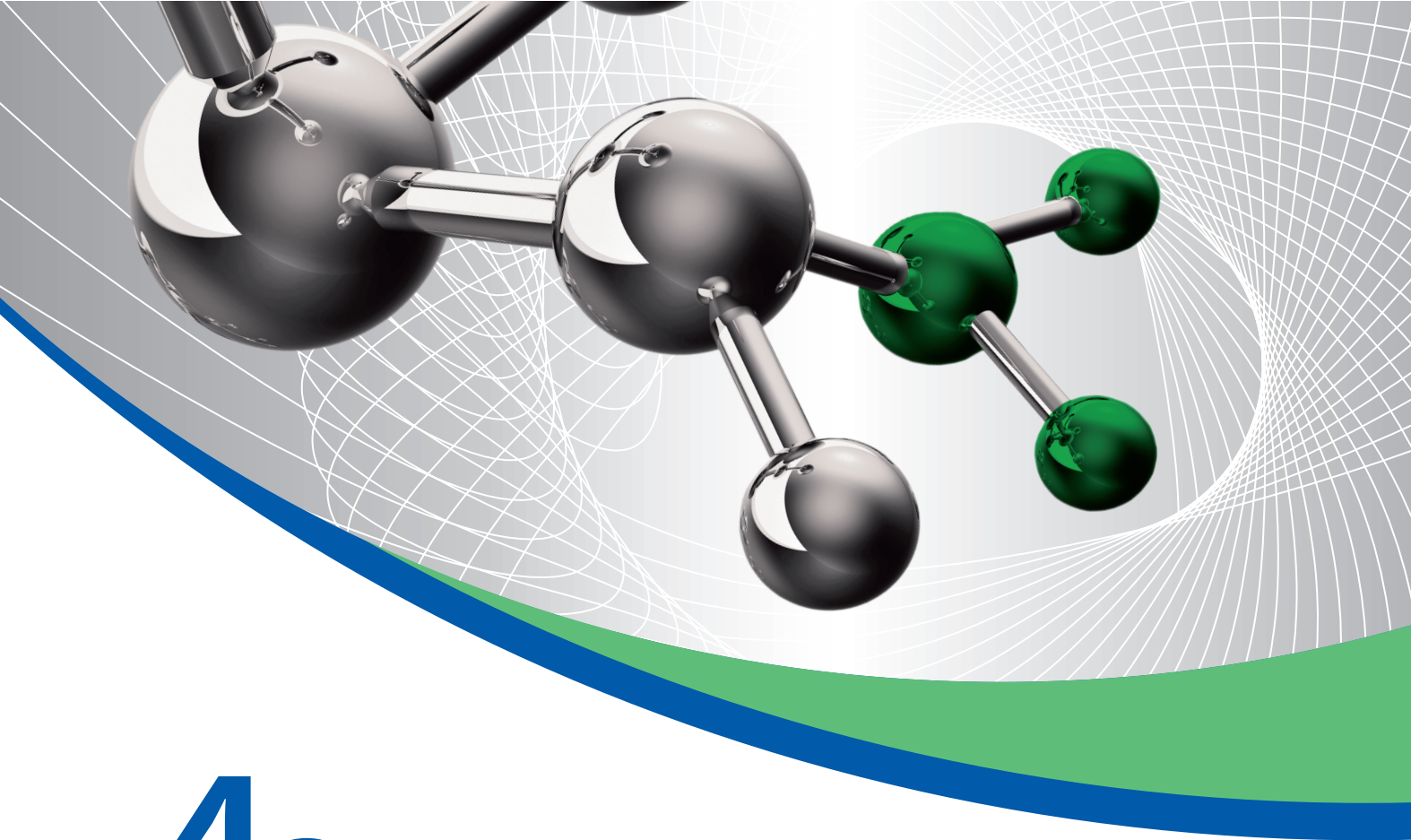




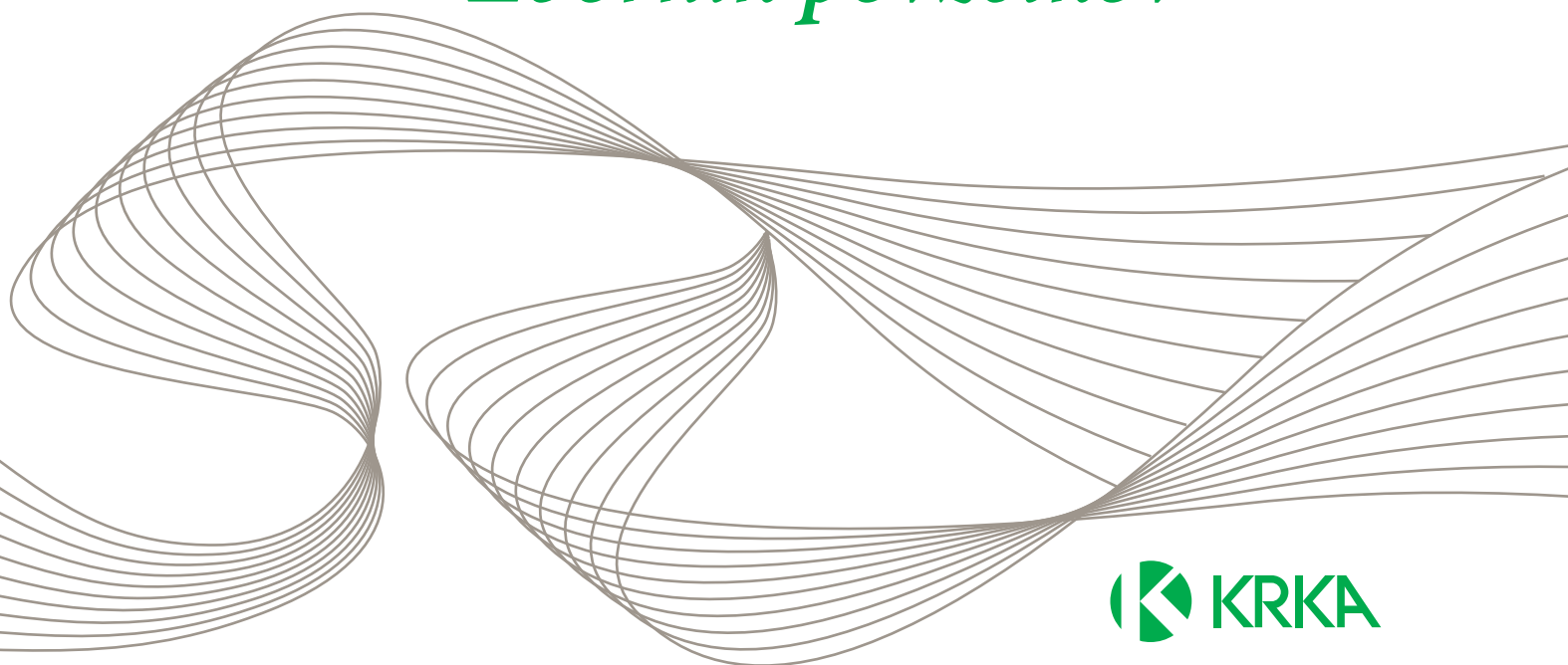
48. Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

48. Krkine nagrade | 48th Krka Prizes

28. simpozij

Zbornik povzetkov



Poslanstvo

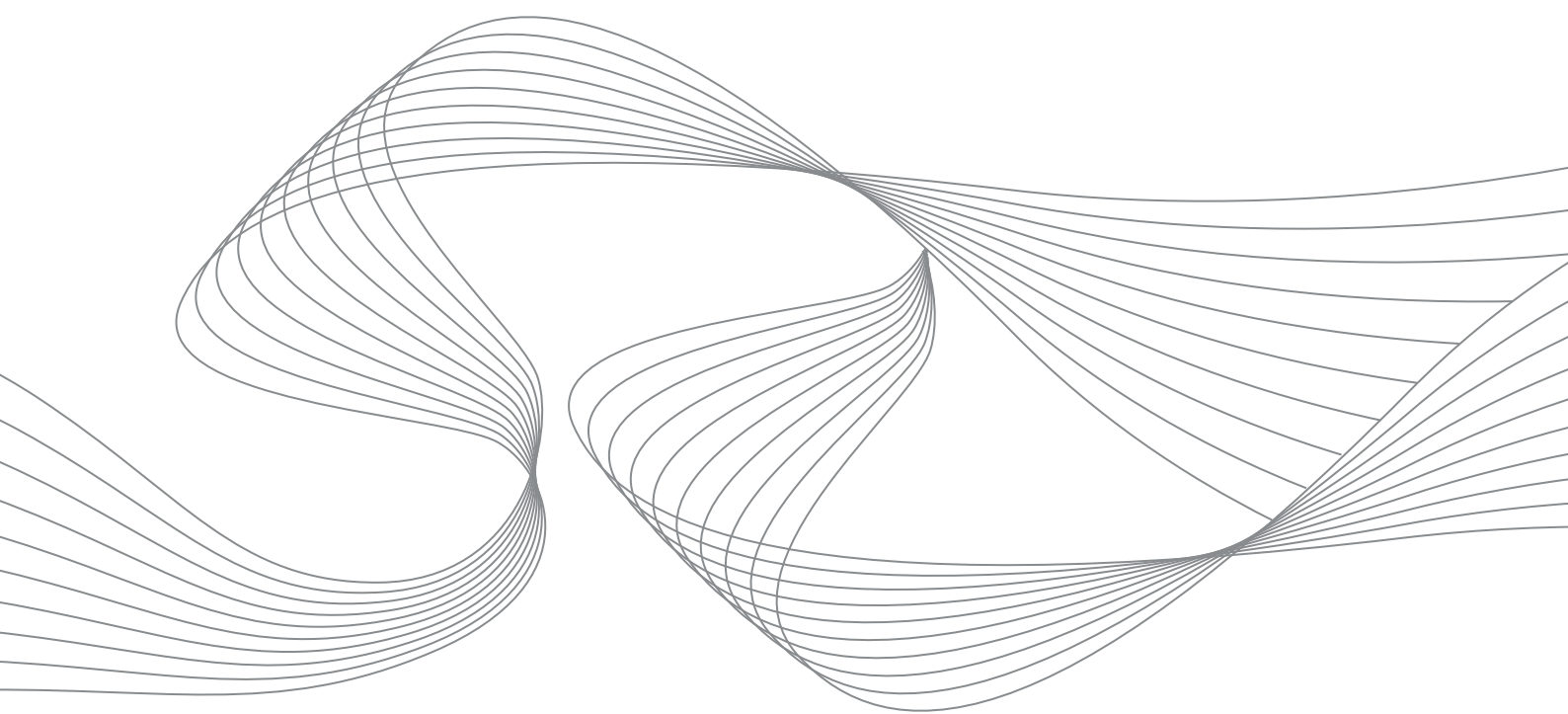
Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

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

28. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 19. oktober 2018

Častni odbor 48. Krkinih nagrad	Jože Colarič , <i>predsednik uprave in generalni direktor Krke</i> akad. prof. dr. Tadej Bajd , <i>predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti</i> prof. dr. Igor Papič , <i>rektor Univerze v Ljubljani</i> prof. dr. Zdravko Kačič , <i>rektor Univerze v Mariboru</i> mag. Matjaž Tuš , <i>predsednik Slovenskega farmacevtskega društva</i> dr. Albin Pintar , <i>predsednik Slovenskega kemijskega društva</i> prof. dr. Radko Komadina , <i>predsednik Slovenskega zdravniškega društva</i>
Svet Sklada Krkinih nagrad	dr. Aleš Rotar , <i>predsednik</i> prof. dr. Mihael Japelj , <i>častni predsednik</i>
Znanstveni odbor	prof. dr. Franc Vrečer doc. dr. Aleš Gasparič dr. Anita Mlakar Dušanka Oblak Božič dr. Leon Ščuka doc. dr. Vida Škrabanja dr. Silvo Zupančič
Organizacijski odbor	Elvira Medved , <i>predsednica</i> Simona Kastelic mag. Simona Torkar Flajnik dr. Jernej Zadnik
Glavni in odgovorni urednik	dr. Miha Plevnik
Recenzenti	Jože Arh , Matej Barič , Nastja Bašelj , mag. Alenka Beličič Kolšek , dr. Primož Benkič , dr. Ana Bergant Simončič , Franci Bevec , dr. Jure Bezenšek , Tanja Blatnik , dr. Sergeja Bombek , dr. Rok Borštnar , dr. Blaž Brulc , dr. Polona Bukovec , Alenka Colarič Wala , dr. Aleš Curk , dr. Irena Čarman , dr. Katja Čerpnjak , dr. Sabina Devjak Novak , dr. Katarina Dobrovoljc , dr. Boris Dular , Blanka Emeršič , Maja Ferbežar , mag. Andrej Ferlan , Tamara Feuš , dr. Aleš Gasparič , dr. Ivan Gobec , mag. Mojca Golob , Tanja Gregorevčič , mag. Mateja Grošelj , Peter Hančič , Mojca Hiti , dr. Žiga Hodnik , dr. Grega Hudovornik , Jernej Hvala , Tina Hvala , mag. Miran Hvalec , Dušan Janežič , dr. Boštjan Jerman , Jernej Jerman , Aleš Judež , Saša Kajdič , dr. Davor Kidemet , Ksenija Kikelj , Teja Kitak , dr. Slavko Klobčar , Filip Kolenc , dr. Tanja Koleša Dobravc , Klemen Korasa , mag. Berta Kotar Jordan , mag. Helena Kotnik , Irena Kovačič , Irena Krajačič , dr. David Kralj , mag. Andrejka Kramar , dr. Zdenka Kranjc Gregorčič , dr. Vesna Krošelj , mag. Bojana Kržič , Andreja Kuhar , dr. Jernej Kužner , dr. Brigita Lapornik , Nataša Lebar , dr. Roman Lenaršič , mag. Denise Leskovar , Irena Lindič , dr. Gregor Lorbek , mag. Matej Luštek , dr. Lea Mauko , dr. Marija Meleh , mag. Dušanka Mervar , dr. Špela Miklič , dr. Anita Mlakar , dr. Tomaž Mohorič , mag. Tamara Nemec , Dušanka Oblak Božič , mag. Irena Orel , dr. Renata Osolnik , mag. Vesna Pahor , Mitja Pelko , dr. Lidija Pezdirc , dr. Andreja Plaper , mag. Igor Plaper , dr. Miha Plevnik , Tamara Potočnik , dr. Gašper Pustovrh , mag. Ivan Radež , Zdenka Ratajc , dr. Nataša Rebolj , Vojko Rebolj , dr. Tadej Recelj , Marjeta Redek , Aleksander Rekič , dr. Matej Repič , Urška Ribič , dr. Aleš Rotar , dr. Saša Rožman , Miloš Ružič , Robert Sekereš , Mirjam Simčič Milharčič , dr. Igor Simonič , Gordan Sladič , dr. Janez Smodiš , dr. Matej Smrkolj , Matej Stergar , Tadej Stropnik , mag. Nada Šavor , dr. Leon Ščuka , dr. Luka Šenica , dr. Ervin Šinkovec , dr. Vida Škrabanja , dr. Natalija Škrbina Zajc , dr. Marko Štefanič , dr. Anton Štimac , dr. Jaroslav Tihi , Andreja Toplišek , dr. Tanja Trafela , dr. Elizabeta Tratar Pirc , Sandra Turk , Urška Turk , mag. Robert Ucman , mag. Aleš Urbančič , dr. Darko Uršič , dr. Sintija Verstovšek , mag. Iztok Vidic , dr. Miha Vrbinc , Tomaž Vrbinc , dr. Franc Vrečer , mag. Tatjana Vrščaj Žunič , dr. Jernej Zadnik , Špela Zajec , David Zupančič , mag. Polonca Zupančič , dr. Silvo Zupančič

