnih celic ob zmanjšanem vnosu hranil. V okviru celostnega programa za zdravje ljudi, ki si želijo narediti pozitivno spremembo v svojem življenju, pa bom vključil tudi svoje znanje s športnega področja.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Vedno mi je uspelo usklajevati vrhunski šport in učenje v šoli, kasneje pa tudi študij in znanstveno-raziskovalno delo v okviru podiplomskega študija. Dosežke na obeh področjih sta mi omogočili vztrajnost in prilagodljivost. Sem tudi zelo natančen pri vseh stvareh, ki se jih lotim.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Vsaka dolgoletna tradicija govori o izkušnjah in kakovosti dela na nekem področju. Jubilejne 50. Krkine nagrade so odraz stabilnosti in uspešnosti podjetja. Na razpis sem se prijavil z željo, da svoje znanje in izkušnje delim z drugimi raziskovalci in predstavim svoj doktorat širšemu krogu ljudi. Prihodnost znanosti je v povezovanju in sodelovanju, prijava na razpis pa je moj prispevek k temu. Vesel sem, da se lahko pridružim skupini Krkinih nagrajencev. Zame ima nagrada posebno vrednost, saj je doktorska disertacija pomembna prelomnica v mojem življenju.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Najboljše zamisli pridejo takrat, ko ste sproščeni in delate z veseljem. Prihodnost znanosti je v povezovanju in sodelovanju.

NAJBOLJŠI NASVET

Edina stalnica v življenju je sprememba.

ŽIVLJENJSKO VODILO

Radost v vsem, kar počneš.



Načrtovanje in sinteza novih protimikrobno delujočih zaviralcev DNA-giraze in Hsp90

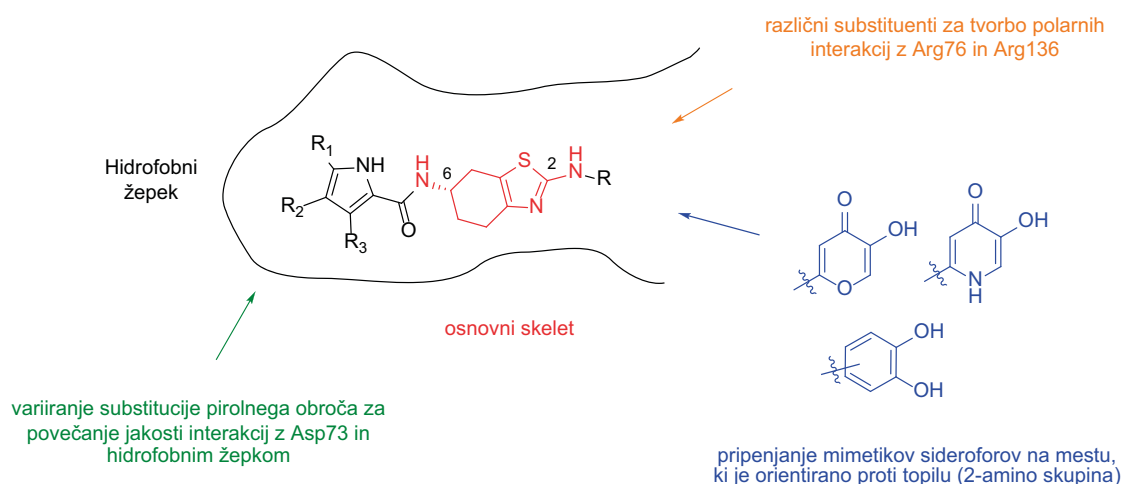
Infekcijske bolezni so zaradi naraščajoče odpornosti mikroorganizmov proti obstoječim načinom zdravljenja velik izziv za svetovno javno zdravstvo. Identifikacija ustreznih tarč in razvoj novih protimikrobnih učinkovin z alternativnim mehanizmom delovanja je ena od strategij za zmanjševanje in preprečevanje pojava odpornih sevov. DNA-giraza je klinično validirana tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, medtem ko je Hsp90 obetavna tarča za razvoj protivirusnih učinkovin. Odkrivanje zaviralcev teh dveh tarč je aktivno področje raziskovanja, kar potrjujejo tudi številne znanstvene publikacije ter veliko število sintetiziranih spojin in objavljenih patentnih prijav. Še posebno velik izziv predstavlja odpornost po Gramu negativnih bakterij, ki z zmanjšano prepustnostjo zunanje membrane in s kompleksnimi sistemi za efluks strukturno raznovrstnih spojin iz bakterijske celice zmanjšuje učinkovitost trenutnega nabora protibakterijskih učinkovin. Možno rešitev, da zaobidemo ta dva mehanizma odpornosti, predstavljata strategija z inhibitorji efluks črpalk in strategija olajšanja prehoda spojin prek bakterijskih membran po načelu trojanskega konja, pri kateri bioaktivne spojine konjugiramo s siderofori ali mimetiki sideroformov ter tako dobimo protibakterijsko delujoče molekule, imenovane sideromicini. Validacija koncepta trojanskega konja v kliničnem okolju je bila nedavno potrjena z registracijo cefiderokola kot prvega predstavnika iz tega razreda učinkovin, in sicer za zdravljenje trdovratnih infekcij, ki jih povzročajo odporni po Gramu negativni patogeni, kot so *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Klebsiella pneumoniae*.

V okviru doktorske disertacije smo uspešno načrtovali in sintetizirali nove pirolamidne zaviralce DNA-giraze B (GyrB) s (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminskim osnovnim skeletom. Izhodišče za naše delo so bili analogi prve generacije teh spojin. Oprli smo se na že poznane kristalne strukture kompleksov strukturno sorodnih pirolamidnih spojin na ATP-vezavnem mestu GyrB, kar je vodilo načrtovanje naših analogov in pripravo sintezne strategije. Najprej smo pripravili serijo spojin, ki imajo na mestu 6 osnovnega skeleta vezane različno substituirane pirole. Naš namen je bil raziskati kemijski prostor, ki je na voljo znotraj vezavnega mesta GyrB. Nato smo z vezavo različnih substituentov na mesto 2 osnovnega skeleta poskušali povečati jakost interakcij tudi v tem delu molekule (Slika 1). Za izboljšanje protibakterijske aktivnosti naših zaviralcev smo uspešno načrtovali in pripravili konjugate med zaviralci GyrB in različnimi mimetiki sideroformov. Mimetike sideroformov smo pripeli na mesto, za katerega smo glede na omenjene kristalne strukture sklepali, da ne bo poslabšalo vezave zaviralcev ali pa jo bo celo izboljšalo. Z uporabo koncepta trojanskega konja smo želeli povečati koncentracijo zaviralcev GyrB v bakterijskih celicah. To bi predvidoma vodilo v izboljšanje *in vitro* protibakterijske aktivnosti ter zmanjšanje učinka efluksa, kar je bila glavna pomanjkljivost prve generacije spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminskim skeletom.

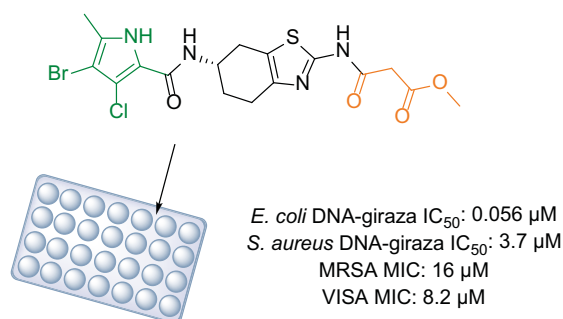
Rezultati encimskih testiranj so pokazali, da druga generacija spojin močnejše zavira encimsko reakcijo DNA-giraze kot prva, saj so bile pri najmočnejših analogih vrednosti IC_{50} med 0,016 μM in 0,044 μM v primerjavi z *E. coli* DNA-girazo ter med 0,43 μM in 0,71 μM v primerjavi z DNA-girazo *Staphylococcus aureus*. Tudi pri drugi generaciji spojin se je izboljšala *in vitro* protibakterijska aktivnost proti po Gramu pozitivnim bakterijam, saj so bile pri obeh najučinkovitejših analogih vrednosti MIC med 8,2 μM in 30 μM v primerjavi z vankomicinom, in proti meticilinu odpornim sevom *S. aureus*. Najmočnejši konjugati zaviralcev DNA-giraze B z mimetiki sideroformov so kazali nanomolarne zaviralne aktivnosti proti DNA-girazi *E. coli* z vrednostmi IC_{50} med 0,058 μM in 0,11 μM , kar je dokaz, da sideroforna komponenta ni motila vezave zaviralca na tarčno mesto. Testiranje na mutantu *E. coli* $\Delta tolC$ z onemogočeno funkcijo efluksne črpalke je razkrilo, da so tako spojine druge generacije kot pripravljeni konjugati podvrženi aktivnemu efluksu iz bakterijskih celic, kar je eden od omejitvenih dejavnikov za doseganje protibakterijskega učinka proti po Gramu negativnim bakterijam. Pri večini spojin, ki so bile testirane proti *E. coli* $\Delta tolC$, se je izboljšala tudi učinkovitost proti temu sevu, pri najučinkovitejših derivatih pa so bile vrednosti MIC med 3,13 μM in 6,25 μM . Pri konjugatih so se minimalno izboljšale vrednosti MIC v primerjavi z divjim sevom *E. coli* v testnem sistemu z majhno koncentracijo železovih ionov, ki posnema infekcijske pogoje, zato so potrebne dodatne študije za ovrednotenje uspešnosti koncepta trojanskega konja pri sideromicinih s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminskim osnovnim skeletom.

Glede na dejstvo, da imajo nekateri dobro znani zaviralci GyrB protivirusne učinke in zaviralno delujejo tudi na Hsp90, smo ovrednotili protivirusno delovanje pri izbranih zaviralcih GyrB s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskim jedrom. Spojine so bile aktivne proti virusom influence A (H1N1, H3N2) in influence B z vrednostmi EC_{50} v nizkem mikromolarnem območju in so prav tako kazale afiniteto vezave do Hsp90. Ugotovitve kažejo, da je protivirusni učinek spojin najverjetneje posledica zaviranja Hsp90. V doktorski disertaciji sintetizirani zaviralci DNA-giraze in Hsp90 so izvirni prispevek k znanosti na področju odkrivanja novih protimikrobnih učinkovin, saj gre za inovativne spojine z alternativnim mehanizmom delovanja glede na obstoječo terapijo, ki ponujajo možnost za soočenje z izzivom virusne in bakterijske odpornosti v prihodnosti.

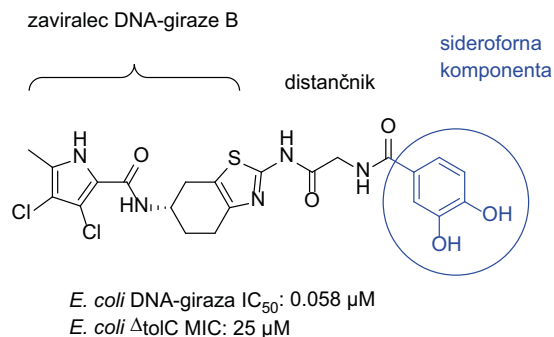
ATP-VEZAVNO MESTO DNA-GIRAZE B:



Zaviranje rasti odpornih sevov *Staphylococcus aureus*



Sintezni sideromicini - konjugati z mimitiki sideroforov



Slika 1. Načrtovanje novih pirolamidnih zaviralcev DNA-giraze B (zgoraj) in najobetavnejša predstavnik sintetiziranih zaviralcev v sklopu doktorske disertacije (spodaj).

Design and Synthesis of Novel Antimicrobial DNA Gyrase and Hsp90 Inhibitors

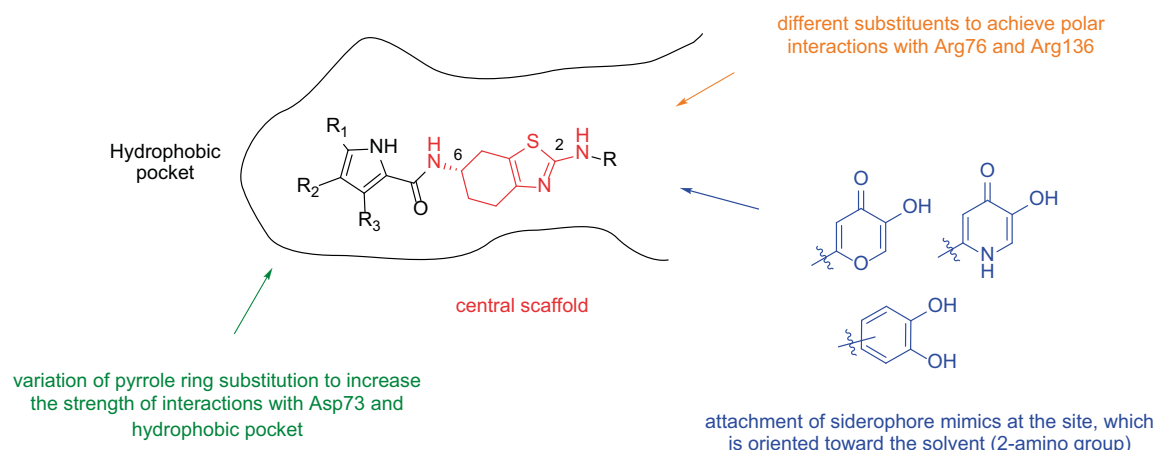
Infectious diseases are a global public health concern due to increasing microbial resistance to currently available therapies. In this context, identification of suitable targets and development of novel antimicrobial agents with alternative mechanisms of action are among the strategies to prevent and lower the outburst of resistant strains. DNA gyrase is a clinically validated target for the development of novel antibacterial drugs, while Hsp90 is a promising target for the development of antiviral drugs. Numerous scientific publications and patent applications and a large number of such compounds synthesized bear witness to the active research for novel inhibitors of these two targets. The especially considerable challenge is the resistance mechanisms of Gram-negative bacteria among which the most important are low outer membrane permeability and complex efflux systems that expel structurally diverse compounds from the bacterial cell, thus lowering the effectiveness of many of the available antibacterial drugs. The possible strategies to circumvent these two resistance barriers are the use of efflux pump inhibitors and increased drug penetration across the bacterial cell wall through the Trojan horse strategy, in which bioactive compounds are conjugated with siderophores or siderophore mimics to yield antibacterial molecules known as sideromycins. The validation of this Trojan horse concept in the clinical setting was recently confirmed with the registration of cefiderocol as a first-in-class agent for the treatment of serious infections caused by resistant Gram-negative pathogens, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*.

In the scope of this doctoral dissertation we have successfully designed and synthesized novel pyrrolamide-based inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) with an (S)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamine scaffold based on their previously reported first generation. The design of these inhibitors and their synthetic strategy was guided by the known crystal structures of structurally similar pyrrolamides in complex with the ATP-binding site of GyrB. First, we prepared a series of compounds with differently substituted pyrroles attached at the position 6 of the core scaffold, to explore the available chemical space in the binding site of GyrB. Secondly, we attached various substituents at the position 2 of the core scaffold in order to increase the strength of the interactions at this site of the molecule as well (Figure 1). To further improve the antibacterial activities of these GyrB inhibitors, we successfully designed and prepared their conjugates with different siderophore mimics. Based on the above-mentioned crystal structures, the siderophore mimics were attached at the inhibitor region, for which we predicted that this would not decrease the binding affinity of the inhibitors, or will even contribute to their binding. Using the Trojan horse concept, the aim here was to increase the concentrations of these GyrB inhibitors inside the bacterial cells to potentially improve their *in vitro* antibacterial activities and diminish the effects of the bacterial efflux pumps as the main drawbacks of the first generation 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamines.

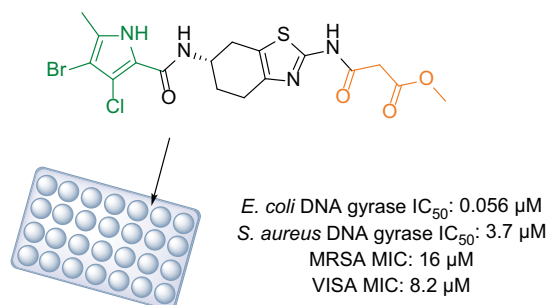
Enzyme inhibition assays showed that these second-generation compounds were indeed more potent than those of the first generation, with IC_{50} values of the most potent analogs from 0.016 μ M to 0.044 μ M against *E. coli* DNA gyrase and from 0.43 μ M to 0.71 μ M against *Staphylococcus aureus* DNA gyrase. These second-generation compounds were also more efficient in *in vitro* antibacterial assays against Gram-positive bacteria, with MICs of the most efficient compounds from 8.2 μ M to 30 μ M against vancomycin-resistant and methicillin-resistant *S. aureus* strains. The most potent GyrB inhibitor-siderophore mimic conjugates had IC_{50} values from 0.058 μ M to 0.11 μ M against *E. coli* DNA gyrase and thus the siderophore component of the conjugates did not disturb the binding of the inhibitors to the target site of GyrB. Antibacterial testing against *E. coli* $\Delta tolC$, which has a defective efflux pump, showed that both the second-generation compounds as well as prepared conjugates are good substrates for the efflux pumps, which is one of the limiting factors for sufficient efficiency against Gram-negative bacteria. Nevertheless, most of the compounds tested against *E. coli* $\Delta tolC$ showed improved activity over the first generation with the most efficient ones with MICs from 3.13 μ M to 6.25 μ M. However, the conjugates showed only minor improvements to their MICs against wild-type *E. coli* in a test system with low iron concentrations, which mimics the conditions present in the host during infection. Therefore, further studies are needed to evaluate the success of the Trojan horse concept for these 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamine-based sideromycins.

The selected GyrB inhibitors with the 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamine core were also tested for antiviral activities, as some of the other well-known GyrB inhibitors have antiviral properties as well as Hsp90 inhibitory activities. Some of these compounds were active against influenza A (H1N1, H3N2) and influenza B viruses, with EC₅₀ values in the low micromolar range. They also showed binding to Hsp90, which suggests that Hsp90 inhibition might be the mechanism that underlies their antiviral activities. DNA gyrase and Hsp90 inhibitors that were synthesized in the scope of this doctoral dissertation are an original contribution to science in this field of research, as these are innovative compounds with an alternative mechanism of action when compared to the currently available therapies. Thus, they offer the opportunity to cope with the challenge of bacterial and viral resistance in the future.

ATP-BINDING SITE OF DNA GYRASE B:



Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus*



Synthetic sideromycins - conjugates with siderophore mimics

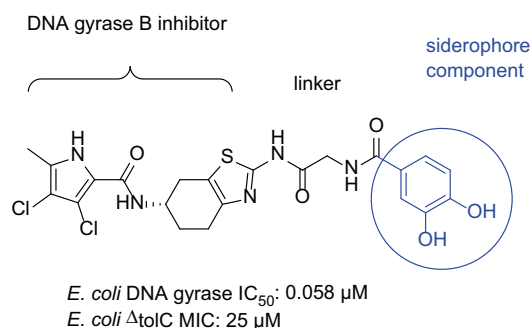


Figure 1: Design of novel pyrrolamides as DNA gyrase B inhibitors (above) and the most promising analogs among synthesized compounds in the scope of this doctoral dissertation (below)

DR. MIHA DREV

Šoštanjčan dr. Miha Drev, ki danes živi v Šmartnem ob Paki, se je že v osnovni šoli navduševal nad kemijo. Njegovo otroško strast je dokončno razvnel eksperimentalni komplet, ki sta mu ga starša podarila v devetem razredu. Vpis na celjsko srednjo kemijsko šolo je bil tako samoumeven. Kot dijak je sodeloval na vrsti tekmovanj in osvajal najvišja odličja. Vse bolj predan raziskovalnemu delu je med študijem na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani raziskoval na katedri za organsko kemijo in dokončal magistrski študij. Prešernovi nagradi za raziskovalno nalogo leta 2014 je dve leti kasneje sledila prva Krkina nagrada za magistrsko nalogo. V začetku leta 2020 je doktoriral na katedri za organsko kemijo. Ukvarja se z analitskim razvojem, predvsem NMR-spektroskopijo.



Od otroške radovednosti do raziskovalnih dosežkov

Primarno področje mojega raziskovanja je organska kemija, kamor me je usmerila želja po odkrivanju novih molekul in njihovih pretvorb. Med doktorskim raziskovanjem sem se ukvarjal s C–H aktivacijo v pogojih mikrovalovnega segrevanja. S sodelavci smo v duhu zelene kemije reakcije izvajal v vodi. Na ta način smo najprej pripravili serijo fenil pirimidinov. Metodo smo kasneje nadgradili in z večkratno zaporedno C–H aktivacijo pripravili serijo heksaheteroarilbenzenov, ki so uporabni v tehnologiji tekočih kristalov, pri pripravi supramolekularnih in redoks materialov ter v fotovoltaiiki. Z uporabo enostavnih izhodnih spojin in Ru(II) katalizatorja smo poenostavili ter skrajšali sintezno pot za njihovo pripravo. Hkrati smo raziskali tvorbo kompleksnejših piridonov iz enostavnih bromopiridinov. Vse novo pripravljene spojine lahko služijo kot ligandi pri pripravi različnih koordinacijskih spojin s prehodnimi kovinami, ki so potencialni katalizatorji v kemijskih pretvorbah. V zadnjem delu raziskave smo pripravili komplekse Ru(II), Pd(II), Pt(II) in Ag(I) s heksapiridilbenzenom.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu so moj največji navdih in motivacija uspeli poskusi. Ko pripraviš 1 gram čiste spojine, ki jo do tedaj ni še nihče, je to res poseben občutek. Najboljše zamisli pa se mi porodijo naključno in spontano, predvsem takrat, ko sem sproščen in spočit.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor lahko s svojimi izkušnjami, znanjem in pogledom z drugega zornega kota veliko prispeva k raziskovalnemu delu. Njegova pomoč je še posebej ključna v trenutkih, ko raziskovalec kljub številnim izvedenim eksperimentom obstane na mestu. Takrat so neprecenljive mentorjeve izkušnje, sveže zamisli in nasveti.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Znanost resnično zahteva celega človeka. Kljub temu da to delo radi opravljamo in je raziskovanje del nas, ne smemo pozabiti na zasebno življenje. Ne glede na predanost stroki, vedno najdem čas za druženje s svojim dekletom, ki ji zaupam in ki mi stoji ob strani tudi v najtežjih časih.

OSEBNE LASTNOSTI

Zanima me veliko različnih stvari, nikoli se nisem ozko usmerjal le na določeno temo. Prav širina znana mi omogoča, da lahko raziskovalni skupini pomagam na več področjih. V veliko veselje so mi nove stvari, rad spoznavam nove tehnike in pridobivam novo znanje, ki mi je v pomoč pri raziskovanju.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade so pomemben kazalec znanstvene odličnosti v Sloveniji. Naravnost navdušujoče je, da Krka že 50 let spodbuja mlade k raziskovanju, jih za njihov trud nagradi in tako potrdi, da so na pravi poti. Krkino nagrado sem prejel že za magistrsko nalogo, zato sem se odločil, da na razpis prijavim še doktorsko disertacijo. Ponosen in počaščen sem, da sem v letošnjem jubilejnem letu med prejemniki velike Krkine nagrade.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Za raziskovalce na področju naravoslovja so Krkine nagrade izredno pomembne, saj prispevajo k prepoznavnosti odličnosti dela. Hkrati pa mlademu raziskovalcu omogočijo boljše možnosti za nadaljevanje raziskovalne kariere.

NAJBOLJŠI NASVET

*Ne glede na to,
da vam izkušeni profesorji in
raziskovalci pravijo,
da določena pretvorba
ne bo potekla,
sledite svojim zamislim.*

ŽIVLJENJSKO VODILO

*Kdor ni nikoli naredil napake,
ta še ni poskusil nič novega.*

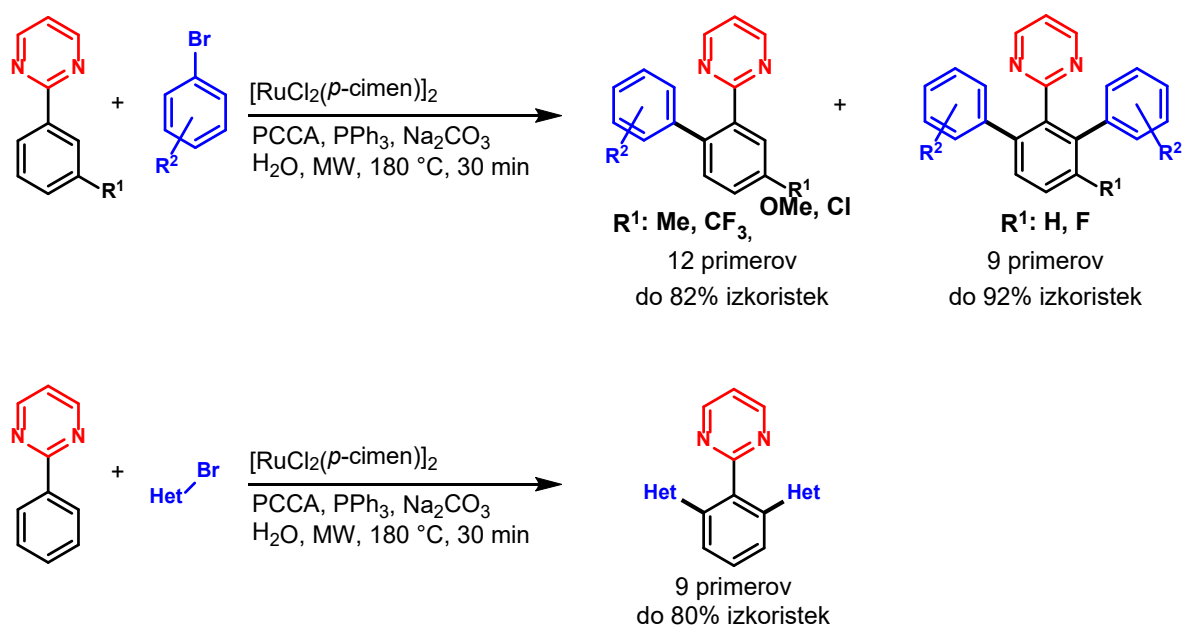
(Albert Einstein)



Katalitsko heteroariliranje kot sintezni pristop v pripravi polidentatnih ligandov

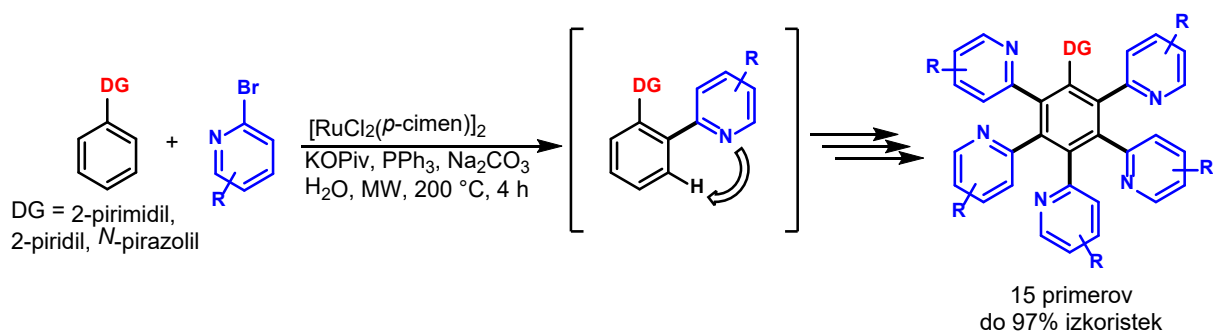
Spojine s pirimidinskim motivom spadajo med pomembnejše tipe struktur predvsem zaradi biološke in farmacevtske aktivnosti. Po drugi strani pa lahko kot ligandi sodelujejo pri katalitskih pretvorbah in pripravi koordinacijskih spojin. Nekatere so zelo pomembne pri sintezi in pripravi funkcionalnih materialov. Še posebej so zanimivi arilirani π -konjugirani pirimidini. Prav zaradi vseh teh lastnosti substituiranih pirimidinov je izrednega pomena razvoj novih hitrih in bolj učinkovitih metod za njihovo sintezo.

V prvem delu smo razvili učinkovito metodo (hetero)ariliranja *orto*-C–H vezi na benzenovem obroču 2-arilpirimidina. Z Ru(II)-karboksilatno katalizirane reakcije s (hetero)aril bromidi smo izvajali v vodi v pogojih mikrovalovnega segrevanja. Na ta način smo po načelih zelene kemije in z visoko regioselektivnostjo pripravili serijo polikonjugiranih pirimidinov. Mehanistične študije na podlagi Hammettove korelacije nakazujejo, da elektronprivlačne skupine na pirimidinskem substratu pospešujejo ariliranje, medtem ko skupine na aril bromidih, tako elektronprivlačne kot elektrondonorske, zagotavljajo hitrejše reakcije. Prikazali smo tudi koordinacijske lastnosti heteroaril pirimidinov pri koordinaciji rutenija(II).



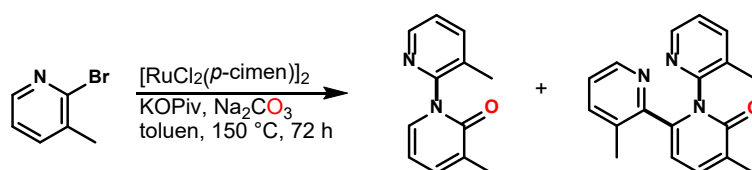
Shema 1. (Hetero)ariliranje C–H vezi substituiranih 2-fenilpirimidinov.

V drugem delu smo z uporabo Ru(II)-karboksilatnega katalitskega sistema pripravili serijo hekso(heteroaril)benzenov. Reakcije večkratne C–H aktivacije z N-heteroaril bromidi so potekale regioselektivno na benzenovih obročih, ki so vsebovali piridinske, pirimidinske ali pirazolinske usmerjajoče skupine. Reakcije smo izvajali v vodi v pogojih mikrovalovnega segrevanja. Zaporedno pentaariliranje poteka prek sekvenčne aktivacije C–H vezi, kjer vsaka nova uvedena skupina usmerja nadaljnjo C–H aktivacijo.



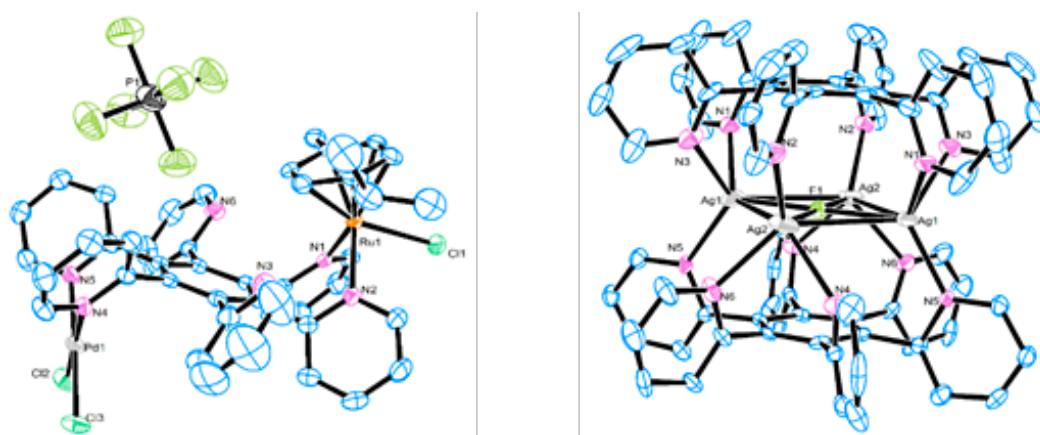
Shema 2. Večkratna zaporedna C–H aktivacija heteroarilov.

V tretjem delu smo raziskovali nastanek *N*-piridilpiridin-2-onov iz različno substituiranih 2-bromopiridinov. Preliminarne študije potrjujejo, da je za nastanek piridona ključna sinergija Ru(II) katalizatorja, kalijevega pivalata in Na₂CO₃. Rezultati eksperimentov z izotopsko označenim kisikom nakazujejo, da kisik pri tvorbi piridona najverjetneje pride iz pivalata, ki se v katalitskem ciklu regenerira s karbonatom.



Shema 3. Tvorba piridin-2-ona iz 2-brompiridina.

V četrtem delu smo pripravljene polidentatne ligande uporabili v koordinaciji z izbranimi kovinami prehoda (Ru, Pd, Pt in Ag). Na ta način smo pripravili nove bidentatne Ru(II) komplekse s sedemčlenskimi kelatnimi obroči z eno ali dvema koordiniranimi kovinama. Metodo koordinacije dveh kovin smo nato aplicirali še na Pd(II) in Pt(II) in za pripravo mešanih Ru(II)-Pd(II) in Ru(II)-Pt(II) kompleksov. S koordinacijo Ag(I) ionov na polidentat smo pripravili štiri- in petjedrne komplekse, kjer so Ag(I) ioni med dvema ligandoma. Na sredini kompleksa je ion F⁻, ki je koordiniran na štiri Ag(I) ione.