VSEBINA | CONTENT

48. KRKINE NAGRADE

- 8 | **Aleš Rotar**, *predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad*
- 10 | **Krkini nagrajenci 2018**

28. SIMPOZIJ | ZBORNİK POVZETKOV

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

VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 20 | **Kaja Rožman**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Strukturno podprto načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev biosinteze peptidoglikana
- 26 | **Gabrijela Horvat**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Priprava, karakterizacija in aplikacija polisaharidnih aerogelov
- 32 | **Špela Alič**, *Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana*
Bakterijska bolezen mehkih gnilob, ki jo povzroča nova vrsta rodu *Dickeya*, in možnost biološkega nadzora bolezni z bakteriofagi
- 38 | **Špela Zupančič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Razvoj dvoslojnih nanovlaken za inovativno zdravljenje parodontalne bolezni
- 44 | **Andrej Emanuel Cotman**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Asimetrične redukcije ketonov, katalizirane s kovinskimi kompleksi

48. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 53 | **Urša Štanfel**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Priprava, karakterizacija in uporaba enaminonskih ligandov
- 54 | **Janja Dermol-Černe**, *Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani*
Matematično modeliranje sprememb električnih lastnosti tkiv in transporta prek celične membrane pri elektroporaciji
- 55 | **Katja Traven**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Nove rutenijeve koordinacijske spojine z N,N-, N,O- in N,N,N-donorskimi ligandi
- 56 | **Anita Klančar**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Ugotavljanje obremenitve pitnih, površinskih in odpadnih vod z zdravilnimi učinkovinami in njihovimi metaboliti v Sloveniji
- 57 | **Ožbej Zupančič**, *Center za kemijo in biomedicino, Innsbruck*
Samoemulgirajoči dostavni sistemi (SEDDS): novo upanje v srcu oralno dostavljenih makromolekul
- 58 | **Helena Brodnik Žugelj**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Selektivna katalitska funkcionalizacija vezi C-H dušikovih heterocikličnih substratov
- 59 | **Tijana Markovič**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Vrednotenje imunske modulacije in učinkovitosti agonista receptorja EP4 in monoklonskih protiteles *in vitro*
- 60 | **Gregor Kravanja**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Načrtovanje visokotlačnih procesov za predelavo polimerov in izboljšave prenosa toplote
- 61 | **Alen Sevšek**, *Univerza v Utrechtu*
Gvanidinski iminosladkorji kot inhibitorji glikozidaz
- 62 | **Jasna Brčić**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Strukturne študije z gvanini in citozini bogatih oligonukleotidov, povezanih z nevrodegenerativnimi obolenji
- 63 | **Tamara Knific**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Iskanje novih biokemijskih označevalcev endometrioze in raka endometrija s pristopi proteomike in metabolomike
- 64 | **Gregor Ratek**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Ugotavljanje obhodnih časov mini tablet v vrtnčnoslojnih oblagalnikih z metodo fotoluminiscentce
- 65 | **Jernej Štukelj**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Navidezna topnost učinkovin v bioloških medijih s slikovno analizo posameznih delcev

- 66 | **Anžej Hladnik**, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Evaluacija virusne TAR RNA in humane mikro RNA hsa-miR-20a-5p kot biooznačevalcev za telesne rezervoarje HIV-1
- 67 | **Urška Mohorič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sklopitev mikroemulzijske elektrokinetične kromatografije brez surfaktantov (SF-MEEKC) z ESI-MS in UV-detekcijo za določitev hidrofilnih in hidrofobnih vitaminov
- 68 | **Nina Ledinek**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Optimizacija metode HPLC za določanje sorodnih substanc prednizolona v učinkovini
- 69 | **Mateja Mežnar**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Vpliv viskoznosti in topila v vzorcu na obliko kromatografskih vrhov pri reverznofazni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti
- 70 | **Tilen Volčanšek**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza modelnih spojin pomalidomida
- 71 | **Veronika Furlan**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
[6]-gingerol kot naravni lovilec kemijskih karcinogenov – računalniški pristop
- 72 | **Miha Mrzlikar**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Analiza neonikotinoidnih pesticidov v medu
- 73 | **Janja Umnik**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Razvoj in validacija analizne metode za merjenje koncentracij izbranih učinkovin v površinskih vodah s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo
- 74 | **Gregor Kodrič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Transformacije trifluorometiloliranih organskih spojin
- 75 | **Ina Kosmač**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Pretvorba tekočega samomikroemulgirajočega sistema s karvedilolom v trdno obliko s tehnologijo sušenja z razprševanjem
- 76 | **Kajetana Bevc**, *Onkološki inštitut Ljubljana*
Stabilnost in ekspresija plazmidov z zapisom za IL-12 različnih vrst
- 77 | **Uroš Filipič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*
Formuliranje farmacevtskih učinkovin s procesom PGSS
- 78 | **Satja Škobalj, Kaja Keglevič**, *II. gimnazija Maribor*
Ocena vpliva cinkovega piritiona na izbrane vrste rastlin in živali
- 79 | **Patrik Pečavar Nežmah**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Priprava vodotopne fluorescenčne učinkovine za označevanje normalnih in rakavih celic urotelija sečnega mehurja *in vitro*
- 80 | **Ana Babnik, Greta Junger**, *Gimnazija Vič*
Vpliv steroidogenega dejavnika 1 na izražanje gonadotropinov v hipofizi miši

- 81 | **Katarina Kokalj**, *Gimnazija Jurija Vege Idrija*
Superhidrofobne sol-gel prevleke za tkanino, steklo, papir in aluminij
- 82 | **Maša Predin**, *II. gimnazija Maribor*
Vpliv mikrovalov na zvijanje β -peptidov
- 83 | **Anja Moškrič, Nina Selan**, *Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Ljubljana*
Vpliv bakterij v probiotičnih kapsulah na simptome prebavnih motenj pri pacientih s putiko
- 84 | **Miha Pompe**, *Gimnazija Vič*
Izboljšava PET-skenerja z zmožnostjo meritve časa preleta
- 85 | **David Ribar**, *Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo*
Uporaba natrijevega tetrafluoroborata pri sintezi stabilnih diazonijevih soli; preučitev, optimizacija in generalizacija reakcije
- 86 | **Nuša Avguštinčič, Jan van Elteren, Jakob Vid Zupančič**, *Gimnazija Novo mesto*
Akumulacija in izločanje mineralov, zaužitih s prehranskim dopolnilom – analiza krvi, urina in las
- 87 | **Anja Kores**, *II. gimnazija Maribor*
Vpliv naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto
- 88 | **Mineja Leban**, *Gimnazija Jurija Vege Idrija*
Analiza citotoksičnosti divje ščetice (*Dipsacus sylvestris*)
- 89 | **Chris Černe, Tomaž Gravnar**, *Gimnazija Nova Gorica*
Fotokatalitska razgradnja reaktivnega barvila reactive blue 19 s TiO_2 , dopiranim s cirkonijem in bakrom
- 90 | **Ana Gabrovšek, Nika Tašler**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Delovanje modelnih učinkovin družine benzosultamov na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*
- 91 | **Nina Pust**, *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*
Izražanje rekombinantnega proteina iz družine aktinoporinov
- 92 | **Ciril Cerovšek, Luka Osredkar, Gregor Osredkar**, *Gimnazija Želimlje*
Primerjava alternativnih celuloznih odpadnih materialov kot substratov za gojenje trosnjakov bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*)
- 93 | **Katjuša Krupenko, Neža Ribnikar, Kaja Ličef**, *Gimnazija Jesenice*
Smrekova kresilača (*Fomitopsis pinicola*) – zdravilna ali radioaktivna?
- 94 | **Zala Božanič, Jana Ušen**, *I. gimnazija v Celju*
Proučevanje antioksidativnih in protimikrobnih učinkov nekaterih rastlinskih ekstraktov in vitamina C v kozmetičnih izdelkih
- 95 | **Niko Farič**, *Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*
Sinteze nanodelcev z ujetimi ekstrakti ter določitev koloidnih lastnosti disperzij



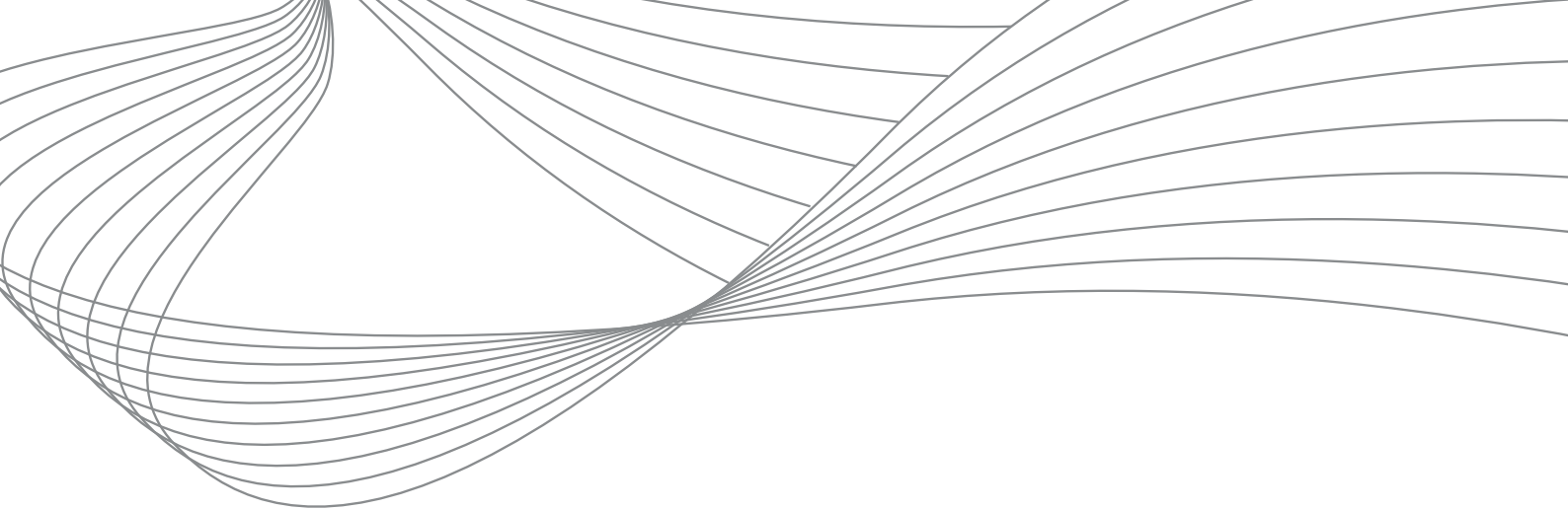
Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!

Krka kot mednarodno farmacevtsko podjetje deluje v zelo dinamičnem svetu. Lahko rečemo, da smo Krkini raziskovalci lahko srečni, da smo izpostavljeni vsakodnevnim spremembah, novim priložnostim, a tudi nepričakovanim oviram. To nas je utrdilo v prepričanju, da so tako priložnosti kot ovire na poti do rezultatov neizčrpen vir motivacije za pospešeno učenje. Na naše izdelke čaka milijone bolnikov, mnogim smo že pomagali, še številnejšim si želimo. Zato napredek znanosti in tehnologije na eni strani in zelo dinamično dogajanje v svetu na drugi zahtevajo od nas veliko prilagodljivosti, dela in pridobivanja novega znanja. Razvojno in raziskovalno delo zato že dolgo ni več zaprto v kreativno neurejene laboratorije in tihe čitalnice s knjigami bogatih knjižnic.

Tudi vi, raziskovalci, ki svojo pot šele začenjate, delate v svetu, ki ni nič manj dinamičen. Upam se reči, da so razlike med akademskim in gospodarskim okoljem v marsičem manjše, kot so bile pred leti.

K temu sta v veliki meri pripomogla zlasti razcvet komunikacijskih tehnologij in globalni oder, na katerem nastopamo. A povezava med poloma razvojnega in raziskovalnega dela je kot vedno naloga vseh in Krkine nagrade so majhen, a pomemben korak na poti k skupnemu uspehu. Oceno našega dela pa bodo dali tisti, ki na rezultate čakajo: bolniki in vsi, ki želijo živeti zdravo. Razvoj novih izdelkov in tehnologij je zanje in za nas nujen. Na tej poti bomo vztrajali, enako želimo tudi vam.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad



Dear Prize winners,

Krka as an international pharmaceutical company operates in a very dynamic business environment. We can say that we, Krka researchers, can consider ourselves lucky to be subject to daily changes, as they do not only open up new opportunities but also pose unexpected obstacles. This has strengthened our belief that both, opportunities and obstacles, are an inexhaustible source of motivation for rapid and effective learning on our road to success. Millions of patients are waiting for our products. We have already helped many of them but we wish to help many more. The progress in science and technology on the one hand and the highly dynamic global circumstances on the other require great flexibility and hard work, as well as acquisition of new knowledge. We have, therefore, abandoned already long ago the limitations of our research and development to working in isolated laboratories, governed by creative disorder, or to quiet well-stocked study rooms.

You, young researchers, who are at the beginning of your career, work in no less dynamic world. I dare say that the differences between the academic and economic environments have in many aspects become much smaller than they used to be some years ago. To a great extent, this has been caused by a big boost in the communication technologies and the circumstances on the 'global stage' we are also a part of. However, connecting both spheres of the research and development work is always a common effort, with Krka Prizes being a small though an important step that contributes to our success. But our work will finally be assessed by those waiting for the results: patients and all who wish to live a healthy life. For them, the development of new products and technologies is of vital importance. We are determined to persist in following this road and wish you would do the same.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2018 | KRKA PRIZE WINNERS 2018

VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Kaja Rožman	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Stanislav Gobec Matej Sova	2692
Gabrijela Horvat	<i>doktorica znanosti s področja kemijske tehnike</i>	Željko Knez Zoran Novak	2693
Špela Alič	<i>doktorica znanosti s področja biotehnologije</i>	Maja Ravnikar Tanja Dreo	2694
Špela Zupančič	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Julijana Kristl	2695
Andrej Emanuel Cotman	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Barbara Mohar Boris Šket	2696

KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Urša Štanfel	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Jurij Svete	2697
Janja Dermol-Černe	<i>doktorica znanosti s področja elektrotehnike</i>	Damijan Miklavčič Gregor Serša	2698
Katja Traven	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Iztok Turel	2699
Anita Klančar	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Robert Roškar Jurij Trontelj	2700

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Ožbej Zupančič	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Andreas Bernkop- -Schnürch	2701
Helena Brodnik Žugelj	<i>doktorica znanosti s področja biomedicine</i>	Bogdan Štefane	2702
Tijana Markovič	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Irena Mlinarič Raščan	2703
Gregor Kravanja	<i>doktor znanosti s področja kemije in kemijske tehnologije</i>	Željko Knez Mojca Škerget Maša Knez Hrnčič	2704
Alen Sevšek	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Roland J. Pieters Nathaniel I. Martin	2705
Jasna Brčić	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Janez Plavec	2706
Tamara Knific	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Tea Lanišnik Rižner	2707
Gregor Ratek	<i>magister farmacije</i>	Rok Dreu	2708
Jernej Štukelj	<i>magister farmacije</i>	Julijana Kristl Sami Svanbäck Jouko Yliruusi	2709
Anžej Hladnik	<i>študent medicine</i>	Metka Lenassi Jana Ferdin	2710
Urška Mohorič	<i>magistrica kemije</i>	Mitja Kolar Frank-Michael Matysik	2711
Nina Ledinek	<i>magistrica inženirka kemijske tehnike</i>	Zoran Novak Matjaž Finšgar	2712
Mateja Mežnar	<i>magistrica industrijske farmacije</i>	Franc Vrečer Darko Uršič	2713
Tilen Volčanšek	<i>magister kemije</i>	Marijan Kočevar	2714

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Veronika Furlan	<i>magistrica kemije</i>	Urban Bren Eva Španinger	2715
Miha Mrzlikar	<i>magister kemije</i>	Helena Prosen Ester Heath	2716
Janja Umnik	<i>magistrica farmacije</i>	Robert Roškar	2717
Gregor Kodrič	<i>magister kemije</i>	Marjan Jereb Jernej Iskra	2718
Ina Kosmač	<i>magistrica farmacije</i>	Alenka Zvonar Pobirk	2719
Kajetana Bevc	<i>univerzitetna diplomirana mikrobiologinja</i>	Maja Čemažar Urška Kamenšek	2720
Uroš Filipič	<i>diplomirani inženir kemijske tehnologije</i>	Maša Knez Hrnčič Gregor Kravanja	2721

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Satja Škobalj Kaja Keglevič	dijakinja dijakinja	Katja Holnthaner Zorec	2722 2723
Patrik Pečavar Nežmah	dijak	Marko Jeran Mateja Erdani Kreft	2724
Ana Babnik Greta Junger	dijakinja dijakinja	Neža Grgurevič Alenka Mozer	2725 2726
Katarina Kokalj	dijakinja	Peter Rodič Ingrid Milošev Valerija Šemrl Kosmač	2727
Maša Predin	dijakinja	Urban Bren Zdenka Keuc	2728
Anja Moškrič Nina Selan	dijakinja dijakinja	Vesna Grgur	2729 2730
Miha Pompe	dijak	Rok Pestotnik Alenka Mozer	2731
David Ribar	dijak	Irena Drofenik	2732
Nuša Avguštinčič Jan van Elteren Jakob Vid Zupančič	dijakinja dijak dijak	Janja Pust Ingrid Falnoga Vid Simon Šelih	2733 2734 2735
Anja Kores	dijakinja	Maja Rupnik Valerija Tkalec Katja Holnthaner Zorec	2736
Mineja Leban	dijakinja	Magdalena Klasinc Aljaž Gaber Berta Košmrlj	2737
Chris Černe Tomaž Gravnar	dijak dijak	Olena Pliekhova Silvana Štucin	2738 2739
Ana Gabrovšek Nika Tašler	dijakinja dijakinja	Marko Jeran Tjaša Klemen	2740 2741

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Nina Pust	<i>dijakinja</i>	Marjetka Podobnik Tomaž Švigelj	2742
Ciril Cerovšek	<i>dijak</i>	Vida Šinkovec	2743
Luka Osredkar	<i>dijak</i>	Andrej Gregori	2744
Gregor Osredkar	<i>dijak</i>		2745
Katjuša Krupenko	<i>dijakinja</i>	Katarina Trontelj	2746
Neža Ribnikar	<i>dijakinja</i>	Andrej Gregori	2747
Kaja Ličef	<i>dijakinja</i>	Alen Šest	2748
Zala Božanić	<i>dijakinja</i>	Mojca Alif	2749
Jana Ušen	<i>dijakinja</i>	Polona Jamnik	2750
Niko Farič	<i>dijak</i>	Mateja Godec Tjaša Kraševac Glaser	2751



Leto 2018 je z vidika odziva na razpis za 48. Krkine nagrade izjemno po kvantitativnih in kvalitativnih parametrih. Mladi raziskovalci, tako dijaki srednjih šol kot študenti vseh treh študijskih stopenj, so prijaviili rekordno število raziskovalnih nalog. Člane Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad nas še posebej veseli, da je bilo veliko nalog zelo kakovostnih tako po aplikativni kot po znanstveni vrednosti. Ocenjevalci in člani Znanstvenega odbora smo imeli prijetno, a težko nalogo med prijavljenimi nalogami z zelo različnih področij izbrati najboljše, ki prejmejo Krkine nagrade.

Letos želim še posebej izpostaviti srednješolske naloge, saj je bil odziv mladih raziskovalcev res izreden. Hkrati je bila zelo dobra tudi kakovost nalog in še posebej kakovost predstavitev nagrajenih nalog. Razveseljivo je, da se je na zemljevid srednjih šol uvrstilo kar nekaj novih šol in da so v vlogi mentorjev in somentorjev sodelovali številni novi učitelji in raziskovalci. To kaže, da se ideja Krkinih nagrad kot izziv in priložnost za dijake in njihove mentorje vse bolj širi in popularizira.

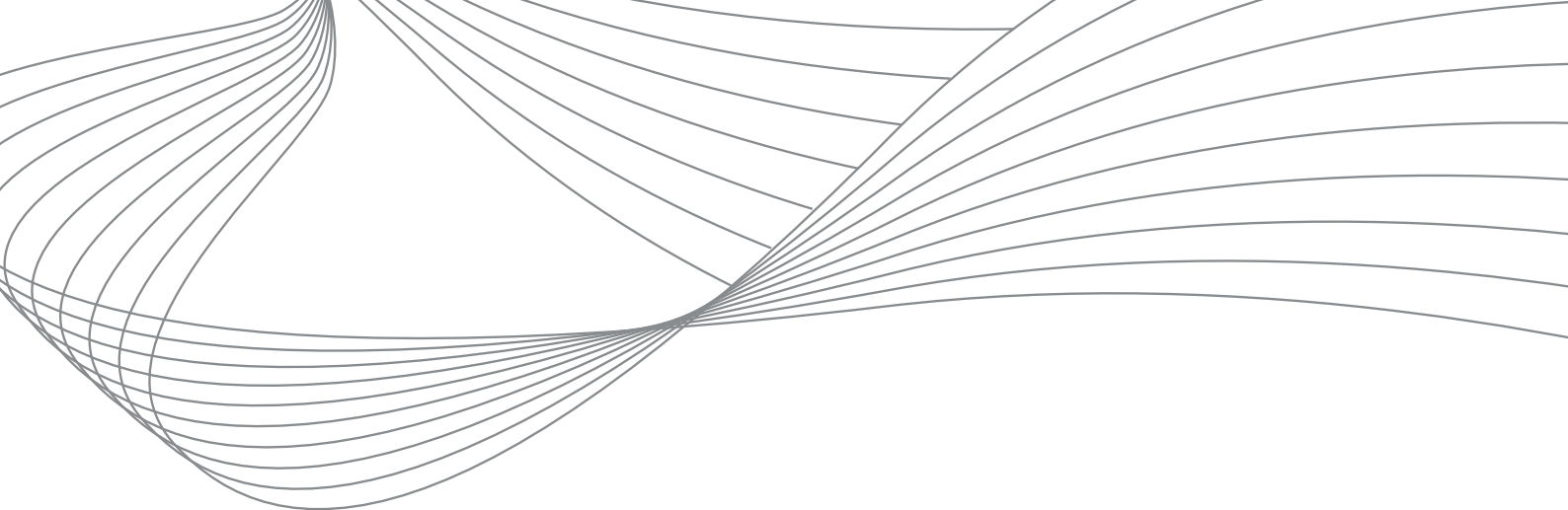
Napredek v številu prijavljenih nalog in v kakovosti je bil letos opazen tudi pri študentskih nalogah. Pri tem je pomembno, da njihova visoka kakovost ni povezana samo z ljubljansko univerzo, ampak so odlične naloge prijaviili tudi študenti z drugih univerz, predvsem mariborske, in z inštitutov, kar dokazuje visoko kakovost raziskav tudi na drugih inštitucijah.

Ob spremljanju vsebinskih in kakovostnih trendov prijavljenih raziskovalnih nalog želim raziskovalce in njihove mentorje spodbuditi k ohranjanju kritične strokovne distance do podatkov in informacij iz virov, posebej elektronskih, še posebej pa k temu, da poskušajo svoje raziskovalne rezultate čim bolj realno umestiti v stroko oziroma realno ovrednotiti njihov pomen za posamezna strokovna oziroma znanstvena področja.

Vsem dijakom in študentom ter njihovim mentorjem čestitam v svojem imenu in v imenu vseh članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad. Hkrati se jim iskreno zahvaljujem, da so nas, ocenjevalce, obogatili s svojimi idejami in strokovnimi oziroma znanstvenimi rešitvami. Sprejeti izziv – ne glede na to, ali je bilo vaše raziskovalno delo nagrajeno s Krkino nagrado ali ne – naj vam bo, drage mlade raziskovalke in raziskovalci, spodbuda za vaše prihodnje življenjske in strokovne odločitve in usmeritve. Strokovnih in znanstvenih izzivov je še veliko in s tem veliko priložnosti, da si dijaki in študenti postavite osebne cilje onkraj trenutnega »obzorja« in se trudite te zastavljene cilje s predanim delom in srčnostjo tudi uresničiti.

Posebne čestitke seveda namenjam vsem prejemnikom Krkinih nagrad, ki bodo gotovo svetel zgled za prihajajoče generacije mladih raziskovalcev, da jim bodo sledili v postavljanju visokih osebnih ciljev in hoji po neizhjenih raziskovalnih in razvojnih poteh, kar bo omogočilo družbeni in gospodarski napredek.

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



The response to the call for the 48th Krka Prizes makes year 2018 exceptional, both in regard to the number of papers submitted and also in regard to their quality. Young researchers, including secondary school pupils as well as students of all three university degrees, submitted a record number of research papers. The members of the Scientific Committee are particularly pleased that the papers submitted are also distinguished for their high quality, both in their applied as well as scientific value. It was, therefore, a pleasant but difficult task for the assessors and the Scientific Committee to select the best papers from various scientific disciplines to be awarded Krka prizes.

This year, I would like to draw your attention to the research papers submitted by secondary school pupils. Their response was truly remarkable. We were greatly impressed by the quality of their research papers and especially by the quality of their presentations. We are also pleased to note that several new secondary schools joined in and responded to our call for papers, and that a large number of new teachers and researchers were engaged as supervisors or co-supervisors. This shows that the idea of Krka Prizes has risen to a challenge and opportunity for students and their supervisors, and is becoming increasingly popular.

This same progress, evident from the number of papers submitted and from their quality, can also be noted in the research papers submitted by students. In that regard, it is important to note that the high quality of research papers submitted by students is not exclusive to the University of Ljubljana, but that students attending other universities, especially those from the University of Maribor as well as from other institutes, also submitted excellent research papers, which proves the high quality of research work also at other institutions.

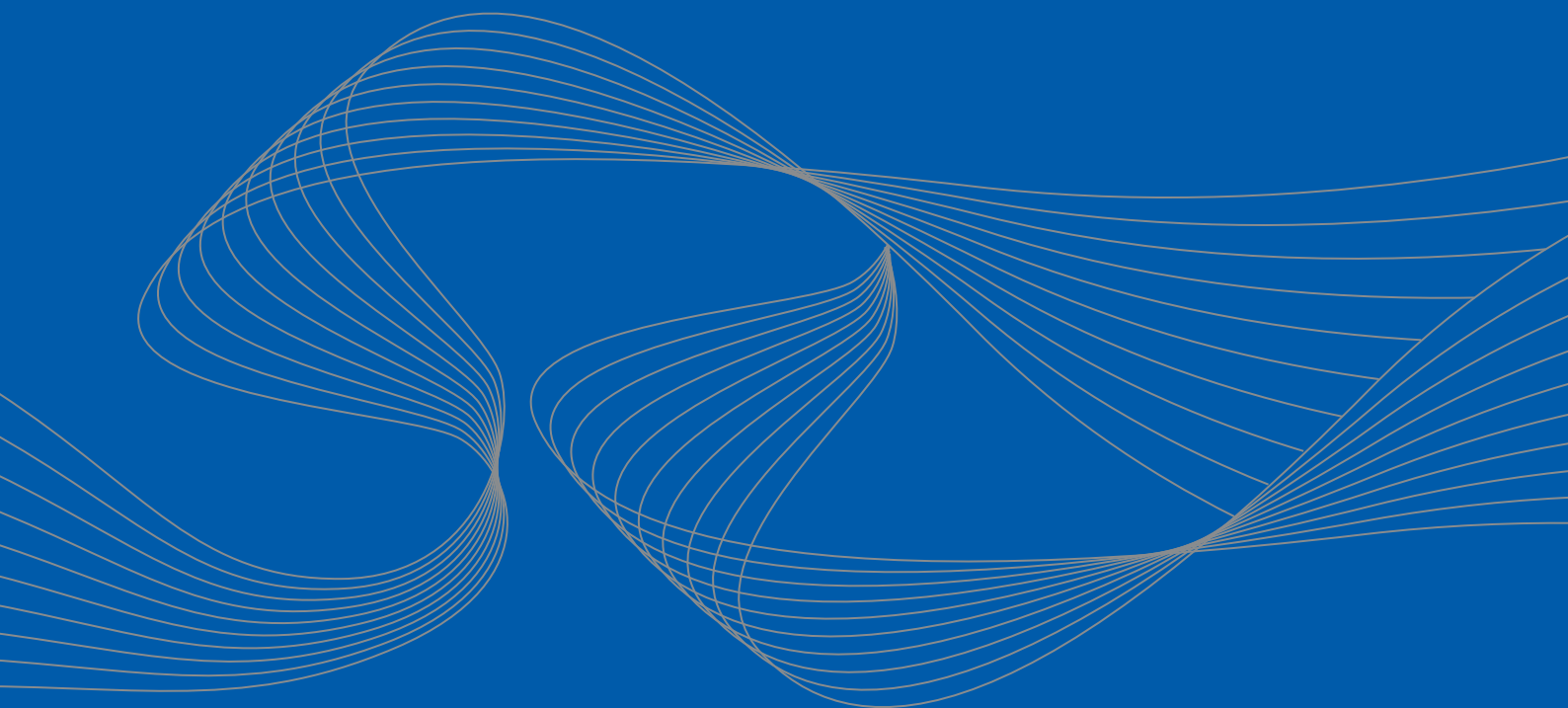
Considering the trends that can be seen in the content and quality of research papers submitted for Krka Prizes, I would like to encourage young researchers and their supervisors to approach the information obtained from various sources, in particular electronic ones, critically, to try to position them as realistically as possible in a relevant discipline, and properly assess their value for individual scientific areas or other areas of expertise.

On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf, I would like to thank all pupils and students for taking on the challenge of Krka Prizes and for broadening our horizons with their new ideas and scientific solutions. The challenge you took on, whether your research paper was awarded the Krka Prize or not, should be an incentive for the decisions and directions you will take in your private and professional lives. There are many expert and scientific challenges still ahead just waiting for you to take them on. I am sure you are bound and determined to set goals that reach beyond what is deemed possible today and that you will try to achieve them with your boldness and dedication.