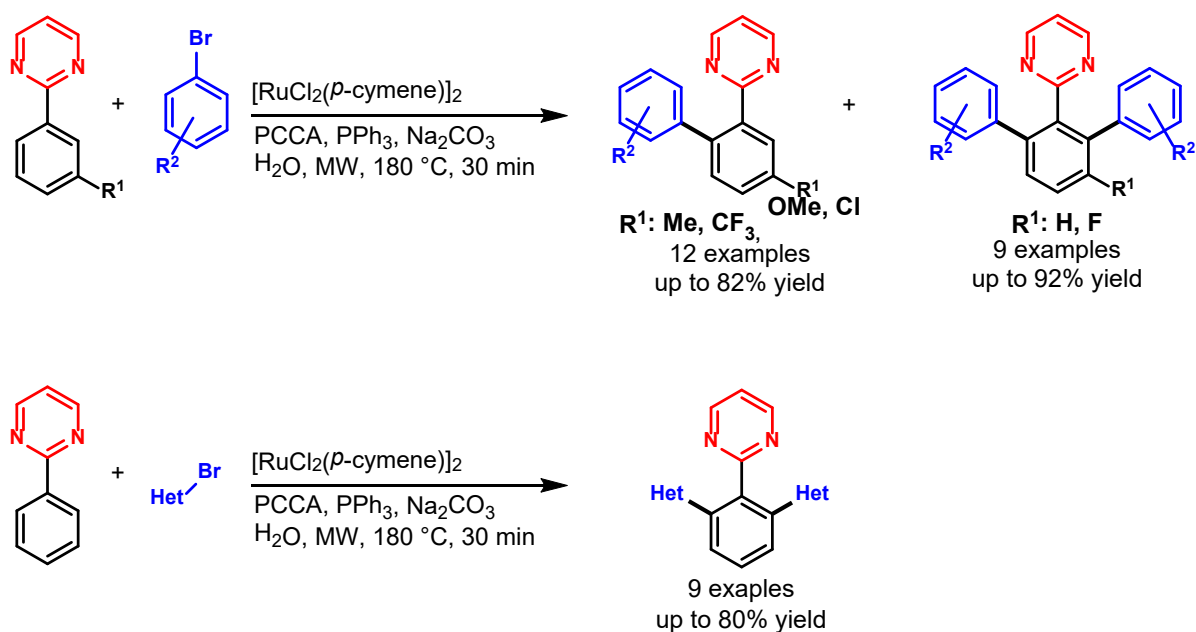


Slika 1. Kristalni strukturi kompleksov Ru(II)-Pd(II) in Ag(I)₄F s heksapiridilbenzenom.

Catalytic Heteroarylation as Synthetic Approach towards Polydentate Ligands

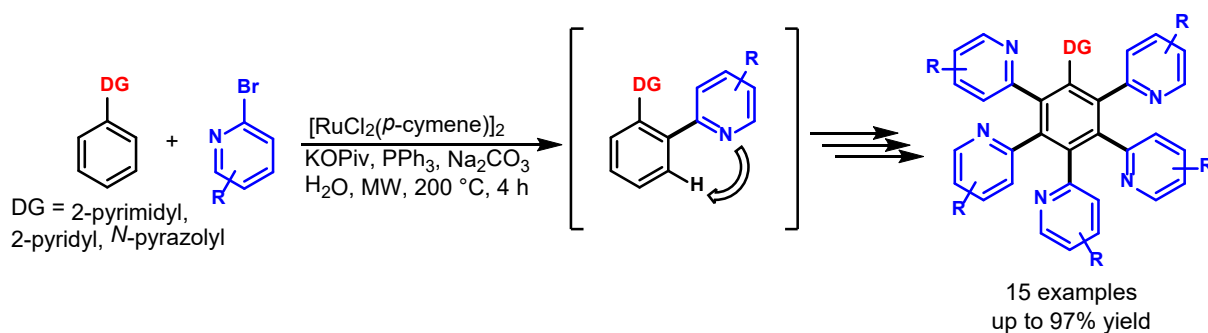
Compounds containing a pyrimidine motif can exhibit interesting biological and pharmaceutical activities. On the other hand, they can serve as a ligand in coordination chemistry or catalysis. Some of them can be important in the synthesis and in the preparation of functional materials. One of the most interesting types are arylated π -conjugated pyrimidines. That is why the development of a fast and efficient method for the synthesis of different substituted pyrimidines is still highly desirable.

In the first part, an efficient (hetero)arylation of *ortho*-C–H bonds of the benzene ring of 2-arylpyrimidines is achieved by Ru(II)–carboxylate-catalyzed reaction with (hetero)aryl bromides in water under microwave irradiation. This ‘green’ methodology provides a series of polyconjugated pyrimidines with high site-selectivity. As established from Hammett plots, electron-withdrawing groups on the phenyl ring of pyrimidine substrates facilitate the arylation, while both electron-withdrawing and electron-donating groups on the aryl bromides assure a faster reaction. Applicability of heteroaryl-pyrimidines was demonstrated by their ligation to ruthenium or palladium centre.



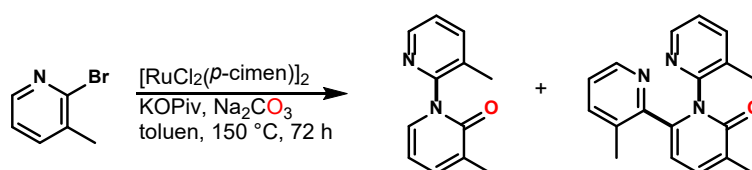
Scheme 1: C–H bond (hetero)arylation of substituted phenylpyrimidines

In the second part, a series of hexa(heteroaryl)benzenes were synthesized by the Ru(II)–carboxylate-catalyzed multiple C–H activation of benzenes carrying pyridyl, pyrimidyl, or pyrazolyl directing groups using N-heteroaryl bromides as coupling partners. The reactions proceeded with high selectivity under microwave irradiation in water. Iterative penta-arylation could be implemented via sequential activation of C–H bonds of generated intermediates by cascade chelation assistance of *in situ* installed pyridyl groups.



Scheme 2: Iterative C–H bond heteroarylation

In the third part, the preliminary study on *N*-pyridylpyridin-2-one formation from substituted 2-bromopyridines was obtained. The pyridones were formed in the presence of the Ru(II)-pivalate- Na_2CO_3 catalytic system. The study suggested that oxygen for 2-pyridone formation comes from pivalate, which is regenerated with carbonate during the catalytic cycle.



Scheme 3: The formation of pyridin-2-one from 2-bromopyridine

In the fourth part, the synthesized multiheteroaryl-substituted benzenes were used as ligands in coordination with selected transition metals (Ru, Pd and Ag) to obtain multinuclear complexes. Novel seven-membered bidentate Ru(II) complexes with one or two metal centres were prepared. The strategy was also employed in coordination of two Pd(II) and two Pt(II) cations as well as mixed Ru(II)-Pd(II) and Ru(II)-Pt(II) complexes. The poly(hetero)arylated benzenes were further used as ligands in coordination with Ag(I) ions in order to obtain tetra- and pentanuclear complexes. The Ag(I) ions are in square or pentagon orientation, with F[−] ion in the centre of complex, between two hexa-coordinating ligands.

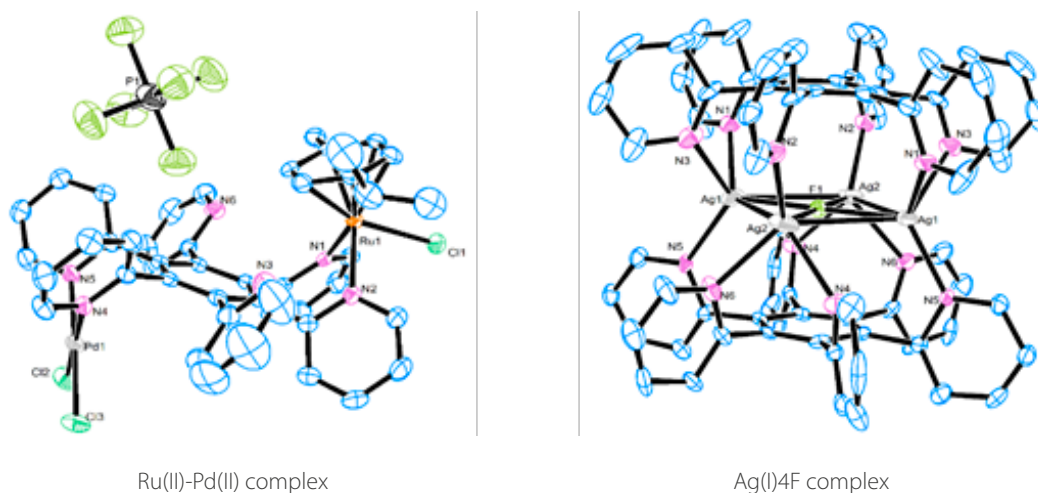


Figure 1: Crystal structures of Ru(II)-Pd(II) and Ag(I)₄F complexes with hexapyridylbenzene

DR. MIHA VIRANT

Metličana dr. Miho Viranta že od začetkov izobraževanja zanima naravoslovje. Med osnovnošolskimi in srednješolskimi predmeti sta ga najbolj pritegnili kemija in matematika, tudi po zaslugi dobrih učiteljev in obeh staršev, ki sta ga spodbujala k učenju z razumevanjem snovi. Pri izbiri študijske smeri je prevladala kemija, saj se mu je zdela bolj praktična in uporabna. Na dodiplomskem študiju na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani se je usmeril na področje organske kemije, kjer je začel sodelovati z mentorjem prof. dr. Janezom Košmrljem. Oba je zanimala uporaba sodobnih instrumentalnih tehnik jedrske magnetne resonance (NMR). To je bilo pomembno za uspešne raziskave paladijevih koordinacijskih spojin, kar je bilo osrednje področje njegovega raziskovanja tudi na magistrskem in doktorskem študiju. Dr. Miha Virant je kot raziskovalec zaposlen na Katedri za organsko kemijo.



Predan izzivom organokovinske kemije

Ukvarjam se predvsem z razvojem novih paladijevih katalizatorjev in njihovo uporabo v kemijskih reakcijah. Paladij je dragocena kovina, ki se uporablja za katalizo, saj omogoča oziroma pospeši potek kemijskih reakcij. Zaradi svoje narave so paladijevi katalizatorji pomembni tako z akademskega vidika kot v industriji, kjer se uporabljajo pri pripravi številnih produktov. Razvoj novih paladijevih katalizatorjev pomeni manjšo porabo te dragocene kovine, posledično pa cenejše in dostopnejše produkte. To je mogoče doseči s pripravo novih, učinkovitejših ligandov. Ti v reakciji obdajo kovino, ki postane bolj aktivna, hkrati pa lahko deluje dalj časa. Za razumsko načrtovanje novih ligandov je pomemben vpogled v kemijsko reakcijo, v tako imenovani reakcijski mehanizem, ki kaže dogajanje na molekularni ravni. V doktorski nalogi sem se ukvarjal predvsem s tem – s sintezo novih in bolj učinkovitih ligandov in študijami reakcijskih mehanizmov, oboje pa naj bi pripomoglo k čim bolj učinkovitim katalizatorjem, katalitskim procesom in v končni fazi produktom, ki jih tako dobimo.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Rad imam zanimive izzive. Tudi če sprva ne gre zlahka, se po navadi najde pot. Zamisli za rešitve se mi porodijo ob najrazličnejših trenutkih, običajno iznenada, med delom, pogovori s sodelavci ali mentorjem, velikokrat pa v prostem času, včasih kar med spanjem.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Vloga mentorja je v začetnem obdobju vsakega raziskovalca ključna in nenadomestljiva. Mentor je vir osnovnih zamisli, raziskovalnega področja in ne nazadnje financiranja, ki določa to, s čim se mladi raziskovalec začne ukvarjati. Z mojim mentorjem sva se dobro razumela, njegov vpliv na moji celotni univerzitetni poti je bil velik. Prav mentor je prepoznal mojo naklonjenost številkam in računalnikom ter mi pomagal pri študijski izmenjavi v Čilu pri prof. dr. Balazsu Pinterju, ki je strokovnjak za računalniško kemijo na osnovi teorije gostotnega funkcionala.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Ker je kemija zame način življenja, delovno okolje precej vpliva tudi na mojo zasebnost, seveda v pozitivnem smislu. S sodelavci smo odličen kolektiv,

družimo se tudi zunaj delovnega časa. Ne nazadnje sem tako spoznal svojo boljšo polovico, Ano. Zaradi vsega naštetega je moje življenje v Ljubljani pestro in zanimivo, vsak dan znova se z veseljem vračam na delovno mesto. Po drugi strani pa se vedno rad vrnem v rodno Metliko na obisk k staršem in sorodnikom.

OSEBNE LASTNOSTI

Sem vztrajen in ambiciozen. Popolnoma se predam delu in iskanju poti do cilja. Pri tem se mi zdita koristni predvsem dve lastnosti, moja domišljija, ki jo razvijam tudi ob fantazijskih knjigah, serijah in računalniških igrah, ter interdisciplinarnost, saj kot znanstvenik skušam po najboljših močeh izkoristiti in komplementarno povezati rezultate eksperimentalnih raziskav s teoretičnimi izračuni.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade vidim kot dodatno potrditev kakovosti dela. Raziskovalce spodbujajo, da se še bolj trudimo in ostajamo motivirani za doseg cilja, kar pomeni, da ob neuspehih eksperimentih raje naredimo še kakšnega dodatnega. Na ta način Krka daje priznanje akademskemu delu in hkrati povezuje bazične raziskave z aplikativnim gospodarskim sektorjem. Na razpis sem se prijavil ravno zato, da preverim konkurenčnost svojega dela in izvem, kako ga ocenjujejo neakademske institucije. Uvrstitev med prejemnike Krkinih nagrad me navdaja s ponosom in me hkrati motivira za dobro delo.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Če nekaj ne uspe, poskusite malo drugače. Še bolje pa je, da pred tem natančno pregledate literaturo, saj ura v knjižnici lahko odtehta številna razočaranja (in ure) v laboratoriju.

NAJBOLJŠI NASVET

En slab rezultat še ne pomeni konca.

ŽIVLJENJSKO VODILO

»Je treba delat.«

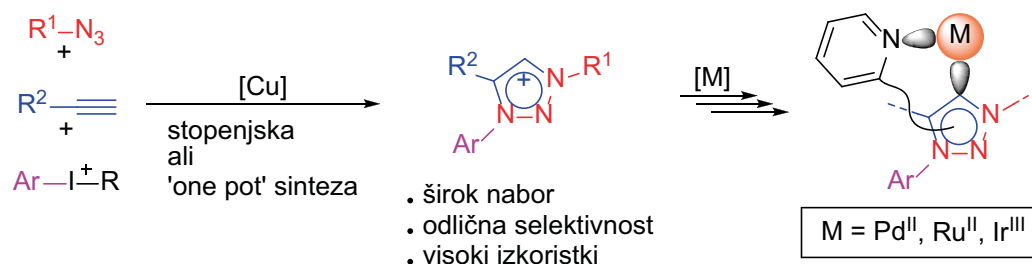
(Adi Smolar)



Razvoj homogenih paladijevih katalitskih sistemov za izbrane pretvorbe terminalnih acetilenov

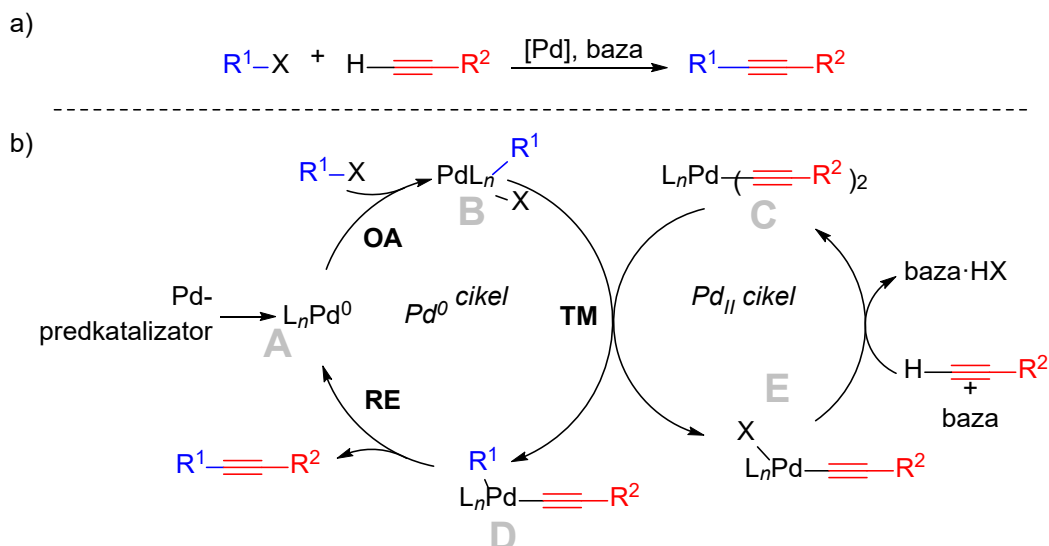
Namen tega dela je bil razumeti različne vidike in faze v razvoju paladijevih katalitskih sistemov, povezanih s funkcionalizacijo terminalnih acetilenov. Ukvarjali smo se z razvojem nove generacije naprednih bifunkcionalnih ligandov za kovine prehoda in s sintezo njihovih koordinacijskih spojin. Na izbranih kemijskih reakcijah smo z identifikacijo reaktivnih intermediatov, kinetičnimi študijami in teoretičnimi pristopi s pomočjo teorije gostotnih funkcionalov (DFT) izpeljali temeljite eksperimentalno-teoretične študije reakcijskih mehanizmov.

Najprej smo razvili metodo za pripravo nove generacije prekurzorjev N-heterocikličnih karbenov (NHC), uporabnih ligandov za prehodne kovine. Ariliranje klik triazolov z diariljodonijevimi solmi v prisotnosti bakrovega katalizatorja je vodilo do selektivnega nastanka triazolijevih soli, prekurzorjev mezoionskih karbenskih ligandov (shema 1). Posebnost metode je, da za razliko od predhodno opisanih omogoča pripravo nesimetrično substituiranih triazolijevih soli, med katerimi so posebej zanimivi produkti s piridinskimi substituenti. Ti omogočajo pripravo t. i. *i*PEPPSI-kompleksov, kjer je z interno piridinsko funkcijo omogočena priprava, stabilizacija in iniciacija predkatalizatorja. Kot posebno zanimivi so se pokazali rutenijevi in iridijevi kompleksi, ki kažejo izjemno katalitsko aktivnost v hidrogeniranju s prenosom vodika.



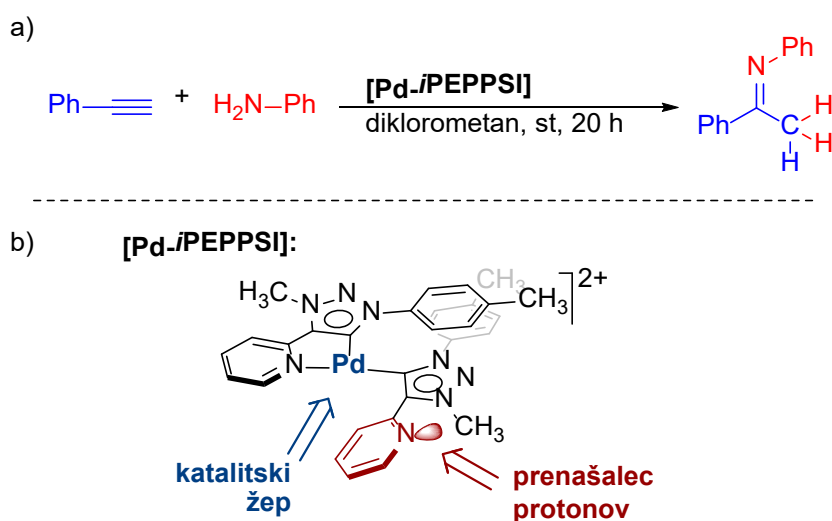
Shema 1. Sinteza ariliranih triazolijevih soli in njihova uporaba za komplekse s kovinami prehoda.

Raziskave, povezane s Pd-NHC-kompleksi, so omogočile pomembna spoznanja na področju Sonogashirjeve reakcije. Gre za pomembno s paladijem katalizirano reakcijo spajanja za funkcionalizacijo terminalnih acetilenov (slika 1a). Mehanizem reakcije in s tem razumevanje njenega poteka je kljub intenzivnim študijam doslej ostalo nepojasnjeno. Z novim vpogledom v reakcijski mehanizem, ki ga je omogočil tip katalizatorjev na osnovi *i*PEPPSI-ligandov, nam je to uganko uspelo razrešiti. V kombinirani eksperimentalno-teoretični študiji smo z uporabo sodobnih instrumentalnih tehnik za identifikacijo reakcijskih intermediatov, podkrepljenih s kinetičnimi raziskavami in teoretičnimi DFT-izračuni, pokazali, da reakcija poteka prek dveh paladijevih katalitskih ciklov, ki ju povezuje stopnja transmetalacije (slika 1b). Nov vpogled v reakcijski mehanizem omogoča razvoj novih, izboljšanih katalitskih sistemov in kataliziranih procesov, ki potekajo z večjimi izkoristki, manj stranskimi produkti in manjšimi količinami katalizatorjev iz dragocenih kovin.



Slika 1. Odkrit mehanizem Sonogashirjevega priipajanja brez uporabe bakra.

Razvit Pd-*i*PEPPSI-kompleks je uspešno kataliziral tudi reakcijo hidroaminiranja organskih acetilenov (slika 2a). Pri tem nastanejo imini, dušikove organske spojine, ki so prav tako kot acetileni pomembni substrati v postopkih organske sinteze ter pri pripravi naravnih in biološko aktivnih spojin. Tvorba iminov je z odličnimi izkoristki potekala že pri sobni temperaturi brez uporabe aditivov. Zaradi nastanka kratkoživih intermediatov smo za študij reakcije uporabili kvantnomehanske DFT-izračune, s katerimi je mogoče simulirati strukture in lastnosti spojin. V mehanistični študiji smo pokazali ključno vlogo piridinskega substituenta v Pd-*i*PEPPSI-kompleksih. V tovrstnih ligandih ima tako piridin poleg klasične stabilizacijske vloge tudi aktivno vlogo interne baze, pri čemer omogoča intramolekularni prenos protonov med reaktanti (slika 2b).



Slika 2. Hidroaminiranje acetilenov in Pd-*i*PEPPSI-kompleks z dvojno vlogo ligandov.

Development of Homogeneous Palladium Catalytic Systems for Selected Transformations of Terminal Acetylenes

This work is aimed at understanding different aspects and stages in the development of palladium catalytic systems through several case studies connected to the functionalization of terminal acetylenes. It describes a novel synthetic approach towards a generation of bifunctional smart ligands for transition metals as well as the preparation of their coordination compounds. Studies of reaction mechanisms by identification of reactive intermediates, kinetic studies as well as computational investigations based on density-functional theory (DFT) were performed for two well-known yet poorly understood reactions involving acetylenes.

The development of ligands was addressed through the synthesis of novel N-heterocyclic carbene (NHC) precursors. They were prepared by selective arylation of click triazoles with diaryliodonium salts in the presence of copper salts. The facile reaction protocol allowed for the preparation of triazolium salts (Figure 1), i.e. mesoionic carbene ligand precursors. Among those, the examples containing pyridine substituents were particularly interesting. These allow for the preparation of enhanced *i*PEPPSI complexes in which the internal pyridine sidearm enables the preparation, stabilization, and initiation of precatalysts. Ruthenium and iridium complexes thus formed showed exceptional catalytic performance in transfer hydrogenation reaction.

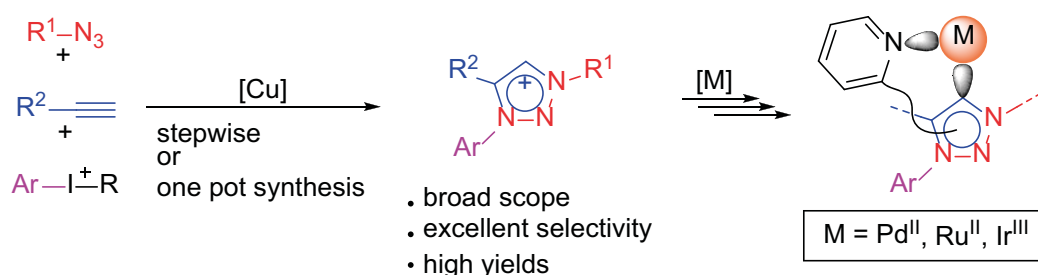


Figure 1. Synthesis of arylated triazolium salts and their use for transition metal complexes

Research of Pd-NHC complexes led to important discoveries in the field of the Sonogashira reaction (Figure 2a), an important cross-coupling process employing terminal acetylenes. Its mechanism had puzzled the chemical community for over half a century. Our Pd-*i*PEPPSI complex offered a new insight on the molecular level of this transformation. Through a combined experimental-computational study involving the identification of reaction intermediates, kinetic studies as well as DFT calculations, we were able to elucidate the key reaction step. It has been demonstrated that the reaction operates through an interplay of two Pd catalytic cycles connected in the transmetalation step (Figure 2b). The new mechanistic understanding of the catalytic process will inspire development of new and improved catalytic systems that will enable the chemical processes proceed with better yields, less side-product formation, and lower catalyst loadings of expensive precious metal catalysts.

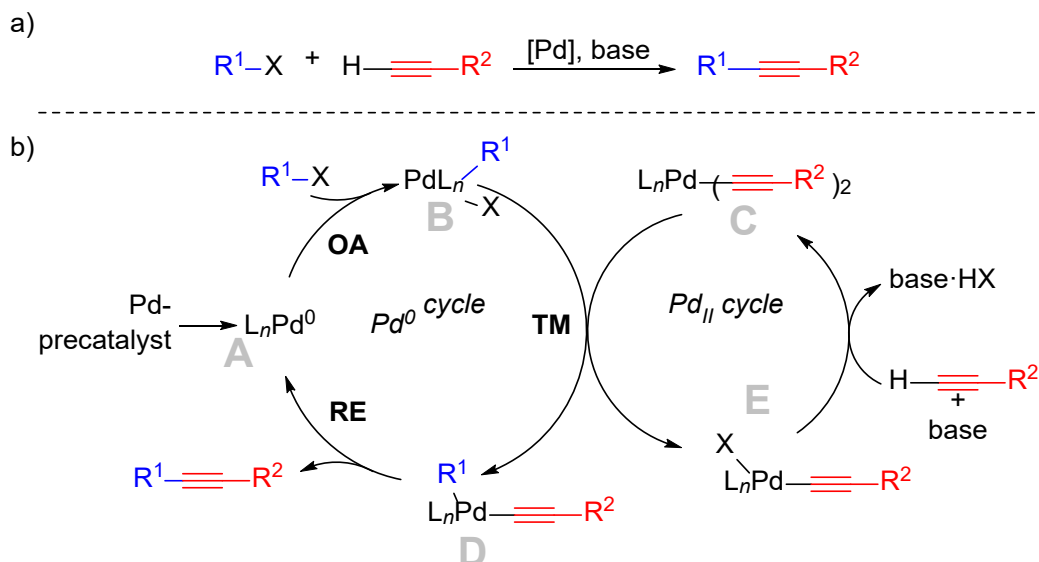


Figure 2. Discovered mechanism of copper-free Sonogashira reaction

Our Pd-*i*PEPPSI complex is a new catalyst for the hydroamination of organic acetylenes (Figure 3a). Imines thus formed are nitrogen-containing organic compounds, which are important building blocks in organic synthesis, preparation of natural compounds as well as biologically active products. Preparation of imines proceeded with excellent yields already at room temperatures and in the absence of additives. For the study of the reaction mechanism, DFT calculations were employed due to the formation of transient intermediates that could not be characterized otherwise. The performed mechanistic study of Pd-*i*PEPPSI catalysed hydroamination offered insight into the key active role of pyridine sidearm in *i*PEPPSI ligands, namely pyridine acts as an internal base and enables proton shuttling between reagents in this new type of catalysis (Figure 3b).

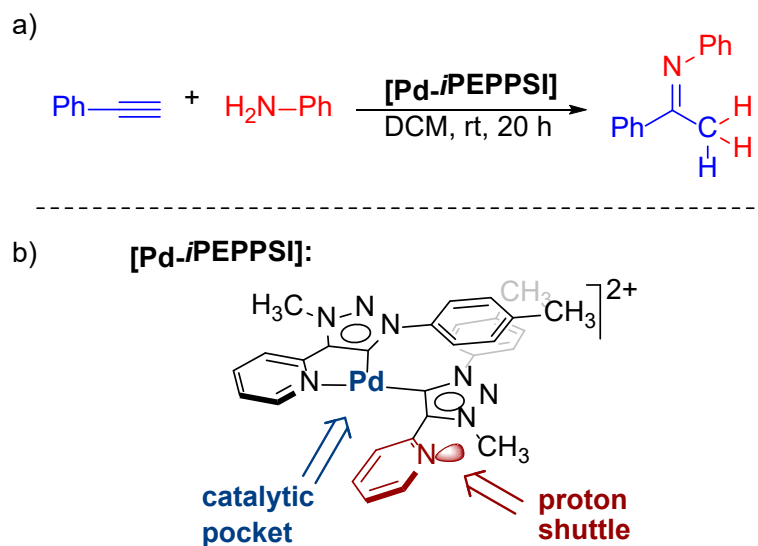


Figure 3. Hydroamination of acetylenes and the dual ligand role in Pd-*i*PEPPSI complex

50. KRKINE NAGRADE
50th KRKA PRIZES

KRKINE NAGRADE

KRKA PRIZES

POVZETKI
ABSTRACTS

TINE TESOVIK, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Mentor: **Tadej Battelino**, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Somentorica: **Katarina Trebušak Podkrajšek**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Majhne nekodirajoče RNA zunajceličnih veziklov pri sladkorni bolezni tipa 1

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) nastane kot posledica avtoimunskega uničenja celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, ki izločajo glavni anabolni hormon inzulin. Zaradi pomanjkanja lastnega inzulina morajo osebe s SBT1 do konca življenja prejemati eksogeni inzulin in si meriti krvni sladkor, saj lahko le tako upočasnijo nastanek bolezenskih zapletov. Vzrok nastanka SBT1 še ni pojasnjen, med drugim zaradi pomanjkanja bioloških označevalcev in tkivne nedostopnosti celic beta. V naši raziskavi smo poskušali dobiti vpogled v patogenezo SBT1 z raziskovanjem zunajceličnih veziklov (ZV) kot potencialnih bioloških označevalcev in medceličnih posrednikov pri nastanku SBT1. Z elektronsko mikroskopijo smo kot prvi v človeški krvni plazmi opredelili prisotnost ZV z značilnimi proteini za celice beta, kar potrjuje zmožnost komuniciranja ZV celic beta z imunskim sistemom in drugimi tkivi v človeškem organizmu. Iz izoliranih zunajceličnih veziklov krvne plazme smo nato s sekvenciranjem naslednje generacije določili miRNA, ki so različno izražene pri preiskovancih z novoodkrita SBT1 in aktivnim propadom celic beta. Imunomodulatorno vlogo izbranih različno izraženih miRNA ZV pri osebah s SBT1 smo na vzorcih človeške krvi določali s funkcionalno analizo *in vitro* in pokazali, da lahko miRNA ZV povzročijo aktivacijo imunskega sistema, ki se kaže s povečano citotoksičnostjo celic imunskega sistema in sproščanjem provnetnih citokinov. Z dodatno funkcionalno opredelitvijo delovanja miRNA ZV smo predpostavili mehanizem vpletenosti miRNA ZV v razvoj SBT1, ki razkriva tudi potencialne tarče za razvoj terapevtikov za preprečevanje razvoja SBT1.