But, of course, my special congratulations go to all recipients of Krka Prizes. They will be an inspiration to the future generations of young researchers for setting high personal goals when taking untrodden paths in the field of research and development, thus contributing to the social and economic progress.

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

48.



Velike Krkine nagrade za raziskovalno nalogo
Krka Grand Prizes for Research

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners



Dr. KAJA ROŽMAN

*Nenavadne ideje
prinesejo najbolj
zanimive rezultate*

Celjanko Kajo Rožman so zdravstvene teme začele zanimati že v osnovi šoli, saj je bila njena otroška želja postati veterinar. Kot gimnazijka je spoznala, da je farmacevt lahko veliko več kot le prodajalec zdravil, zato je svojo pozornost usmerila k doseganju novega cilja, študiju na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Najprej je uspešno končala program magistrskega študija, nato pa še doktorski študij Biomedicine. Zdaj svoje znanstveno delo na področju protibakterijskih učinkovin za zdravljenje tuberkuloze nadaljuje na podoktorskem študiju na Univerzi v Minnesoti v Združenih državah Amerike.

Moje raziskovalno delo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani se je začelo s spoznavanjem načrtovanja učinkovin s protivnetnim delovanjem, a se je hitro preusmerilo na področje protibakterijskih učinkovin, saj sem imela veliko željo po virtualnem načrtovanju učinkovin in biološkem vrednotenju novih zaviralcev. Na tem področju smo s skupinskim delom precej nadgradili tako študije in silico kot *in vitro*.

Osnovno sporočilo moje doktorske naloge je ozaveščanje javnosti o problematiki odpornosti bakterij proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam, hkrati pa je dober prikaz potrebe po načrtovanju novih učinkovin s tem delovanjem. Rezultati naloge kažejo, da lahko na osnovi strukturno podprtega načrtovanja in biološkega vrednotenja kemijskih knjižnic spojin pridobimo nove zaviralce biosinteze peptidoglikana in mikolnih kislin. Pri tem govorimo o eni izmed ključnih tarč v razvoju protibakterijskih učinkovin, tj. za bakterijo esencialnih encimih. Njihovo zaviranje onemogoči nastanek celične stene bakterije in povzroči njeno smrt. Verjamem, da bodo računalniški programi in encimski testi, ki smo jih razvili v okviru naloge, omogočili učinkovitejši razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovanju me navdihuje želja po osebnem napredovanju in tudi širjenju znanja o farmaciji in kemiji med vse ljudi, ki sta jim ti dve vedi tuji. Najboljše ideje se mi porodijo v pogovoru z drugimi raziskovalci ali s sodelavci, največkrat pa takrat, ko se popolnoma odklopim od dela. To je pogosto med telovadbo, potikanjem v naravi ali pa ob druženju s prijatelji.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Vloga mentorja prof. dr. Stanislava Gobca in somentorja doc. dr. Mateja Sove je bila v mojem primeru pomembna pri usmerjanju celotne raziskovalne naloge. Nista le prepoznala mojih dobrih idej, temveč tudi možne težave do cilja. Njuna ključna vloga je bila tudi pri vzpostavljanju stikov z drugimi strokovnjaki, saj mi je sodelovanje z njimi omogočilo lažje in hitrejšo delo ter prispevalo k vsebinski vrednosti naloge. Pridobila

sem veliko izkušenj z delom v tujini in spoznala nove metode raziskovanja.

DODANA VREDNOST KRKINIH NAGRAD

Sodelovanje med akademskim svetom in industrijo je ključno za nadaljnji razvoj farmacije, zato Krkine nagrade ocenjujem kot izjemno pozitivne. Med mladimi spodbujajo ustvarjalnost in željo po raziskovanju, saj želimo številni ob koncu študija pokazati kar najbolj inovativno delo. V izjemno čast mi je, da sem prejemnica Krkine nagrade, saj potrjuje, da je moje delo kakovostno in ga bo kot takega spoznala širša javnost.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Zasebno in poklicno življenje skušam čim bolj ločevati. Ko sem na delu, se posvečam raziskovanju, ko potrebujem oddih, ne mislim na delo. Tako sem se med doktorskim študijem v Ljubljani v prostem času veliko družila s prijatelji ali se posvečala športu, vikende pa preživljala v domačem Celju. Tudi potovanja po svetu me miselno spočijejo in mi vsakič znova dajo nov zagon za delo.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Moja najboljša lastnost je zanesljivost. Ker sem zelo komunikativna, družabna in sočutna, se dobro znajdem tudi v skupini in rada prevzamem vodilno vlogo. Hitro se učim. Ko nastopi težava, nikoli ne obupam – ohranim trezno glavo in se premišljeno odzovem.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Upajte si! Raziskovanje je nepredvidljivo in včasih najbolj nenavadne ideje prinesejo najbolj zanimive rezultate. Naj vas neuspešni poskusi ne potrejo, temveč spodbudijo, da boste postali še močnejši in pametnejši. In ne pozabite na zasebno življenje in aktivnosti, ki vas napolnijo z energijo.

Najboljši nasvet

Ko nastopi težava, globoko zadihaj in jo premišljeno reši.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Ni pomembno, kolikokrat padeš, pomembno je, kolikokrat se postaviš nazaj na noge.

Strukturno podprto načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih zaviralcev biosinteze peptidoglikana

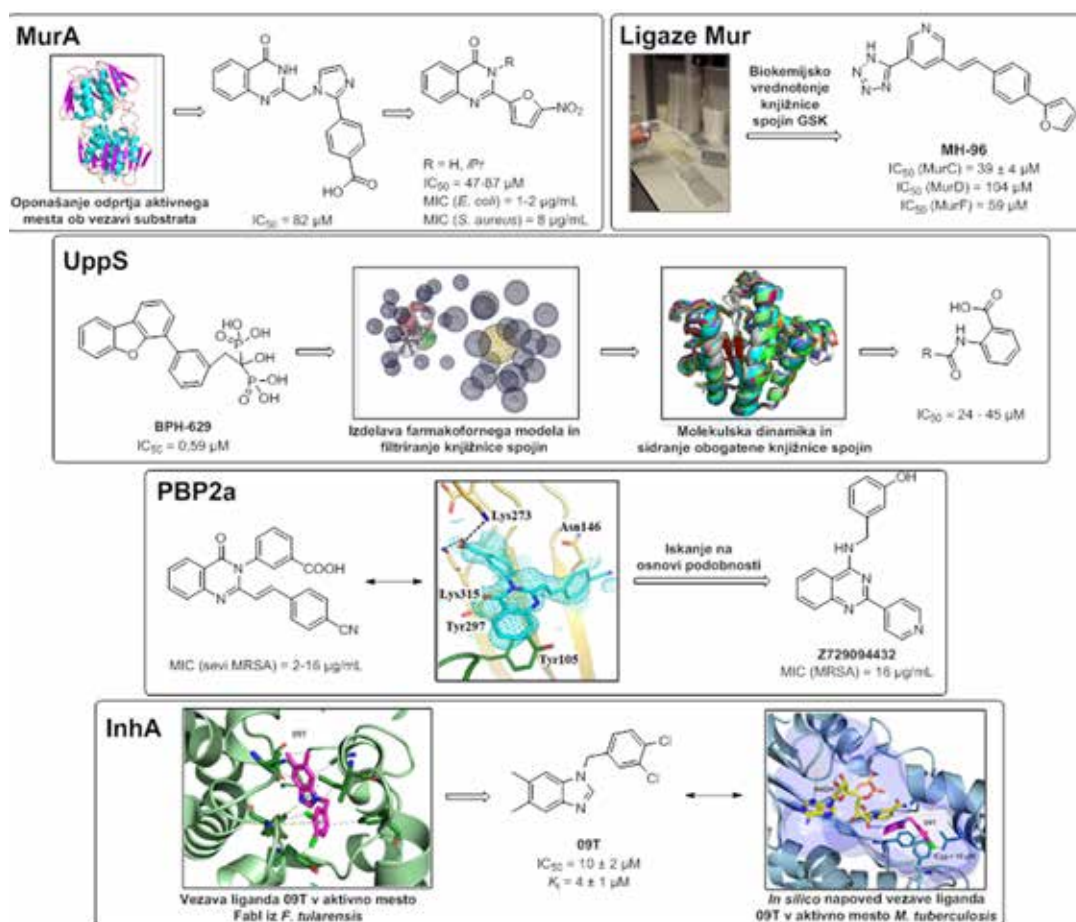
KAJA ROŽMAN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Stanislav Gobec**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Matej Sova**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Zdravljenje bakterijskih okužb postaja zaradi porasta števila odpornih bakterijskih sevov vse večji klinični problem. Velik delež razvoja protibakterijskih učinkovin se je v zadnjih letih prenesel v akademske in druge raziskovalne ustanove. Za eno najpomembnejših tarč pri razvoju protibakterijskih učinkovin velja bakterijska celična stena. Ta je v večji meri zgrajena iz peptidoglikana, sestavljenega iz ponavljajočih se amino sladkornih enot, ki so med sabo prečno povezane s peptidnim mostom. Biosinteza peptidoglikana poteka tako znotraj kot zunaj celične membrane, v tem procesu pa so udeleženi številni encimi, ki so potencialne tarče za razvoj protibakterijskih učinkovin. Glavni prednosti takih učinkovin sta selektivna toksičnost in specifičnost. Posebnost mikobakterijske celične stene je debela plast mikolil-arabinogalakšana v kompleksu s peptidoglikanom, ki je preprejena s prostimi lipidi in številnimi proteini. Kompleksnost take celične stene predstavlja največjo oviro in hkrati izziv v razvoju novih učinkovin za zdravljenje tuberkuloze. V doktorskem delu predstavljamo načrtovanje zaviralcev encimov Mur, UppS in PBP2a, ki sodelujejo pri biosintezi peptidoglikana bodisi v citoplazemskih ali končnih modifikacijskih stopnjah (Slika 1). Posvetili smo se tudi razvoju zaviralcev encima InhA, vpletenega v sintezo mikolnih kislin, ki predstavljajo pomemben del celične stene mikobakterij (Slika 1). Encimi Mur v citoplazmi bakterijske celice katalizirajo nastanek UDP-*N*-acetilmuramoil pentapeptida, prekursorja peptidoglikanske verige. Z uporabo spletnega strežnika ProBiS-CHARMMing smo simulirali proces inducirane prilagoditve encima MurA iz bakterije *Escherichia coli* ob vezavi liganda TAV iz kristalne strukture encima MurA iz bakterije *Enterobacter cloacae*. Tako smo povzročili odprtje in povečanje aktivnega mesta encima, ki smo ga uspešno uporabili kot osnovo virtualnega reševanja filtrirane knjižnice spojin «ZINC Drugs Now». Pridobili smo tri spojine, in sicer derivate dikarboksilne kisline, kinazolinona ter pirolopiridina, ki so *in vitro* zavirali encim MurA iz *E. coli* v mikromolarnem območju (v istem zaporedju, IC_{50} = 1 μ M, 82 μ M in 109 μ M). Sintetizirali smo večjo serijo derivatov kinazolinonskega tipa. Z odstranitvijo metilenskega distančnika na mestu 2 med obema dušikoma kinazolinona ter sočasno vpeljavo 5-nitrofurnilne skupine na to mesto smo poleg zaviralnega delovanja na MurA pridobili še dobro protibakterijsko delovanje na seva *E. coli* in *Staphylococcus aureus*. Spojina 2-(5-nitro-furan-2-il)-3*H*-kinazolin-4-on (IC_{50} = 47 μ M, MIC = 1–8 μ g/mL) in njen 3-izopropilni derivat (IC_{50} = 87 μ M, MIC = 2–8 μ g/mL) predstavljata dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo zaviralcev MurA pri razvoju protibakterijskih učinkovin. V nadaljevanju smo z reševanjem knjižnice kinaznih zaviralcev podjetja GlaxoSmithKline na ligazah Mur prišli do 5 različnih strukturnih razredov zaviralcev. Vse zadetke smo najprej ponovno sintetizirali in tako potrdili njihovo strukturo. Z biokemijskimi testi smo potrdili zaviralno delovanje stilbenskega derivata MH-96 in mu določili mikromolarno območje delovanja na encimih MurC, MurD in MuF (IC_{50} = 39–104 μ M) ter z metodo STD-NMR potrdili tudi vezavo na encim MurD. Spojina tako predstavlja obetavno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj protibakterijskih učinkovin. Sintaza UppS sodeluje pri nastanku lipida II v citoplazmi bakterijske celice, tako da katalizira nastanek undekaprenil pirofosfata. Mehanizem delovanja in zaviranje encima sta še precej neraziskana, kljub temu da je za bakterijo esencialen encim. Na osnovi trenutno najbolj odmevnih bisfosfonatnih zaviralcev UppS, natančneje bisfosfonata BPH-629, smo zasnovali *in silico* farmakoforni model, ki nam je služil kot filter za presejanje večmilijonske knjižnice spojin. Vzporedno s pripravo knjižnice smo ob upoštevanju pomembnosti dveh vezavnih mest, pri čemer mesto 1 sovпада z vezavnim mestom substrata farnezil pirofosfata, protein oblikovali tako, da je postal primeren za sidranje spojin. Z biokemijskim vrednotenjem smo nato dokazali zaviralno delovanje treh derivatov antranilne kisline v mikromolarnem območju (IC_{50} = 24–45 μ M). Spojine s kisliniskim delom oponašajo pirofosfatni del substratov, zato predpostavljamo, da gre za kompetitiven mehanizem zaviranja encima UppS. Kljub pomanjkanju protibakterijskega

delovanja pa so spojine zanimive za nadaljnji razvoj, ki naj bi prinesel izboljšanje prehajanja celične membrane bakterij. Transpeptidaza PBP2a je odgovorna za prečno premreženje peptidoglikanskih verig v zaključnih stopnjah sinteze celične stene bakterij. Specifično zaviranje PBP2a je v literaturi omenjeno kot ključno v razvoju ozkospektralnega antibiotika, saj je encim značilno izražen v proti meticilinu odpornem bakterijskem sev (MRSA) kot mehanizem obrambe pred učinki penicilinov. Kot izhodišče iskanja novih zaviralcev smo vzeli kinazolinonski derivat, ki po kristalografskih podatkih za svoje zaviralno delovanje, podobno kot učinkovina ceftarolin, izkorišča vezavo v alosterično mesto PBP2a. Pripravili smo knjižnico spojin na osnovi podobnosti z omenjenim kinazolinonskim zaviralcem in spojine sidrali v alosterično mesto encima. Z biokemijskimi testi smo dokazali vezavo in zaviralno delovanje trem spojinam. Med temi je najboljši kinazolinonski derivat Z729094432 zaviral encim pri koncentraciji 100 μM , hkrati je deloval zaviralno na rast MRSA (MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$), ne pa tudi na neodporni sev *S. aureus* (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$), kar priča o vzročni povezavi med zaviranjem encima in protibakterijskim delovanjem. Odkriti strukturno različni zaviralci PBP2a s protibakterijskim delovanjem predstavljajo izjemno obetajočo osnovo za razvoj protibakterijskih učinkovin. Reduktaza enoil acil prenašalnega proteina InhA je pomembna tarča pri razvoju učinkovin za zdravljenje tuberkuloze. Nove zaviralce encima smo načrtovali s pomočjo vtičnika ProBiS, s katerim smo iskali ligande iz proteinske baze PDB, ki se vežejo na aktivna mesta encimov s podobno strukturo, kot jo ima InhA. Najbolje ocenjenih 8 ligandov iz baze PDB smo naročili in jih biokemijsko ovrednotili. Najboljši spojin, ligandu 09T, smo določili mešani tip zaviranja z določeno K_i -vrednostjo $4 \pm 1 \mu\text{M}$. Čeprav je spojina šibkejši zaviralec od izhodiščnih molekul, pa zaradi precej majhne molekulske mase lahko služi kot dober fragment za nadaljnjo optimizacijo.