TINE TESOVIK, University Children's Hospital, University Medical Centre Ljubljana
Supervisor: **Tadej Battelino**, University Children's Hospital, University Medical Centre Ljubljana
Co-supervisor: **Katarina Trebušak Podkrajšek**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana

Extracellular Vesicles Derived Small Non-Coding RNA in Type 1 Diabetes

Type 1 diabetes (T1D) is caused by autoimmune destruction of Langerhans islet beta cells, resulting in lack of insulin production. Hence, individuals with T1D require lifelong exogenous insulin therapy and glucose monitoring to prevent the development of diabetes-related complications. The cause of T1D is still unknown due to difficulties in gaining an insight into beta cells during disease development. In our study, we investigated T1D development and pathogenesis by studying extracellular vesicles (EVs) as biomarkers and cellular mediators in T1D in human blood plasma, which present the ability of beta-cell communication with the immune system and other cells in a human organism. Using next-generation sequencing, we characterized EVs miRNAs, which are differentially expressed in individuals at T1D onset and in the active beta-cell destruction. The immunomodulatory role of the selected differentially expressed EVs miRNAs was assessed with the *in vitro* functional study where miRNAs with vesicles were exposed to whole blood samples, which resulted in the vesicles-miRNAs induced activation of the immune system, cytotoxicity and the proinflammatory cytokine release. An additional *in vitro* characterization revealed the potential mechanism of the vesicle-miRNAs activation of the immune system, providing a potentially new insight into the pathogenesis of the disease, and novel molecular targets for the intervention and T1D prevention.

BOJAN PAPIĆ, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Mateja Pate**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Darja Kušar**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ugotavljanje značilnosti in epidemioloških povezav med izolati bakterije *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije

Listerioza je resno obolenje ljudi in živali, ki ga povzroča bakterija *Listeria monocytogenes*. V prvem delu doktorske disertacije smo retrospektivno analizirali sedem izbruhov listerioze pri drobnici in en izbruh pri ljudeh. Izolate bakterije *L. monocytogenes* smo tipizirali s sekvenciranjem celotnih genomov (angl. whole-genome sequencing, WGS) in elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (angl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE). Izvedli smo tudi dve epidemiološki preiskavi poti širjenja listerij v kmetijskem okolju. Metoda WGS je potrdila monoklonalno naravo vseh preiskovanih izbruhov in je imela večjo moč razlikovanja kot metoda PFGE, zato bi jo morala nadomestiti kot metoda izbire za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes*. V drugem delu naloge smo analizirali populacijsko strukturo izolatov živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja, ki je slabo poznana. Za opis populacijske strukture izolatov smo uporabili tipizacijo na osnovi zaporedij več lokusov (angl. multilocus sequence typing, MLST). Klon CC1 je bil značilno povezan s kliničnim izvorom in z živčno obliko listerioze. Na novo smo opisali značilno povezavo klonov CC6 in CC37 z abortivno obliko bolezni. Kloni CC9, CC14 in CC29 so bili značilno povezani z naravnim okoljem. Rezultati raziskave so na svetovni ravni pomemben prispevek k razumevanju genetske raznolikosti bakterije *L. monocytogenes* v kmetijskem okolju.

BOJAN PAPIĆ, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: **Mateja Pate**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Darja Kušar**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Characterization and Epidemiological Investigation of *Listeria monocytogenes* Isolates using Next-Generation Sequencing

Listeriosis is a serious disease of humans and animals caused by *Listeria monocytogenes*. In the first part of the doctoral dissertation, we retrospectively analysed seven listeriosis outbreaks in small ruminants and one listeriosis outbreak in humans. To this aim, *L. monocytogenes* isolates were typed using whole-genome sequencing (WGS) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). To elucidate the on-farm transmission routes of *L. monocytogenes*, we also performed two epidemiological investigations in the agricultural environment. WGS confirmed the monoclonal nature of the investigated outbreaks and showed a greater discriminatory power compared with PFGE; thus, WGS should replace PFGE as the primary typing method for *L. monocytogenes*. In the second part of the dissertation, we used multilocus sequence typing (MLST) to analyse the population structure of *L. monocytogenes* isolates of animal clinical origin and from the natural environment, which is poorly known. CC1 clone was significantly associated with a clinical origin and with neurolisteriosis. We described a novel and significant association of CC6 and CC37 with abortion. CC9, CC14 and CC29 were significantly associated with the natural environment. The results of the study represent an important contribution to the understanding of the genetic diversity of *L. monocytogenes* in the agricultural environment at the global level.

Strukturne študije z gvanini bogatih zaporedij v promotorskih regijah protoonkogenov

G-kvadrupleksi so štirivijačne strukture, ki jih tvorijo z gvanini (G) bogati oligonukleotidi. G-bogata zaporedja so pogosto v promotorskih regijah genov, ki so povezani z rakavimi obolenji (protoonkogeni). Nastanek G-kvadrupleksnih struktur v teh regijah lahko na več načinov regulira izražanje genov, npr. sterično ovira transkripcijo. V doktorski disertaciji smo se osredotočili na neraziskano možnost, da bi G-kvadruplekse uporabljali za utišanje transkripcije protoonkogenov EGFR in c-kit. Oba gena kodirata tirozin kinazna receptorja in napake v njunem izražanju so povezane s številnimi rakavimi obolenji. Z NMR-spektroskopijo smo proučevali strukturne lastnosti G-kvadrupleksov, ki jih tvorijo oligonukleotidi iz promotorskih regij obeh protoonkogenov. Določili smo poti zvijanja oligonukleotidov v G-kvadruplekse in njihove strukture na atomskem nivoju resolucije. Identificirali smo specifične in unikatne strukturne motive, po katerih se G-kvadrupleksi EGFR in c-kit razlikujejo od že znanih struktur. Določitev strukture visoke resolucije kompleksa med ligandom in G-kvadrupleksom nam je ponudila neprecenljiv vpogled v interakcije med aromatskimi ligandi in G-kvadrupleksi. Pridobljeno znanje nam omogoča racionalno načrtovanje G-kvadrupleksnih ligandov za terapevtske namene. Natančno poznavanje G-kvadrupleksnih struktur in pogojev, v katerih nastajajo, omogoča tudi boljše razumevanje vloge G-kvadrupleksov pri regulaciji genov in možnosti, da se uporabljajo kot alternativni način zdravljenja rakavih obolenj.

ANITA KOTAR, National Institute of Chemistry, Ljubljana
Supervisor: **Janez Plavec**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Structural Investigation of G-rich Sequences in Human Promoter Regions of Proto-Oncogenes

G-quadruplexes are tetrahelical structures formed by guanine (G) rich oligonucleotides. G-rich sequences are frequently found in promoter regions of proto-oncogenes. G-quadruplex formation in these regions can control the expression of genes by various mechanisms, e.g. it can sterically prohibit transcription. In the doctoral dissertation, we focus on examining G-quadruplexes as unexplored targets for silencing the transcription of EGFR and c-kit proto-oncogenes. These two genes code for tyrosine kinase receptors and their deregulation has been implicated in several human cancers. Using NMR spectroscopy, we studied structural properties of G-quadruplexes formed by G-rich oligonucleotides from promoter regions of EGFR and c-kit proto-oncogenes. We explored the folding pathways of oligonucleotides into G-quadruplexes and their structures on the atomic level of resolution. Specific and unique structural motifs were identified in EGFR and c-kit G-quadruplexes, which differ from other known structures. Determination of a high-resolution structure of a complex between a ligand and a G-quadruplex provided us with invaluable insights into interactions between aromatic ligands and G-quadruplexes. The gained understanding allows us to rationally design G-quadruplex ligands for therapeutic use. Knowledge about G-quadruplex structures and the conditions under which they form allows us to better understand the role of G-quadruplexes in gene regulation and their potential use as an alternative cancer treatment.

ANDRAŽ MEHLE, Sensum, d. o. o.

Mentor: **Dejan Tomaževič**, Sensum, d. o. o., Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Analiza farmacevtskih kapsul in pelet s strojnim vidom

Spremljanje in kontrola kakovosti vizualnih značilnosti surovin, polizdelkov in končnih izdelkov sta med ključnimi elementi zagotavljanja kakovosti zdravil. Zato se na številnih stopnjah proizvodnje zdravil med drugimi uveljavlja tehnologija sistemov s strojnim vidom. Za samodejno vizualno pregledovanje končnih izdelkov so se ti sistemi že dobro uveljavili, saj so v primerjavi z ročnim pregledovanjem zanesljivejši in predvsem hitrejši, kar omogoča pregled vseh proizvedenih izdelkov. Različni laboratorijski sistemi s strojnim vidom se rutinsko uporabljajo za samodejno kvantitativno analizo surovin in polizdelkov. V zadnjih letih se sistemi s strojnim vidom vedno bolj uveljavljajo tudi v medprocesnem spremljanju proizvodnih procesov. V doktorski disertaciji obravnavamo sisteme s strojnim vidom, ki se uporabljajo tako za kontrolo kakovosti končnih izdelkov kot za medprocesno spremljanje in analizo proizvodnje. V prvem delu predlagamo in ovrednotimo slikovno metodo za določitev območja oznak na slikah prozornih farmacevtskih kapsul, ki se uporablja za vizualno kontrolo kakovosti. V drugem delu obravnavamo razvoj celovitega postopka za medprocesno spremljanje stopnje aglomeracije farmacevtskih pelet med oblaganjem. Na koncu predlagamo uporabo metod strojnega učenja za izboljšanje točnosti in robustnosti medprocesne ocene stopnje aglomeracije.

ANDRAŽ MEHLE, Sensum, d. o. o.

Mentor: **Dejan Tomaževič**, Sensum, d. o. o., Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Analysis of Pharmaceutical Capsules and Pellets using Machine Vision

Some of the crucial elements of quality assurance of medicinal products include monitoring and quality control of visual characteristics of materials, intermediate products and finished products. Machine vision is a promising technique that has already proven useful or is being promoted at various stages of pharmaceutical manufacturing processes. For example, the machine vision systems for visual inspection of tablets and capsules have proven superior compared to manual visual inspection in terms of reliability and speed, which allows for the inspection of every single product in a batch. Likewise, various laboratory machine vision systems for automated analysis of raw materials and intermediate products are routinely employed. Moreover, in recent years, machine vision systems are increasingly being adopted for in-line and on-line monitoring of manufacturing processes. This dissertation studies machine vision systems for both quality control of finished products as well as in-line monitoring and analysis of manufacturing processes. In the first part, we propose and validate an image analysis method for print region detection on images of transparent pharmaceutical capsules for visual quality control. In the second part, we describe a novel method for in-line monitoring of the agglomeration degree of pharmaceutical pellets during the coating process. Furthermore, we propose a machine learning approach that improves the accuracy and robustness of in-line agglomeration degree estimation.

Pretvorbe kisikovih funkcionalnih skupin v organskih molekulah ob prisotnosti molekularnega joda ali/in *N*-halo spojin

Vedno strožje regulativne zahteve v farmacevtski industriji ostajajo pomembna gonilna sila, da organska kemija pri pripravi različnih sinteznih gradnikov teži k razvoju za okolje manj škodljivih pristopov. Namen raziskave je bil proučiti možnosti uporabe določenih halogenskih spojin v vlogi nekovinskih mediatorjev pri nekaterih pomembnejših in uveljavljenih transformacijah, kot so direktno dehidracijsko pripajanje ogljik–ogljik, esterifikacija in aldolna kondenzacija. V prvem koraku smo razvili metodo za direktno dehidracijsko pripajanje benzilnih alkoholov in fenil substituiranih alkenov, ki vključuje uporabo molekularnega joda kot ekološko sprejemljivega nekovinskega katalizatorja. Razviti sistem omogoča sintezo polisubstituiranih olefinov z velikimi izkoristki in vodenje reakcij v reakcijskih pogojih brez uporabe topil tudi na večji skali. V nadaljevanju smo predstavili metodo direktne kondenzacije karboksilnih kislin in alkoholov v prisotnosti *N*-bromosukcinimida (NBS), priročnega in cenovno ugodnega mediatorja, ki omogoča enostavno delo, reciklažo in vodenje reakcije v blagih reakcijskih pogojih brez uporabe topil pri relativno nizkih temperaturah (70 °C) v prisotnosti zraka in tudi vlage. Metoda omogoča esterifikacijo širokega spektra substituiranih benzojskih kislin ter mono-, di- in trikarboksi alkil derivatov, njeno učinkovitost pa smo prikazali tudi na kompleksnejših strukturnih ogrodjih, kot sta holna in dehidroholna kislina. V naslednjem koraku smo metodo esterifikacije nadgradili z uporabo 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoina (DBDMH), ki v primerjavi z *N*-bromosukcinimidom omogoča esterifikacijo več karboksilnih kislin, pri tem pa ohranja vse prednosti reakcijskega sistema z NBS. Da bi pokazali, da DBDMH lahko deluje kot splošen aktivator karbonilne skupine, smo metodologijo v zaključku razširili še na aldolno kondenzacijo aldehydov.

KLARA ČEBULAR, Jožef Stefan Institute, Ljubljana
Supervisor: **Stojan Stavber**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Transformations of Oxygen Functional Groups in Organic Molecules Mediated by Molecular Iodine or/and *N*-Halo Compounds

Increasingly stricter regulative demands in pharmaceutical industry remain an important driving force towards the development of environmentally friendlier methodologies for preparation of various synthetic building blocks in organic chemistry. In this context, the purpose of this research lays in the exploration of capabilities of certain halogen compounds to act as metal-free mediators in significant and established reactions, such as dehydrative C–C coupling, esterification and aldol condensation. Firstly, a method for direct dehydrative C–C coupling between benzylic alcohols and phenyl-substituted alkenes was developed, using molecular iodine as an ecologically acceptable metal-free catalyst. The method allows solvent-free reaction conditions and scale-up, furnishing polysubstituted olefins in high yields. Further on, air- and moisture-tolerant methodology for direct esterification of carboxylic acids and alcohols was developed, using a convenient, easily-handled, recyclable, low-priced bench-top mediator – *N*-bromosuccinimide (NBS), which allows mild neat reaction conditions and relatively low temperatures (70 °C), providing comprehensive esterification of substituted benzoic acids as well as of mono-, di- and tri-carboxy alkyl derivatives. The efficacy of this method was elaborated also on more complex structural backbones, such as cholic and dehydrocholic acid. Subsequently, the esterification protocol was further upgraded by using 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DBDMH), which allows the use of a broader scope of carboxylic acids than the *N*-bromosuccinimide mediator, while maintaining all other advantages of the NBS-mediated reaction system. Lastly, to show a general ability of DBDMH acting as the activator of the carbonyl functionality, the methodology was expanded also to the aldol condensation of aldehydes.

MATEJA ŠENICA, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Franci Štampar**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Maja Mikulič Petkovšek**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vsebnost in vrste fenolov in cianogenih glikozidov v različnih delih sadnih rastlin

Nekatere sadne vrste in njihovi plodovi vsebujejo številne koristne snovi. To so predvsem fenoli, ki imajo na naše telo antioksidativni učinek. Manj znano pa je, da nekateri plodovi vsebujejo tudi za nas manj koristne ali celo škodljive snovi. Med njimi so cianogeni glikozidi, ki nam lahko povzročijo vrsto neprijetnosti, če jih zaužijemo preveč. Po spletu se celo širi zmotno mnenje, da te snovi zdravijo rakava obolenja. Zelo pomembna sadna vrsta, ki vsebuje tovrstne škodljive snovi, je črni bezeg, katerega cvetovi in plodovi se povsod po svetu uporabljajo v zdravilne namene. Z nalogo smo modificirali obstoječo metodo in v različnih vzorcih določili prisotnost in vsebnost cianogenih glikozidov. Metoda je enostavnejša, hitrejša, cenovno ugodnejša ter za okolje in zdravje manj škodljiva kot predhodne. V študiji smo tudi ugotavljali, kako na vsebnost proučevanih snovi v rastlini vpliva okolje. Bolj je rastlina izpostavljena stresnim razmeram (nizka temperatura, večje UV-sevanje ...), več zaščitnih snovi kopiči, da se obvaruje pred negativnimi vplivi okolja. Poznavanje manj znanih rastlin in nekaterih zdravilnih rastlin je ponovno v razmahu. Vsebujejo pa lahko vrsto škodljivih snovi (alkaloidi, cianogeni glikozidi), vsebnost katerih se z večjim okoljskim stresom še povečuje.

MATEJA ŠENICA, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: **Franci Štampar**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Maja Mikulič Petkovšek**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Content and Types of Phenolics and Cyanogenic Glycosides in Different Parts of Fruit Species

Many fruit species contain various beneficial compounds. These compounds are mainly phenolics with high antioxidant activity. It is much less known that some fruits also contain harmful or even toxic compounds. These are cyanogenic glycosides. Ingestion of larger doses of cyanogenic glycosides can cause many harmful effects on human health. They have been promoted as an alternative cancer therapy online, although this is completely without scientific basis. Black elderberry also contains such harmful compounds. Its flowers and berries are used all over the world for various medicinal purposes. In a postgraduate study, we modified an existing method for determining the presence of cyanogenic glycosides. The new, modified method is simpler and cheaper than the previous one. Moreover, it is environmentally friendly, and the environment is one of the factors that influence the studied compounds. The more plants are exposed to negative conditions (lower temperature, higher solar irradiation), the more protective compounds they produce. Plants accumulate these compounds to protect themselves against negative conditions. In recent years, interest in various herbal and medicinal plants has greatly increased, but they accumulate various harmful compounds (alkaloids, cyanogenic glycosides), which highly accumulate under different stress circumstances.

Kristijan Skok, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru
Mentor: **Iztok Takač**, Univerzitetni klinični center Maribor
Somentor: **Uroš Maver**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Razvoj in testiranje celičnih linij z namenom proučevanja trojno negativnega raka dojke

Eden izmed podtipov raka dojke je trojno negativni rak dojke, za katerega je značilna izjemna heterogenost, odsotnost hormonskih receptorjev za estrogene in progesteron ter odsotnost izraženosti receptorjev za človeški epidermalni rastni faktor 2. Pri tem podtipu raka dojke sta prognoza in stopnja preživetja najslabši. Pomembno vlogo pri raziskovanju značilnosti tumorja imajo celične linije. V svoji nalogi sem želel pripraviti prvo celično linijo trojno negativnega raka dojke v našem okolju. Del operativno odstranjenega tkiva je bil po patologovem pregledu v najkrajšem možnem času prenesen v laboratorij, kjer se je nemudoma začela izolacija celic. Postopek je potekal v več korakih in je vključeval makroskopsko ločitev maščobnega tkiva od tumorja, mehansko in encimsko razgradnjo tkiva, suspendiranje in inkubacijo celic. Gojenje po standardnih postopkih je potekalo do četrte pasaže in z vsako višjo pasažo so se ohranile celice v tistih gojilnih posodicah, v katerih je spontano prevladal morfološko epitelijski tip celic. Po uspešni izolaciji smo v sklopu karakterizacije (RT-qPCR) ob pozitivni kontroli v obliki komercialnih celičnih linij raka dojke potrdili trojno negativni status in skladnost naše linije s primarnim tkivom.

Kristijan Skok, Faculty of Medicine, University of Maribor
Supervisor: **Iztok Takač**, University Medical Centre Maribor
Co-supervisor: **Uroš Maver**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Development and Testing of Cell Lines for Study of Triple-Negative Breast Cancer

One type of breast cancer is the triple negative subtype, which is known for its heterogeneity and loss of receptors for oestrogen, progesterone as well as lack of expression for human epidermal growth factor - 2. The prognosis and survival rates for this subtype are, in comparison, the worst. Breast cancer cell lines play a significant role in breast cancer research. The aim of this research was to develop and optimize the first triple negative breast cancer cell line in our region, which would then be used for the study of triple negative breast cancer. After examination by the pathologist, part of the surgically removed tissue was promptly transported to the laboratory where cell isolation was started. Isolation consisted of several steps, including separation of fat from tumour tissue, mechanical and enzymatic homogenisation, suspension, and incubation. The cells were cultivated according to standard cultivation protocols until the fourth passage. Later within every passage, cells exhibiting spontaneous epithelial cell growth were preserved. After successful isolation, we characterised our cells using RT-qPCR with positive controls in the form of commercially available cell lines and confirmed that the primary cell line retained the triple-negative status of the original tissue.

Optimizacija reakcijskih parametrov Suzuki-Miyaura reakcije

Cilj magistrskega dela je bil določiti optimalne reakcijske parametre Suzuki-Miyaurove reakcije v zelenih pogojih z uporabo predkatalizatorja $[\text{Pd}(\text{Py-tzNHC})_2](\text{BF}_4)_2$. Pri optimizaciji smo skušali čim bolj slediti načelom zelene kemije, tj. uporabi za okolje neškodljivih topil in baz ter izvajanju reakcij pri čim nižji temperaturi ter s čim manjšo količino paladija. Na izbrani modelni reakciji smo preverjali učinkovitost različnih topil in baz. Najvišje stopnje pretvorb substrata v produkt smo dobili pri uporabi vode kot topila, kar se je skladalo z željo po sledenju načelom zelene kemije. Pri pregledu izbranih baz smo velike pretvorbe dobili pri kalijevev karbonatu (K_2CO_3), kalijevev fosfatu (K_3PO_4) in dinatrijevev hidrogenfosfatu heptahidratu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), pri katerih je bila izbira baze za nadaljnje reakcije (K_2CO_3) določena glede na njeno ceno in varnost za okolje. Po dobljenih optimalnih reakcijskih parametrih za modelno reakcijo smo učinkovitost metode preverili na različnih substratih. Poleg vpliva temperature, baze in časa reakcije na stopnjo pretvorbe pri Suzuki-Miyaurovi reakciji vplivajo tudi substituenti na substratih in morebitne sterične ovire, ki jih povzročajo, predvsem pa vrsta aril halida (Cl, Br, I). Izbira substratov je bila načrtovana tako, da smo lahko opazovali vpliv različnih substituentov pri aril borovih kislinah in aril halidih na stopnjo pretvorbe. Izbrali smo tudi različne (hetero)aril halide in (hetero)borove kisline. Reakcije so učinkovito potekale na aril bromidih, medtem ko so aril kloridi do zelenih produktov vodili z nižjimi stopnjami pretvorbe. Poleg preverjanja učinkovitosti paladijevega predkatalizatorja pri Suzuki-Miyaurovi reakciji smo izvedli še nekaj eksperimentov za določitev poteka katalize, da bi ugotovili, ali gre za homogeno ali heterogeno katalizo. Ugotovili smo, da je homogena. Poskušali smo določiti še potek reakcije in izboljšati proces izolacije produkta. Predpostavili smo, da se karbonatni ion veže na borov atom v borovi kislini in tvori tetravalentni borov ion, ki nato reagira s produktom oksidativne adicije.

Rok Marinič Podbršček, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Martin Gazvoda**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Optimization of Reaction Parameters of Suzuki-Miyaura Reaction

The goal of this master's thesis was to determine optimal reaction parameters of the Suzuki-Miyaura reaction under green conditions with the usage of the palladium precatalyst $[\text{Pd}(\text{Py-tzNHC})_2](\text{BF}_4)_2$. During optimization, we tried to follow the principles of green chemistry, which meant the usage of environmentally friendly solvents and bases, and low temperature of the reaction mixture. In this process, we also tried to use a low loading of the palladium catalyst. A model reaction was chosen to determine the most efficient base and solvent. Conveniently, water turned out to be the solvent of choice for the studied reaction, which fits perfectly into the principles of green chemistry. The screening of bases showed that potassium carbonate (K_2CO_3), potassium phosphate (K_3PO_4), and disodium hydrogenphosphate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were the most efficient bases. Since the above bases gave comparable results, the selection of the base for further reactions (K_2CO_3) was made on the basis of its price and environmental friendliness. After the reaction parameters were determined, the efficiency of the method was tested on different substances. Apart from the influence of the temperature, base and reaction time on the conversion rate, the electronic-influence and steric hindrance of substituents on substrates were also found to play an important role in the Suzuki-Miyaura reaction. Likewise, the type of halogen atom (Cl, Br, I) proved crucial for the (in)activity of this substrate. The selection of the substrates was based on the possibility of observing the effect of different groups on aryl boronic acids and aryl halides on the conversion rate. We have variegated different substituents on both, aryl halides and boronic acids. We have also tested different (hetero)aryls and (hetero)boronic acids. High yields of products were obtained in the case of aryl bromides, whereas aryl chlorides returned low conversions of starting material. Apart from precatalyst efficiency on the Suzuki-Miyaura reaction, we also wanted to determine the catalytic pathway, starting with the determination of whether the catalysis is either homogeneous or heterogeneous. Mercury poisoning experiments confirmed that the system is operating via homogeneous catalysis. We tried to determine the course of reaction and improve the isolation process. We postulated that carbonate ion reacts with boron atom of boronic acid and creates tetravalent boron ion, which further reacts with the product of oxidative addition.

Sandi Svetič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Rok Dreu**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Teja Brezovar**, Krka, d. d., Novo mesto

Primerjava robustnosti postopka filmskega oblaganja pelet brez in z medprocesnim vrednotenjem debeline obloge

Farmacevtsko proizvodnjo večinoma še vedno izvajamo v obliki serij z definirano velikostjo, njihovo kakovost pa preverjamo tako, da pred sprostitvijo izdelka na trg analiziramo vzorce. Medprocesno vrednotenje z določanjem vrednosti kritičnih lastnosti polizdelka pa nam omogoča zagotavljanje kakovosti izdelka že med proizvodnjo. Namen naloge je bil primerjati robustnost procesa filmskega oblaganja pelet z oblogo za podaljšano sproščanje, vodenega na klasičen način do porabe ciljne mase suspenzije za oblaganje in vodenega z medprocesnim analizatorjem PATVIS APA do doseganja ciljne debeline obloge, izmerjene z analizatorjem. Kinetiko sproščanja učinkovine smo določili s preizkusom sproščanja, profile sproščanja smo primerjali med seboj. V prvem delu naloge nam je uspelo pokazati, da sta ob enakih pogojih izvedbe oba načina vodenja procesa primerljivo robustna. V drugem delu naloge pa smo želeli vplivati na izkoristek procesa z večjo vlažnostjo vhodnega zraka ter pri manjšem razmiku in manjši masi pelet z manjšim razmikom med distribucijsko ploščo in razmejitvenim valjem v Wursterjevi komori. Na podlagi vseh zbranih rezultatov smo zaključili, da so bili izvedeni procesi filmskega oblaganja brez medprocesne kontrole in z njo primerljivo robustni.

Sandi Svetič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Rok Dreu**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Teja Brezovar**, Krka d. d., Novo mesto

Comparison of Pellet Film Coating Robustness with and without In-Process Coating Thickness Evaluation

Pharmaceutical production is mostly still carried out in the form of batches with a defined size. Their quality is verified by analysing the batch samples before releasing the product on the market. Process analytical technology allows us to assess product critical quality attributes during the manufacturing process and thus ensure its quality. The purpose of the thesis was to compare the robustness of the pellet coating process with and without the in-process coating thickness evaluation. Coating processes were stopped when target mass of the suspension was sprayed or when the target coating thickness was achieved, as determined with the PATVIS APA in-process analyser. The dissolution test was used to determine the release kinetics of the active substance from sustained release coated pellets and the resulting dissolution profiles were compared with the goal of verifying comparability of individual batches of pellets. In the first part of the thesis, we demonstrated that under equal process conditions, both process control approaches are comparably robust. In the second part of the thesis, we tested the robustness of processes under deliberate variations of process conditions with the aim of influencing process yield. The first variation of conditions included raising the humidity of the inlet air, and the second and third variations included coating the same and smaller mass of pellet cores while reducing the gap between the distribution plate and Wurster partition. Based on all obtained results, we concluded that the film coating processes with and without in-process control exhibit comparable robustness.

Taja Ložar, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Cvetka Grašič Kuhar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Tanja Jesenko**, Onkološki inštitut Ljubljana

Predklinično in klinično testiranje protokola za izolacijo cirkulirajočih tumorskih celic

Tekočinska biopsija je neinvazivna diagnostična metoda, ki obsega odvzem in preiskavo krvi na prisotnost cirkulirajočih tumorskih celic (CTC) ali njihovih produktov. Številne študije so dokazale, da je število CTC v krvi bolnikov neodvisen prognostični dejavnik pri različnih vrstah raka. Namen raziskovalne naloge je bil slediti trendom v obravnavi bolnic z rakom dojke z vzpostavitvijo metode za izolacijo CTC, ki temelji na izolaciji celic v magnetnem polju na podlagi izražanja epitelijskega celičnega označevalca. V predkliničnem delu raziskave smo opredelili občutljivost in specifičnost metode (34 % in 100 %) in pokazali, da metoda ohrani morfologijo celic raka dojke. V kliničnem delu raziskave smo izvedli prospektivno klinično raziskavo in vanjo vključili 45 bolnic z lokalno napredovalim rakom dojke pred neoadjuvantno kemoterapijo ter poskušali izolirati CTC iz njihove krvi. Pozitivna identifikacija CTC je temeljila na prisotnosti morfoloških tumorskih značilnosti v citoloških preparatih, barvanih po Giemsi, ter pozitivnem imunocitokemijskem barvanju na pancitokeratin. Pri eni bolnici (2,3 %) je vzorec vseboval CTC, ki so ustrezale morfološkim in imunocitokemijskim kriterijem. Pri 14 bolnicah (31,8 %) so bile celice v vzorcih delno degenerirane in se z imunocitokemijskim barvanjem niso obarvale, a so kazale morfološke značilnosti tumorskih celic. Zaradi slabe občutljivosti metode in opažene degeneriranosti celic bodisi zaradi obdelave vzorca bodisi zaradi delovanja strižnih sil pred izolacijo menimo, da preizkušena metoda ni primerna za klinično rabo in predlagamo, da se uporablja v raziskovalne namene.

Taja Ložar, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Supervisor: **Cvetka Grašič Kuhar**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Tanja Jesenko**, Institute of Oncology Ljubljana

Preclinical and Clinical Validation of a Circulating Tumor Cell Isolation Protocol

The liquid biopsy is a non-invasive diagnostic test consisting of a blood draw and subsequent screening for the presence of circulating tumor cells (CTC) or their products. Multiple studies have demonstrated CTC count is an independent prognostic factor in various types of cancer. The aim of this study was to follow the trends in breast cancer treatment by establishing a method for CTC isolation based on magnetic activated cell sorting of epithelial cell adhesion molecule positive cells. In the preclinical part of the study, the method's sensitivity and specificity was determined (34% and 100%, respectively) and we observed the method preserves the morphology of cultured breast cancer cells. In the clinical part of the study, we carried out a prospective clinical trial. 45 patients with locally advanced breast cancer prior to neoadjuvant chemotherapy were included in the study and CTC isolation was attempted. Positive identification of CTCs was based on the presence of tumor cell morphology on Giemsa stained slides and positive immunocytochemical staining of pancitokeratin. In one patient (2.3%) the sample contained cells that meet the morphological and immunocytochemical criteria (CTC positive). In 14 (31.8%) other patients, samples contained cells that were partially degenerated and did not stain, but showed morphological characteristics of tumor cells. Due to low sensitivity of the method and the observed degeneration of cells that may be caused by the isolation process or by sheer forces prior to it, we believe the tested method is not suitable for clinical use and we propose the method be used for research purposes.

Eva Praunseis, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Janez Mravljak**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Jure Hren**, Lek, d. d., Ljubljana

Raziskava in vrednotenje vpliva formaldehida na fizikalno-kemijske lastnosti trdih želatinskih kapsul

Želatina je v številnih farmacevtskih oblikah zelo pogosto uporabljen material. Njena slabost je reaktivnost, ki povzroči premreženje polimera. Premreženje povzroči spremembo strukture, hidrofilnosti in molekulske mase želatine, kar vpliva na kvaliteto farmacevtske oblike. Formaldehid močno pospeši premreženje želatine. Namen naloge je bil raziskati vpliv formaldehida na lastnosti trdih želatinskih kapsul. Kapsule smo izpostavili atmosferi formaldehida in jih polnili s pomožnimi snovmi (HPMC in PEG), iz katerih nastaja formaldehid *in situ*. Na trdih želatinskih kapsulah smo izvedli gravimetrično analizo netopnega preostanka, teste sproščanja in posneli spektre FT-IR. Ugotovili smo, da je hitrost reakcije premreženja odvisna od količine formaldehida. Masa netopnega preostanka in profili sproščanja so v korelaciji z obsegom premreženja. Dlje, kot je kapsula izpostavljena formaldehidu, oz. večja, kot je količina generiranega formaldehida *in situ*, večja je masa netopnega preostanka in bolj je upočasnjeno sproščanje učinkovine iz želatinskih kapsul. Z analizo FT-IR nismo mogli ugotoviti signifikantnih razlik med spektri premreženih in nepremreženih kapsul. Kot najboljša (najbolj občutljiva) metoda za zaznavanje premreženja v trdih želatinskih kapsulah se je pokazal test sproščanja.

Eva Praunseis, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Janez Mravljak**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Jure Hren**, Lek d. d., Ljubljana

Research and Evaluation of Formaldehyde Effect on Physicochemical Characteristics of Hard Gelatin Capsules

Gelatin is a widely used material in many pharmaceutical formulations. Its use is problematic because of its reactivity, which leads to cross-linking of the polymer. Cross-linked gelatin has a changed structure, is less hydrophilic and has a higher molecular mass. This results in changed characteristics of the polymer and quality of the dosage form. The presence of formaldehyde accelerates cross-linking of the gelatin polymer. The aim of the study was to evaluate the effect of formaldehyde on the characteristics of hard gelatin capsules. Hard gelatin capsules were exposed to a formaldehyde atmosphere and filled with excipients (HPMC and PEG), which produce formaldehyde *in situ* during the degradation process. On stressed hard gelatin capsules, we performed gravimetric determination of insoluble residue and dissolution tests, and recorded their FT-IR spectra. We found that the rate of reaction is determined by the concentration of formaldehyde. Mass of insoluble residue and dissolution profiles correlate with the extent of cross-linking. Prolonged exposure time or more *in situ* generated formaldehyde result in a higher mass of insoluble residue and slowed dissolution profiles. By analysing the FT-IR spectra, we could not distinguish between the spectra of cross-linked and uncross-linked capsules. The dissolution test proved to be the most sensitive method for detection of cross-linking in hard gelatin capsules.

Eric Frančišković, Department of Pharmacy, University of Copenhagen
Mentor: **Jörg P. Kutter**, Department of Pharmacy, University of Copenhagen
Sommentor: **Drago Sticker**, Department of Pharmacy, University of Copenhagen

Razvoj integriranega hidrodinamičnega in elektrokinetičnega injiciranja ter elektroforetske separacije v biofarmaciji

Med bolj opaznimi trendi v analizni kemiji je miniaturizacija naprav in porast sklopljenih tehnik. Mikrofluidika daje vtis idealne kombinacije obeh: majhna velikost dovoljuje integracijo več stopenj obdelave in analize vzorca v dokaj majhnem prostoru, s čimer se zmanjšajo stroški izdelave, obratovanja in potrebne količine vzorca, prav tako pa ponuja večje možnosti popolne avtomatizacije celotnega analiznega postopka. Ni presenetljivo, da se je mikrofluidika hitro razširila in postala zelo multidisciplinarna, saj zajema področja od kemične analize in inženirstva do medicinske diagnostike in farmacije. V nalogi smo proučevali možnost razvoja hibridne multidimenzionalne separacijske naprave (mikročip). Omogočala bi večkratno vzorčenje majhnih volumnov peptidne mešanice iz kromatografskih sistemov, kot je npr. HPLC, separacije z elektroforezo (microchip electrophoresis, MCE) in detekcije z *on-chip* elektrosprej masno spektrometrijo. Prototip mikročipa z integrirano membrano, ki je služila kot uporni element, je uspešno ločil sistem s tlačnim gradientom od elektrokinetičnega z minimalnim puščanjem med sistemi. Razvite sheme injiciranja z električnimi pulzi so pokazale linearno odvisnost injiciranja od časa trajanja pulza in uporabljene napetosti, kar je omogočilo natančno kontrolo injiciranega volumna. Separacija dveh poskusnih analitov, fluoresceina in 5-karboksifluoresceina, je nadalje dokazala separacijske zmožnosti razvite mikrofluidne naprave. Da bi razvili pravi sistem μ -TAS (micro total analysis system), je bil karakteriziran novi vmesnik *chip-to-chip*, ki omogoča združitev več čipov oz. delov čipa v celoto, ter njegov vpliv na kakovost kromatografskega vrha pri prehodu čez omenjeni vmesnik. Prav tako je bil razvit prevodni polimer tiolen z dodatkom ogljikovih nanocev, ki bi služil kot električni kontakt brez mrtvega volumna v kapilari za potrebe CE-ESI-MS.

Eric Frančišković, Department of Pharmacy, University of Copenhagen
Supervisor: **Jörg P. Kutter**, Department of Pharmacy, University of Copenhagen
Co-supervisor: **Drago Sticker**, Department of Pharmacy, University of Copenhagen

Development of Integrated Hydrodynamic to Electrokinetic Flow Injection and Hyphenated Electrophoretic Separation for Potential Biopharmaceutical Separations

Among the most notable trends in analytical chemistry nowadays are the miniaturization of devices and the rise of hyphenated techniques. Microfluidics seems to be a perfect combination of both: the small size allows for the integration of multiple sample treatment and analysis steps within a small space, thus lowering the costs of fabrication, operation, and sample quantity, as well as offering a greater possibility for full automation of the entire analytical procedure. It is no wonder that microfluidics have rapidly expanded over the years to become a highly multidisciplinary field, covering areas from chemical analysis, engineering, to medical diagnostics and pharmaceutical sciences. In the present work, the possibility of developing a hybrid multidimensional separation device (microchip) was investigated. The device would have been able to repeatedly sample small amounts of peptide mixtures coming from the pressure-driven chromatographic system, and separate peptides via microchip electrophoresis (MCE). Detection would have been performed via on-chip electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). A chip prototype with an integrated membrane serving as a high flow resistance element was developed. It was able to successfully isolate the pressure-driven from the electrokinetically-driven system with minor leakage between the two. The developed injection schemes via electric pulse were shown to be linearly dependent on the injection time and voltage, thus allowing for the possibility of having precise control over injection volumes. The separation of two model analytes, fluorescein and 5-carboxyfluorescein, furthermore illustrated the feasibility of performing real separations on the microfluidic device. Finally, with the purpose of developing a true μ -TAS, an effect of the novel chip-to-chip interface that allows the integration of multiple chips or their components was characterised, and its effect on peak migration was evaluated. A conductive thiol-ene (with added carbon nanotubes), which would serve as an in-channel zero dead volume electrical connection for CE-ESI-MS, was developed in the process.

Paladij/rutenij dvojno ariliranje heteroaril kinolinskih derivatov

Reakcije funkcionalizacije petčlenskih heterociklov največkrat potekajo na mestu C2 in/ali C5, medtem ko sta mesti C3 in C4 manj reaktivni. Z uporabo dveh kovin prehoda (rutenij in paladij) smo selektivno funkcionalizirali petčlenske heterocikle s kinolinom kot usmerjajočo skupino. Izvedli smo Ru-katalizirano C–H ariliranje 2-heteroarilkinolinov ter z rentgensko analizo dokazali, da poteka prek tvorbe petčlenskega rutenacikla. Temu je sledilo nadaljnje ariliranje heterocikla s Pd-katalizatorjem. Proučili smo regioselektivnost reakcij in poiskali optimalne reakcijske pogoje za posamezno stopnjo neposredne C–H funkcionalizacije za doseganje čim višje stopnje pretvorbe do končnih diariliranih produktov. V obeh stopnjah smo reakcije 2-heteroarilkinolinov izvedli z različnimi aril bromidi, ki so vključevali tako elektronprivlačne kot tudi elektrondonorske skupine. Dokazali smo, da je izvedba reakcije »one pot« ustrezna alternativa stopenjsko izvedeni reakciji, saj so izkoristki primerljivi. Poleg tega je izvedba lažja in hitrejša, saj se izognemo dodatni izolaciji produkta, ki nastane kot intermediat.

Urša Rozman, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Bogdan Štefane**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Palladium/Ruthenium Dual Arylation of Heteroaryl Quinoline Derivatives

Functionalization of five-membered heteroaromatics generally proceeds at the C2- and/or C5-position, whereas C3- and C4-positions are less reactive. The aim of our work was to selectively functionalize five-membered heterocycles with the use of two different transition metals (ruthenium and palladium) and quinoline as a directing group. We performed Ru-catalyzed C–H arylation of 2-heteroarylquinolines. Additionally, the formation of a five-membered ruthenacycle was proved, which was confirmed by crystal structure analysis of the complex. Furthermore, Pd-catalyzed arylation of heterocycle was carried out. We studied the regioselectivity of the performed reactions and optimized the reaction conditions for each step of the reaction. We wanted to achieve the highest possible conversion to the final diarylated products. In both steps, the reactions of 2-heteroarylquinolines were carried out with different aryl bromides, which included both electron-withdrawing and electron-donating groups. We proved that the 'one pot' reaction is an appropriate alternative to a stepwise reaction, since the yields are comparable. Additionally, it is faster and easier to perform because it avoids the isolation of the product, which forms as an intermediate.

Andreja Horvat, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentorica: **Žane Temova Rakuša**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Razvoj ekstrakcijskega postopka za določanje hidrofilnih in lipofilnih vitaminov iz multivitaminskih izdelkov

Multivitaminski izdelki pogosto vsebujejo hidrofilne in lipofilne vitamine, ki se v fizikalno-kemijskih lastnostih zelo razlikujejo. Ker v literaturi ne najdemo postopkov za enostavno in hkratno pripravo vzorcev za analizo obeh skupin vitaminov, smo razvili ekstrakcijske postopke za sočasno ločevanje hidrofilnih in lipofilnih vitaminov. Vrednotili smo deset hidrofilnih (askorbinska kislina, tiaminijev klorid, riboflavin, nikotinamid, kalcijev pantotenat, piridoksinijev klorid, biotin, folna kislina, cianokobalamin in tetrahidrofolna kislina) in pet lipofilnih (retinil acetat, retinil palmitat, D₃, K₁, tokoferil acetat) vitaminov, ki se najpogosteje pojavljajo v multivitaminskih izdelkih. Da bi vrednotili vitamine, smo pred razvojem ekstrakcijskega postopka preverili ustreznost dveh prej razvitih kromatografskih metod, ene za lipofilne (metoda HPLC) in druge za hidrofilne vitamine (metoda UHPLC). Metodi smo ovrednotili v skladu s smernicami ICH in za obe potrdili selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost in stabilnost analitov med analizo. Razvoj in optimizacijo ekstrakcijskega postopka smo najprej izvedli na vodnih zmesih standardov, nato pa še na izbranih izdelkih različnih farmacevtskih oblik. Postavili smo tri ločene ekstrakcijske postopke, in sicer za sirupe, kapsule in tablete, pri čemer smo pri optimizaciji preverjali različne ekstrakcijske parametre: vrstni red uporabe topil, izbiro vodne in organske faze, njun volumen in razmerje, število ciklov ekstrakcije, čas mešanja in stresanja, odvzem vzorca in druge. Z optimiziranimi postopki smo uspešno ekstrahirali obravnavane vitamine iz vseh treh farmacevtskih oblik, kar smo za večino analitov ovrednotili s ponovljivimi (RSD < 5 %) in velikimi izkoristki ekstrakcije (100 ± 10 %). Ugotovljene vsebnosti vitaminov v izbranih izdelkih so bile večinoma večje od navedenih, a le izjemoma zunaj mej sprejemljivosti, ki veljajo po priporočilih USP za prehranska dopolnila. Razvite postopke za sočasno ekstrakcijo vitaminov smo nato primerjali s prej razvitimi ločenimi postopki za obe skupini vitaminov in dobili primerljive rezultate. Zaključimo lahko, da so vpeljeni postopki priprave vzorca primerni za analizo vitaminov v multivitaminskih izdelkih, njihova glavna prednost pa je enkratna priprava vzorca za obe skupini vitaminov, kar skrajša čas izvedbe ter zmanjša porabo vzorca in topil za analizo.

Andreja Horvat, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Žane Temova Rakuša**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Development of Extraction Procedure of Hydrophilic and Lipophilic Vitamins from Multivitamin Products

Water-soluble and fat-soluble vitamins are very different in their physicochemical properties, but are often found together in multivitamin products. Our main goal was to develop simple procedures for simultaneous extraction and separation of water- and fat-soluble vitamins, because such sample preparation for the analysis of both vitamin groups cannot be found in other literature. We evaluated ten hydrophilic vitamins (ascorbic acid, thiamine hydrochloride, riboflavin, niacinamide, calcium pantothenate, pyridoxine hydrochloride, biotin, folic acid, cyanocobalamin and tetrahydrofolic acid) and five lipophilic vitamins (retinyl acetate, retinyl palmitate, D₃, K₁, alpha tocopheryl acetate) most commonly found in multivitamin products. Two previously developed chromatographic methods (HPLC method for fat-soluble and UHPLC method for water-soluble vitamins) were verified in accordance with ICH guidelines before the development of the extraction procedures. We confirmed the selectivity, linearity, accuracy, repeatability and sample stability for both vitamin groups. The development of the extraction procedures was first performed on aqueous standards mixtures and later also on selected commercial products in different dosage forms. For this purpose, three different extraction procedures were developed for each dosage form (capsules, tablets and oral solutions). During extraction procedure optimization, the following parameters were verified: solvent addition order, choice of aqueous and organic solvent, their volumes and ratios, number of extraction cycles, mixing and shaking time, sampling and others. The developed final extraction procedures were suitable for vitamins extraction from each tested dosage form. It was then confirmed by high extraction efficiency (100 ± 10%) and low variability of the results (RSD < 5%) for most analytes. The determined vitamin contents in the tested products were typically higher than the labelled contents, but were seldom beyond the acceptable USP limits for dietary supplements. The developed extraction procedures were further compared with established extraction procedures of the separate vitamin groups. The obtained results were equivalent or even better. Therefore, it can be concluded that the developed extraction procedures are suitable for the analysis of both vitamin groups in multivitamin products, with a single sample preparation as the main advantage, thus reducing the time and sample usage as well as solvents for analysis.



Tjaša Pavčnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Janez Košmrlj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Razvoj metode za *gem*-dimerizacijo terminalnih acetilenov

V raziskovalnem delu smo se ukvarjali z razvojem metode za selektivno *gem*-dimerizacijo terminalnih acetilenov. Na primeru modelne reakcije fenilacetilena (1a) smo optimizirali reakcijske pogoje, to je izbiro katalizatorja, topila, temperature in reakcijskega časa. Kot izhodne substrate smo uporabili različne aromatske in alifatske acetilene. V literaturi je mogoče zaslediti podatke o temperaturni občutljivosti eninov, zato smo analizirali stabilnost izbranih produktov. Razvili smo metodo za izolacijo in čiščenje nastalih produktov, ki smo jih karakterizirali s tehnikami NMR. S tako pripravljenimi *gem*-enini smo preverili njihovo uporabnost za Heckovo reakcijo. Z uporabo stabilnega enina 2f* in 4-jodotoluena (4a) nam je v prisotnosti kompleksa PEPPSI Pd-tzNHC uspelo pripraviti želeni trisubstituirani produkt.

Tjaša Pavčnik, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Janez Košmrlj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Development of Synthetic Procedure for *Gem*-Dimerization of Terminal Alkynes

This work is aimed to describe the development of a method for selective *gem*-dimerization of terminal acetylenes. In model reaction of phenylacetylene (1a), the reaction conditions were optimized through the choice of catalyst, solvent, temperature and reaction time. Various aromatic and aliphatic acetylenes were used as starting substrates. Data on the temperature sensitivity of enynes can be traced in the literature, prompting us to analyze the stability of the selected products. We have developed a method for isolating and purifying the resulting products, which were characterized by NMR techniques. With the *gem*-enynes prepared in this way, we tested their usefulness for the Heck reaction. Using the stable enyne 2f* and 4-iodotoluene (4a), we were able to prepare the desired trisubstituted product in the presence of a PEPPSI Pd-tzNHC complex.

Neja Kuret, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

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

Somentorica: **Jerica Sabotič**, Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Delovanje lektina kokaprina na patogene in probiotične bakterije

Odpornost mikroorganizmov proti protimikrobnim učinkovinam postaja globalna težava javnega zdravstva. Protimikrobna sredstva so problematična tudi z vidika normalnega človeškega mikrobioma, saj zavrejo rast probiotičnih, za človeka koristnih bakterij. Lektini, proteini, ki se reverzibilno in specifično vežejo na ogljikove hidrate, imajo dokazano protibakterijsko aktivnost in potencialno predstavljajo alternativno strategijo nadzora ali preprečevanja okužb z odpornimi mikroorganizmi. V raziskovalnem delu smo z bakterijskim ekspresijskim sistemom pripravili lektin kokaprin (KKP) iz gobe *Coprinosopsis cinerea* ter proučevali njegov vpliv na rast in adhezijo patogenih in probiotičnih mikroorganizmov. Lektin KKP zmanjša kapaciteto rasti patogene bakterije *Salmonella infantis*, ob dodatku proteaznih zaviralcev pa zmanjša tudi adhezijo. Nasprotno pa poveča adhezijo večine analiziranih probiotičnih bakterij, predvsem rodu *Lactobacillus*. Učinek lektina KKP je bil zelo podoben pri bakterijah istega rodu, različen pa pri bakterijah različnega rodu, kar kaže na zelo specifično delovanje. Lektin KKP se specifično veže na proteine celične stene oz. zunajcelične proteine pri bakterijah vrste *L. plantarum*. Pomembna ugotovitev naloge (COBISS.SI-ID 9347193) in znanstvenega prispevka (COBISS.SI-ID 4812657) je, da bi se potencialno lahko uporabljal kot naravno dopolnilo pri zdravljenju z uveljavljenimi protimikrobnimi učinkovinami, saj bi s tako strategijo lahko ohranili rast oz. delovanje humane mikroflore. Z zmanjšanjem adhezije preprečimo tudi nastanek biofilma ter tako z alternativno strategijo nadzorujemo kontaminacijo oz. infekcijo patogenih mikroorganizmov (COBISS.SI-ID 5176696).

Neja Kuret, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Jerica Sabotič**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Effect of Lectin Kokaprin on Pathogenic and Probiotic Bacteria

Antimicrobial resistance against commonly used antibiotics is one of the most serious global public health threats of this century. In addition, the use of antibiotics also has adverse effects on the diversity of human intestinal microbiome diversity due to their microbicidal action against beneficial commensal bacteria. Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates and exert antimicrobial activity, which may provide an alternative strategy for controlling infections caused by resistant microbial strains. In our study we have isolated recombinantly expressed lectin kokaprin (KKP) from *Coprinosopsis cinerea*. We evaluated its effect on growth and adhesion of pathogenic and commensal microorganisms. Lectin KKP reduced the growth capacity of the pathogenic bacteria *Salmonella infantis*, and an additive effect of KKP and protease inhibitors was observed that reduced the adhesion of these bacteria. In contrast, lectin KKP augmented the adhesion of commensal bacteria, especially *Lactobacillus* species. The overall effect of lectin KKP on the growth and adhesion of microorganisms was very similar for strains of the same species, but varied significantly between species, suggesting very specific target recognition and binding. We were able to show that lectin KKP specifically binds to the cell wall proteins and extracellular proteins of *L. plantarum* strains. In summary, lectin KKP could potentially be used as a natural, alternative antimicrobial agent against *S. infantis* infections. In addition, it could also be used as a natural supplement to antibiotic therapy that maintains the growth and function of commensal bacteria. An important finding of this work [COBISS.SI- ID 9347193] and the scientific contribution [COBISS.SI- ID 4812657] is its potential use of KKP as a natural supplement in the treatment of known antimicrobial agents, since such a strategy could maintain the growth/functioning of the human microflora. By reducing adhesion, we prevent the formation of a biofilm and thus control the contamination/ infection of pathogenic microorganisms with an alternative strategy [COBISS.SI- ID 5176696].

Nina Krištofelc, Institut Jožef Stefan, Ljubljana

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

Somentorica: **Ester Heath**, Institut Jožef Štefan, Ljubljana

Ocena učinkovitosti hidrodinamske kavitacije za odstranjevanje bisfenolov iz odpadnih vod

Z bisfenoli (BP) se srečujemo vsakodnevno pri uporabi polikarbonatne plastike (posode za hrano, plastenke za pijačo, igrače, športni in medicinski pripomočki), epoksi smol (notranja prevleka vodovodnih cevi, premazi notranjosti konzerv za hrano in pločevink za pijačo) in termičnega papirja (računi, vozovnice za javni prevoz, parkirni listki). Najpogostejše uporabljeni BP je bisfenol A (BPA), vendar ga zaradi neželenih učinkov na zdravje ljudi in s tem povezanimi regulatornimi omejitvami v industriji zamenjujejo z drugimi BP. Zaradi široke uporabe se BP pogosteje pojavljajo tudi v okolju. Do sedaj so v okolju odkrili BPA, BPAF, BPF, BPS, BPAP, BPB, BPP in BPZ. Glavni vir teh spojin v okolju predstavlja odpadna voda. BP so bili zaznani tako v dotoku v čistilne naprave kot iztoku iz njih, kar kaže, da uporabljeni načini čiščenja odpadnih vod ne zadostujejo. Kavitacija je fizikalni pojav v tekočini, pri katerem pride do tvorbe, rasti in kolapsa zračnih mehurčkov. Pri razpadu mehurčkov se lokalno sprostijo velike količine energije. Oblikujejo se območja, podobna vročim točkam, na katerih temperatura naraste na 1000–10.000 K in tlak na 100–5000 barov. Ekstremni pogoji vodijo v disociacijo vodnih molekul v radikale $\text{OH}^\cdot$ in $\text{H}^\cdot$, kar omogoča oksidativne reakcije in oksidativno razgradnjo snovi v tekočini. V magistrski nalogi smo proučevali odstranjevanje oz. razgradnjo naslednjih BP s HC: BPA, BPB, BPC, BPC2, BPE, 22BPF, 24BPF, 44BPF, BPAF, BPS, BPAP in BPZ. Uporabili smo rotacijski generator HC. Učinkovitost HC v odpadni vodi iz laboratorijskih bioreaktorjev smo ovrednotili v različnih eksperimentalnih pogojih (čas, moč in temperatura kavitacije). Rezultati so pokazali, da HC izbranih BP iz odpadne vode ne odstrani v celoti, ampak je potrebna kombinacija z drugimi metodami čiščenja. Pomembno je poudariti, da učinkovitost HC za razgradnjo organskih onesnažil ni odvisna samo od eksperimentalnih pogojev kavitacije, ampak nanjo vplivajo tudi kompleksnost matrike, sestava reaktorja HC in fizikalno-kemijske lastnosti proučevanih spojin. Glede na rezultate so optimalni eksperimentalni pogoji za razgradnjo proučevanih BP s HC 10 minut pri 9500 rpm in nenadzorovani temperaturi. V teh pogojih dosežemo naslednje deleže razgradnje BP: 54–63 % za BPB, BPC, BPZ in BPF, 38–49 % za 24BPF, BPE, BPAF, BPA BPC2 in BPAP, 15–24 % za 22BPF in BPS.

Nina Krištofelc, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

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

Co-supervisor: **Ester Heath**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Effectiveness Assessment of Hydrodynamic Cavitation for Bisphenols Removal from Wastewater

We come across bisphenols (BP) daily by using polycarbonate plastics (food containers, drink bottles, toys, sports and medical equipment), epoxy resins (internal water pipe coating and protective coatings for the interiors and exteriors of food, and beverage cans) and thermal paper (invoices, public transport tickets, and parking tickets). The most commonly used BP is bisphenol A (BPA), but it is often replaced by other BPs due to its adverse effects on human health and the associated regulatory restrictions in the industry. The widespread use of BPs is reflected in their greater occurrence in our environment. Up to now, BPA, BPAF, BPF, BPS, BPAP, BPB, BPP and BPZ have been detected in the environment. The main source of these compounds in the environment is wastewater. BPs have been detected in both the influent as well as the effluent from wastewater treatment plants, which indicates that the current wastewater treatment is not sufficient. Cavitation is a physical phenomenon in liquids, where the formation, growth and collapse of bubbles occurs. When the bubbles break down, it leads to a localized release of large amounts of energy. Areas similar to hot spots start to form, with temperatures rising up to 1,000–10,000 K and the pressure up to 100–5,000 bars. Extreme conditions lead to the dissociation of aqueous molecules into $\text{OH}^\cdot$ in $\text{H}^\cdot$ radicals. Strong oxidation conditions are created which enable the oxidative decomposition of substances present in the liquid. In this master's thesis, we studied the removal or degradation of the following bisphenols with hydrodynamic cavitation: BPA, BPB, BPC, BPC2, BPE, 22BPF, 24BPF, 44BPF, BPAF, BPS, BPAP and BPZ. A rotation generator of hydrodynamic cavitation was used for the research. The efficiency of hydrodynamic cavitation in the waste water from laboratory bioreactors was evaluated under various experimental conditions (time, power, and temperature of cavitation). The results showed that HC does not remove the selected BP from the waste water in its entirety, but rather requires assistance from other methods of purification. It is important to note that the efficiency of HC for the degradation of organic pollutants depends not only on the experimental conditions of cavitation, but also on the complexity of the matrix, the composition of the HC reactor, and the physicochemical properties of the compounds studied. Optimal experimental conditions for the degradation of the studied BP with HC in terms of results are 10 minutes at 9,500 rpm and uncontrolled temperature. Under these experimental conditions, the following degradation rates are achieved: 54–63% for BPB, BPC, BPZ and BPF; 38–49% for 24BPF, BPE, BPAF, BPA BPC2 and BPAP; 15–24% for 22BPF and BPS.

Svetlana Utroša, Kemijski inštitut Ljubljana

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

Somentor: **Samo Andrenšek**, Kemijski inštitut Ljubljana

Razvoj in validacija analiznega postopka za vrednotenje vsebnosti vitaminov B-kompleksa v okolju dobre proizvodne prakse

Namen magistrske naloge je bil razviti analizni postopek za HPLC-UV, ki omogoča, da se hkrati zazna devet vitaminov B-kompleksa v prehranskih dopolnilih in da se analizni postopek validira po ICH-smernicah. Z analizo vsebnosti in enakomernosti smo želeli preveriti, koliko se realne vsebnosti vitaminov B-kompleksa v štirih prehranskih dopolnilih razlikujejo od deklariranih vrednosti. Pri testu sproščanja, ki smo ga po Evropski farmakopeji izvajali z aparaturo 1 s košaricami, je bil cilj ugotoviti, ali imajo prehranska dopolnila res podaljšano sproščanje, kakor je deklarirano v priloženih podatkih. Celotni eksperimentalni del naloge je potekal v skladu z dobro proizvodno prakso ter sledil vsem smernicam, ki so zahtevane. Razviti analizni postopek nam omogoča detekcijo devetih vitaminov B-kompleksa v 30 minutah. Potrdili smo validacijske parametre, ki so ustrezali postavljenim kriterijem. Rezultati testa vsebnosti so v veliki večini ustrezali predpisanim kriterijem. V vseh vzorcih smo zaznali vse vitamine, ki imajo navedeno vrednost. Pri testu sproščanja v nobenem izdelku zaradi prenizkih koncentracij nismo zaznali biotina. Rezultati so pokazali, da testirane tablete glede na kriterij Ameriške farmakopeje nimajo podaljšanega sproščanja.

Svetlana Utroša, National Institute of Chemistry, Ljubljana

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

Co-supervisor: **Samo Andrenšek**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Development and Validation of an Analytical Procedure for Determination of B-complex Vitamins in a Good Manufacturing Practice Environment

The purpose of this master's thesis was to develop an analytical procedure based on HPLC-UV, which enables concurrent detection of nine B-complex vitamins in dietary supplements, and to validate this analytical procedure in accordance with ICH guidelines. Furthermore, we wanted to use the validated analytical procedure on four dietary supplements and test the content and uniformity of vitamin B-complex content. We also carried out a European Pharmacopoeia release test with apparatus 1 with baskets. The purpose of the release test was to determine whether the release of supplements was in reality a prolonged-release, as is indicated on the data on their packaging. The entire experimental part was conducted in accordance with good manufacturing practice. The analytical procedure we developed allows us to do this within 30 minutes. We confirmed that our analytical procedure is suitable for the evaluation of B-complex vitamins in samples. The results of the content test in the vast majority correspond to the prescribed criteria. We detected all vitamins that have a declared value in all the samples. In the release test, no biotin was detected in any product due to its low concentrations. The results showed that the tested tablets do not have retard release according to the prescribed USP criterion.

Barbara Vrečer, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Aleš Podgornik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Matejka Podlogar**, Institut Jožef Štefan, Ljubljana

Konstrukcija polšaržnega hidrotermalnega reaktorja z dodajanjem substrata za sintezo kristalnih dvojčkov rutila

Na številnih področjih znanosti in tehnike, kot so npr. kataliza, separacijski procesi, akumulatorski in kondenzatorski elementi, gorivne celice, želimo imeti materiale z veliko specifično površino, poroznostjo in ustrezno strukturo lahko dostopnih por. Material, ki ga lahko sintetiziramo v kompleksnih 3D-razvejanih morfologijah, je najstabilnejša polimorfna modifikacija TiO_2 – rutil. V eksperimentalnem delu smo skonstruirali in okarakterizirali polšaržni sistem, ki vključuje hidrotermalni reaktor z možnostjo dodajanja substrata v sistem med hidrotermalno sintezo. S tem sistemom smo želeli izvesti hidrotermalno sintezo rutila in podrobno raziskati mehanizem rasti kristalov TiO_2 v hidrotermalnih pogojih. Med opravljanjem eksperimentov smo ugotovili, da na hidrotermalno sintezo kristalov rutila bistveno vpliva hitrost segrevanja reaktorja. Reaktor smo segrevali na 200 °C različno dolgo, in sicer med 15 minutami in 6 urami. Počasnejše, kot je segrevanje reaktorja, več kristalov rutila dobimo v produktu in vse manj anatasne oblike. S hitrostjo segrevanja ne vplivamo na velikost kristalov rutila, vplivamo pa na njihovo obliko. Počasnejše, kot je segrevanje, več dvojčkov rutila 1. generacije dobimo in vse manj paličastega rutila. Do sedaj to še ni bilo znano. Prav tako smo želeli s polšaržnim sistemom ustvariti večgeneracijske dvojčke kristalov rutila, ki bi pripomogli k še večji specifični površini kristala. Večgeneracijskih dvojčkov nam ni uspelo pripraviti, ker na njihov nastanek vpliva veliko parametrov, ki so med seboj variabilni ter njihovo tvorbo povzročijo le ob določenih kombinacijah. V nadaljevanju raziskovanja te tematike bi bilo treba parametre identificirati in definirati razmerja med njimi, kar bi nam dalo možnost pridobivanja dvojčkov višjih generacij.

Barbara Vrečer, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Aleš Podgornik**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Matejka Podlogar**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana

Construction of Semi-Batch Hydrothermal Reactor by Adding a Substrate for Synthesis of Rutile Crystal Twins

In many fields of science and technology, e.g. catalysis, separation processes, elements of batteries and capacitors, fuel cells etc., our goal is to produce materials with large specific surface area, porosity and appropriate structure of easily accessible pores. The material that can be synthesized in complex 3-D branching morphologies is the most stable polymorphic modification of TiO_2 – rutile. During the experimental part of this master's thesis, we designed and characterized a semi-batch system that included a hydrothermal reactor with the possibility of adding a substrate to the system during hydrothermal synthesis. With the system in place, we wanted to understand in detail the mechanism of growth of TiO_2 crystals under hydrothermal conditions. During the experiments, we found that hydrothermal synthesis of rutile crystals is significantly influenced by the reactor-heating rate. The reactor was heated up to 200 °C in the range between 15 min and 6 hours. When the heating rate was slower, more crystals of rutile-type TiO_2 were formed and less anatase form was produced. The heating rate did not affect the size of the rutile crystals, but it did affect the shape of the crystals. The slower the heating rate, the more 1st generation twins we got, and the less rod-like rutile form was made. Until now, this was unknown. We also wanted to create multigenerational twins of rutile crystals that would contribute to an even larger specific surface of crystals. We found out that their formation is influenced by many parameters that are variable and can cause formation of twins only in certain combinations. In the continuation of the research, these parameters and the relationships between them should be identified, and that would give us the opportunity to generate multiple twins.

Tina Pečarič Strnad, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Bogdan Štefane**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Rutenij/paladij dvojno ariliranje 3-heteroarilizokinolinov

V magistrski nalogi smo izvajali rutenij katalizirano neposredno C–H ariliranje 3-heteroarilizokinolinov, ki mu je sledilo paladij katalizirano neposredno C–H ariliranje. Uspešno smo optimizirali reakcijske pogoje obeh stopenj tako, da smo dosegli optimalno stopnjo pretvorbe. Z optimiziranimi pogoji smo sintetizirali več različnih monoariliranih in nekaj diariliranih produktov. Nadalje smo optimizirane reakcijske pogoje uporabili pri izvedbi sekvenčne reakcije »one-pot« za sintezo končnih diariliranih produktov, saj nas je zanimalo, ali je sekvenčna metoda »one-pot« enako učinkovita, kot če reakcijo izvedemo stopenjsko s čiščenjem intermediata. S primerjavo izkoristkov končnih produktov smo ugotovili, da sta oba načina sinteze diariliranih produktov podobno učinkovita.

Tina Pečarič Strnad, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Bogdan Štefane**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Ruthenium/Palladium Diarylation of 3-Heteroarylisoquinolines

This master's thesis describes ruthenium-catalyzed direct C–H arylation of 3-heteroarylisoquinolines, followed by palladium-catalyzed direct C–H arylation. We successfully optimized the reaction conditions of both steps to achieve the optimum conversion. Several different monoarylated and some diarylated products were synthesized using the optimized conditions. We further used the optimized conditions to perform a sequential one-pot reaction for the synthesis of the final diarylated products. We were interested in whether the effectiveness of the sequential one-pot method was comparable to that of reactions performed sequentially with purification of the intermediate. By comparing the yields of the products, we concluded that both modes of synthesis of diarylated products are similarly effective.