Slika 1. Povzetek razvoja zaviralcev encimov Mur, UppS, PBP2a in InhA.

Structure-Based Design, Synthesis and Evaluation of New Inhibitors of Peptidoglycan Biosynthesis

KAJA ROŽMAN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Stanislav Gobec**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Matej Sova**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Treatment of bacterial infections is becoming a pressing clinical problem due to the increasing number of resistant bacterial strains. In recent years, a large part of the antibacterial agent development has been transferred to the academia and other research institutions. One of the most important targets in the antibacterial agent development is the bacterial cell wall, which is composed largely of peptidoglycan, consisting of repeated amino sugar units that are cross-linked to another peptidoglycan chain through a peptide bridge. The biosynthesis of peptidoglycan occurs on both sides of the cell membrane and involves many enzymes, representing potential targets for the development of antibacterial agents. The main advantages of these agents are selective toxicity and specificity. The mycobacterial cell wall consists of a thick layer of mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex, which is interspersed with free lipids and numerous proteins. The complexity of the cell wall therefore represents the biggest obstacle and also a challenge in the development of new agents for the treatment of tuberculosis. In this doctoral thesis, we present the design of novel inhibitors of Mur enzymes, UppS and PPB2a, which participate in either cytoplasmic or final modification stages of the peptidoglycan biosynthesis (Figure 1). We also focused our efforts on developing inhibitors of InhA, which is involved in the synthesis of mycolic acids that represent a significant proportion of mycobacteria cell wall (Figure 1). The cytoplasmic Mur enzymes catalyse the formation of UDP-*N*-acetylmuramoyl-pentapeptide, the soluble precursor of the peptidoglycan chain. The ProBiS-CHARMMing web server was used to simulate the induced-fit effect of MurA from *E. coli* upon binding the TAV ligand from the crystal structure of the MurA from *E. cloacae*. This led to the opening and enlargement of the enzyme active site, which was successfully used for the docking of the filtered 'ZINC Drugs Now' compound library. Three hit compounds were obtained: dicarboxylic acid, quinazolinone and pyrrolopyridine, which *in vitro* inhibited MurA from *E. coli* in micromolar concentrations (IC_{50} = 1 μ M, 82 μ M, and 109 μ M, respectively). A large series of quinazolinone derivatives were synthesised. The removal of the methylene bridge at site 2 between the two quinazolinone nitrogens and the simultaneous introduction of the 5-nitrofuranyl group to this site not only improved the inhibitory potency against MurA but also promoted antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. The 2-(5-nitro-furan-2-yl)-3H-quinazolin-4-one (IC_{50} = 47 μ M, MIC = 1–8 μ g/mL) and its 3-isopropyl derivative (IC_{50} = 87 μ M, MIC = 2–8 μ g/mL) are considered a good starting point for further optimisation of MurA inhibitors in the development of antibacterials. Further, during the screening of GlaxoSmithKline focused library of kinase inhibitors on Mur ligases, five different structural classes of inhibitors were discovered and then re-synthesised. The inhibitory potency of styrene derivative MH-96 against MurC, MurD and MuF enzymes (IC_{50} = 39–104 μ M) was confirmed using biochemical assays. In addition, the binding of this compound to MurD was confirmed using the STD-NMR. This compound thus represents a promising starting point for further optimisation. UppS synthase is involved in the formation of lipid II in the cytoplasm of the bacteria by catalysing the formation of UPP. Although the enzyme is a validated antibacterial drug discovery target, mechanisms of action and inhibition of the enzyme are still fairly unexplored. Based on the currently most promising bisphosphonate inhibitors of UppS, more specifically BPH-629, an *in silico* pharmacophore model was designed and used to filter a library of several million compounds. Simultaneously with the library preparation, the protein construction was carried out by taking into account the importance of the two binding sites, among which site 1 coincides with the binding site of the farnesyl pyrophosphate substrate. The biochemical evaluation further demonstrated the inhibitory potency of three benzoic acid derivatives in the micromolar range (IC_{50} = 24–45 μ M). Carboxylic groups of the compounds mimic the pyrophosphate moiety of the substrates, therefore, a competitive mechanism of UppS inhibition was assumed. Despite the lack of antibacterial activity, these compounds provide a good basis for further optimisation.

Transpeptidase PBP2a is responsible for peptidoglycan cross-linking in the final stages of bacterial cell wall synthesis. Specific inhibition of PBP2a is crucial in the development of narrow-spectrum antibiotics, since the enzyme is typically expressed in methicillin-resistant bacterial strain (MRSA) as a mechanism of defence against the effects of penicillins. Similarity search was performed based on previously mentioned quinazolinone, which according to crystallographic data utilises the binding to the allosteric site of PBP2a as a mechanism of inhibition, similarly to a known drug ceftarolin. Further on, the pre-filtered compound library was docked in the allosteric site of the enzyme. Biochemical assays demonstrated the binding and inhibitory potencies of three hit compounds. Among these, quinazoline derivative Z729094432 inhibited PBP2a at 100 μM , while showing antibacterial activity against MRSA (MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$), but not against *S. aureus* (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$), indicating a possible link between enzymatic inhibition and antibacterial activity. The discovery of PBP2a inhibitors with distinctive chemical structures supported by antibacterial activities presents a promising starting point for further development of antibacterials. The enoyl acyl carrier protein reductase InhA is an important target in the development of active substances for the treatment of tuberculosis. The new inhibitors were designed with the ProBiS plugin, which collects ligands from active sites of all enzymes whose structure resembles the structure of InhA. Eight top-scoring ligands from the PDB database were purchased and biochemically evaluated. For the most potent compound, the ligand 09T, a mixed type of inhibition with a given K_i value of $4 \pm 1 \mu\text{M}$ was determined. Although the compound is a less potent inhibitor than query compounds, it can serve as a good fragment for further optimisation due to its relatively small molecular weight.

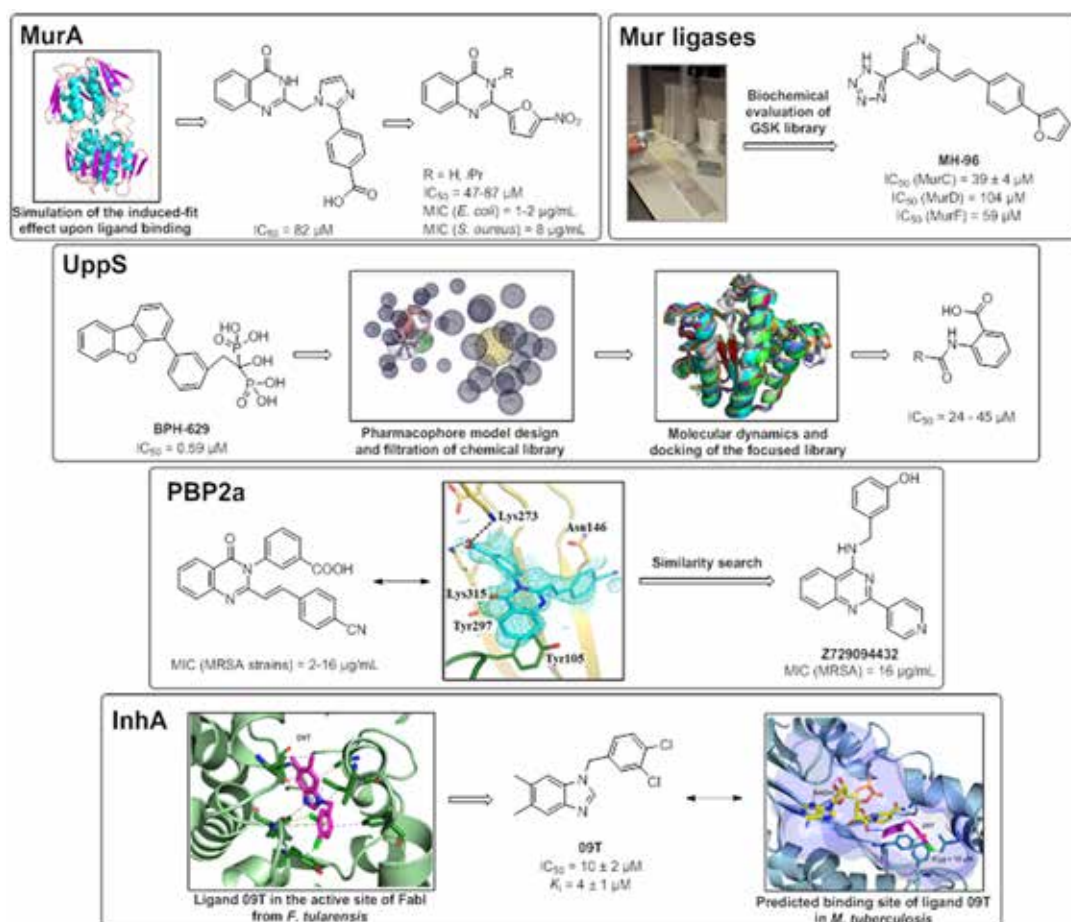


Figure 1: A summary of the development of the Mur, UppS, PBP2a and InhA enzyme inhibitors.



Dr. **GABRIJELA
HORVAT**

*Navdihuje me neznano,
še neodkrito*

Gabrijelo Horvat iz Srednje Bistrice v Prekmurju raziskovalno delo, povezano zlasti s kemijskimi poskusi, navdihuje že od otroštva. Prvih tekmovanj iz kemije se je začela udeleževati v osnovi šoli, zelo pomembno vlogo na njeni profesionalni poti pa je imela profesorica kemije na Gimnaziji Franca Miklošiča Ljutomer. Njena predanost pri poučevanju je Gabrijelo le še dodatno prepričala za študij kemijske tehnologije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru. Z neomajno vztrajnostjo je najprej diplomirala na področju aerogelov, nato pa svoj znanstveni potencial potrdila še z doktorsko nalogo, v kateri je razvila novo metodo za pripravo polisaharidnih aerogelov. Danes je kot raziskovalka zaposlena na fakulteti, kjer je novo strast našla v laboratoriju.

V doktorski nalogi sem skupaj s sodelavci razvila novo metodo za pripravo polisaharidnih aerogelov*. S to metodo je njihova priprava hitrejša in preprostejša, porabimo manj organskih topil, druge kemikalije razen alkohola (etanola) pa niso potrebne. Nova metoda je izjemna zato, ker lahko v procesu geliranja v material hkrati dodamo v vodi slabo topne ali dobro topne učinkovine. Razvili smo tudi polisaharidno aerogelno prevleko na medicinskem jeklu, v katero smo dodali zdravilno učinkovino. Končni material je potencialni kolčni implantat, ki vsebuje zdravilno učinkovino. Ta se iz implantata začne lokalno sproščati takoj po vsaditvi. S tem bi lahko občutno zmanjšali pooperativno intravensko odmerjanje zdravil. Veseli me, da so celični testi pokazali izjemen potencial teh materialov za nadaljnje raziskave oziroma klinične študije.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu me navdihuje neznano, še neodkrito. Rada sem v laboratoriju in eksperimentiram, preizkušam nove metode, nove ideje. Ko nastane kaj res obetavnega, je to še toliko večji zagon za naprej. Nove ideje se mi porodijo tudi ob prebiranju znanstvenih člankov, ki niso nujno z mojega področja, ali pa čisto spontano, večkrat pred spanjem. Je pa res, da je tudi vztrajnost tista, ki pripomore, da sem osredotočena na doseganje rezultatov, in zaradi katere sem uspešno dokončala tudi doktorski študij. Namreč, ko kakšen poskus ni in ni deloval, nikoli nisem obupala. Poskušala sem znova in znova in na koncu se je izplačalo.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Tudi mnenja in usmeritve sodelavcev so bile zelo dobrodošle. Predvsem svojemu mentorju dr. Željku Knezu sem zelo hvaležna, da mi je zaupal, še preden sem začela raziskovati, in mi ob največjih dvomih razumno svetoval. Posebna zahvala gre somentorju prof. dr. Zoranu Novaku, ki mi je bil vedno na voljo in je znal odgovoriti na mnoga, meni neresljiva vprašanja, ter me spodbujal k udeležanju novih idej.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade vidim kot elitne nagrade, predvsem na področju naravoslovja. Zagotovo so ena od glavnih

referenc v življenjepis vsakega mladega znanstvenika. Gre pa tudi za izjemno priložnost, da lahko svoje raziskovalno delo pokažemo širši javnosti. Nagrada, za katero sem Krki izjemno hvaležna, je tudi velika spodbuda za moje raziskovalno delo v prihodnje, saj so bili rezultati doktorske naloge prepoznani kot kakovostni in vredni nadaljnjega dela in truda.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Med doktorskim študijem sem vedno ostajala v službi dlje, delala pa sem tudi ob koncih tedna. Rezultati so bili tisti, ki so me vlekli naprej. Pri tem me je vsekoli srčno podpiral moj mož, s katerim sva ob koncu mojega študija dobila otroka. Prosti čas zdaj namenim zlasti družini, nekaj časa mi vzame tudi pot v službo, saj se v Maribor vozim iz Prekmurja. Toda v bližini so babice, zato si lahko privoščim, da v laboratoriju ostanem tudi dlje kot le osem ur.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Zavedam se, da smo ljudje različni, zato skušam delovati v skladu z mislijo živi in pusti živeti. Sodelavci pravijo, da sem pri delu stroga, sama pa bi prej dejala, da sem trmasta. Verjamem namreč, da se lahko z vztrajnim delom veliko doseže. Sicer pa me osrečujejo malenkosti, zato sem ob koncu dneva nasmejana in srečna.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Nikoli ne obupajte, pa naj se zdi še tako nesmiselno. Če vas raziskovanje resnično osrečuje, je vredno in se na koncu splača. Zato preizkušajte nove stvari, iščite nove poti, svoje znanje in moč pa vedno usmerite v iskanje pravega odgovora. Bodite edinstveni.

Najboljši nasvet

Trdo delaj za tisto, kar te osrečuje, a vmes si ne pozabi vzeti časa tudi zase.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Dvom pokonča več sanj, kot bi jih neuspeh lahko kadarkoli.

* Aerogel je material, ki se uporablja kot pomožna snov v zdravilu. Je popolnoma naraven in se v telesu poponoma razgradi. Pripravljen je iz naravnega polisaharida brez dodanih kemikalij. Izjemna lastnost aerogela je, da v telesu nadzorovano sprošča zdravilno učinkovino.