Črt Dragar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentorica: **Eva Roblegg**, Inštitut za farmacevtske znanosti, Univerza v Gradcu

Razvoj, funkcionalizacija in vrednotenje nanodelcev na osnovi kopolimera mlečne in glikolne kisline

Nanodelci (ND) na osnovi kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) se intenzivno raziskujejo in razvijajo za uporabo na številnih področjih farmacije, vključno z dostavo učinkovin, diagnostiko in teranostiko. Takšni ND imajo edinstvene lastnosti in številne prednosti, kot so biorazgradljivost, biokompatibilnost, možnost prirejenega sproščanja učinkovin ter sposobnost dostave tako malomolekulskih učinkovin kot makromolekul na mesto delovanja. Namen raziskave je bil razvoj protokola za izdelavo nefunkcionaliziranih in funkcionaliziranih ND PLGA z emulzijsko-difuzijsko metodo z odparevanjem topila. Za modifikacijo površine osnovnih ND smo uporabili pozitivno nabita polimera hitosan in polietilenimin. Izdelane ND smo podrobno ovrednotili z vidika velikosti in porazdelitve velikosti delcev, površinskega naboja, hidrofobnosti površine, morfologije, kristalne strukture in interakcij s celicami *in vitro*. Razviti protokol izdelave ND PLGA se je pokazal kot ustrezen za izdelavo osnovnih in s hitosanom modificiranih ND. Ponovljivo in robustno izdelavo osnovnih ND smo nadgradili z relativno enostavno in hitro enostopenjsko metodo modifikacije njihove površine. S postopkom sušenja z zamrzovanjem smo pripravljene disperzije ND uspešno pretvorili v stabilno suho obliko, pri čemer nismo uporabili dodatnih pomožnih snovi. Velikost izdelanih ND je bila 230 do 330 nm, naboj na površini delcev pa ~ -5 mV pri nemodificiranih in $\sim +30$ mV pri modificiranih ND. Pokazalo se je, da nemodificirani ND (negativno nabiti) v večjem obsegu vstopajo v celice, medtem ko modificirani (pozitivno nabiti) tvorijo interakcije s celično membrano in v celice vstopajo v manjši meri ter tako kažejo obetavne lastnosti za dostavo učinkovin na površino sluznic.

Črt Dragar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Eva Roblegg**, Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Graz

Development, Functionalization and Characterization of Poly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles

Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (NPs) have been intensively studied and developed for their use in pharmaceuticals, diagnostics, and theranostics. They exhibit unique properties and show numerous advantages including biodegradability, biocompatibility, and the ability to deliver small molecular weight drugs as well as biomacromolecules to the site of action in a controlled manner. The aim of this study was to develop a protocol for the manufacture of non-functionalized and functionalized PLGA NPs with the emulsion-diffusion-evaporation method. The NP surface properties were modified by chitosan or poly(ethylene imine). The manufactured NPs were precisely characterized regarding their particle size and particle size distribution, zeta potential, surface hydrophobicity, morphology, solid-state properties, and cellular interactions. The developed protocol for the manufacturing of PLGA NPs has been confirmed as suitable for the manufacture of non-functionalized and chitosan-functionalized NPs. The reproducible and robust manufacturing of non-functionalized NPs was upgraded further with a relatively simple and rapid single-step surface functionalization method. The final NP dispersions were freeze-dried without additional excipients and were thus transformed into stable dry form. The manufactured NPs had an average particle size of 230-330 nm and the zeta potential of ~ -5 mV and $\sim +30$ mV for non-functionalized and functionalized NPs, respectively. The non-functionalized (negatively charged) NPs were internalized by the cells to a higher extent compared to the chitosan-functionalized (positively charged) NPs, which strongly interacted with the outer cell membrane, and thus, they show potential as candidates for drug delivery to the mucosal surfaces.

Jasmina Heric, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru

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

Somentorica: **Maja Čolnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Določanje molskih mas α -amilaze, β -glukozidaze, proteaze in lipaze z metodo gelske kromatografije

Gelska kromatografija je vrsta tekočinske kromatografije in metoda za ločevanje molekul glede na molekulsko maso. Za gelsko filtracijo uporabljamo steklene kolone, napolnjene s stacionarno (trdno) fazo z enakomerno velikostjo por. Volumen oz. prostor med kroglicami gela (prazen volumen kolone) zapolnjuje mobilna (tekoča) faza. Namen magistrske naloge je bil z gelsko kromatografijo določiti molske mase encimov α -amilaze, β -glukozidaze, proteaze in lipaze. Najprej smo določili skupno koncentracijo proteinov v vzorcih ter določili elucijski profil encimov. Z označevalci znanih molekulskih mas (metilenskega modrila in dekstran modrega) smo izrisali umeritveno krivuljo za določanje molskih mas in nato določili molske mase encimov α -amilaze, β -glukozidaze, proteaze in lipaze. Ugotovili smo, da je eksperimentalno določena molska masa α -amilaze 54,6 kDa, β -glukozidaze 112,2 kDa, proteaze 78,3 kDa in lipaze 26,6 kDa. Rezultate eksperimentalno določenih molskih mas smo primerjali s podatki o molskih masah, najdenih v literaturi. Nato smo vse štiri encime združili v mešanico encimov. Z Bradfordovo metodo smo jim določili skupno koncentracijo proteinov, nato pa smo v mešanici določili tudi aktivnost posameznih encimov α -amilaze, β -glukozidaze, proteaze in lipaze.

Jasmina Heric, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor

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

Co-supervisor: **Maja Čolnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Determination of Molecular Weight of α -amylase, β -glucosidase, Protease and Lipase by Gel Filtration

Gel chromatography is a type of liquid chromatography and a method for separating molecules by molecular weight. For gel filtration, we use glass columns filled with a stationary (solid) phase with a uniform pore size. Volume or the space between the gel balls (empty column volume) fills the mobile (liquid) phase. The purpose of this master's thesis was to determine molar masses of α -amylase, β -glucosidase, protease and lipase by gel chromatography. We first determined the total concentration of proteins according to the Bradford method by which we determined the elution profile of the enzymes. Using the markers of known molecular weights (methylene blue and blue dextran) we plotted the calibration curve for the determination of molar masses and then determined the molar masses of the α -amylase, β -glucosidase, protease and lipase enzymes. We found that the molar mass of α -amylase is 54.6 kDa, β -glucosidase 112.2 kDa, protease 78.3 kDa, and lipase 26.6 kDa. The results of experimentally determined molar masses were compared with data on molar masses found in the literature. Then, all four enzymes were combined into a mixture of 4 enzymes, for which we also determined the total protein concentration using the Bradford method, and determined the activity of the individual enzymes of α -amylase, β -glucosidase, protease and lipase in a mixture of 4 enzymes.

Klavdija Bastl, IMC Fachhochschule Krems

Mentor: **Adam Bass**, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School

Somentorica: **Rita Seeböck**, IMC Fachhochschule Krems

Razjasnitev fiziologije KRAS-amplificiranega želodčnega raka

Rak želodca je na svetu tretji najpogostejši vzrok umrljivosti zaradi raka. V 8 % primerov raka želodca je prisotno čezmerno izražanje naravnega nemutiranega (angl. wild-type) proteina KRAS, kar je povezano z maligno transformacijo in slabšim preživetjem bolnikov. Da bi razjasnili fiziologijo KRAS-amplificiranega želodčnega raka, smo vzpostavili dvostopenjsko primerjavo: osnovno primerjavo med naravnim nemutiranim proteinom KRAS, amplificiranim proteinom KRAS in G12D-mutiranim proteinom KRAS ter primerjavo med osnovnim in hiperaktiviranim stanjem proteina KRAS v KRAS-amplificiranih celicah. V raziskavi pridobljeni podatki o tumorogenosti KRAS-amplificiranega raka kažejo, da je samostojna KRAS-amplifikacija res onkogeni dogodek. Pokazali smo, da KRAS-amplificirano signaliziranje zahteva stimulirajoči faktor za tumorogenezo, kar pri KRAS-mutantni signalizaciji ni potrebno. To nujnost zgornjih signalov je mogoče razložiti s povečano fosforilacijo receptorjev tirozin kinaze pri KRAS-amplifikaciji. Poleg tega naši podatki kažejo na prisotnost pozitivne povratne zanke, ki deluje prek celično izločenih citokinov ter pripadajočih receptorjev tirozin kinaze. Naše raziskave nakazujejo, da bi bil glavni regulator te pozitivne povratne zanke lahko amphiregulin. V raziskavi smo pridobili veliko pomembnih informacij o obogatenih poteh, ki kažejo, da sta celično preživetje in imunski sistem v želodčnih celicah s hiperaktivnim proteinom KRAS spremenjena. Če povzamemo, nam ugotovitve omogočajo bolj usmerjeno raziskovanje imunoterapije pri KRAS-amplifikaciji in z njo povezanim želodčnem raku.

Klavdija Bastl, IMC University of Applied Sciences Krems

Supervisor: **Adam Bass**, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School

Co-supervisor: **Rita Seeböck**, IMC University of Applied Sciences Krems

Elucidating the Physiology of KRAS-Amplified Gastric Cancer

Gastric cancer is the third most common cause of cancer-related mortality. 8% of all gastric cancers carry an over-expression of the wild-type KRAS protein, which is correlated with malignant transformation and poor patient survival. In order to elucidate the physiology of KRAS-amplified gastric cancer we set up a 2-step comparison. Comparison I was a baseline comparison between wild-type, amplified and G12D mutated KRAS, and comparison II between baseline and hyperactivated KRAS in KRAS-amplified cells. The obtained KRAS-amplified cancer tumorigenicity data suggests that KRAS amplification alone is sufficient for an oncogenic event. We have shown that compared to KRAS-mutant signaling, KRAS-amplified signaling requires upstream stimuli for tumorigenesis, possibly explained by higher phosphorylation levels of receptor tyrosine kinases (RTKs) in KRAS amplification. Furthermore, our data indicates the presence of a positive KRAS-activating feedforward loop acting through cell-secreted cytokines and their corresponding RTKs. We postulate that amphiregulin may be the main regulator of this positive feedforward loop. Moreover, we obtained some intriguing data of enriched pathways, which show that cell survival and immune system pathways, when compared to baseline, are altered in gastric cells with hyperactive amplified KRAS. In summary, these findings make us more confident to pursue immunotherapy development against KRAS amplification as an attempt to improve patient survival, as well as target the reactivation of KRAS and its downstream pathways.

Sinteza in aplikacija tripropargilamina v pripravi novih ligandov za kovine prehoda

V diplomskem delu smo se ukvarjali s sintezo in karakterizacijo tripropargilamina in derivatov te spojine. Tripropargilamin smo pripravili z nukleofilno substitucijo amonijevega hidroksida s propargil bromidom pri povišani temperaturi. V nadaljevanju smo pripravili tri aromatske azide, ki smo jih v kombinaciji s predhodno pripravljenim tripropargilaminom uporabili za sintezo 1,4-disubstituiranih-1,2,3-triazolov. Za pripravo triazolov smo uporabili z bakrom katalizirano cikloadicijo, ki smo jo katalizirali s $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Pokazali smo, da je za tvorbo ariliranih 1,3,4-trisubstituiranih-1,2,3-triazolijevih soli iz molekule TBTA in njenih analogov primeren sintezni postopek z uporabo predhodno pripravljenih diariljodonijevih soli, kataliziran z brezvodnim CuSO_4 . Sinteza je bila uspešna tudi pri uporabi diariljodonijevih soli z elektrondonorskimi substituenti. Preverili smo tudi kemoselektivnost pri uporabi nesimetrične diariljodonijeve soli. Pri tem smo potrdili predhodno eksperimentalno ugotovljeno dejstvo, da z bakrom katalizirano *N*-ariliranje poteče s sterično manj ovirano skupino. Na novo pripravljene arilirane triazolijske soli kažejo potencial v sintezni kemiji, saj bi jih lahko uporabili kot prekursorje za pripravo triazol-5-ilidenov, ki spadajo v širšo skupino spojin, imenovanih *N*-heterociklični karbeni. Triazolilideni so odlični ligandi za tvorbo kompleksov s katalitsko aktivnimi prehodnimi kovinami, kot so železo, rutenij in paladij. Z mezoionskimi karbenskimi kompleksi, pripravljenimi iz naših na novo sintetiziranih in okarakteriziranih triazolijskih soli, bi tako lahko potencialno katalizirali različne tipe reakcij, med drugim tudi tvorbo vezi ogljik–ogljik.

Uroš Vezonik, 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 Tripropargylamine in Preparation of New Ligands for Transition Metals

This thesis describes the synthesis and characterization of tripropargylamine and its derivatives. The preparation of tripropargylamine was successfully achieved with nucleophilic substitution of ammonium hydroxide with propargyl bromide at an elevated temperature. We then prepared 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles by using the previously prepared tripropargylamine in combination with three aromatic azides. For the preparation of triazoles, we used copper-catalysed alkyne-azide cycloaddition, which we catalysed with $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Using diariliodonium salts and anhydrous CuSO_4 as a catalyst, we successfully prepared a series of arylated 1,3,4-trisubstituted-1,2,3-triazolium salts from TBTA molecule and its derivatives. This procedure also proved successful when using diariliodonium salts with electron-donor substituents. The newly prepared arylated triazolium salts are showing potential in synthetic chemistry, as they could be used as precursors for the preparation of triazol-5-ylidenes, which belong to the group of compounds called *N*-heterocyclic carbenes. Triazolylidenes are great ligands for the preparation of complexes with catalytic active transition metals like iron, ruthenium and palladium. Mesoionic carbene complexes prepared from our newly synthesized and characterized triazolium salts could potentially be used for the catalysis of different types of reactions, including carbon-carbon bond formation.

Žan Smrekar, Kemijski inštitut Ljubljana

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

Somentor: **Janez Konc**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Računalniško načrtovanje terapevtskih proteinov

Z uporabo računalniških programov in simulacij lahko predvidimo in predstavimo situacijo iz resničnega sveta oz. se ji precej približamo. Kompleksnejše simulacije modelirajo potek interakcij, ki so ključne pri razumevanju delovanja in razvoju novih zdravilnih učinkovin. Pri zdravljenju rakavih bolezni postaja vse pomembnejša uporaba imunoterapije, kjer gre za zdravljenje raka s terapevtskimi proteini oz. biološkimi zdravili, ki izboljšajo in obnovijo človeški imunski sistem. Med biološka telesa spadajo tudi monoklonska protitelesa (*rituksimab*, *pembrolizumab*, *obinutuzumab* ...), ki lahko delujejo na različne načine. Pogosto se uporabljajo kot inhibitorji rakavih celic, agonisti ali signalne molekule. Protitelesa delujejo popolnoma zadovoljivo, vendar obstajajo primeri, ko ne dosežejo želenega učinka in imajo negativne stranske učinke. Zaradi takšnih primerov se v uporabo vključujejo novi terapevtski proteini afimeri. V primerjavi s protitelesi so manjši. Vežejo se na tarčne molekule s podobno afiniteto ter jih generirajo in proizvajajo s procesi, za katere ne potrebujejo živih organizmov. V diplomskem delu je prikazano računalniško modeliranje afimera, ki se veže na epitop človeškega receptorja CD20 s podobno afiniteto, kot je vezava med receptorjem in protitelesi.

Žan Smrekar, National Institute of Chemistry, Ljubljana

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

Co-supervisor: **Janez Konc**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Computational Design of Therapeutic Proteins

Computer programs and simulations enable us to anticipate and present real life situations or examine them closely. More complex simulations are used for modelling interactions. They are crucial for understanding the mechanisms of action and development of new active substances. Cancer treatment increasingly involves the use of immunotherapy – a type of treatment involving therapeutic proteins and biological bodies, which improve and restore the human immune system. Biological antibodies include monoclonal antibodies (*rituximab*, *pembrolizumab*, *obinutuzumab* etc.) that can function in various ways. They are often used as cancer cell inhibitors, agonists or signalling molecules. The functioning of antibodies has been proven as satisfactory, with some exceptions where they fail to achieve the desired effect or may even cause side effects. In order to prevent such situations, new therapeutic proteins called affimers are starting to be used. Compared to antibodies they are smaller proteins that bind with target molecules having similar affinity and are generated and produced without the presence of living organisms. This thesis describes the computational modelling of the affimer, which binds with the epitope of the CD20 human receptor with a similar affinity as the binding of the receptor and antibodies.

Gregor Kržmanc, Tadej Strah, Gimnazija Vič
Mentor: **Uroš Javornik**, Kemijski inštitut Ljubljana
Somentor: **Janez Plavec**, Kemijski inštitut Ljubljana
Somentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

Ali lahko s pomočjo spektroskopije razložimo vpliv epigenetskih sprememb na potek bolezni?

Študije nekanoničnih struktur DNK pomagajo razumeti njihovo vlogo pri razvoju bolezenskih stanj in odkrivanju potencialnih tarč za vplivanje na razvoj bolezni. Metilacija citozinskih organskih baz je epigenetski proces, ki lahko vpliva na izražanje genov. Študije kažejo, da metilacijski vzorci na z gvaninom bogati promotorski regiji Pu39 antiapoptotskega gena *BCL-2* pomembno vplivajo na izražanje gena. Motnje v izražanju tega gena so povezane z rakavimi obolenji in drugimi boleznimi. V tej raziskavi z uporabo UV-, CD- in NMR-spektroskopije proučujemo vpliv CpG-metilacije na strukturo zaporedja BCL2MidG4, ki je del regije Pu39. Naši rezultati kažejo, da lahko v vzorcih s CpG-metiliranimi in nemetiliranimi BCL2MidG4-oligonukleotidi pod določenimi pogoji hkrati so obstajajo G-kvadrupleksi, i-motivi in vijačnica B-DNK, vendar v prisotnosti obeh verig DNK unimolekularni G-kvadrupleksi ne morejo tekMOVATI z B-DNK, i-motivi pa se razvijejo že pri pribl. 20 °C. Rezultati kažejo, da metilirani oligonukleotidi tvorijo bolj stabilno dvojno vijačnico s približno 3 °C višjo T_m . Poskusi z modificiranim zaporedjem BCL2Mid so pokazali, da metilacija rahlo poveča stabilnost tvorjenih G-kvadrupleksov v enojni verigi. Na podlagi tega sklepamo, da metilacija ob prisotnosti obeh komplementarnih verig BCL2MidG4 stabilizira tako dvojno vijačnico kot G-kvadruplekse, a je vpliv stabilizacije večji pri vijačnici. Naša opažanja podpirajo teorijo, da sprememba stabilnosti sekundarnih struktur vpliva na regulacijske mehanizme izražanja gena *BCL-2*. Vse opažene strukture, tvorjene iz metilirane DNK, so bolj stabilne od nemetiliranih, kar se lahko odraža v manjšem izražanju gena. Bazične raziskave, kot je naša, so pomembne za razumevanje temeljnih bioloških celičnih procesov in razvoja bolezenskih stanj. Epigenetski procesi predstavljajo obetavne tarče za zdravljenje določenih bolezni.

Gregor Kržmanc, Tadej Strah, Gimnazija Vič Grammar School
Supervisor: **Uroš Javornik**, National Institute of Chemistry, Ljubljana
Co-supervisor: **Janez Plavec**, National Institute of Chemistry, Ljubljana
Co-supervisor: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič Grammar School

Can Spectroscopy Studies Explain Epigenetic Disorders?

The studies of non-canonical DNA structures help understand their role in disease development and identify potential targets for therapeutic intervention. Methylation of cytosine is an epigenetic factor that can play an important role in gene regulation mechanism. Studies have suggested that methylation of Pu39, a guanine-rich promoter region of *BCL-2*, plays an important role in its regulation. Disturbances in expression of the gene are linked to cancer and other diseases. In this paper, we use UV, CD and NMR spectroscopy to study the effect of CpG methylation on the structure of BCL2MidG4. We show that i-motifs, G-quadruplexes and B-DNA can coexist both in samples of methylated and demethylated complementary pairs of oligonucleotides, but unimolecular G-quadruplexes are unable to compete with the canonical B-DNA structure. The methylated oligonucleotides form a more stable structure with T_m , which is about 3 °C higher. Experiments with modified oligonucleotides (BCL2Mid) have shown that demethylation of single stranded DNA slightly reduces thermal stability of G-quadruplexes. We suggest that methylation stabilizes B-DNA duplex to a greater degree than G-quadruplex in double-stranded BCL2MidG4. Our observations support changes in the stability of secondary structures as a possible mechanism behind epigenetic regulation of *BCL-2* expression – all of the structures formed from methylated DNA are more stable, suggesting lowered gene expression. Basic studies like this one are important for understanding fundamental cell processes and thus the development of diseases. Epigenetic processes provide an important target for epigenetics-based treatment of several diseases.

Matic Jože Grdadolnik, Arne Klemen Marušič, Gimnazija Vič

Mentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

Somentor: **Urban Novak**, Kemijski inštitut Ljubljana

Analiza polietilena v kolenskih in kolčnih protezah z vibracijsko spektroskopijo

Število ljudi z gibalnimi težavami zaradi okvar kolenskega ali kolčnega sklepa se hitro povečuje. Razlogi za to so staranje prebivalstva in različne poškodbe, okvaro pa pogosto lahko odpravimo le z zamenjavo okvarjenega sklepa z umetnim. Stroški operacije so veliki in bolnik mora prestati stresen poseg, zato je zelo pomembno, da je vsajeni sklep brezhiben. Najšibkejšo točko v umetnih sklepih predstavlja polietilen velike gostote in premreženosti (Ultra-high Molecular Weight Polyethylene, UHMWPE). Uporablja se kot material za skodelico, ki drsi mimo glave stegenice iz titana. Četudi je UHMWPE trenutno najprimernejši polimer za tako uporabo, lahko že majhne spremembe v njegovi kemični zgradbi vplivajo na njegove mehanske lastnosti. Od teh je odvisno delovanje celotnega zamenjanega sklepa. Ker so mehanske lastnosti UHMWPE tesno povezane z njegovo kemično zgradbo, smo se pri proučevanju njegove strukture odločili za sistematično uporabo infrardeče (IR) in Ramanove spektroskopije. Iz vibracijskega spektra lahko razberemo podatke o kemični zgradbi materiala, nato pa z našo metodo napovemo, ali je material primeren za nadaljnjo uporabo. Našli smo ustrezne spektralne parametre, ki so občutljivi za stopnjo kristaliničnosti, premreženosti in oksidacije. Te lastnosti najbolj vplivajo na mehanske lastnosti polimera. Metodologijo smo preizkusili na vzorcih z znano strukturo. Rezultati so pokazali, da je vibracijska spektroskopija zelo učinkovito orodje za določanje stopnje oksidacije in kristaliničnosti UHMWPE, s tem pa tudi odlična metoda za kontrolo kakovosti materiala.

Matic Jože Grdadolnik, Arne Klemen Marušič, Gimnazija Vič Grammar School

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

Co-supervisor: **Urban Novak**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Application of Vibrational Spectroscopy for Analysing Polyethylene Used in Knee and Hip Prosthetics

The number of people with functional immobility due to pathological conditions of the knee or hip joints is increasing. This is happening because of aging of the human population and injuries in accidents, and can only be solved by hip or knee replacements. Such a surgery is very expensive, so it is very important that a replaced artificial hip or knee is of the best quality that ensures no further complications. The weakest point in any artificial knee or hip is made of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE), which is the ideal polymer for that use. Its mechanical properties are second to none. However, any small deviations in chemical structure of the polymer may result in the change of mechanical behaviour of the replaced joint. We need a fast, accurate and non-destructive method to test the polymer before surgery. Since the mechanical properties of UHMWPE are closely related to its chemical composition, we systematically applied infrared (IR) and Raman spectroscopy to probe the structure of the material. We have found appropriate spectral parameters, which are sensitive to degree of crystallinity, degree of cross-linked chains and level of oxidation. Our findings were also applied to real samples of damaged artificial joints. The results have proven that vibration spectroscopy is a very efficient tool for characterization of the UHMWPE.

Vita Movrin, II. gimnazija Maribor

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

Somentorica: **Veronika Furlan**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Antikarcinogeni potencial karnozola iz rožmarina – računalniški pristop

V raziskovalni nalogi smo proučevali biološko aktivno polifenolno spojino karnozol iz rožmarina v vlogi naravnega lovilca devetih kemijskih karcinogenov, ki smo jim v vsakdanjem življenju pogosto izpostavljeni: aflatoksina B1-ekso-8,9-epoksid, etilen oksida, kloroetilen oksida, vinil karbamat epoksida, glicidamida, stiren oksida, propilen oksida, 2-cianoetilen oksida in beta propiolaktona. S pomočjo molekularnega modeliranja in kvantnomehanskih izračunov smo določili proste aktivacijske energije za reakcije kemijskih karcinogenov s karnozolom ter jih primerjali s prostimi energijami aktivacije vezave enakih karcinogenov z najreaktivnejšo organsko bazo v DNK – gvaninom. Izračune smo izvedli na ravni teorije Hertree-Fock ob uporabi treh fleksibilnih baznih setov: 6-31G(d), 6-31+G(d,p) in 6-311++G(d,p). V izračune smo z metodo samouglašene reakcijskega polja (SCRF) in metodo Langevinovih dipolov (LD) vključili tudi solvatacijske efekte. Iz rezultatov lahko zaključimo, da ima karnozol velik potencial kot naravni lovilec kemijskih karcinogenov epoksidnega tipa, saj na podlagi primerjave prostih energij aktivacije sklepamo, da z večino obravnavanih karcinogenov reagira hitreje oz. s primerljivo hitrostjo, kot ti uspejo tvoriti adukte z gvaninom. Menimo, da smo z raziskovalno nalogo postavili dobro izhodiščno točko za raziskovanje antikarcinogenega potenciala polifenola karnozola, vendar pa so za potrditev naših napovedi potrebne nadaljnje eksperimentalne in klinične raziskave.

Vita Movrin, II. Gimnazija Maribor Grammar School

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

Anticarcinogenic Potential of Rosemary's Carnosol – Computational Approach

In this research thesis, we examined the biologically active polyphenolic compound carnosol from rosemary as a natural scavenger of nine ultimate chemical carcinogens to which we are often exposed in our everyday life: aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide, ethylene oxide, chloroethylene oxide, vinyl carbamate epoxide, styrene oxide, propylene oxide, 2-cyanoethylene oxide, and beta-propiolactone. Using molecular modelling and quantum mechanical calculations, we determined the activation free energies for the reactions of studied chemical carcinogens with carnosol and compared them with activation free energies for the reactions of the same carcinogens with the most reactive organic base in DNA – guanine. The calculations were performed at the Hartree-Fock level of theory using three different flexible basis sets: 6-31G(d), 6-31+G (d,p) and 6-311++ G(d,p). Solvation effects were also included in the calculations using the Self-Consistent Reaction Field (SCRF) method and the Langevin Dipole (LD) method. Based on the obtained results we can conclude that carnosol has considerable potential as a natural scavenger of chemical carcinogens of the epoxy type as – based on the comparison of free activation energies – it reacts with most of the examined chemical carcinogens either faster or at a very comparable rate to that of chemical carcinogens forming adducts with guanine. We believe that our research thesis has set a good starting point for investigating the anticarcinogenic potential of carnosol, although further experimental and clinical research are needed to confirm our predictions.

Bert Kokovnik, Brina Predalič, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorica: **Katja Strašek Smrdel**, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Tatjana Avšič Županc**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Gašper Jan Simon**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Ugotavljanje okuženosti navadne ali rdeče lisice (*Vulpes vulpes*) z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum* v slovenskem prostoru

Pri projektni nalogi smo ugotavljali okuženost navadnih ali rdečih lisic (*Vulpes vulpes*) z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum* v slovenskem prostoru. *A. phagocytophilum* pri psih in ljudeh povzroča bolezen anaplazmozo. Prenašajo jo klopi rodu *Ixodes* sp.; rezervoar bakterije v Evropi je srnjad, v Ameriki pa belonoga miš. Želeli smo ugotoviti, ali so lisice v slovenskem prostoru posredniki v prenašalni verigi med klopi ter hišnimi ljubljenci in ljudmi. Med vsemi testiranimi vzorci DNK-ja lisic je bilo pet vzorcev pozitivnih. Ta podatek je potrdil, da so lisice res okužene z *A. phagocytophilum*. Želeli smo tudi ugotoviti, ali so lisice okužene s sevom bakterije, ki povzroča okužbe ljudi in psov. Z že poznanimi sekvencami *A. phagocytophilum* pri različnih organizmih smo primerjali sekvence naših vzorcev. Ugotovili smo, da so imeli trije zapis za *A. phagocytophilum* pri ljudeh, eden pri psih in eden pri konjih. Hipotezo, da je navadna lisica lahko nosilka *A. phagocytophilum*, smo v večji meri potrdili, saj smo dokazali, da je lahko okužena s to bakterijo. Naši podatki so se ujemali z drugimi raziskavami po svetu. Če bi želeli preveriti, ali so lisice naravni rezervoar za bakterijo, bi morali testirati njihovo dolgotrajno okuženost, te možnosti pa nismo imeli. Kljub temu smo dokazali, da je v slovenskem prostoru navadna lisica okužena z *A. phagocytophilum*.

Bert Kokovnik, Brina Predalič, Biotechnical Education Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisor: **Katja Strašek Smrdel**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Tatjana Avšič Županc**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Gašper Jan Simon**, Biotechnical Education Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Determining the Infection Rate of Red Foxes (*Vulpes vulpes*) with *Anaplasma phagocytophilum* in the Slovenian Territory

The aim of our project was to determine the infection rate of red foxes (*Vulpes vulpes*) with *Anaplasma phagocytophilum* in the Slovenian territory. *A. phagocytophilum* causes the disease anaplasmosis in dogs, horses, cats and people. The tick *Ixodes* sp. is the vector of the bacterium. The natural reservoir of *A. phagocytophilum* in Europe is deer, and in America white-footed mice. We wanted to determine whether foxes in the Slovenian territory are the intermediary in the chain of infection between house pets. Of all the tested DNA samples from foxes, five were positive. This fact tells us that foxes are infected with *A. phagocytophilum*. Additionally, we wanted to determine the strain of the bacterium. We compared the genetic sequences of the bacterium from our foxes to sequences of *A. phagocytophilum* in the database. We determined that three samples had a sequence identical to *A. phagocytophilum* found in humans, one previously detected in dogs and one detected in a horse. We proved our hypothesis that red foxes could be carriers of *A. phagocytophilum*. We also determined that they are infected with the strain of the bacterium that causes infection in dogs, horses and humans. Our results match other research data from around the world. We could not determine that foxes are a natural reservoir of *A. phagocytophilum* as longitudinal studies are needed. Nevertheless, we were able to prove that the red fox is infected with *A. phagocytophilum* in the Slovenian territory.

Anja Sedušak Kljakič, Hana Remškar, Biotehnični izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Marko Jeran**, Zdravstvena fakulteta in Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Martina Oder**, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

Protimikrobno delovanje macerata iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije *Legionella pneumophila*

V raziskovalnem delu smo proučevali delovanje maceratov iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije rodu *Legionella*. Gre za patogeno skupino po Gramu negativnih bakterij, v katero spada tudi vrsta *Legionella pneumophila*, ki med drugim povzroča legionelozo. Iz iglic zdrave navadne smreke smo pripravili etanolni in *n*-heksanski macerat. Macerata smo z uporabo FTIR-spektroskopije kvantitativno določili vsebnost limonena in borneola, ki sta pomembni biološko aktivni učinkovini. Večjo vsebnost limonena smo zaznali v maceratih iz nepolarnega *n*-heksanana in borneola iz polarnega etanola. Mikrobiološke raziskave so pokazale, da oba tipa maceratov v območju od 2 do 18 utežnih odstotkov ne kažeta delovanja na bakterijo *Legionella pneumophila*. V nadaljevanju smo na modelnem organizmu z etanolnim maceratom, ki je pri 50 utežnih odstotkih pokazal izrazit pojav inhibicijske cone, pokazali tudi njegovo optimalno delovanje.

Anja Sedušak Kljakič, Hana Remškar, Biotechnical Education Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Marko Jeran**, Faculty of Health Sciences and Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Martina Oder**, Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana

Antimicrobial Activity of Norway Spruce (*Picea abies*) Needle Macerate on *Legionella pneumophila*

In this research project, we studied the activity of the European spruce (*Picea abies*) needle macerate on bacteria of the genus *Legionella*. This is a pathogenic gram-negative bacteria that includes the species *Legionella pneumophila* causing legionellosis. We prepared ethanol and *n*-hexane macerate from needles of healthy European spruce. Using FTIR spectroscopy, we quantitatively determined in both macerats the content of limonene and borneol, which are both significant biologically active substances. Higher limonene content was detected in macerates from non-polar *n*-hexane and in borneol from polar ethanol. Microbiological studies show that in the range between 2% and 18% by weight, the two macerate types do not have any impact on *Legionella pneumophila*. Furthermore, we demonstrated the optimal performance of ethanol macerate on the model organism, which displayed a pronounced inhibitory zone at concentrations of 50% by weight.

Pridobivanje ekstraktov čilija in blaženje pekočega občutka

Navadna paprika je ena izmed najbolj razširjenih vrst zelenjave na svetu. Zelo razširjen je tudi čili, ki spada v isti rod, vendar v ustih povzroča pekoč občutek. Veliko ljudi se marsikdaj preceni in pojedo zelo močan čili, ki jih spravi v nelagodje in lahko privede tudi do želodčnih krčev. Pri raziskovanju naju je zanimalo, kako narediti najmočnejši ekstrakt čilija, katere metode poznamo in kako vplivati na večji uspeh ekstrakcije, pa tudi, kako blažiti pekoč občutek v ustih. V prvem delu sva proučila tri vrste ekstrakcij s čilijem vrste trinidad moruga scorpion, in sicer maceracijo, ekstrakcijo po Soxhletu in ekstrakcijo s superkritičnim CO₂. Ekstrakcijo po Soxhletu sva ponovila z rumenim čilijem vrste habanero, ki je po Scovillovi lestvici veliko šibkejši od vrste škorpion. Iz ekstraktov sva pripravila razredčene raztopine, ki so jih preizkušali prostovoljci. Tako sva ugotovila, kateri ekstrakt je močnejši. Zavedava se, da je metoda subjektivna, vendar meniva, da sva vključila dovolj prostovoljcev, zato so rezultati vseeno relevantni. V drugem delu raziskave sva ugotavljala, kateri blažilec pekočega občutka je najučinkovitejši. Najprej sva pripravila srednje močno raztopino ekstrakta. Preizkuševalci so zaužili žlico takšne raztopine, da so začutili pekoč občutek, nato pa so ga blažili. Zaradi nekoliko nepričakovanih rezultatov sva preizkus ponovila s prahom rumenega habanera, ki je bil bistveno močnejši kot raztopina, pripravljena v prvem poizkusu. Z analizo sva ugotovila, da sva najmočnejši ekstrakt dobila pri ekstrakciji s superkritičnim CO₂ in da je za blaženje pekočega občutka najboljše mleko, ker je vedno pri roki in nima neprijetnega okusa.

Klemen Novak, Aleks Rautar, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School
Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

Obtaining Chilli Extracts and Soothing the Burning Sensation

The bell pepper is one of the most widespread vegetables around the world. Hot chilli peppers are the same genus but produce special alkaloids, which give a burning sensation in the mouth. Many pepper lovers or non-lovers often overestimate themselves and eat more hot chilli than they can handle, which makes them uncomfortable and can also lead to stomach cramps. In this research, we were interested in how to make the hottest chilli extract, which methods are available and how to increase its efficiency, and later on how to relieve the burning sensation. In the first part, we learned about three methods of extracting capsaicin from the Trinidad Moruga Scorpion pepper by soaking it in ethanol, with the Soxhlet extractor and supercritical CO₂ extraction. We repeated the Soxhlet extraction with yellow habanero peppers, which are much lower on the Scoville scale than the Trinidad Moruga Scorpion peppers. We used the extracts to make solutions which volunteers tasted to determine the heat. We realise that this method is very subjective, but we believe that we had enough volunteers to make our results comparable. In the second part, we compared different spicy food remedies. First, we prepared a medium solution with an extract. The testers tasted a spoon of the solution and then tried one of the spicy remedies we had at disposal. Due to the unexpected results, we repeated the test with a yellow habanero powder, which was much stronger than the solution from before. By analysis, we established that the strongest extract was obtained by supercritical CO₂ extraction and milk is best for alleviating the burning sensation as it is always at hand and has no unpleasant taste.

Povprečna hitrost razpada antocianov v malinah v odvisnosti od temperature, pri katerih so le-te hranjene

S številnimi raziskavami, ki razkrivajo negativen vpliv umetnih pigmentov na človeško zdravje, so v živilski industriji v vzponu naravni pigmenti. Naloga je osredotočena na njihov termični razpad, ki v predelavi živil pogosto predstavlja oviro. Antociani so velika skupina naravnih modro rdečih barvil, ta naloga pa se osredotoča na antociane v malinah. S predpostavko, da je razpad barvil premo sorazmeren z zmanjšanjem absorbanca razredčenega malinovega soka pri valovni dolžini 507,1 (pri kateri je bila v začetnem vzorcu absorbanca največja), je bil razpad antocianov spremljan z metodo spektroskopije. Absorbanca soka, hranjenega pri različnih temperaturah, je bila izmerjena v časovnih intervalih, da je bila ugotovljena hitrost razpada antocianov pri različnih temperaturah. Rezultati so pokazali, da so antociani kratkoročno precej stabilni pri temperaturi do 40 °C, pri višjih temperaturah pa se hitrost razpada povečuje. Ugotovitve raziskave so pomembne tudi zaradi velike antioksidativne sposobnosti antocianov. S segrevanjem živil, bogatih z njimi, se namreč zmanjša tudi njihova antioksidativna vrednost.

Metka Rus, Gimnazija Kranj Grammar School
Supervisor: **Petra Flajnik**, Gimnazija Kranj Grammar School

Temperature Dependant Average Rate of Degradation of Anthocyanin in Raspberries

Many studies have exposed potentially adverse effects of synthetic pigments on human health, which means the role of natural pigments in food industry is increasing. This research paper focuses on the thermal degradation of anthocyanins, a common problem in food processing. Anthocyanins are a large group of blue and red pigments – in this research paper we focused on anthocyanins in raspberries. Under the assumption that anthocyanin degradation is directly proportional to the decrease in the absorbance of diluted raspberry juice at a wavelength of 507.1 (in the initial sample, the absorbance was the highest at this value), we monitored the degradation of anthocyanins by use of spectroscopy. The absorbance of samples kept at different temperatures was measured at different time intervals, and the rate of degradation of anthocyanins at different temperatures was determined. The results show that anthocyanins are stable short-term at temperatures under 40 °C, but their thermal stability decreases with higher temperatures. The findings of this research are also important due to high antioxidant capacity of anthocyanins. By heating foods rich in anthocyanins, their antioxidant capacity decreases.

Vpliv množinskega razmerja med metiltrimetoksisilanom in topilom na sintezo monolitnega fleksibilnega hidrofobnega aerogela pri normalnem zračnem tlaku

Fleksibilni kserogeli in aerogeli na osnovi silicijevega dioksida so bili sintetizirani s sol-gel tehnologijo. Kot prekurzor smo uporabili metiltrimetoksisilan (MTMS). Uporabljeni postopek je bil kataliziran s kislinskim katalizatorjem, temu je sledilo sušenje produkta pri normalnem zračnem tlaku in temperaturah do 140 °C. Najugodnejše razmerje med prekurzorjem, topilom in vodo je bilo razmerje 1 : 8 : 16. Uspelo nam je pridobiti mešanico aerogelov, ki so kazali kserogelske lastnosti, kot sta krhkost in majhna elastičnost, pa tudi majhno gostoto (0,011 g/cm³), veliko absorpcijsko kapaciteto za nepolarna topila, še posebej halogenirana organska topila, superhidrofobnost in veliko temperaturno odpornost (do 350 °C). Ker so pridobljeni produkti cenovno ugodni, zaradi svoje nanodendritne zgradbe in hidrofobnosti predstavljajo material, ki bi ga lahko uporabili tudi kot filter pri obraznih zaščitnih maskah.

Žiga Kovačič, II. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: Zdenka Keuc, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Effect of Molar Ratio of Methyltrimethoxysilane and Solvent on Synthesis of Monolithic Flexible Hydrophobic Aerogel at Normal Air Pressure

Flexible xerogels and aerogels based on silicon dioxide were synthesized with the help of sol-gel technology. As a precursor, we used methyltrimethoxysilane (MTMS). The process included catalysis by an acid catalyst followed by drying the product at normal air pressure and temperatures up to 140 °C. The most favourable ratio of precursor, solvent and water was found to be 1 : 8 : 16. We succeeded in obtaining a mixture of aerogels, which also showed xerogel properties (brittleness and low elasticity). The obtained materials showed promising properties such as low density (0.011 g / cm³), high absorption capacity for halogenated organic solvents, super hydrophobicity and high temperature resistance (up to 350 °C). The obtained products are affordable. Due to their nano size, internal web structure and highly hydrophobic properties, they form a material that may also be used as a filter in face protection masks.

Miša Pintarič, Kaja Zupanič, Il. gimnazija Maribor

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

Somentorica: **Sandra Janežič**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano Maribor

Bakteriofagi v boju proti bakteriji *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je po Gramu negativna patogena bakterija, ki spada v družino enterobakterij. Povzroča bolnišnične in oportunistične okužbe sečil in dihal (Gubina in Ihan, 2002), pri katerih je sposobna tvoriti biofilm, ki daje bakterijskim celicam dodatno zaščito pred antibiotiki. Proti bakterijskim okužbam bi lahko uporabljali viruse (bakteriofage), ki bakterije napadajo in uničujejo. V okviru raziskovalne naloge smo preverili, ali z bakteriofagi lahko zmanjšamo možnost tvorbe biofilma *S. marcescens* na površinah. Preverili smo še, ali lahko bakteriofagi učinkovito uničujejo tudi celice v že nastalih biofilmih. Dva bakteriofaga (A in C), specifična za *S. marcescens*, smo izolirali in namnožili iz vode iz čistilne naprave. Bakteriofag A je uspešno preprečil nastanek biofilma *S. marcescens*. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da bakteriofagi poleg učinkovitega uničevanja posamezne planktonske celice preprečujejo tudi nastanek biofilma.

Miša Pintarič, Kaja Zupanič, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

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

Co-supervisor: **Sandra Janežič**, National Laboratory of Health, Environment and Food, Maribor

Bacteriophages in Fight Against *Serratia marcescens*

Serratia marcescens is a gram-negative pathogenic bacteria that belongs to the family of Enterobacteriaceae. It causes nosocomial and opportunistic urinary and respiratory tract infections (Gubina and Ihan, 2002), where it is capable of forming a biofilm that provides bacterial cells with an additional protection against antibiotics. It is known that viruses (bacteriophages) that attack and destroy bacteria can be used against bacterial infections. In our research paper, we examined the efficiency of bacteriophages in reducing the formation of *S. marcescens* biofilms. We also examined whether bacteriophages could be used in effective destruction of cells in the already formed biofilms. Two bacteriophages (A and C), specific for *S. marcescens*, were isolated and propagated from a water sample taken from a wastewater treatment plant. Bacteriophage A successfully prevented the formation of a *S. marcescens* biofilm. Based on these results, we can conclude that bacteriophages, in addition to effectively destroying individual planktonic cells, also prevent the formation of a biofilm.

Preučevanje vpliva sode bikarbone na Maillardovo reakcijo

Vedno, ko pečemo piškote, pražimo čebulo ali pa samo opečemo toast, lahko na hrani opazimo zlato rjavo barvo, ki kaže na prisotnost produktov Maillardove reakcije. Ta reakcija poteka med aminokislinami in reduciranimi sladkorji pri visoki temperaturi, hrano obarva rjavo in ji da okus. Obstaja pa veliko variabel, ki tako ali drugače vplivajo na reakcijo. Mednje štejemo temperaturo, čas toplotne obdelave, vrsto sestavin, pH in druge. Ker med peko jedem pogosto dodajamo sodo bikarbono, me je zanimalo, kako vpliva na potek reakcije. Hitrost Maillardove reakcije se namreč v bazičnem okolju poveča, saj so protoni v aminokislinah zaradi alkalij lažje dostopni reduciranim sladkorjem. Ker je soda bikarbena bazična, naj bi torej povečala hitrost Maillardove reakcije. Cilj moje raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako različne količine dodane sode bikarbone vplivajo na Maillardovo reakcijo med jajčnimi beljaki in raztopino glukoze oz. fruktoze. Ker vsi produkti te reakcije še niso identificirani, sem se odločila, da bom njen obseg merila z določanjem prisotnosti melanoidinov, molekul, ki povzročajo zlato rjavo obarvanje. To sem storila z merjenjem absorbanc končnih zmesi, saj so melanoidini edine znane molekule, ki absorbirajo svetlobo pri $\lambda = 400,7$ nm. Ugotovila sem, da prisotnost melanoidinov narašča razmeroma linearno s količino dodane sode bikarbone in da več produktov nastane pri reakciji s fruktozo kot pri reakciji z glukozo, kar je posledica bolj razvejane verige, ki v prisotnosti proste karbonylne skupine omogoča hitrejšo reakcijo.

Neža Peternel, Gimnazija Kranj Grammar School
Supervisor: **Petra Flajnik**, Gimnazija Kranj, Grammar School

Investigating the Effect of Baking Soda on Maillard Reaction

The golden-brown colour of baked cookies, sautéed onions or toasted bread is a clear indicator of Maillard reaction products. The Maillard reaction occurs at high temperatures between amino acids and reducing sugars, giving browned food its distinctive colour and taste. It is influenced by many factors, such as temperature, time, ingredients, and pH. Baking soda is one of the ingredients often used in baking and we wanted to study its impact on the Maillard reaction. The rate of the Maillard reaction increases in an alkaline environment because alkalis make protons in amino acids more easily accessible to reducing sugars. Since baking soda is a base, it should accelerate the Maillard reaction. The goal of this research paper was to find how different amounts of baking soda affect the Maillard reaction between egg whites and a solution of glucose and fructose. As not all Maillard reaction products have yet been identified, we decided to measure the extent of the reaction by determining the amount of melanoidins, a type of molecule responsible for the specific golden-brown colour of food. This was done with absorbance measurements of the final solution, because melanoidins are the only known compound that absorbs wavelengths at $\lambda = 400.7$ nm. We discovered that more added baking soda results in more melanoidins, and that reactions involving fructose are more rapid compared to those involving glucose because compared to glucose, fructose exists, to a greater extent, in the open-chain form and therefore reacts more rapidly in any reaction involving a free carbonyl group.

Jernej Birk, Domen Hočevar, Kaja Rangus, Gimnazija Novo mesto

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

Somentorici: **Jerica Sabotič, Ana Mitrović**, Institut Jožef Stefan

Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2

Lektini so proteini, ki se specifično vežejo na ogljikove hidrate. Zaradi velike specifičnosti vezave lahko delujejo antiproliferativno (delovanje, ki preprečuje razmnoževanje celic) na omejen tip celic, zato predstavljajo velik potencial pri zdravljenju rakavih obolenj. S preprečitvijo absorpcije hranil v prebavnih sistemih žuželk lektini delujejo tudi insekticidno. Za gobo poprhnjeno livko (*Clitocybe nebularis*) je značilna velika vsebnost različnih lektinov. Z afinitetno kromatografijo smo iz nje izolirali za glukozo specifičen lektin z oznako CnGlcL in njegovo čistost potrdili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. V drugem delu naloge smo z mikrotermoforezo analizirali vezavo med pripravljenim rekombinantnim saharozil izolektinom rCnSLB2 in sladkorji saharozo, glukozo, fruktozo, α -D-glukopiranozidom, N-acetilglukozaminom in maltotriozo. Mikrotermoforeza je nova metoda, ki za določanje biofizikalnih lastnosti molekulskih interakcij uporablja fizikalni pojav termoforeze. Potek termoforeze je odvisen od velikosti, naboja in solvacijskih ovojev udeleženih molekul. Prednosti tega postopka so majhna poraba vzorcev, možnost analize šibkih molekulskih interakcij, enostavna uporaba in možnost analize molekulskih interakcij v pogojih, ki so podobni naravnim. Vezava med lektini in sladkorji ima pomembno vlogo pri molekularnih interakcijah med celicami v organizmu in s povzročitelji bolezni ter se lahko uporablja pri zaznavi nekaterih bolezni. Mikrotermoforeza še ni bila uporabljena za določanje lastnosti interakcij med lektini in sladkorji, zato naša raziskovalna naloga odpira široka vrata nadaljnjim raziskavam.

Jernej Birk, Domen Hočevar, Kaja Rangus, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Co-supervisors: **Jerica Sabotič, Ana Mitrović**, Jožef Stefan Institute

Utilization of Microthermophoresis for Quantification of Binding Sugars to Isolectin rCnSLB2

Lectins are proteins that specifically bind to carbohydrates. Due to their high binding specificity, some show antiproliferative activity (activity that prevents proliferation of cells) on a specific type of cells and therefore have a potential in cancer treatment. Furthermore, the insecticidal activity of lectins has been confirmed in numerous studies. Lectins act as insecticides by disrupting the digestion in insect gut. The mushroom *Clitocybe nebularis* has high content of diverse lectins. We isolated the glucose-specific lectin CnGlcL from the fruiting bodies of clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) with affinity chromatography and analysed it using polyacrylamide gel electrophoresis. In the second part of the study, we used microthermophoresis to analyse the binding between the recombinant sucrose-binding isolectin rCnSL-B2 from the same mushroom and the carbohydrates sucrose, glucose, fructose, α -D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine and maltotriose. Microthermophoresis is a new technology that uses the physical phenomenon of thermophoresis to determine the biophysical properties of molecular interactions. The results of thermophoresis depend on the size, electric charge and solvation shell, which is why it can be used for analysing molecular interactions. The advantages of microthermophoresis include low sample consumption, the possibility to analyse weak molecular interactions, simple use and the possibility to analyse molecule interactions in an environment similar to the natural one. A lectin binding to glycans plays an important role in molecular interactions between cells in an organism or with pathogens and can be useful in disease diagnostics. Microscale thermophoresis has not yet been used for detecting interactions between lectins and sugars. Therefore, we believe our research opens many possibilities for its new potential application.

Alja Petrović, Urban Bauman, II. gimnazija Maribor

Mentorica: **Tamara Šiško**, II. gimnazija Maribor

Somentorica: **Anita Mustač**, II. gimnazija Maribor

Primerjava vsebnosti antioksidantov in fenolnih spojin v različnih vrstah slovenskega medu in njihova protimikrobna učinkovitost na ustno mikrobioto

V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali z vplivom protimikrobnih lastnosti medu na mikroorganizme v ustih. Med je namreč tudi priljubljeno ljudsko zdravilo, ki se uporablja že tisoče let. Zanimale so nas predvsem vsebnosti različnih značilnih učinkovin v medu, kot so antioksidanti, kisline, encimi, minerali, vitamini in fenolne spojine. Za vzorce smo izbrali štiri vrste slovenskega jedilnega medu in medicinski med, ki je namenjen zunanji uporabi. Z vis-spektrofotometrom smo izmerili absorbanco posameznih vzorcev medu in izračunali koncentracije fenolnih spojin, ki smo jih primerjali z rezultati merjenja različnih koncentracij vodne raztopine galne kisline. Prav tako smo izmerili absorbanco antioksidantov v medu. V mikrobiološkem delu smo skupnim izmerjenim učinkovinam v posameznem vzorcu medu z metodo difuzije na trdem gojišču dokazali še protimikrobni učinek na mikrobioto ustne votline, ki smo jo pridobili z brisom ustne sluznice zdravega človeka.

Alja Petrović, Urban Bauman, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Tamara Šiško**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisor: **Anita Mustač**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Comparison of Content of Antioxidants and Phenolic Compounds in Different Types of Slovenian Honey and their Antimicrobial Effect on Oral Microbiota

In this research paper, we focused on the effect of antimicrobial properties of honey on microorganisms in the mouth. Honey is a popular folk remedy that has been used for thousands of years. We were mainly interested in the contents of various characteristic active ingredients in honey, such as antioxidants, acids, enzymes, minerals, vitamins and phenolic compounds. Four different types of Slovenian edible honey and medical honey intended for external use were selected for samples in the research paper. Using a Vis spectrophotometer, we measured the absorbance of individual honey samples and calculated the concentration of phenolic compounds, which we compared with the results of measuring different concentrations of the aqueous gallic acid solution. In addition, we measured the absorbance of antioxidants in honey. In the microbiological part of the paper, we proved the antimicrobial effect of all measured active ingredients in an individual honey type by method of diffusion on a solid medium on the microbiota of the oral cavity, which was obtained by swabbing the oral mucosa of a healthy person.

Jurij Malovrh, Andraž Rotar, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorica: **Majda Golob**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Darja Kušar**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Gašper Jan Simon**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Huda gniloba čebelje zalege: štetje spor v medu ter tipizacija izolatov *Paenibacillus larvae*

Huda gniloba čebelje zalege je ena najnevarnejših bolezni čebel, njen povzročitelj pa je bakterija *Paenibacillus larvae*, ki je v sporulirani obliki izredno odporna proti zunanjim vplivom. Bolne čebelje družine popolnoma propadejo, okužba pa lahko pred pojavom kliničnih znakov več mesecev poteka prikrito in se neovirano širi. Najučinkovitejši ukrep za zatiranje hude gnilobe je uspešno preprečevanje širjenja bolezni, kar je povezano tudi z zgodnjim odkrivanjem spor. V nalogi smo primerjali dve metodi za štetje spor v medu iz okuženih panjev: štetje na gojiščih in štetje z metodo PCR v realnem času (qPCR). Iz medu smo *P. larvae* tudi izolirali ter izolate tipizirali z metodo ERIC-PCR, da bi ugotovili, ali se v medu pojavlja več različnih sevov, spoznali pa smo tudi metodo sekvenciranja celotnih genomov (WGS). Ugotovili smo, da je štetje z metodo qPCR primernejše kot štetje na gojiščih ter da ne drži podatek, da v laboratorijskih pogojih vzkali samo vsaka dvatisoča spora *P. larvae*. Vsi pridobljeni izolati so bili tipa ERIC II, s čimer smo potrdili, da je za analizo raznolikosti sevov *P. larvae* primernejša metoda WGS.

Jurij Malovrh, Andraž Rotar, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisor: **Majda Golob**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Darja Kušar**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Gašper Jan Simon**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

American Foulbrood: Counting Spores in Honey and Typing of *Paenibacillus larvae* Isolates

The American foulbrood is one of the most devastating diseases of honeybees. Its causative agent is the bacterium *Paenibacillus larvae*, which is extremely resistant to the environmental factors in its sporulated form. The diseased bee societies are completely destroyed, but prior to the occurrence of clinical signs the infection may be latent for months and spreads unimpededly. The most efficient measure to suppress the disease is to prevent its spreading, which is also linked to the early detection of spores. In the present study, we compared two methods for spore enumeration in honey collected from the infected hives: counting on culture media and counting with real-time PCR (qPCR). We also isolated *P. larvae* from honey and typed the isolates with ERIC-PCR to determine the presence of different strains. For this purpose, we learned about the whole genome sequencing (WGS). Our results showed that qPCR is more suitable for spore enumeration than plate counting and that not only every two thousandth *P. larvae* spore germinates in laboratory conditions. All isolates obtained were of ERIC II type, confirming that WGS is more suitable for analysing the diversity of *P. larvae* strains.

Dokazovanje antimikotičnega delovanja vodnih ekstraktov na kvasovko *Candida albicans*

Candida albicans je gliva kvasovka, ki pri človeku povzroča mikoze. Je del naše naravne mikrobiote, vendar lahko vpliv različnih dejavnikov poruši ravnovesje v našem telesu in število teh oportunističnih gliv naraste. Glavni namen raziskovalne naloge je sestaviti čim ugodnejše gojišče za uspešno kultivacijo *C. albicans* in z difuzijskim antibiogramom odkriti različne antimikotične učinkovine, ki naj bi zaviralno delovale na rast glive. Praktični del smo začeli s pridobivanjem brisov sluznic ustnih votlin oseb, ki naj bi trpele za kandidozo. Vzorce smo nato prenašali na različno pripravljena sestavljena gojišča, kajti poleg izoliranja čiste kulture so nas zanimali tudi vplivi različnih gojišč in različnih spodbujevalcev rasti (kave in mleka) na uspešnejšo razrast *C. albicans*. Pregledali smo tudi morfološke značilnosti kolonij *C. albicans* in jih identificirali s klasičnimi identifikacijskimi morfološkimi in biokemijskimi metodami. Z metodo difuzijskega antibiograma smo ugotavljali antimikotično delovanje treh potencialnih učinkovin, ki naj bi zavirale rast kandidate, perkolata grenivkinih pešk, perkolata zelenega čaja ter ekstrakta domačega propolisa. Difuzijski antibiogram smo izvajali na PDA-gojišču z dodatkom krvi in antibiotika. Ugotovili smo, da perolat zelenega čaja ni zaviral rasti kandidate. Zaviralni učinek je bil prisoten pri ekstraktu grenivkinih pešk, največji pa pri propolisu, pri katerem so bile inhibicijske cone največje.

Lara Markelj, Neža Perko, Maša Repinc, Biotechnical Centre Naklo
Supervisor: Marjetka Kastelic Švab, Biotechnical Centre Naklo

Demonstration of Antifungal Action of Aqueous Extracts on *Candida albicans* Yeast

Candida albicans is a yeast fungus that causes mycoses in humans. *C. albicans* fungus is part of our natural microbiota, but the influence of various factors can upset the balance in our body and cause the number of these opportunistic fungi to increase. The main purpose of this research paper was to compile the most favourable medium for the successful cultivation of *C. albicans* and to detect, by use of a diffusion antibiogram, various antifungal agents, which are supposed to inhibit the growth of *C. albicans* fungus. In the practical part of our research, we obtained swabs of the mucous membranes of the oral cavities of people supposedly affected by candidiasis. The samples were then transferred to differently prepared composite media, since in addition to isolating pure culture, we were also interested in the effects of different media and different growth promoters (coffee and milk) on the more successful growth of *C. albicans*. We also reviewed the morphological characteristics of *C. albicans* colonies and identified them by using classical identification morphological and biochemical methods. Using the diffusion antibiogram method, we determined the antifungal action of three potential active ingredients that are supposed to inhibit the growth of candida: percolate of grapefruit seeds, percolate of green tea, and homemade propolis extract. The diffusion antibiogram was performed on PDA medium with the addition of blood and antibiotics. We found that green tea percolate did not inhibit candida growth. The inhibitory effect was present in grapefruit seed extract, and was the greatest in propolis, where the inhibition zones were immense.

Urška Šumak, II. gimnazija Maribor

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

Somentorica: **Petra Kotnik**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

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

Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov različnih genotipov murve (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.)

V raziskovalni nalogi smo proučevali antioksidativne lastnosti ekstraktov listov bele, rdeče in črne murve (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.). Liofilizirani material smo ekstrahirali s Soxhletovim aparatom ali z ultrazvočno ekstrakcijo. Ekstraktom smo s spektrofotometričnimi metodami in s tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo določili vsebnost aktivnih komponent (klorogenske kisline, rutina in hesperidina). Dobljenim ekstraktom smo z metodo DPPH določali antioksidativne lastnosti. V literaturi se navaja tudi znotrajcelična antioksidativnost ekstraktov, ki smo jo glede na dobljene rezultate lahko testirali z meritvijo antioksidativnega potenciala v celici.

Urška Šumak, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Katja Holnthaner Zorec**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisor: **Petra Kotnik**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Co-supervisor: **Eneko Jose Madorran Esteiro**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Antioxidant Properties of Extracts Made of Different Genotypes of Mulberry Leaves (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.)

In this research paper, we studied the antioxidant properties of extracts made of white, red and black mulberry leaves (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.). The freeze-dried plant material was extracted with a Soxhlet apparatus and/or by ultrasonic extraction. We then determined the quantity of certain active ingredients (chlorogenic acid, rutin and hesperidin) in extracts by use of liquid chromatography with mass spectrometry. Their antioxidant properties were determined by the DPPH method. It is also commonly stated in literature that the extracts possess intracellular antioxidant properties, which, according to the obtained results, could be tested by measuring the antioxidant potential within the cell.

Špela Žunec, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Mentorica: **Mojca Podlipnik**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Somentor: **Črtomir Podlipnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Program Orange kot orodje za napoved lastnosti molekul

Namen raziskovalne naloge je bil preveriti možnost uporabe odprtokodnega programa Orange, ki je namenjen podatkovnemu rudarjenju, vizualizaciji podatkov in modeliranju povezave med strukturo in lastnostmi molekul. Najprej sem zbrala podatke, tj. strukture molekul in pripadajoče lastnosti, ki so potrebne za izdelavo modelov. S pomočjo zunanjega mentorja sem s programom Canvas izračunala opisnike, ki so predstavljali neodvisne spremenljivke pri izdelavi modelov, odvisno spremenljivko pa je predstavljala lastnost. S programom Orange sem izdelala modele za napoved vrelišč alkanov, aromatskih ogljikovodikov in alkoholov ter model za napoved akutne toksičnosti pesticidov za organizem *Daphnia Magna*. Ugotovila sem, da je delo s programom Orange enostavno, saj omogoča vizualno programiranje, tj. programiranje, ki poteka z zlaganjem in povezovanjem gradnikov na delovni površini grafičnega vmesnika brez pisanja zapletenih algoritmov. Za izdelavo modelov sem uporabila dve metodi: metodo večparametrsk linearne regresije in metodo naključnega gozda, za preverjanje napovedne moči modelov pa metodo »izpusti enega«. Pri modeliranju vrelišč alkanov sem uporabila tudi set testnih spojin, ki ni bil vključen v izdelavo modela. Ugotovila sem, da je za zadovoljiv opis vrelišč potrebno le majhno število opisnikov; na primer pri vreliščih alkanov sem dobila dobre modele s tremi opisniki, tj. relativno molekulsko maso in dva topološka indeksa (Randićev, Wienerjev), s katerima opišemo razvejanost molekul alkanov. Podobno dobre rezultate sem dobila tudi za napoved vrelišč aromatskih in alkoholov. V skladu s pričakovanji so bili modeli za napoved akutne vodne toksičnosti manj zanesljivi, a vendar dovolj uporabni, da lahko pesticide razvrstimo na manj in bolj toksične.

Špela Žunec, Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School

Supervisor: **Mojca Podlipnik**, Gimnazija Jože Plečnik Ljubljana Grammar School

Co-supervisor: **Črtomir Podlipnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Orange Software as a Tool for Predicting Molecular Properties

The purpose of the research project was to examine the use of Orange, an open-source tool intended for data mining, data visualization and modelling the link between the structure and properties of molecules. First, the data was collected – the structures of the molecules and the associated properties required to make the models. With the help of an external mentor, I used the Canvas software to calculate the descriptors that represented independent variables in model making, the dependent variable being an individual property. With Orange, I developed models for predicting the boiling point of alkanes, aromatic hydrocarbons and alcohols, and a model for predicting acute toxicity of pesticides on *Daphnia Magna*. We found that the Orange tool is easy to work with as it allows for visual programming, i.e. programming that involves stacking and linking widgets on a graphical interface desktop without writing complex algorithms. We used two methods to make models: the multiparameter linear regression method and the random forest method; and then used the "leave one out" method to check the predictive power of models. When modelling the boiling points of alkanes, we also used a set of test compounds that was not included in the creation of the model. We found that a satisfactory description of boiling points requires only a small number of descriptors; for example, for the boiling points of alkanes, we obtained the relevant models with three descriptors, i.e. relative molecular mass and two topological indices (Randić's, Wiener's) that describe the branching of alkane molecules. We also obtained similarly promising results for predicting the boiling points of aromatics and alcohols. As expected, the models for predicting acute aquatic toxicity were less reliable but useful enough to classify pesticides as less and more toxic.

Arne Kolenc Šušterčič, Gimnazija Poljane

Mentorica: **Maruša Sotler Wedam**, Gimnazija Poljane

Somentor: **Miran Šebeštjen**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Primerjava urejenosti dejavnikov tveganja pri pacientih po miokardnem infarktu in njihovih zdravih sovrstnikih

Ateroskleroza s svojimi kliničnimi posledicami, kot so ishemična bolezen srca, možganskožilne bolezni in periferna žilna bolezen, je eden od najpogostejših vzrokov obolevnosti in umrljivosti v zahodnem svetu. Za razvoj aterosklerotičnega procesa so odgovorni predvsem dejavniki tveganja, kot so dislipidemija, zvišan arterijski krvni tlak, sladkorna bolezen, debelost in kajenje. Namen naloge je bil preučiti, ali so dejavniki tveganja pri bolnikih po prebolelem miokardnem infarktu bolj urejeni kot pri njihovih vrstnikih brez klinično pomembne ateroskleroze. Ugotovili smo, da so imeli bolniki v primerjavi s kontrolno skupino manjše vrednosti skupnega in aterogenega holesterola LDL. Imeli so mejno nižji sistolični krvni tlak in nižji diastolični krvni tlak, vrednost krvne glukoze pa je bila mejno večja. V ostalih merjenih parametrih se skupini nista razlikovali. Bolniki po prebolelem miokardnem infarktu imajo dobro, čeprav ne idealno urejene dejavnike tveganja, na katere lahko vplivamo z zdravlili, še veliko prostora za izboljšave pa je pri dejavniki tveganja, ki so odvisni od življenjskega sloga.