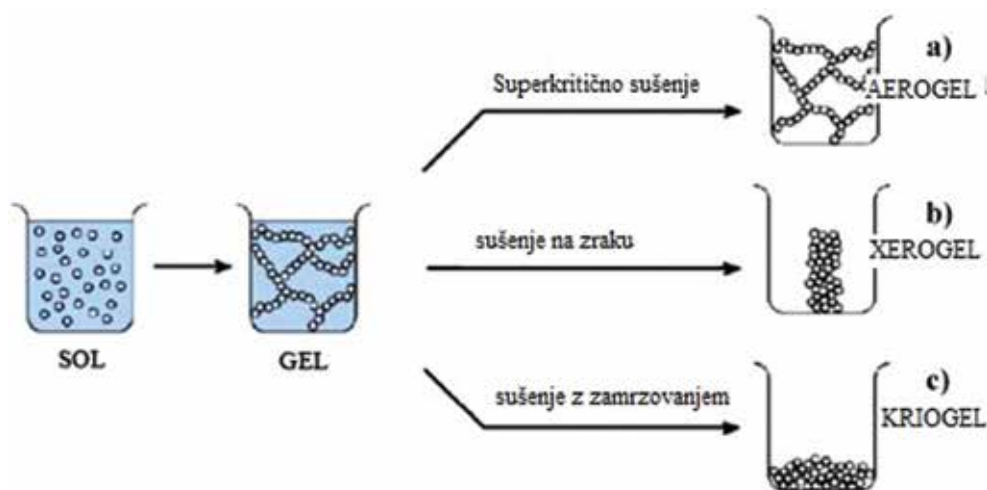
Priprava, karakterizacija in aplikacija polisaharidnih aerogelov

GABRIJELA HORVAT, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

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

Somentor: **Zoran Novak**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Polisaharidi, kot so nizkometilirani pektin (nmP), visokometilirani pektin (vmP), alginat, ksantan in guar, so materiali, ki so predvsem zaradi sposobnosti geliranja izredno zaželeni v farmaciji in prehrabni industriji. Gel je tridimenzionalni material, ki ima v porah tekočino. Mokri gel lahko posušimo s sušenjem na zraku, z zamrzovanjem ali pa s sušenjem s superkritičnimi fluidi, predvsem s CO_2 (Slika 1). Pri slednjem je potrebna samo ena faza sušenja, zaradi česar se struktura materiala ne uniči. Zato imajo aerogeli izjemne lastnosti, npr. visokospecifično površino, visoko poroznost, celo do 99-odstotno, ter izredno nizko gostoto.

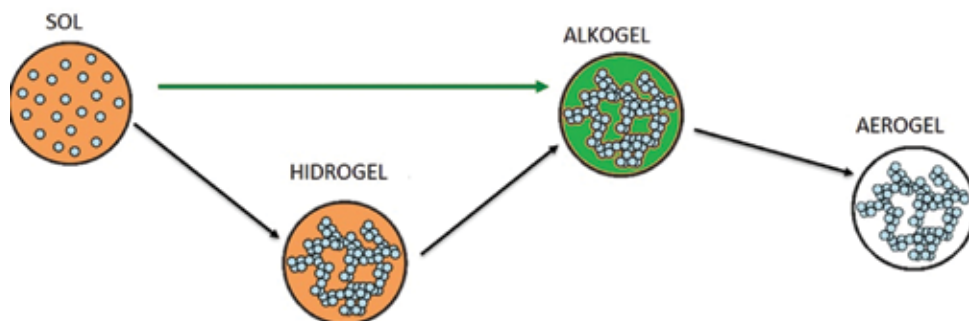


Slika 1. Metode sušenja mokrega gela do aerogela (a), kserogela (b) in kriogela (c).

Tako nizkometilirani pektin kot alginat tvorita gel v prisotnosti bivalentnih ionov, najpogosteje kalcijevih. Ker pa se bivalentni ioni različno vežejo na funkcionalne skupine v teh dveh polisaharidih, je končna struktura gelov drugačna. Zato smo pektinske in alginatne aerogele pripravili s kalcijevimi, cinkovimi in stroncijevimi ioni. Aerogeli, ki so bili zamreženi s cinkom, so imeli najnižjo specifično površino, vendar so sposobni zadržati največ tekočine.

Ker je priprava organskih aerogelov običajno zamudna, hkrati pa se ob tem porabijo velike količine organskega topila, smo razvili novo metodo s krajšim časom priprave (Slika 2). V prisotnosti alkohola se v polisaharidih zaradi hidrofobnih interakcij poveča viskoznost in verige se začnejo povezovati. Na podlagi tega smo sklepali, da je ta model primeren za pripravo polisaharidnih gelov direktno v alkoholu. Da bi zmanjšali porabo organskih topil v procesu dehidracije gela, smo se izognili pripravi hidrogela in pripravili gel z dodatkom alkohola in brez ostalih zamreževalcev in kemikalij. Na ta način smo lahko gele sušili direktno s superkritičnim CO_2 . S to metodo lahko v nosilce enostavno dodamo tako v vodi dobro topne kot slabo topne učinkovine.

Tako pripravljeni aerogeli imajo izredne lastnosti. Med drugim smo pripravili nizkometilirani pektin z največjo specifično površino ($510 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Prvi smo s to metodo pripravili ksantanske in guarjeve aerogele, ki so bili prej pripravljani le kot kompoziti. Pektinski aerogeli so imeli tudi izredno nizko prevodnost, $0,021 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$, kar jih uvršča med superizolatorje.

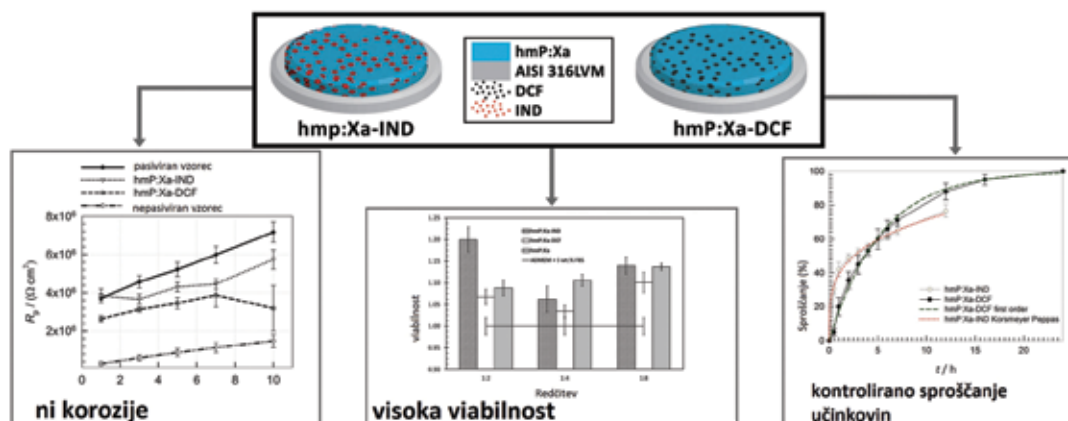


Slika 2. Nova metoda (zelena puščica) za pripravo polisaharidnih aerogelov v primerjavi s konvencionalno metodo (črna puščica).

Polisaharidi so idealni materiali tudi v farmacevtskih aplikacijah, predvsem za razvoj novih dozirnih oblik. Če jih pripravimo v obliki aerogelov, dobimo idealni nosilec zdravilnih učinkovin, saj so ti materiali biorazgradljivi in biokompatibilni. Zaradi visokospecifičnih površin lahko zadržijo večje količine zdravilne učinkovine. Ker so polisaharidni aerogeli občutljivi za pH, lahko z njihovo pripravo simuliramo, kje v telesu se bo aktivna učinkovina sproščala.

Pripravili smo sferične aerogele, zamrežene z različnimi ioni, in preverjali sproščanje aktivne učinkovine diklofenak natrij. Ugotovili smo, da najpogosteje uporabljeni kalcijevi ioni niso primerni za zamreženje pektina in alginata, če želimo doseči kontrolirano sproščanje učinkovine. Diklofenak natrij se je iz takega nosilca sprostil že po 1 h. Z zamreženjem polisaharidov s cinkovimi ioni pa smo dosegli kontrolirano sproščanje diklofenaka natrija. Nifedipin, ki je v vodi slabo topna učinkovina, smo vezali na monolitne aerogele, pripravljene po novi metodi. Primerjali smo sproščanje te učinkovine iz aerogelov, pripravljenih iz pektina, alginata, ksantana in guarja. Ugotovili smo, da ksantanski in guarjevi aerogeli niso najprimernejši nosilci za slabo topno učinkovino, saj se njeno sproščanje podaljša celo do dveh tednov, kar za oralno dostavo zdravil ni ustrezno. Smo pa dosegli hitrejšo sproščanje te slabo topne učinkovine iz alginatnih in pektinskih aerogelov. V prvih 5 urah se je sprostila vsa učinkovina.

Glede na rezultate sproščanja nifedipina smo razvili nov material, in sicer aerogelno prevleko na medicinskem jeklu za potencialne ortopedske aplikacije (Slika 3). Kompozitni aerogel smo pripravili iz viskometiliranega ksantana in pektina. Vanj smo dodali diklofenak natrij ali indometacin ter preverjali njuno sproščanje. Z elektrokemijskimi študijami smo potrdili odpornost materiala proti koroziji. Obe učinkovini sta se iz aerogela sprostili po 24 urah, kar smo pokazali s FT-IR-spektroskopijo ter *in vitro* testi raztapljanja. Celični testi so pokazali, da so vsi vzorci biokompatibilni. Večja sposobnost preživetja celic nakazuje, da imajo ti materiali izredno visok potencial za nadaljnje raziskave in potencialno klinično uporabo.



Slika 3. Kompozitna ksantan-pektinska aerogelna prevleka na medicinskem jeklu za ortopedske aplikacije.

Formation, Characterisation and Application of Polysaccharide Aerogels

GABRIJELA HORVAT, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

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

Co-supervisor: **Zoran Novak**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Low-methoxyl pectin (lmP), high-methoxyl pectin (hmP), alginate, guar and xanthan gum are polysaccharides. Presently, they are used mainly in the food and pharmaceutical industry owing to their gelling and stabilising abilities. They could be used during the sol-gel process to obtain wet gels. A gel consists of a sponge-like, three-dimensional solid network, whose pores are usually filled with a liquid. The most common ways to dry wet gels are evaporative drying, freeze drying, and supercritical drying (Figure 1). Supercritical drying with CO₂ consists of a single phase and does not alter the structure of the material. The liquid-gas interface is circumvented and, therefore, the collapse of the network is prevented. The resulting materials, aerogels, retain most of the structure of the wet gel and possess interesting properties, such as high porosity, large surface area, low thermal and electrical conductivity, and low density.

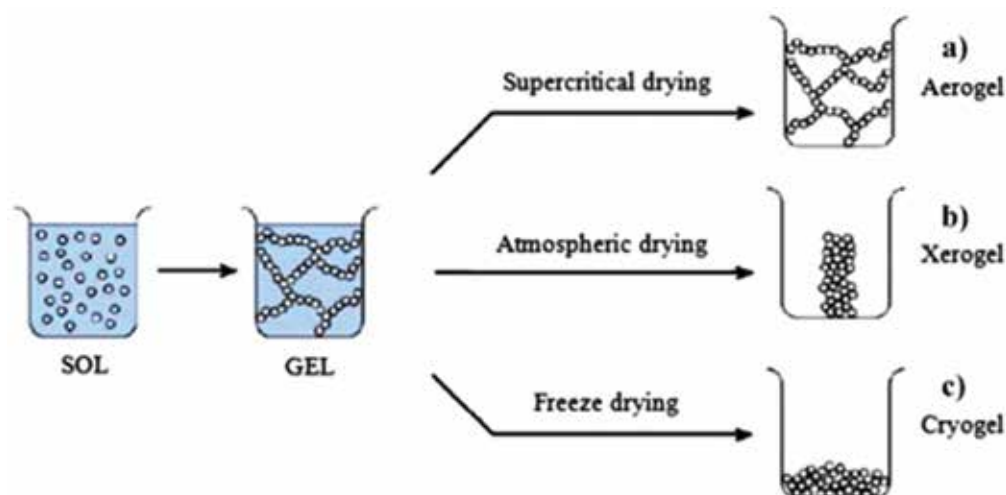


Figure 1. Methods of drying of a wet gel to give an (a) aerogel, (b) xerogel and (c) cryogel.

Both, lmP and alginate can form a gel in the presence of divalent ions. Since all divalent ions bind to different sites of pectin and alginate, zinc, strontium and calcium ions were used for cross-linking and later properties of aerogels were investigated. Zinc cross-linking resulted in lowest surface area of both, lmP and alginate aerogels, but provided highest swelling of those materials.

Conventional aerogel production is time consuming. Owing to the dehydration step, it also consumes a lot of organic solvents. This led us to investigate new possibilities for polysaccharide aerogel production (Figure 2). In order to decrease the consumption of organic solvents, wet gels should be prepared directly in alcohol. Hence, the production of hydrogel is avoided and the resulting alcogels are directly dried with supercritical CO₂. Since hydrophobic interactions in polysaccharides are increased with the addition of alcohol, we investigated the applicability of the model by preparing polysaccharide aerogels in ethanol. The so-prepared aerogels were highly porous and possessed some outstanding properties, namely lmP and hmP monolithic aerogels possessed the highest yet reported surface areas, 510 m²g⁻¹ and 390 m²g⁻¹, respectively. To our knowledge, this is the first known report regarding synthesis and characterisation of the pure xanthan and guar aerogels. Their surface areas were also high, 370 m²g⁻¹ and 110 m²g⁻¹, respectively. Very low thermal conductivity was observed for lmP aerogels, 0.021 Wm⁻¹K⁻¹.

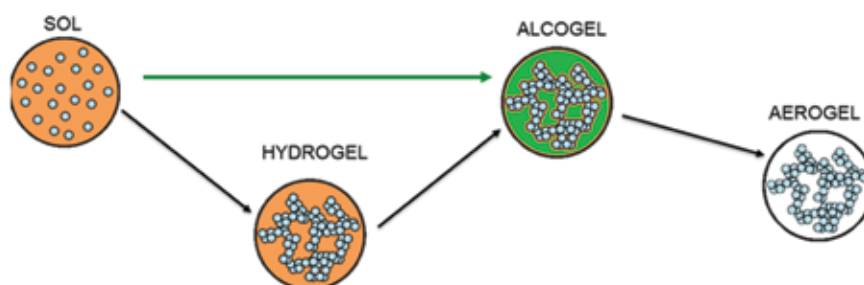


Figure 2. Novel route (green arrow) for the formation of polysaccharide aerogels vs. conventional route (black arrow).

Because of the wide variety and range of physicochemical properties and the possibility of performing a large number of specific modifications, polysaccharides are ideal starting materials for the production of new dosage forms in pharmaceutical industry. In developing the ‘ideal active substance carrier’, bio-based aerogels emerge as a great choice. Polysaccharide aerogels are biodegradable and biocompatible and they are able to retain a large amount of active substance. Nevertheless, pH sensitive polysaccharides are able to deliver the active substance through the stomach to the active site, i.e. the intestines.

The release rate of diclofenac sodium from spherical aerogels, cross-linked with divalent ions, was investigated *in vitro*. Widely used calcium ions are not the best cross-linkers when controlled release is desired, since the release of a model active substance was achieved in only one hour. Oppositely, zinc cross-linking provided a more controlled release of diclofenac sodium. Poorly water-soluble active substance, nifedipine, was incorporated within monolithic aerogels, prepared by the novel method. Its release was compared between all carriers. It was observed that guar and xanthan are not the best candidates for oral delivery of nifedipine, since its release was prolonged to up to 14 days. On the contrary, ImP and alginate are both suitable for nifedipine encapsulation as they released 100% of nifedipine within the first five hours. Higher active substance loading was achieved with ImP aerogels, most likely owing to their higher surface area.

Based on the nifedipine release study, we developed a novel high methoxyl pectin, namely xanthan aerogel coating on medical-grade stainless steel (Figure 3). Two non-steroidal anti-inflammatory active substances, i.e. diclofenac sodium and indomethacin, were incorporated into the aerogel coating. Electrochemical analyses showed that all passivated samples were highly resistant to general corrosion. The release of both non-steroidal anti-inflammatory active substances was completed after 24 hours, as confirmed by the plateau in the active substance release profiles as well as by IR spectroscopy after the final release point. The potential of samples for use in orthopaedic applications was evaluated on a human bone-derived osteoblast cell. All samples were shown to be biocompatible. The increased viability of some samples indicates the high potential for further investigation of their use in clinical practice.

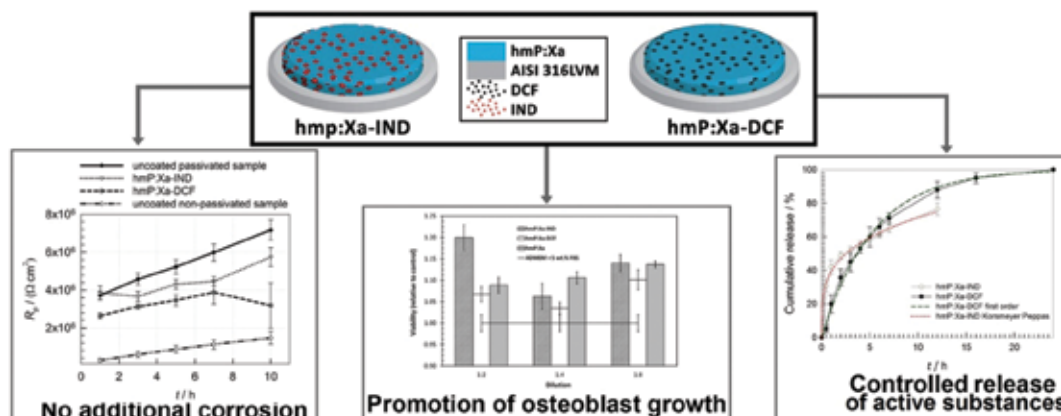


Figure 3. Novel xanthan-pectin aerogel coating on medical grade stainless steel for hip implants.



Dr. ŠPELA ALIČ

*Največja odkritja so
običajno presenečenja*

Špela Alič je svoje prve raziskovalne korake naredila v objemu naše največje učiteljice – narave, saj je razposajeno otroštvo preživela v vasi Murave v Škofjeloškem hribovju. Tudi v osnovni in srednji šoli so jo učitelji vedno znali navdušiti, še posebej za naravoslovje. Biologijo ji je na škofjeloški gimnaziji približala prof. Mojca Mravlja in jo spodbudila, da se je leta 2008 udeležila mednarodne biološke olimpijade v Indiji, s katere se je vrnila z bronasto medaljo. Med študijem biokemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko biologijo v Ljubljani je izjemno uživala, saj se je v laboratoriju počutila kot doma. Njeno diplomsko delo s področja molekularne biologije je bilo odlična popotnica v nadaljnji raziskovalni svet. Doktorski študij, pri katerem se je usmerila bolj na interdisciplinarno raven raziskovanja, je uspešno končala na Nacionalnem inštitutu za biologijo, kjer je zaposlena.

Raziskovalna doktorska naloga je imela dva osnovna namena: opis in določitev lastnosti povzročiteljev bolezni mehkih gnilob na orhidejah in možnosti nadzora povzročiteljev z biološkim nadzorom bakterijskih bolezni rastlin. Ugotovili smo, da uničujočo bolezen mehkih gnilob na orhidejah povzročajo bakterije iz rodu *Dickeya*, najpogostejše predstavnice nove vrste *Dickeya fangzhongdai*. Ko bolezen izbruhne, imajo pridelovalci orhidej velike izgube, zato smo proučili možnost nadzora bolezni z uporabo bakteriofagov. To so naravno prisotni virusi, ki okužijo le bakterijske celice in omogočijo, da iz okolja na varen način odstranimo povzročitelje bolezni. V okviru raziskave smo izolirali bakteriofage, ki so primerni za biološki nadzor bolezni. Za uspešno implementacijo bodo potrebne nadaljnje raziskave na realnem sistemu rastlinjaka za vzgojo orhidej, sicer pa je raziskava prvi poglobljeni pogled v novoopisano vrsto *Dickeya fangzhongdai* in je zelo pomembna za znanost, ki raziskuje mehke gnilobe.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Nepričakovani rezultati so tisti, ki mi vedno dajo nov zagon in energijo za raziskovanje. Z leti sem spoznala, kako edinstvena je narava, saj poskrbi, da mi navdihov ne zmanjka. Tudi med pogovori s sodelavci raziskovalci običajno dobim marsikatero dobro idejo. Njihove izkušnje in drugačni pogledi mi pomagajo, da razširim svoja razmišljanja. Najbolj unikatne ideje pa običajno dobim ponoči, ko ne morem spati.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Izredno pomembno vlogo na poti vsakega mladega raziskovalca ima zagotovo mentor. Je kot svetilnik, ki z nasveti pomaga, da ne zaideš, a hkrati dovoljuje, da se naučiš samostojno krmariti in usmerjati svojo raziskovalno pot. Njihovo delo je vse prej kot enostavno, zato sem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar in somentorici dr. Tanji Dreoz Nacionalnega inštituta za biologijo zelo hvaležna za podporo. Brez njiju moje raziskovalno delo ne bi ugledalo luči sveta v tako uspešni obliki.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Sodelovanje akademskega sveta in gospodarstva je eden bistvenih dejavnikov v tehnološkem razvoju človeštva. Zame je Krkina nagrada predvsem velika čast in motivacija za naprej. Ponosna sem, da sem lahko s svojim delom prispevala delček znanosti, ki je perspektivna tudi za industrijo.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Znanost in raziskovalno delo imata svoj urnik, ki ga ni mogoče uokviriti v 8-urni delovnik. A tako delo me veseli, zato se laže prilagodim. Tudi moji številni hobiji, povezani s področjem zaščite in reševanja (sem aktivna gasilka, prva posredovalka in članica ekipe prve pomoči), mi omogočajo dodatne veščine in širino, kar mi koristi tudi pri znanstvenem delu. Za pravi »odklop« pa najraje sedem na motor ali se odpravim v hribe. Življenje si ne znam predstavljati tudi brez družine in prijateljev.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Sem zelo vztrajna in radovedna oseba, ki vedno stremi k preizkušanju novih stvari in izpopolnjevanju. Raziskovalni izzivi me zelo hitro pritegnejo in vedno najdem področje, o katerem bi želela vedeti več. Največji izziv vidim v tem, da se lahko ukvarjam z zanimivimi temami, ki me navdihujejo. Morda mi bo nekoč uspelo v skupni projekt povezati znanstveno raziskovanje in moje hobije.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Največja in najboljša odkritja so običajno presenečenja, zato ne obupajte ob neuspehih. Prepustite se toku znanosti in predvsem uživajte v izkušnji.

Najboljši nasvet

V življenju moraš delati stvari tako, da se lahko vedno brez slabe vesti pogledaš v ogledalo.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Ni treba spremeniti celotnega sveta, dovolj je, da spremenimo svet okoli sebe.

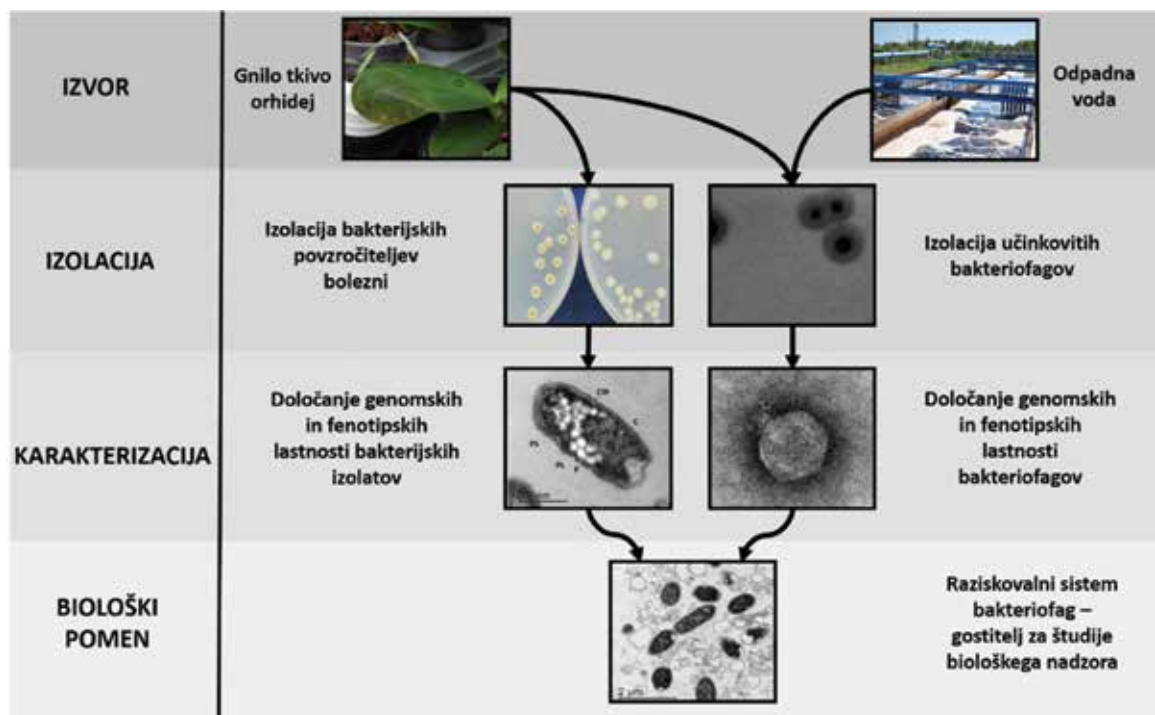
Bakterijska bolezen mehkih gnilob, ki jo povzroča nova vrsta rodu *Dickeya*, in možnost biološkega nadzora bolezni z bakteriofagi

ŠPELA ALIČ, Nacionalni inštitut za biologijo

Mentorica: Maja Ravnikar, Nacionalni inštitut za biologijo

Somentorica: Tanja Dreo, Nacionalni inštitut za biologijo

Bakterijska mehka gniloba je uničujoča rastlinska bolezen, ki prizadene številne vrste okrasnih rastlin in poljščin. Pogost povzročitelj so bakterije iz rodu *Dickeya*. Značilni znaki bolezni se pojavijo zaradi encimov za razgradnjo rastlinskih celičnih sten, ki jih izločajo bakterije. Bolezen predstavlja veliko omejitev pri vzgoji okrasnih rastlin, med drugim pri tržni vzgoji orhidej. Orhideje so ena največjih in najbolj prodajanih skupin cvetočih okrasnih rastlin, bolezen mehkih gnilob pa povzroča veliko ekonomsko škodo številnim pridelovalcem po celem svetu. Trenutno ni na voljo nobenega učinkovitega kemičnega sredstva za zatiranje ali preprečevanje okužb z *Dickeya* spp., zato predstavlja biološki nadzor s pomočjo bakteriofagov obetaven način obvladovanja bolezni. Bakteriofagi, virusi, ki okužujejo zgolj bakterijske celice, zaradi svojih specifičnih lastnosti omogočajo tarčni pristop biološkega nadzora. V okviru naše raziskave smo si prizadevali celostno opisati in taksonomsko uvrstiti povzročitelje mehkih gnilob orhidej *Phalaenopsis*, vzgojenih v rastlinjaku za tržno vzgojo orhidej. Obenem smo se usmerili v izolacijo bakteriofagov z ustreznimi lastnostmi za biološki nadzor bolezni (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz poteka raziskovalnega dela.

Najpogostejše izolirane bakterijske povzročiteljice bolezni iz okuženega tkiva orhidej *Phalaenopsis* so bile v predhodnih raziskavah uvrščene med predstavnike rodu *Dickeya*. Opažena genska raznolikost izolatov je ustrezala predhodno opisani raznolikosti neuvrščenih linij *Dickeya* iz orhidej in drugih rastlin. Glede na zaznano raznolikost naših izolatov smo izbrali 2 reprezentativna izolata, *Dickeya* sp. B16 in S1, ki smo ju podrobno analizirali. Bakterijska izolata sta izkazovala visoko stopnjo virulence na orhidejah in zelo visoko stopnjo agresivnosti na različnih vrstah rastlinskega tkiva (orhideje, belgijski radič, krompirjevi gomolji). Stopnja in hitrost razgradnje rastlinskega tkiva sta bili občutno višji kot pri ostalih bakterijskih vrstah rodu *Dickeya*, vključenih v testiranje. Izredno pomembna poljščina, ki jo prizadene bolezen mehkih gnilob, je krompir. Reprezentativna izolata sta bila sposobna sistemske kolonizacije rastlin krompirja, ki pa ni znan kot osnovni gostitelj. Rezultati podpirajo teorijo o vnosu in širjenju patogenov *Dickeya* spp. z okrasnih rastlin na poljščine.

Rod *Dickeya* je v preteklem desetletju doživel številne spremembe. Opisanih in dodanih je bilo več novih. Glede na genomsko in gensko podobnost *Dickeya* sp. B16 in S1 pripadata neuvrščeni skupini sevov *Dickeya*, izoliranih iz enokaličnic in vode. S primerjavo naših izolatov in opisanih *Dickeya* spp., povprečne identitete nukleotidov med genomi *Dickeya* (angl. average nucleotide identity) in tipizacijo na podlagi multilokusnih zaporedij ter fenotipskimi lastnostmi smo naša izolata uvrstili v nedavno opisano novo vrsto *Dickeya fangzhongdai*. Kljub veliki genomski podobnosti sevov *D. fangzhongdai* smo med predstavniki vrste opazili fenotipske raznolikosti. Pravilna klasifikacija bakterijskih povzročiteljev rastlinskih bolezni je nujen člen pri preprečevanju širjenja povzročiteljev bolezni in vzpostavitvi primernih nadzornih ukrepov. Vendar pa je bakterijske izolate izredno težko pravilno uvrstiti, če imajo predstavniki vrste variabilni fenotip.