Arne Kolenc Šušterčič, Gimnazija Poljane Grammar School

Supervisor: **Maruša Sotler Wedam**, Gimnazija Poljane Grammar School

Co-supervisor: **Miran Šebeštjen**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Comparison of Risk Management in Patients after Myocardial Infarction and their Healthy Peers

With its clinical implications, such as ischemic heart disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease, atherosclerosis is one of the most common causes of morbidity and mortality in the Western world. The development of the atherosclerotic process is primarily caused by risk factors such as dyslipidemias, increased arterial blood pressure, diabetes, obesity, and smoking. The aim of the study was to examine whether the risk factors in patients after myocardial infarction are better regulated than in their peers without clinically relevant atherosclerosis. We found that patients had lower values of both total and atherogenic LDL cholesterol compared to the control group. Patients also had borderline lower systolic blood pressure and lower diastolic blood pressure, but patients had borderline higher blood glucose compared to healthy subjects. The groups measured did not differ in the other parameters measured. Patients with myocardial infarction have well-regulated – though not ideally – risk factors, which can be influenced by medication while there is still plenty of room for improvement in the lifestyle-dependent risk factors.

Ana Slomšek, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo
Mentorica: **Mojca Drofenik Čerček**, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

Primerjava različnih metod izolacije evgenola iz klinčkov in analiza produktov

Evgenol je pomembna, največkrat iz klinčkov izolirana aromatska spojina. Njegova uporaba se razteza vse od prehranske industrije pa do parfumerije, medicine in farmacije. Na človeško telo ima številne pozitivne učinke, predvsem zaradi svojega antioksidativnega delovanja. Njegov potencial za nadaljnje raziskave in uporabo je izjemen. V raziskovalni nalogi sem z različnimi načini (parno destilacijo, navadno destilacijo, maceracijo, ekstrakcijo po Soxhletu, izolacijo z mikrovalovi) izolirala evgenol iz klinčkov in dobljene produkte analizirala s tankoplastno kromatografijo in IR-spektroskopijo. Posebna pozornost je bila usmerjena v novejšo metodo izolacije z mikrovalovi. Uspešno prilagojena in izvedena je bila alternativna metoda z gospodinjstvo mikrovalovno pečico. Produkt je bil z vsemi metodami uspešno pridobljen, kakovost, količina in izkoristki pa so se precej razlikovali. Dokazano je bilo, da je za izolacijo najprimernejša parna destilacija. Pri vseh metodah je izkoristek drugotnega pomena zaradi slabše kakovosti produktov z večjim izkoristkom.

Ana Slomšek, School Centre Celje, Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering
Supervisor: **Mojca Drofenik Čerček**, School Centre Celje, Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering

Comparison of Different Methods of Isolation of Eugenol from Cloves and Analysis of Products

Eugenol is an important aromatic compound mostly isolated from cloves. Its use extends from the food industry to perfumery, medicine and pharmacy. It has many positive effects on the human body, mainly due to its antioxidant activity. It has great potential for further research and application. In this research assignment, we isolated eugenol from cloves using various methods (steam distillation, ordinary distillation, maceration, Soxhlet extraction, microwave isolation) and analysed the obtained products by thin-layer chromatography and IR spectroscopy. Particular attention was paid to a more recently developed method of microwave isolation. We successfully adapted and implemented an alternative method using a household microwave oven. The product was successfully obtained by all methods, however, its quality, quantity and yields varied considerably. We proved that steam distillation is the most suitable method for isolation. Yield was of secondary importance in all methods due to lower quality of products with higher yields.

Daša Žuman, Ajda Ivezić, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorici: **Nina Žuman, Vesna Vrhovski**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

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

Tehnologija pridelave in prehranska vrednost mlade listnate zelenjave, gojene na plavajočem sistemu

V raziskovalni nalogi sva na hidroponskem sistemu gojili listnato zelenjavo in merili količino pridelka ter vsebnost suhe snovi in prehransko pomembnih snovi (vitamina C in glukozinolatov) v posamezni rastlinski vrsti glede na način gojenja. Eksperimentalni del raziskave in meritve sva izvedli na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani v jesensko-zimskem obdobju leta 2019. Na hidroponskem sistemu sva gojili tri vrste listnate zelenjave: rukvico (*Eruca sativa* Mill.), špinačo (*Spinacia oleracea* L.) in mizuno (*Brassica rapa* var. *nipposinica/japonica*). Vse tri sva primerjali z gojenjem teh rastlin v šotnem substratu. Na osnovi rezultatov ugotavljava, da je imela največji pridelek mizuna, pridelana na hidroponu (1,34 kg/m²), v primerjavi s pridelkom, gojenim v substratu, je bil trikrat večji. Tudi špinača in rukvica sta imeli večji pridelek na hidroponskem sistemu kot v substratu. Pri špinači je bil petkrat večji (0,94 kg/m²), pri rukvici pa dvakrat večji (0,66 kg/m²). V odstotku suhe snovi se rastline glede na sistem gojenja niso pomembno razlikovale. Vsebnost vitamina C je bila pri špinači večja pri pridelavi v substratu, pri križnicah (mizuni in rukvici) pa na hidroponu. Sestava glukozinolatov v listih mizune je bila drugačna kot v listih rukvice. Vsebnost glukozinolatov je bila v listih rastlin, pridelanih v substratu, večja kot v listih rastlin, pridelanih na hidroponskem sistemu.

Daša Žuman, Ajda Ivezić, Gimnazija Franc Miklošič Grammar School

Supervisors: **Nina Žuman, Vesna Vrhovski**, Gimnazija Franc Miklošič Grammar School

Co-supervisor: **Nina Kacjan**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Technology and Nutritional Value of Young Leafy Vegetables Grown in Hydroponic System

For this research project, we grew leafy vegetables in a hydroponic system. We measured the crop yield and the amounts of both dry material and nutrients (vitamin C and glucosinolates) in different plants taking into consideration the growing conditions. The experimental part of the survey and the measurements were carried out at the Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana in the autumn and winter of 2019. Three types of leafy vegetables were grown in the hydroponic system: rocket (*Eruca sativa* Mill.), spinach (*Spinacia oleracea* L.) and mizuna – Japanese mustard (*Brassica rapa* var. *nipposinica* (japonica)). All three were compared to those grown in peat substrate. The largest yield was recorded in the hydroponically grown mizuna crop (1.34 kg/m²). It was three times larger than that of the mizuna crop grown in substrate. The spinach and rocket grown hydroponically also had a greater yield than their substrate counterparts. For spinach, the yield was five times greater (0.94 kg/m²), and for the rocket it was twice the value reached in substrate (0.66 kg/m²). The amount of dry material did not differ much in either system. Vitamin C content was higher in spinach grown in the substrate, and in the brassicas (mizuna and rocket) it was higher in the hydroponic system. The composition of glucosinolates in mizuna leaves was different from that in rocket leaves. The amount of glucosinolates was higher in the leaves of plants grown in substrate compared to those grown in the hydroponic system.

Mark David Longar, Gimnazija Poljane

Mentor: **Blaž Zupan**, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Boštjan Žnidaršič**, Gimnazija Poljane

Umetna inteligenca v biologiji: globoki modeli za napovedovanje celičnih tipov iz podatkov o genskih izrazih

Analiza podatkov o genskih izrazih posameznih celic je pomemben korak pri razumevanju celične sestave in delovanja kompleksnih tkiv. Klasični pristopi uporabljajo nenadzorovano gručenje celic in ročno razvrščanje celičnih tipov posameznih skupin. Ti pristopi pri večjih količinah podatkov niso praktični, zato se je pojavila potreba po avtomatizirani klasifikaciji. Sodobni pristopi uporabljajo markerske gene za prepoznavanje vrst celic. V nalogi smo razvili metodo globokega učenja, ki je sposobna nenadzorovanega, delno nadzorovanega in nadzorovanega učenja z vključitvijo povezav med markerskimi geni in njihovimi ustreznimi celičnimi tipi v strukturo nevronske mreže samokodirnika. S poskusi na že objavljenih eksperimentalnih podatkih smo ugotovili, da dodatna znanja o markerskih genih pomagajo nevronske mreže in prispevajo k napovedni točnosti.

Mark David Longar, Gimnazija Poljane Grammar School

Supervisor: **Blaž Zupan**, Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Boštjan Žnidaršič**, Gimnazija Poljane Grammar School

Artificial Intelligence in Biology: Deep Models for Cell-Type Classification with Single-Cell RNA Sequencing Data

Single-cell RNA sequencing data analysis is an important step in cellular decomposition of complex tissues. Classical approaches use unsupervised cell clustering and a manual annotation of their corresponding cell types. These classical approaches do not scale well to bigger data sets and consequentially, a need for automated approaches of cellular annotation has been developed. Contemporary approaches use marker genes to identify cell types. In this paper, we have developed a deep learning method capable of unsupervised, semi-supervised and supervised learning by incorporating the relationships between marker genes and their corresponding cell types into the structure of an autoencoder neural network. With experiments on already-published experimental data, we have concluded that additional knowledge of marker genes helps neural networks learn and directs their classification accuracy.

Julija Vodenik, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorica: **Janja Božič**, Institut Jožef Stefan, Ljubljana
Somentorica: **Darja Rizmal**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Vpliv dipeptidnih ponovitev gena C9orf72 na celične procese

Mutacije v genu C9orf72, ki se nahaja na 9. kromosomu v 72. odprtem bralnem okvirju, so najpogostejši genetski vzrok za razvoj amiotrofične lateralne skleroze (ALS) in frontotemporalne demence (FTD). Do mutacije pride na nekodirajočem odseku gena, kjer pride do nukleinskih ponovitev GGGGCC (G4C2). Pri zdravem posamezniku je teh ponovitev do 20, v bolezenskem stanju pa lahko tudi nekaj 100. Nevrotoksičnost mutacije je lahko posledica različnih mehanizmov, ki niso popolnoma raziskani. Eden od njih je toksičnost, ki je posledica RAN-translacije in nastanka proteinov z dipeptidnimi ponovitvami (DPR). Generira se lahko pet različnih dipeptidnih proteinskih ponovitev: poliGA, poliGR, poliGP, poliPA in poliPR. V nalogi sem želela raziskati vpliv izražanja dipeptidnih ponovitev na avtofagijo in apoptozo, procesa programirane celične smrti, ki povzročata spremembe v fiziologiji in mehanizmih celice ter na koncu vodita v njen propad. Ugotovila sem, da izražanje DPR-proteinov v celični kulturi ne vpliva na apoptozo, kar ne potrjuje naše hipoteze. Prav tako sem ugotovila, da poliPR, poliGP, poliGR in poliPA minimalno vplivajo na avtofagijo, poliGA pa jo poveča.

Julija Vodenik, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisor: **Janja Božič**, Jožef Stefan Institute, Ljubljana
Co-supervisor: **Darja Rizmal**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Effect of Repeat Expansions in C9orf72 Gene on Cell Processes

Mutation within the C9orf gene, located on chromosome 9 open reading frame 72, is the most common genetic cause of both amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). The mutation occurs at the non-coding region of the gene where GGGGCC (G4C2) nucleic repeats occur. A healthy individual carries up to 20 repeats of G4C2, but where the gene is mutated due to a disease, a patient may carry several 100 repeats. Mutation neurotoxicity can result from different mechanisms; one of them is toxicity caused by RAN translation and production of proteins with dipeptide repeats (DPR). It can generate five different dipeptide protein repeats: polyGA, polyGR, polyGP, polyPA and polyPR. In our research project, we wanted to investigate the effects of expression of dipeptide repeats on the process of autophagy and apoptosis. Autophagy and apoptosis are processes of programmed cell death that cause changes in the physiology and mechanisms of the cell and ultimately lead to cell death. We have found that expression of DPR proteins in cell culture does not affect the processes of apoptosis, which does not support our hypothesis. We also found that polyPR, polyGP, polyGR, and polyPA have minimal effects on the autophagy process while polyGA increases autophagy.

Luka Irenej Pečan, Biotehnični izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentor: **Marko Jeran**, Zdravstvena fakulteta in Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Karmen Godič Torkar**, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentor: **Roman Štukelj**, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

Kvantitativno določanje biološko aktivnih učinkovin v navadni konoplji (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in njena mikrobiološka kakovost

Ponovni prepored raziskav o konoplji, aktualnost teme, terapijska obetavnost konoplje in njena klinična pomembnost ter hkrati obilo vprašanj, ki se porajajo pri njenem spoznavanju, proučevanju in uporabi, so spodbudili zamisel o obravnavi in analizi specifičnih vzorcev konoplje v tem raziskovalnem delu. Čedalje večja uporaba konoplje in njenih derivatov v prehrani, medicini, kozmetiki in na drugih področjih je odprla tudi vprašanje vpliva skladiščenja posušenih rastlinskih delov konoplje na njeno končno kakovost. Delo vsebuje kemijsko in mikrobiološko analizo specifičnih vzorcev konoplje. Učinki konoplje so namreč odvisni tudi od sort, saj sta vsebnost in razmerje kanabinoidov v njih različna. Poleg uvodnega dela, posvečenega opisu rastline in njenih učinkovin ter uporabi v medicinske namene, je naloga razčlenjena na mikrobiološki in kemijski del. V kemijskem delu smo z metodo HPLC preverjali vsebnost kanabinoidov v različnih sortah, nabranih v dveh različnih rastnih sezonah in pridobljenih na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. V istih vzorcih smo preverjali tudi prisotnost aflatoksinov. Mikrobiološki del je bil posvečen ugotavljanju prisotnosti mikroorganizmov v istih desetih vzorcih posušene konoplje, ki bi bila lahko uporabljena za pripravo zeliščnega poparka. Preverili smo tudi mikrobiološko kakovost teh vzorcev po skladiščenju in pri tem upoštevali smernice za mikrobiološko varnost živil, da bi ugotovili, kakšna je kakovost vzorcev po fazi hrambe in kakšna je prisotnost mikroorganizmov, ki bi bili v večjih koncentracijah lahko patogeni za končnega potrošnika. Želeli smo ugotoviti, ali se pojavljajo razlike med posameznimi sortami konoplje, ki so bile gojene v identičnih rastnih pogojih in kasneje v vseh fazah skladiščenja obravnavane enako.

Luka Irenej Pečan, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School, Biotechnical Education Centre Ljubljana

Supervisor: **Marko Jeran**, Faculty of Health Sciences and Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Karmen Godič Torkar**, Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Roman Štukelj**, Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana

Quantitative Determination of Biologically Active Compounds in Industrial Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) and its Microbiology Quality

The revival of cannabis research, the topicality of the subject, the therapeutic promise of cannabis and its clinical relevance, and the variety of issues that arise in its study have prompted the idea of addressing and analyzing specific cannabis patterns for the purpose of this research. The increasing use of cannabis and its derivatives in nutrition, medicine, cosmetics and other fields has also raised the question of the impact of storage of dried cannabis plant parts on its final quality. This research contains a chemical and microbiological analysis of specific cannabis samples. In fact, the effects of cannabis also depend on the variety thereof, since the content and proportion of cannabinoids varies. In addition to the introductory part, dedicated to the description of the plant, its active substances and their use for medical purposes, the research is divided into two parts: microbiological and chemical. The chemical part consists of a HPLC measurement of the content of cannabinoids in different varieties, produced in two different growing seasons and harvested from the laboratory field of the Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana. The microbiological part is dedicated to the detection of the presence of microorganisms in the same ten samples of dried cannabis that could be used for the preparation of herbal infusions. We also examined the microbiological quality of these samples after storage in accordance with the guidelines for microbiological safety of foodstuffs in order to determine their quality after the storage phase and the presence of microorganisms that could be pathogenic at higher concentrations for the end consumer. Our purpose was to determine if there were any differences between individual varieties of cannabis grown under identical conditions and treated equally in all stages of storage.

Vpliv časa maceracije na vsebnost fenolnih spojin v vinu sorte sauvignon in modra frankinja

Namen raziskave je bil ugotoviti, kako maceracija vpliva na fenolno sestavo, antioksidativno lastnost in senzorične lastnosti vina, ter primerjati vino sort sauvignon in modra frankinja. Pridelani so bili štiri vzorci sauvignona in štiri modre frankinje, in sicer z različno dolgo maceracijo. Prvi vzorec ni bil maceriran, naslednji pa so bili macerirani 55, 110 in 165 ur. Vzorcem so bile določene vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antocianov ter antioksidativna aktivnost, ocenjeni so bili tudi senzorično. Rezultati so pokazali, da se z daljšo maceracijo povečuje koncentracija skupnih fenolnih spojin, koncentracije so manjše pri sauvignonu. Z daljšo maceracijo se povečuje tudi vsebnost antocianov v modri frankinji, v sauvignonu pa antocianov ni. Rezultati niso potrdili povečevanja antioksidativne lastnosti z večjo koncentracijo skupnih fenolov, vendar so to potrdile številne druge raziskave. Vinu za takojšnjo prodajo koristi krajša maceracija, daljša pa brez zorenja negativno vpliva na senzorične lastnosti.

Jerneja Marko, Il. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: **Anita Mustač**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Effect of Maceration Time on Phenolic Content in Sauvignon and Blaufränkisch Wines

The aim of this research was to investigate the effect of maceration on phenolic composition, antioxidant activity and sensory characteristics, and to compare those in Sauvignon and Blaufränkisch wines. For this purpose, four samples of Sauvignon and four samples of Blaufränkisch wine were produced. The first sample was not macerated, while the other three were macerated for 55, 110 and 165 hours. Total phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity were determined. Samples were also sensory evaluated. The results showed that the total phenolic content increases with longer maceration time. Nonetheless, the Sauvignon samples have lower concentrations. Likewise, with longer maceration time, anthocyanin content also increases in Blaufränkisch. However, anthocyanins are not present in Sauvignon. Obtained results did not confirm an increased antioxidant activity with a higher total phenolic content, although confirmed in previous studies. Wine intended for immediate sale benefits from shorter maceration, while longer maceration without maturation negatively affects the sensory characteristics.

Aleš Poljanšek, Gimnazija Ledina

Mentorja: **Mihaela Skrt, Ilja Gasan Osojnik Črnivec**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina

Zelena ekstrakcija čebulnih listov za podaljševanje obstojnosti oljčnega olja

Suhi luskolisti čebule, ki jih pri procesiranju zelenjave in pripravljanju hrane obravnavamo kot odpadke, vsebujejo velike količine prostega kvercetina. Ta upočasnjuje oksidacijo, deluje antioksidativno in bi se zato lahko uporabljal kot sredstvo za podaljševanje obstojnosti živil. Iz celic čebule ga pridobimo z ekstrakcijo. Obstaja več ekstrakcijskih metod, pri našem raziskovalnem projektu pa smo se osredotočili na ekstrakcijo z ultrazvočno kopeljo, ki spada med zelene načine. Metodo smo primerjali z ekstrakcijo kvercetina s stresanjem. Preizkušali smo tudi vpliv topila (etanola in vode) na učinkovitost ekstrakcije kvercetina kot poglavitne komponente antioksidativnih spojin v ekstraktu in preverili, kako alkoholni oziroma vodni ekstrakti vplivajo na oksidativno stabilnost oljčnega olja.

Aleš Poljanšek, Gimnazija Ledina Grammar School

Supervisors: **Mihaela Skrt, Ilja Gasan Osojnik Črnivec**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Nika Cebin**, Gimnazija Ledina Grammar School

Green Extraction of Onion Leaves for Prolonging the Shelf Life of Olive Oil

The dry outer skin of an onion is often considered as waste in vegetable processing and cooking food, but it contains large amounts of free quercetin. Quercetin is an antioxidant, i.e. a substance that can slow down oxidation, which means it can be used as a preservative. Quercetin is extracted from plant cells. There are various extraction methods available. In our study we used an ultrasound-assisted green extraction technique and compared it with extraction in a shaker. We tested the influence of different solvents on extraction where quercetin was assumed to be the principal antioxidant, and examined the prepared extracts for their effect on the oxidative stability of olive oil.

Aleksandra Vujanović, II. gimnazija Maribor

Mentor: **Gregor Kravanja**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Darja Kravanja**, II. gimnazija Maribor

Uporaba nanodelcev cinkovega oksida v gelskih strukturah

V raziskovalni nalogi smo sintetizirali biokompatibilne gelske strukture (hidrogele) in vanje vezali različne koncentracije nanodelcev cinkovega oksida $n(\text{ZnO})$. Pridobljenim gelskim strukturam smo izmerili nabrekanje vezane tekočine in z metodo ESEM proučevali mikrostrukturo. Z metodo FTIR smo analizirali spektre in z metodo disk difuzije preverjali protimikrobno delovanje na po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli*. Ugotovili smo, da imajo vse sintetizirane gelske strukture zaradi porozne strukture veliko sposobnost vezave tekočine. Na podlagi rezultatov mikroanalize predvidevamo, da je prišlo do vezave ionov Zn^{2+} na karboksimetilno skupino, ki je sestavni del gelske strukture. Z disk difuzijo smo potrdili, da gelske strukture z vezanim $n(\text{ZnO})$ na bakterijo *Escherichia coli* delujejo inhibitorno. Ugotovili smo tudi, da se s povečevanjem koncentracije $n(\text{ZnO})$ povečuje protimikrobna učinkovitost.

Aleksandra Vujanović, II. Gimnazija Maribor Grammar School

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

Co-supervisor: **Darja Kravanja**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Incorporation of Zinc Oxide Nanoparticles in Gel Structures

In our research project, we focused on the synthesis of biocompatible gel structures (hydrogels) in order to establish the impact of incorporation of hydrogels and zinc oxide $n(\text{ZnO})$ nanoparticles in different concentrations. We carried out a study to specify the swelling capacities of hydrogels by using the ESEM technique. The swelling rate increases mainly due to the quantity of bonded water. The aim was to identify the obtained spectra by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and determine the antimicrobial effect of gram-negative bacteria *Escherichia coli* using the disc diffusion test. The porous structure appeared to be the prevailing factor influencing the enhancement of bonded water in hydrogels. The results revealed that bonding between Zn^{2+} ions and the carboxylic group is part of gel structure formation. Application of the disc diffusion test confirmed the inhibitory effects of gel structures bonded with $n(\text{ZnO})$ on *E. Coli*. Similarly, we proved that a higher concentration of $n(\text{ZnO})$ affects the increase of antimicrobial efficacy.

Mirjam Ogrinc, Nuša Pangerc, Eva Šubic, Gimnazija Novo mesto

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

Somentor: **Dušan Harlander**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Novo mesto

Somentor: **Damjan Jan Pavlica**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

PCB ostaja, zavedanje pohaja – pomembnost zavedanja ekoloških nesreč

Poliklorirani bifenili so skupina spojin, ki so se zaradi unikatnih lastnosti uporabljali skoraj v vseh industrijskih panogah, zaradi neprevodnosti so bili privlačni predvsem v elektroindustriji. Leta 1979 so jih zaradi toksičnih lastnosti prepovedali, kljub temu pa so zaradi počasnega razpadanja še vedno prisotni v okolju. Ena izmed prizadetih pokrajin je Bela krajina, kjer je PCB v proizvodnji uporabljala tovarna Iskra. Zaradi izpustov v okolje so se onesnažile reke, posledično pa so bile PCB-jem izpostavljene tudi živali. Z raziskovalno nalogo smo želele proučiti trenutno stanje PCB-jev v ribah iz lokalnih rek z enako metodo, kot je bila uporabljena leta 2010. Vzorce iz rib smo ekstrahirale s heksanom ter analizirale z masno spektrometrijo (GC) in ECD-detektorjem. Po primerjavi rezultatov s preteklimi smo ugotovile, da se stanje izboljšuje. Koncentracija PCB-jev v ribah se je zmanjšala za več kot polovico, v vzorcu iz reke Krupe pa je bila zaznana le tretjina količine iz raziskave leta 2010. Rezultati kažejo, da se prisotnost PCB-jev z leti zmanjšuje. Ribe kljub temu še niso primerne za uživanje, saj vrednosti presegajo sprejemljivi tedenski vnos PCB-jev, določen v evropski zakonodaji. V prihodnosti želimo v svoje raziskovalno delo o PCB-jih uvesti novo metodo ekstrakcije vzorca QuEChERS in analize GC/MS-MS.

Mirjam Ogrinc, Nuša Pangerc, Eva Šubic, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: **Janja Pust**, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Co-supervisor: **Dušan Harlander**, National Laboratory of Health, Environment and Food, Novo mesto

Co-supervisor: **Damjan Jan Pavlica**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

PCBs Remain, Awareness Fades – Importance of Ecological Disasters

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of organic compounds that were in the past used almost in all industries, especially in the electrical industry because of their unique properties, such as non-conductivity. In 1979, they were banned because of their toxicity. However, they are still present in many places due to their slow degradation. One of the affected areas is the Bela krajina region of Slovenia, where Iskra Capacitors, the Slovenian capacitor manufacturer, used this compound in their products. Due to improper storage of used PCBs, leakages started appearing and the disposed PCBs found their way into the local underground waterway, which gradually made the rivers more polluted. Consequently, the toxin started accumulating in animal fats, especially in fish. We analysed the current concentration of PCBs in fish from Bela Krajina rivers, such as Krupa, Lahinja, and Kolpa. The samples were extracted with hexane and analysed with a gas chromatograph (GC) and an electron capture detector (ECD). A comparison was made with the results of a 2010 research that also focused on PCBs in fish. After comparing the results, we found that the concentrations are steadily dropping. In comparison to the 2010 results, the concentration of detected PCBs in some fish has dropped by more than half. Only a third of the value from 2010 was detected in fish sampled from the Krupa River. It is evident that the presence of PCBs is gradually decreasing. However, the fish from these rivers are not suitable for consumption, since the values still exceed the tolerable weekly intake (TWI) of PCBs, which is stipulated by the European legislation. We would like to continue our research on PCBs with a new, not yet validated method of extracting samples (QuEChERS) and an analysis using a gas chromatograph with an MS-MS detector.

Vloga etanola in klorovodikove kisline pri ekstrakciji antocianov

Antociani so naravni pigmenti modre, vijolične in rdeče barve, ki jih najdemo v različnih rastlinah. Primer vira antocianov so borovnice, ki vsebujejo 3-glikozidne derivate cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina in peonidina. Ti dajejo borovnicam izrazito modro vijolično barvo, sočasno pa zagotavljajo njihove antioksidativne, protivnetne in protimikrobne lastnosti. Zaradi morebitnih ugodnih učinkov naj bi jih uporabljali za preprečevanje številnih kroničnih bolezni – nevroloških, srčno-žilnih, sladkorne bolezni in rakavih obolenj. Uporabljajo se lahko kot naravna barvila in tudi kot prehranski dodatek v živilskih izdelkih. Da bi bolje razumela kemične lastnosti antocianov, ki vplivajo na njihovo pridobivanje, sem se v raziskovalni nalogi osredotočila na vpliv kislosti in polarnosti topila na uspešnost ekstrakcije. Kislost je bila dosežena z uporabo klorovodikove kisline, polarnost pa z uporabo etanola. Pridobljeni ekstrakti so bili analizirani s spektrofotometrom, saj so absorbance ekstrahiranih raztopin premo sorazmerne s koncentracijo antocianov v ekstraktih. Za ugotavljanje vpliva različnih razmerij etanola in klorovodikove kisline v topilih na uspešnost ekstrakcije sem primerjala relativno uspešnost ekstrakcije antocianov (relative anthocyanin extraction yield). Pokazalo se je, da se je s povečevanjem količin etanola in klorovodikove kisline povečala tudi uspešnost ekstrakcije. Pomembnejše je bilo kislo okolje. Tako je bila največja sprememba v koncentraciji pridobljenih antocianov med topilom brez klorovodikove kisline in topilom s klorovodikovo kislino.

Ema Grmek, Gimnazija Kranj Grammar School
Supervisor: **Petra Flajnik**, Gimnazija Kranj Grammar School

Effect of Ethanol and Hydrochloric Acid on Extraction of Anthocyanins

Anthocyanins are blue, violet or red natural pigments, which can be found in various plants. An example of a source of anthocyanins are blueberries that contain 3-glycosidic derivatives of cyanidin, delphinidin, malvidin, petunidin, and peonidin. These give blueberries a distinct blue-violet colour and simultaneously enable their antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial effects. Therefore, they have been considered for the prevention of many chronic diseases such as neurological and cardiovascular diseases, diabetes and cancer. As such, anthocyanins are used as natural pigments and food additives. To improve the understanding of the chemical properties of anthocyanins, which influence their extraction, we focused on the effect of acidity and polarity of the solvent on the efficiency of the extraction. Acidity was achieved with the use of hydrochloric acid and the polarity with the use of ethanol. The obtained extracts were analysed with a spectrophotometer as the absorbance of the extracts is directly proportional with the anthocyanin concentration in the extracts. To find the effect of different ratios of ethanol and hydrochloric acid in the solvent on the efficiency of the extraction, the results were compared as 'relative anthocyanin extraction yield'. The results showed that increasing the quantity of both ethanol as well as hydrochloric acid improved the efficiency of the extraction. The acidity of the solvent was more important – the greatest difference in the concentration of the extracted anthocyanins was between the solvent without hydrochloric acid and the solvent that was already added hydrochloric acid.

Določanje skupnih estrogenov v površinskih vodah in odpadnih vodah čistilnih naprav vzhodne in severovzhodne Slovenije

Prek koncentriranja vzorcev površinskih voda in voda komunalnih čistilnih naprav smo merili vsebnost semisintetičnega hormona 17 α -etinilestradiola (EE2), ki je hormonski motilec. Rezultati so pokazali, da je koncentracija estrogenov v desetih naključno izbranih vzorcih površinskih voda in odpadnih voda čistilnih naprav v vzhodni in severovzhodni Sloveniji v primerjavi s koncentracijo v urinu najstnice, ki redno jemlje oralno kontracepcijo, nižja za velikostni razred 10³ do 10⁵. Kljub temu so vrednosti EE2 in sorodnih spojin v preiskanih vzorcih velike, s koncentracijo 960 ng/l še posebej izstopa Bistrica (pred čistilno napravo in za njo). Z UV-spektroskopijo smo določili koncentracije estrogenov do najmanj 99 ng/l ($\pm 10,9$). Ugotovili smo, da komunalne čistilne naprave estrogenov ne odstranijo iz vode: če so bili v vzorcu vode, ki predstavlja vtok v komunalno čistilno napravo, smo jih zaznali tudi v vzorcu vode, ki predstavlja odtok iz komunalne čistilne naprave.

Niko Mlinarič, Brina Poropat, Klar Daniel Opraus, Il. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: **Zdenka Keuc**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School

Content of Estrogens in Surface Waters and Waters from Wastewater Treatment Plants in East and North-East Slovenia

We measured the content of semi synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE2), which is known as an endocrine disruptor. We measured its content in concentrated samples of surface waters and concentrated samples of waters from various wastewater treatment plants. The results have shown that the concentration of estrogens in 10 randomly picked samples of surface waters and waters from wastewater treatment plants in East and North-East Slovenia, when compared to the concentration in urine of a female teenager on regular oral contraception, appears to be lower in size classes from 10³ to 10⁵. However, the content of EE2 and similar compounds is still high – a sample that especially stands out is the one from the Bistrica River with a concentration of 960 ng/L. Using UV spectroscopy we measured the concentrations of estrogens to as low as 99 ng/L (± 10.9). If there were estrogens in water samples taken from water before it entered wastewater treatment plants, there were estrogens found in water samples taken from water after it left wastewater treatment plants as well. Therefore, we established that wastewater treatment plants do not destroy estrogens.

Goran Jocić, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Somentorica: **Olivija Plohl**, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

Magnetni nanodelci na osnovi lizina kot potencialni dostavni sistem amoksicilina

Amoksicilin se pogosto uporablja kot antibiotik za zdravljenje bakterijskih vnetij. Kljub oralnemu jemanju so sistemi za dostavo antibiotika na ciljno mesto redko znani, vendar so s stališča hitre, tarčne in kontrolirane dostave izrednega pomena. Zato smo v tem delu razvili magnetni nanokompozit, sestavljen iz magnetnega jedra, prevlečen s tanko silikatno prevleko in funkcionaliziran z derivatom na osnovi lizina. Uporablja se kot dostavni sistem amoksicilina, ki ga ujamemo oz. se prek različnih interakcij pripne na magnetni nosilec. Silikatna prevleka, ki smo jo nanegli na magnetni nanokompozit, zaradi poroznosti signifikatno poveča specifično površino, kar omogoča še večjo vezavo liganda. Lizin, aminokislina, ki smo jo uporabljali, spada med osnovne gradnike našega telesa. Zaradi svojih prednosti se lahko uporablja za bioaplikacije. Ker pa je njegova vezava na površino silikatno-magnetnih nanodelcev težavna, smo ga najprej kemijsko povezali z organosilanom glikidoksilanom. Aminokupina lizina se pri specifičnih reakcijskih pogojih poveže z epoksiskupino organosilana, nato pa se derivati lizina s silanizacijo kovalentno vežejo na magnetno-silikatni kompozit. Uspešnost vezave lizina na nanomagnetni kompozit smo preverili s FTIR-analizo, elektrokinetičnimi meritvami (zeta potencial) in termogravimetričnimi analizami, morfologijo vzorcev pa smo opazovali s transmisijem elektronskim mikroskopom. Da bi spremljali kinetiko sproščanja amoksicilina na tarčnem mestu, smo antibiotik najprej ujeli v pripravljene nanodelce in kinetiko sproščanja v različnih časovnih obdobjih spremljali z UV-VIS-spektroskopijo. Razložiti jo bomo skušali s kinetičnimi modeli sproščanja, prav tako bomo skušali razložiti mehanizem vezave. Sproščanje bo potekalo v simuliranih bioloških pogojih, tj. PBS s pH 7,4.

Goran Jocić, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School
Co-supervisor: **Olivija Plohl**, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor

Magnetic Nano-Composites Based on Lysine as Potential Delivery System of Amoxicillin

Amoxicillin is commonly used as an antibiotic for treating different bacterial infections. Although it is used orally in the form of capsules, its target delivering systems, which are of tremendous importance with regard to fast, precise and controlled delivery of medicine, are rarely known. Because of that, we developed a magnetic nano-composite with a magnetic core, a thin layer of silica and functionalised with a derivate of lysine. It represents a potential delivery system of amoxicillin, which is attached to magnetic nano-composites by several intermolecular interactions. We layered them with thin silicate layer to prevent agglomeration and make the surface applicable for further ligand reactions. Lysine, the amino acid that we used, is also a building block in our body. Due to its advantages, it is used for bioapplications. As the direct bonding of lysine to silicate surface is difficult, we derivated lysine with organosilane glycidoxysilane, which binds lysine with a covalent bond to the surface of the nano-composite. We verified the efficacy of bonding by FTIR analysis, electro-kinetic measurements or zeta potential, and with thermo-gravimetric analysis. We will check the morphology of the sample with TEM analysis. To track the desorption of amoxicillin, we primarily adsorbed the antibiotic to nano-composites and then tracked the release by UV-VIS analysis in different time intervals. The release of amoxicillin will happen in slightly basic circumstances at pH 7.4.

Brina Godec, Timotej Pukšič, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Somentorici: **Milica Pantić, Gabrijela Horvat**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Oralno dovajanje insulina – mit ali upanje za diabetike?

Po postopku sol-gel sinteze smo pripravili alginatne aerogele s prevleko iz hitozana in jih superkritično posušili. Nanje smo poskušali z dvema metodama vezati insulin – z difuzijo z etanolom in s superkritično impregnacijo. Aerogele smo testirali z napravo USP 2 za sproščanje *in vitro* v SGF in PBS po standardih USP ter spremljali spreminjanje absorbance z UV-spektrofotometrom. Za karakterizacijo aerogelov smo uporabili FTIR, TGA/DSC in adsorpcijo dušika. Z uporabo FTIR-a smo želeli dokazati prisotnost insulina v vzorcih. Z analizami TGA/DSC smo določili stabilnost pripravljenih vzorcev ob povišanih temperaturah, z adsorpcijo dušika pa smo vzorcem določili specifično površino. S pomočjo dobljenih rezultatov smo ugotavljali uporabnost in lastnosti aerogelov z insulinom. Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali bi alginatni aerogel s prevleko iz hitozana zaščitil insulin pred kislim pH-jem želodca in se nato kontrolirano sproščal v črevesju.

Brina Godec, Timotej Pukšič, Gimnazija Franc Miklošič Grammar School

Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franc Miklošič Grammar School

Co-supervisors: **Milica Pantić, Gabrijela Horvat**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Oral Delivery of Insulin – Myth or Hope for Diabetics?

Within the scope of our research work, we synthesized alginate aerogels with chitosan coating using salt-gel synthesis and dried them supercritically. We tried to bind insulin to aerogels using two methods: diffusion of ethanol and supercritical impregnation. Aerogels were tested by using a USP 2 device for *in vitro* release in SGF and PBS according to USP standards, and absorbance changes were monitored using a spectrophotometer. We used FTIR, TGA/DSC and nitrogen adsorption for aerogels characterisation. By using FTIR, we tried to prove the presence of insulin in samples. TGA/DSC analyses enabled us to determine the stability of prepared samples at increased temperatures, while nitrogen adsorption helped us identify the specific surface area of samples. Based on results obtained we aimed to establish the usefulness and characteristics of aerogels with insulin. The aim of this research work was to find whether alginate aerogel with a chitosan coating would protect insulin from acid pH of the stomach and afterwards release into intestine.

Klara Žos, Biotehniški center Naklo
Mentor: **Borut Lazar**, Biotehniški center Naklo

Obdelava mlekarskih odpadnih vod z algami

Zaradi pospešenega gospodarskega razvoja v zadnjih letih vedno več materialov in surovin pristane v okolju v obliki odpadnih snovi. Mednje spadajo tudi odpadne vode. Mlekarske odpadne vode vsebujejo velike koncentracije organskih in anorganskih snovi, ki lahko ob izpustu v naravni ekosistem porušijo njegovo ravnovesje. V raziskavi sem proučevala, kako lahko z uporabo algnih tehnologij razbremenimo mlekarske odpadne vode. Ugotovila sem, da alge učinkovito zmanjšajo količino fosfatov, amonij pa v procesu nitrifikacije pretvorijo v nitrate in nitrite. Tehnike čiščenja mlekarskih in drugih odpadnih vod bi z izboljšanjem njihove učinkovitosti lahko uporabljali tudi širše ter tako manj obremenjevali okolje. Alge so tudi uporabna izhodna surovina za industrijske in druge procese, tudi za proizvodnjo biogoriv.

Klara Žos, Biotechnical Centre Naklo
Supervisor: **Borut Lazar**, Biotechnical Centre Naklo

Treatment of Dairy Wastewater with Algae

Accelerated economic development means that increasing amounts of materials end up as waste. This also applies to wastewater. In particular, wastewater from the dairy industry has high concentrations of organic and inorganic substances, which can cause environmental degradation. In this project, we researched algae technologies as an option for treating dairy wastewater. The results show that algae can reduce phosphate concentrations and convert ammonium to nitrates and nitrites through the process of nitrification and denitrification. Such technology could be used on a larger scale. This would cause minor environmental damage and, furthermore, algae biomass could be used in certain industries or even in the production of biofuels.

Katja Pehlić, Kaja Vončina, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorica: **Jelka Zabavnik Piano**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Lidija Gnidovec**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Genotipizacija gena za prionski protein pri ovcah

Prskavec je ena od transmisivnih spongiformnih encefalopatij, ki prizadenejo ovce in koze. Pri živalih je dokaj redka bolezen, povezana s kopičenjem nenormalnih prionskih proteinov v možganih. Te bolezni so smrtno, saj je zanje značilna gobasta degeneracija možganov, zdravljenja in cepiva pa ni. Poleg klasične oblike praskavca poznamo tudi atipično obliko, ki ni prenosljiva in se pojavi naključno. V projektni nalogi sva ugotavljali pogostost genetske dovzetnosti ovac za atipični prskavec. Na različnih skupinah ovac, kot so poginule ovce z atipičnim prskavcem, poginule ovce brez atipičnega praskavca in plemenski ovni, sva proučevali deleže različnih alelov gena za prionski protein (*PRNP*). Uporabili sva različne metode, kot so izolacija DNK, elektroforeza in PCR v realnem času. Raziskava je pokazala, da je bil delež različnih genotipov *PRNP* pri skupinah poginulih ovac s potrjenim atipičnim prskavcem drugačen kot pri poginulih ovcah brez atipičnega praskavca in plemenskih ovnih. Pri ovcah z genotipom *PRNP*, ki so imele na kodonu 141 zapis za aminokislino fenilalanin, je bil največji delež obolelih z atipičnim prskavcem.

Katja Pehlić, Kaja Vončina, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisor: **Jelka Zabavnik Piano**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Lidija Gnidovec**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Genotyping of the Prion Protein Gene in Sheep

Scrapie is one of the transmissible spongiform encephalopathies that affect sheep and goats. In animals, this is a fairly rare disease associated with the accumulation of abnormal prion protein in the brain. This disease is fatal as there is no treatment available and no vaccine. They are characterized by spongiform degeneration of the brain. In addition to its classical form, scrapie also occurs in the atypical form, which is not transferable, but sporadic. In our research project, we determined the frequency of genetic susceptibility of sheep to atypical scrapie. We used different groups of sheep, e.g. dead sheep with atypical scrapie, dead sheep without atypical scrapie and breeding rams, and studied the proportions of different prion protein gene (*PRNP*) alleles. We used different laboratory methods, such as DNA isolation, electrophoresis and real time PCR. Our research showed that the proportion of different *PRNP* genotypes was different in the groups of dead diseased sheep with confirmed atypical scrapie, dead sheep without atypical scrapie, and breeding rams. The highest proportion of atypical scrapie was determined in sheep with the *PRNP* genotype and amino acid phenylalanine encoded at codon 141.

Helena Godina, Barbara Simonič, Il. gimnazija Maribor
Mentorica: **Katja Holnthaner Zorec**, Il. gimnazija Maribor
Somentorica: **Pija Rep**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

Vsebnost težkih kovin v zemlji in rastlinah na poplavnem območju Drave v okolici Dupleka

V raziskavi smo poskušali ugotoviti, kolikšna je vsebnost težkih kovin v zemlji in rastlinah na poplavnem območju Drave v okolici Dupleka. Ugotavljali smo tudi, kako se njihova vsebnost spreminja z oddaljenostjo od rečne struge. Po pripravi vzorcev v laboratoriju in meritvah z metodo ICP-MS smo, kot smo pričakovali, ugotovili, da vsebnost težkih kovin v vzorcih zemlje z vseh lokacij tik ob strugi presega mejno vrednost. V najbolj oddaljeni točki na vsaki lokaciji je vsebnost merjenih težkih kovin pod mejno vrednostjo. Če primerjamo le točke na eni lokaciji, se vsebnost od točke do točke ne zmanjšuje linearno, vendar pa trendna črta kaže zmanjševanje. Vzorčili smo japonski dresnik (*Fallopia japonica*), žlezavo nedotiko (*Impatiens glandulifera*), navadno robido (*Rubus fruticosus*), navadni regrat (*Taraxacum officinale*) in ozkolistni trpotec (*Plantago major*). Tudi v vzorcih rastlin ob strugi je vsebnost kovin povečana, z oddaljenostjo od struge pa pade pod kontrolno vrednost. Ugotovili smo tudi, da imata japonski dresnik (*Fallopia japonica*) in žlezava nedotika (*Impatiens glandulifera*) potencial za bioremediacijo tega območja, saj imata veliko biomaso in sta v velikih količinah akumulirala predvsem kadmij in cink.

Helena Godina, Barbara Simonič, Il. Gimnazija Maribor Grammar School
Supervisor: **Katja Holnthaner Zorec**, Il. Gimnazija Maribor Grammar School
Co-supervisors: **Pija Rep**, National Laboratory of Health, Environment and Food, Maribor

Heavy Metal Contamination of Soils and Plants Collected from the Drava Floodland Area in the Vicinity of Duplek

The aim of our research was to determine the heavy metal content in soil and plant samples collected from the Drava floodland in the vicinity of Duplek, and to establish the relationship between the heavy metal content and the proximity to the Drava River. We used the ICP-MS method for heavy metal measurements. As expected, it was established for the samples obtained at various locations next to the river that the heavy metal content in all soil samples exceeded the limit values of dangerous substances in the soil. However, at the sampling location that was furthest from the river, the heavy metal content of the soil fell under the limit value. When comparing the heavy metal content of the soil at a single location, in the line from closest to furthest to the river, we saw that the fall in heavy metal contamination is not linear. The plants sampled included *Fallopia japonica*, *Impatiens glandulifera*, *Rubus fruticosus*, *Taraxacum officinale* and *Plantago lanceolata*. Similarly to the soil samples, the plant samples also showed the pattern of heavy metal content decreasing as the plants were obtained from further away from the river, compared with those taken closer to the river. At the furthest sampling spot, the heavy metal content in plants fell under the control value threshold. Importantly, we realized that *Fallopia japonica* and *Impatiens glandulifera* can have a bioremediation potential in the area since they have large biomass and accumulated cadmium and zinc.

Vpliv polarnosti topila na svetlobno degradacijo avobenzona, merjeno z metodo spektroskopije

Zavedanje o nevarnosti UV-sončnega sevanja se v zadnjem času povečuje in s tem potreba po učinkovitih zaščitnih izdelkih. Ena od najpogosteje uporabljenih spojin za zaščito pred UVA-sončno radiacijo je avobenzon, katerega stabilnost pa je odvisna tudi od uporabljenega topila. Tema te raziskovalne naloge je ugotavljanje vpliva polarno aprotičnih topil na fotorazgradnjo avobenzona. Avobenzon, raztopljen v različnih topilih (acetonitril, DMSO, DMF, kloroform), je bil izpostavljen umetni UV-svetlobi, nato pa je bil v časovnih intervalih narejen spektrofotometrični posnetek valovnih dolžin v UV-spektru, ki jih raztopina absorbira. Zmanjševanje absorpcije pri valovnih dolžinah okrog 360 nm je bilo asociirano z razpadom avobenzona v spojini, s čimer je bila ugotovljena hitrost njegovega razpada. Ugotovljeno je bilo, da je avobenzon najbolj stabilen v kloroformu, malo manj v DMF, nestabilen pa je v DMSO in še bolj v acetonitrilu. Reakcija je torej hitrejša v topilih večje relativne polarnosti. V nalogi so obravnavani še ostali trendi v spremembi absorpcijskih krivulj, ki so predvidoma povezani z izomeričnimi lastnostmi avobenzona.

Metka Rus, Gimnazija Kranj Grammar School
Supervisor: **Petra Flajnik**, Gimnazija Kranj Grammar School

Spectrophotometric Investigation into the Effect of Polarity of Solvents on Photodegradation of Avobenzene

The awareness about the harmful effects of solar radiation has been increasing during these past few years, together with the demand for sun protection products. One of the most widely used compounds for protection against UVA radiation is avobenzene, the stability of which strongly depends on the properties of the solvent. The focus of this research paper is to determine the trend in which polarity of aprotic solvent affects the photostability of avobenzene. The samples of avobenzene diluted in different solvents (acetonitrile, DMSO, DMF and chloroform) were exposed to an artificial source of UV light. The spectre of UV light absorption by samples was measured with a spectrophotometer at different time intervals. The slow decrease of absorption at around 360nm (initial peak wavelength) was associated with the decay of avobenzene and so the rate of degradation was determined. Results show that avobenzene is most stable in chloroform, a bit less in DMF, but unstable in DMSO and even more in acetonitrile. In general, the rate of degradation is higher in solvents with a higher relative polarity. In addition, this paper includes some other trends observed in graphs, mainly the ones that are the result of isometric properties of avobenzene.

Karmen Rehar, Tinkara Rupnik, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Mentorica: **Lidija Gnidovec**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Somentor: **Metod Kovačič**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Vpliv rožmarina na krompir in patogene mikroorganizme

Namen naloge je bil preveriti rast mikroorganizmov, ki smo jih izolirali iz gnilega krompirja in kasneje izpostavili snovem, pridobljenim iz rožmarina. Želeli smo zavreti rast mikroorganizmov, ki bi lahko povzročili gnitje ali okužbo krompirja. Poskušali smo najti način, da bi preprečili prezgodnjo kalitev krompirja in s tem omogočili nadaljnjo raziskovanje zaviralcev kalitve pri krompirju. To bi omogočilo razvoj ekoloških zaviralcev rasti, saj se danes uporabljajo le kemične snovi. Iskali smo optimalno temperaturo za rast mikroorganizmov, zato smo jih izpostavili trem različnim temperaturam: 4 °C, 20 °C in 37 °C. Ugotovili smo, da vsem izbranim mikroorganizmom za rast najbolj ustreza sobna temperatura. Iz rožmarina smo poskusili izolirati snovi na več načinov, z alkoholno in vodno ekstrakcijo ter z destilacijo. Za alkoholno ekstrakcijo smo uporabili *Rosmarinus officinalis*, nabran ob istem času v Velenju in Piranu. Pri poskusu zaviranja kalitve krompirja smo uporabljali tudi kupljeno eterično olje rožmarina Favn, za izdelavo antibiograma pa še kupljeno eterično olje timijana, origana in žajblja Favn. Za poskus zaviranja kalitve krompirja smo uporabljali krompir sort arrow, agata in KIS slavník. Ugotovili smo, da kalitev krompirja najbolj zavirajo hlapi alkoholnih ekstraktov rožmarina, manj uspešno pa hlapi kupljenega eteričnega olja rožmarina Favn. Pri izdelavi antibiograma smo ugotovili, da rast mikroorganizmov najboljše zavirata alkoholna ekstrakta rožmarina iz Pirana in Velenja, saj smo okoli diskov izmerili inhibicijske cone s premeri med 5 in 12 mm. Sledilo je še preverjanje reverzibilnosti, saj nas je zanimalo, ali se krompir lahko vrne v stanje kalitve. Kalčki so v enem tednu po odstranitvi ekstraktov pomrli in krompirji so začeli gniti, razen kontrolnih in ene sorte, ki je bila v stiku s hidrolatom.

Karmen Rehar, Tinkara Rupnik, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Supervisor: **Lidija Gnidovec**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School
Co-supervisor: **Metod Kovačič**, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Influence of Rosemary on Potatoes and Pathogenic Microorganisms

The purpose of the assignment was to verify the growth of microorganisms that were isolated from rotten potatoes and subsequently exposed to substances derived from rosemary. We wanted to inhibit the growth of microorganisms that could cause rot or infection of potatoes. We tried to find a way to prevent the potatoes from sprouting prematurely, thereby allowing further exploration of the potato inhibitors. This would allow for the development of organic growth inhibitors, since today only chemical substances are used to inhibit the potato growth. We searched for the optimal temperature of the microorganisms, so we exposed them to three different temperatures: 4 °C, 20 °C and 37 °C. We have found that room temperature is most suitable for growth of all selected microorganisms. We have tried to isolate substances from rosemary in several ways, by alcoholic and aqueous extraction and distillation. *Rosmarinus officinalis*, collected at the same time in Velenje and Piran, was used for alcohol extraction. When trying to inhibit the germination of potatoes, we also used the purchased essential oil of Favn rosemary, and for the preparation of the antibiogram we also purchased essential oil of Favn thyme, oregano and sage. To try to inhibit the sprouting of potatoes, we used potato species Arrow, Agata and KIS Slavník. We found that the vapour of alcoholic rosemary extracts most inhibits the sprouting of potatoes, and that the vapour of purchased rosemary essential oil is also a successful inhibitor of germination, but to a lesser extent. In the preparation of the antibiogram, we found that the alcoholic extracts of rosemary from Piran and Velenje best inhibit the growth of microorganisms: we measured inhibition zones around the disks with diameters between 5 and 12 mm. This was followed by a reversibility check to determine if the potatoes could return to the germination status. The sprouts died and the potatoes began to rot one week after the extracts were removed, except for control potatoes and one potato species that was in contact with a hydrolate.

KAZALO

INDEX

KAZALO AVTORJEV

82	Klavdija Bastl	98	Lara Markelj
96	Urban Bauman	107	Jerneja Marko
95	Jernej Birk	86	Arne Klemen Marušič
64	Klara Čebular	63	Andraž Mehle
80	Črt Dragar	28, 32	Janja Mirtič
50	Miha Drev	112	Niko Mlinarič
71	Eric Frančišković	87	Vita Movrin
114	Brina Godec	90	Klemen Novak
117	Helena Godina	110	Mirjam Ogrinc
86	Matic Jože Grdadolnik	112	Klar Daniel Opraus
111	Ema Grmek	110	Nuša Pangerc
81	Jasmina Heric	61	Bojan Papić
95	Domen Hočevar	74	Tjaša Pavčnik
73	Andreja Horvat	106	Luka Irenej Pečan
103	Ajda Ivezić	79	Tina Pečarič Strnad
113	Goran Jocić	116	Katja Pehlić
88	Bert Kokovnik	98	Neža Perko
101	Arne Kolenc Šušterčič	94	Neža Peternel
62	Anita Kotar	96	Alja Petrović
92	Žiga Kovačič	93	Miša Pintarič
76	Nina Krištofelc	108	Aleš Poljanšek
85	Gregor Kržmanc	112	Brina Poropat
75	Neja Kuret	70	Eva Praunseis
40, 44	Andraž Lamut	88	Brina Predalič
104	Mark David Longar	114	Timotej Pukšič
69	Taja Ložar	34, 38	Andreja Radman Kastelic
97	Jurij Malovrh	95	Kaja Rangus
67	Rok Marinič Podbršček	90	Aleks Rautar



KAZALO AVTORJEV

119	Karmen Rehar
89	Hana Remškar
98	Maša Repinc
97	Andraž Rotar
72	Urša Rozman
119	Tinkara Rupnik
91, 118	Metka Rus
89	Anja Sedušak Kljakič
117	Barbara Simonič
66	Kristijan Skok
102	Ana Slomšek
84	Žan Smrekar
85	Tadej Strah
68	Sandi Svetič
65	Mateja Šenica
110	Eva Šubic
99	Urška Šumak
60	Tine Tesovnik
77	Svetlana Utroša
83	Uroš Vezonik
56	Miha Virant
105	Julija Vodenik
116	Kaja Vončina
78	Barbara Vrečer
109	Aleksandra Vujanović
93	Kaja Zupanič
115	Klara Žos
103	Daša Žuman
100	Špela Žunec



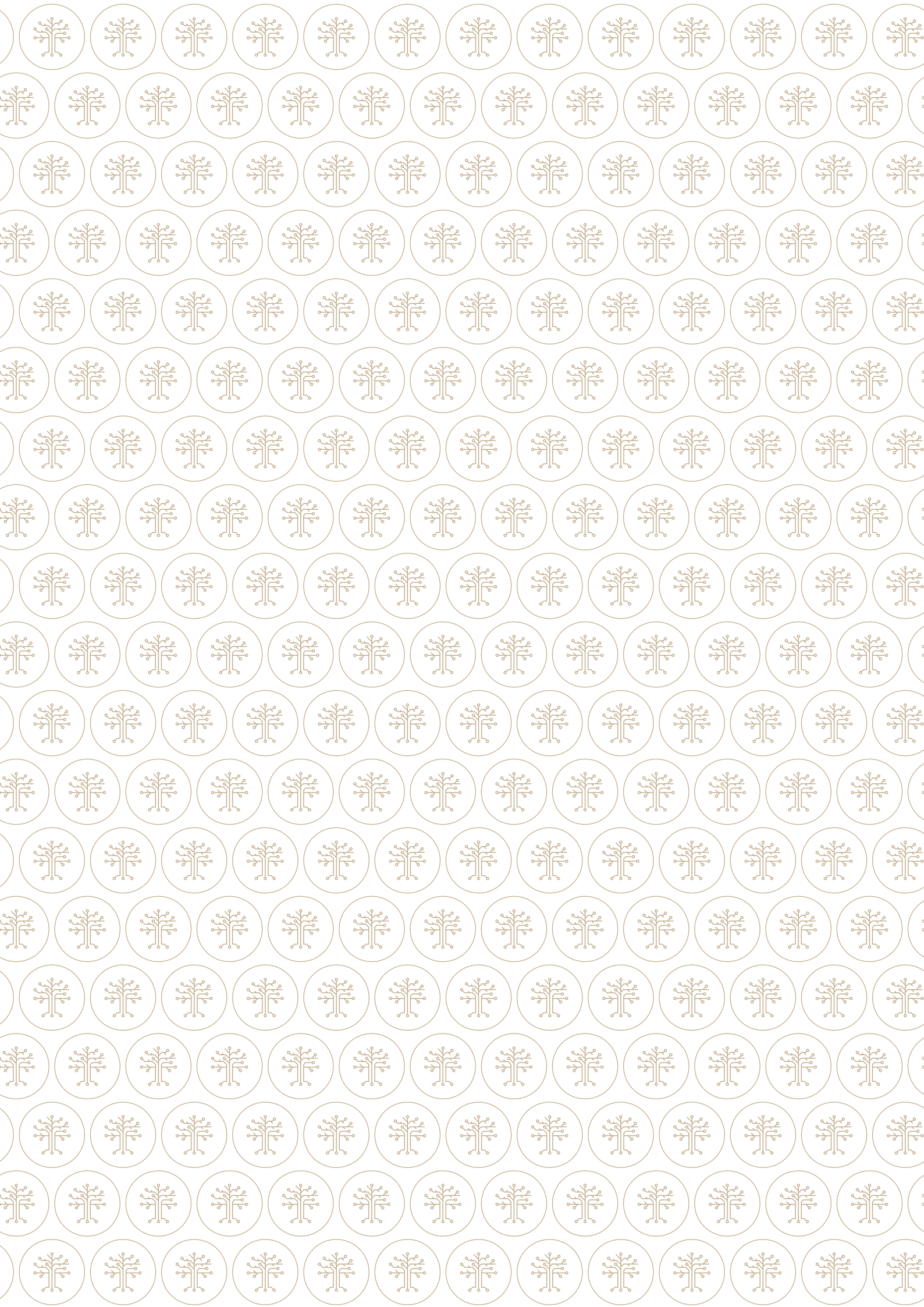
KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

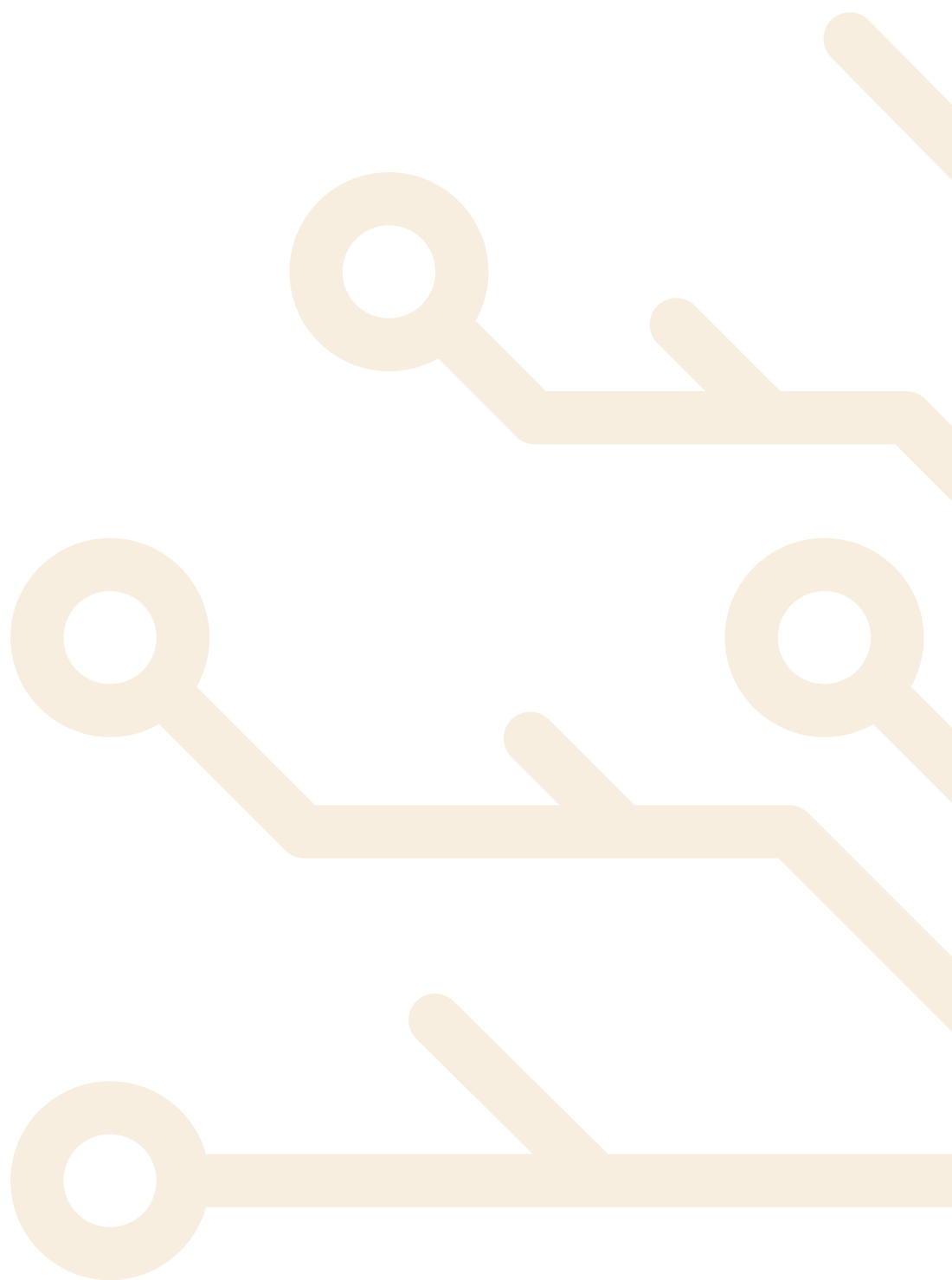
77	Samo Andrenšek	44	Danijel Kikelj
88	Tatjana Avšič Županc	75	Anja Klančnik
82	Adam Bass	80	Petra Kocbek
60	Tadej Battelino	84	Janez Konc
105	Janja Božič	56, 75, 83	Janez Košmrlj
84, 57	Urban Bren	99	Petra Kotnik
68	Teja Brezovar	119	Metod Kovačič
108	Nika Cebin	109	Darja Kravanja
81	Maja Čolnik	109	Gregor Kravanja
68	Rok Dreu	32	Julijana Kristl
102	Mojca Drofenik Čerček	61, 97	Darja Kušar
91, 94	Petra Flajnik	71	Jörg P. Kutter
111, 118	Petra Flajnik	115	Borut Lazar
87	Veronika Furlan	81	Maja Leitgeb
108	Ilja Gasan Osojnik Črnivec	99	Eneko Jose Madorran Esteiro
67	Martin Gazvoda	66	Uroš Maver
116, 119	Lidija Gnidovec	65	Maja Mikulič Petkovšek
90, 113, 114	Mateja Godec	95	Ana Mitrović
106	Karmen Godič Torkar	85, 86	Alenka Mozer
97	Majda Golob	70	Janez Mravljak
69	Cvetka Grašič Kuhar	96, 107	Anita Mustač
110	Dušan Harlander	86	Urban Novak
76	Ester Heath	89	Martina Oder
99, 117	Katja Holnthaner Zorec	114	Milica Pantić
114	Gabrijela Horvat	61	Mateja Pate
70	Jure Hren	110	Damjan Jan Pavlica
93	Sandra Janežič	50	Franc Perdih
85	Uroš Javornik	62, 85	Janez Plavec
89, 107	Marko Jeran	113	Olivija Plohl
69	Tanja Jesenko	78	Aleš Podgornik
103	Nina Kacjan Maršič	100	Črtomir Podlipnik
98	Marjetka Kastelic Švab	100	Mojca Podlipnik
92, 112	Zdenka Keuc	78	Matejka Podlogar

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

50	Franc Požgan
36	Ines Primožič
95, 110	Janja Pust
117	Pija Rep
105	Darja Rizmal
80	Eva Robbleg
73, 77	Robert Roškar
75, 95	Jerica Sabotič
82	Rita Seeböck
88, 97	Gašper Jan Simon
108	Mihaela Skrt
76	Marija Sollner Dolenc
101	Maruša Sotler Wedam
64	Stojan Stavber
71	Drago Sticker
88	Katja Strašek Smrdel
101	Miran Šebeštjen
96	Tamara Šiško
93	Jure Škraban
65	Franci Štampar
72, 79	Bogdan Štefane
106	Roman Štukelj
66	Iztok Takač
73	Žane Temova Rakuša
44	Tihomir Tomašič
63	Dejan Tomaževič
60	Katarina Trebušak Podkrajšek
103	Vesna Vrhovski
116	Jelka Zabavnik Piano
104	Blaž Zupan
104	Boštjan Žnidaršič
103	Nina Žuman







#krkinenagrade

www.krkinenagrade.si