Bakteriofage, učinkovite proti izolatom *Dickeya*, smo izolirali iz odpadne komunalne vode, na kateri smo demonstrirali uporabnost monolitne kromatografije (angl. convective interaction media monolith chromatography) za izolacijo bakteriofagov iz okoljskih vzorcev. Bakteriofage, izolirane iz odpadne vode, in predhodno izolirane bakteriofage iz gnilega tkiva orhidej *Phalaenopsis* smo glede na morfologijo uvrstili v 3 družine bakteriofagov rodu *Caudovirales*, in sicer *Podoviridae*, *Myoviridae* in *Siphoviridae*. Razlike med skupinami bakteriofagov smo opazili na nivoju genomske informacije in na nivoju profila gostiteljskih bakterij. Raziskave smo usmerili na bakteriofag BF25/12, prvi bakteriofag iz družine *Podoviridae*, ki je aktiven proti bakterijam iz rodu *Dickeya*. Prek obsežne karakterizacije bakteriofaga BF25/12, razvoja orodij za njegovo sledenje, kvantifikacije ter analize interakcij med gostiteljem in bakteriofagom smo uspešno vzpostavili raziskovalni sistem bakteriofag – gostitelj, ki bo omogočal študij dinamike, ki je ključna za uspešno uporabo bakteriofagov za namene biološkega nadzora patogenih bakterij. S pomočjo podrobne genomske analize in testiranja odpornosti proti ključnim okoljskim dejavnikom (pH, temperatura, UV-sevanje, razvoj odpornih bakterij) pa smo pokazali, da ima bakteriofag ustrezne osnovne lastnosti za biološki nadzor bolezni mehkih gnilob.

Rezultati predstavljenega raziskovalnega dela vključujejo prvi celosten opis izolatov vrste *D. fangzhongdai* in opišejo prvi sistem bakteriofag – gostitelj za raziskave dinamike za bakterije rodu *Dickeya*.

Bacterial Soft Rot Disease Caused by New *Dickeya* Species and Its Bacteriophage Biocontrol Possibilities

ŠPELA ALIČ, *National Institute of Biology*
 Supervisor: Maja Ravnikar, *National Institute of Biology*
 Co-supervisor: Tanja Dreo, *National Institute of Biology*

Bacterial soft rot is a destructive disease affecting various ornamental plants and crops worldwide. Causative bacteria are frequently identified as members of the *Dickeya* genus. Soft rot symptoms are caused by the pathogen producing and secreting high levels of plant cell wall-degrading enzymes, which results in general plant tissue maceration. Bacterial soft rot disease limits the production of several crops and ornamental plants, including commercial orchid production. Orchids belong to one of the largest families of flowering plants and are one of the best-selling plants in the horticultural trade with high added value. Therefore, soft rot disease causes severe economic losses in orchid nurseries on a global scale. No effective chemical-based approach is currently available for the control or treatment of *Dickeya* infections. Therefore, the bacteriophage biocontrol approach represents a promising management strategy for preventing and controlling *Dickeya* soft rots. Bacteriophages, viruses that can infect and lyse only bacterial cells, provide a target approach to managing the disease by biocontrol owing to several advantageous characteristics. Within our research, we strived to comprehensively characterise and taxonomically classify causative pathogenic bacteria from symptomatic *Phalaenopsis* orchids from a commercial production site, as well as to isolate and characterise bacteriophages against bacterial isolates and assess their biocontrol potential (Figure 1).

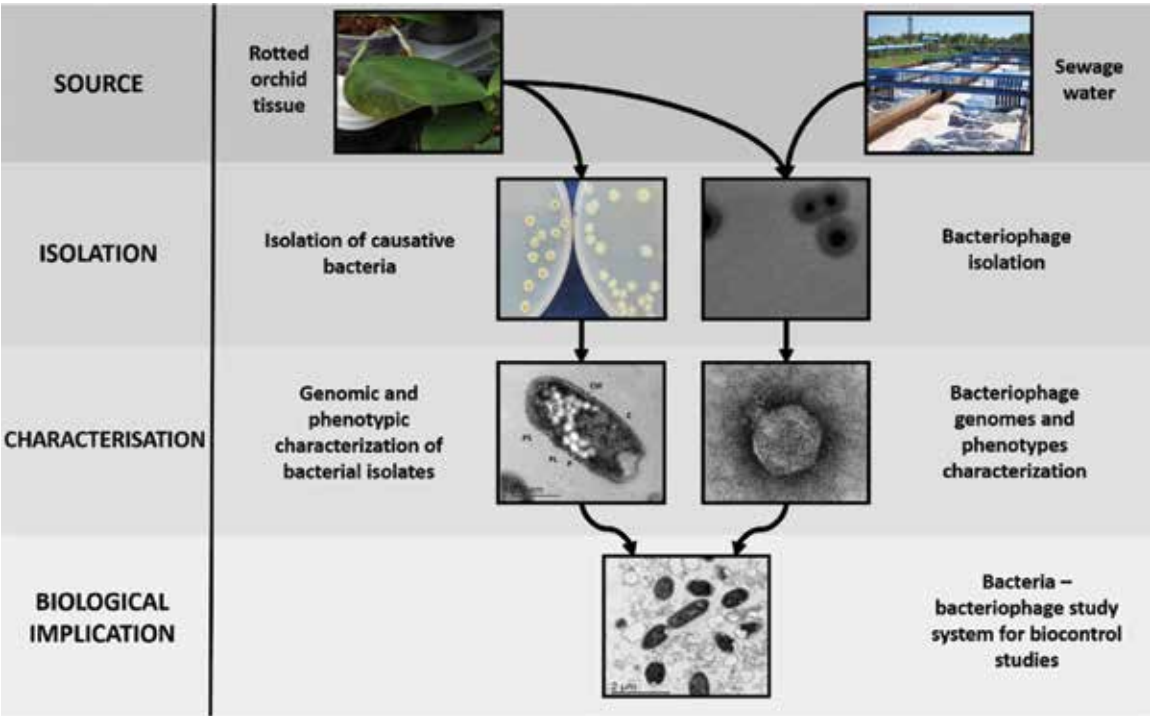


Figure 1. Schematic presentation of the research workflow.

In previous experiments, the most commonly isolated bacteria from diseased *Phalaenopsis* tissue were identified as *Dickeya* spp. Genetic diversity of the isolates was compliant with previously reported undefined *Dickeya* lineages from orchids (UDL-3 and UDL-4) and other plants. Two model isolates, *Dickeya* sp. B16 (UDL-3) and S1 (UDL-4), representing the observed diversity, were comprehensively analysed. Virulence and aggressiveness comparison tests on *Phalaenopsis* orchids, potato plants and witloof chicory leaves indicated a high virulence and extreme maceration potential of these novel *Dickeya* isolates compared to a reference panel of *Dickeya* spp. Potato is one of the most economically important crops affected by soft rot disease. Representative bacterial isolates S1 and B16 could also persist and systematically colonise potato plants, which are not their primary host. These results support indications of the possible introduction and spread of the *Dickeya* spp.

In the last decade, the *Dickeya* genus has undergone multiple changes as multiple new taxa have been described. However, *Dickeya* sp. B16 and S1 genetically and genomically corresponded to a, at that time, unclassified group of *Dickeya* strains isolated from monocotyledonous plants and water. Average nucleotide identity analysis and multilocus sequence analysis enabled us to classify these isolates as the recently reported new *Dickeya fangzhongdai* species. However, variations among the isolates and *D. fangzhongdai* type strain could be observed on the phenotypic level. The correct bacterial classification is essential for the prediction and prevention of pathogen spread and disease management, yet a variable species phenotype makes it difficult to classify all isolates accurately.

Bacteriophages active against causative *Dickeya* isolates were isolated from sewage water demonstrating the applicability of the convective interaction media monolith chromatography for bacteriophage isolation from environmental sources. Bacteriophages isolated from sewage water and previously isolated bacteriophages from rotted *Phalaenopsis* tissue were classified into three different *Caudovirales* families: *Podoviridae*, *Myoviridae* and *Siphoviridae*, expressing variations on the genome level and in their host profiles. Bacteriophage BF25/12, the first bacteriophage from the *Podoviridae* family, active against *Dickeya* spp., was comprehensively characterised (pH, UV and temperature stability, resistance development, and whole-genome analysis); molecular tools for tracking and quantification were developed, and initial bacteriophage-host interactions were examined. We have successfully established a bacteriophage-host system for studying dynamics that is essential for effective bacteriophage applicability. Furthermore, the determined characteristics of bacteriophage indicate suitability for use in soft rot biocontrol applications.

The results of the research work represent the first comprehensive characterisation of *Dickeya* isolates corresponding to the *D. fangzhongdai* species. Furthermore, we have established a well-defined model system for a bacteriophage-host dynamics study, i.e. the first one for the *Dickeya* genus.



Dr. ŠPELA ZUPANČIČ

*Prava moč raziskovanja
je v povezovanju
strokovnjakov*

Špela Zupančič, velika ljubiteljica narave, se je z raziskovalnim delom prvič srečala na Gimnaziji Kočevje in ga takoj vzljubila. Kasneje se je vpisala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani, kjer je leta 2013 magistrirala in leta 2017 doktorirala s področja farmacevtske nanotehnologije. Na tem področju je začela raziskovati že v okviru izmenjave prek programa Erasmus v Londonu. Ker je svoje delo opravila odlično, so jo na fakulteti še istega leta zaposlili kot mlado raziskovalko. Na podiplomskem študiju na Biomedicini, smer Farmacija, je imela možnost podrobneje spoznavati in raziskovati različne nanodostavne sisteme. V okviru doktorske naloge je del raziskovanja uspešno opravila tudi na illinojski univerzi v Chicagu v ZDA.

Razvoj uspešnega zdravila za katerokoli bolezen ni vedno povezan le z iskanjem novih zdravilnih učinkovin, temveč tudi z razvojem dostavnih sistemov. Ti podpirajo farmakološko in farmakokinetično plat učinkovin in olajšajo jemanje zdravila. V doktorski nalogi sta predstavljena razvoj in vrednotenje nanovlaknen za inovativno zdravljenje zelo razširjene parodontalne bolezni, ki jo je sicer težko popolnoma pozdraviti. Razvita nanovlakna s protivnetno in protimikrobno učinkovino ter probiotiki podpirajo strategijo inovativnega pristopa, ki vključuje tri prijemališča, in sicer vpliv na imunski sistem, odstranitev patogenih bakterij in vzpostavitev normalne ustne flore. Zaradi odličnih rezultatov na fakulteti nadaljujemo raziskovanje s poudarkom na vgradnji probiotikov in njihovem vrednotenju *in vitro* in *in vivo*, da bi bili bližje končnim zdravilom.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Iskanje novih idej in razvoj inovativnih dostavnih sistemov mi predstavlja velik navdih. Z izbiro pravilnega dostavnega sistema lahko bolniku olajšamo težave in skrajšamo čas zdravljenja. Raziskovalnih izzivov na tem področju ne bo zmanjkalo, in to je eden od razlogov, zakaj imam to področje tako rada. Običajno se dobra ideja ne pojavi nenadoma, ampak je preplet različnih dejavnikov. Tako lahko nekega dne neznamenit dogodek sproži briljantno idejo, ki je povezava med našim delom v laboratoriju, pogovori s kolegi, predavanji, konferencami ali članki.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Vloga mentorja je pri znanstvenoraziskovalnem delu zelo pomembna. Včasih se niti nisem zavedala, kako pomemben temelj predstavlja mentor. Moja mentorica je bila prof. dr. Julijana Kristl, ki me je sprejela v svojo raziskovalno skupino, zato je bila marsikatera naloga lažja, kakor bi bila sicer. Številni pogovori, usmeritve, mnenja in popravki so bistveno vplivali na raziskovanja, objavljane člankov in pisanje doktorske naloge. Vedno me je spodbujala in podpirala pri udeležbi na različnih mednarodnih delavnicah v okviru projekta COST s področja nanovlaknen, kjer sem se srečala z doktorskimi študenti in izvrstnimi profesorji. Med njimi je bil tudi profesor Alexander L. Yarin iz ZDA, ki me je na priporočilo mentorice za pol leta sprejel v svoj laboratorij. Poleg tega sem z aktivno udeležbo na raznih konferencah in izobraževanjih pridobivala samozavest in samostojnost. Za vse sem mentorici zelo hvaležna.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade vidim kot izjemno pomemben povezovalni element med akademskim svetom in gospodarstvom. Nam, mladim raziskovalcem, predstavljajo priložnost za potrditev inovativnosti naših raziskav in uporabnosti znanja. Dobimo pa tudi trdno izhodišče za uspešno nadaljevanje kariere. V čast mi je, da sem prejemnica Krkine nagrade, saj je to potrditev, da je bilo delo v zadnjih štirih letih kakovostno in inovativno zastavljeno in tudi izvedeno. Seveda so za vrhunski dosežek, kot je Krkina nagrada, ki sem jo prejela že drugič, ključni tudi nesebični sodelavci ter čustvena podpora družine in prijateljev.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Iskanje ravnotežja med profesionalnim in zasebnim življenjem je vedno lažje. Med doktoratom je lahko 12-ali večurni delavnik v trenutku zdrvel mimo mene, saj sem pri delu izjemno uživala, v mojih mislih pa običajno ni bilo drugega kot naslednji eksperiment, analiza, pisanje in iskanje rešitev za marsikatero zagato. Sedaj, ko je doktorat za menoj, ugotavljam, da je bil tak ritem življenja naporen, a koristen. V prihodnje si želim več časa, seveda poleg službe, za prijatelje, hobije, športne aktivnosti, pa tudi podoktorsko izobraževanje.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Radovednost, vedoželjnost in navdušenost so lastnosti, zaradi katerih je moje življenje povezano z znanstvenoraziskovalnim delom. Moja vztrajnost, delavnost, pozitivna naravnost in iznajdljivost so mi pomagali najti rešitve tudi v navidezno nerešljivih situacijah. Predvsem pa me je skozi take trenutke vodila hvaležnost do sodelavcev, ki so mi pomagali.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Vaše prve raziskave naj bodo enostavne, da z njimi osvojite pravi koncept dela, dobro predelajte literaturo, saj se na ta način izognete „odkrivanju tople vode“, in zavedajte se, da je prava moč raziskovanja v povezovanju strokovnjakov z različnih področij.

Najboljši nasvet

Pomembno je poslušati druga mnenja in hkrati slišati samega sebe ter se na koncu odločiti za najboljšo možnost.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Kdor išče cilj, bo ostal prazen, ko ga bo dosegel, kdor pa najde pot, bo cilj vedno nosil v sebi.

Razvoj dvoslojnih nanovlaken za inovativno zdravljenje parodontalne bolezni

ŠPELA ZUPANČIČ, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: **Julijana Kristl**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

Parodontalna bolezen spada med najpogostejša in hkrati najmanj raziskana obolenja v Evropi. Gre za kronično vnetje obzobnih tkiv, ki se začne s krvavitvijo dlesni in počasi napreduje v propad obzobnih tkiv, nastanek obzobnih žepov, majavost in izpadanje zob. Poleg lokalnih sprememb je parodontalna bolezen tudi dejavnik tveganja za nastanek sistemskih bolezni in zapletov, kot so srčno-žilne bolezni, diabetes, bolezni dihal in prezgodnji porod. Posledično lahko ta zelo razširjena bolezen znatno zmanjša kakovost bolnikovega življenja. V nastanek in napredovanje bolezni so vpleteni številni dejavniki, med katerimi imajo ključno vlogo po Gramu negativne parodontalne patogene bakterije in bolnikov imunski odziv. Zaradi kompleksne patogeneze je zdravljenje zahtevno, glavna pomanjkljivost danes razpoložljivih pristopov k zdravljenju pa je le začasna ozdravitev ali delno izboljšanje zdravstvenega stanja. Posledično obstaja velika potreba po razvoju novih pristopov in zdravil za bolj učinkovito zdravljenje.

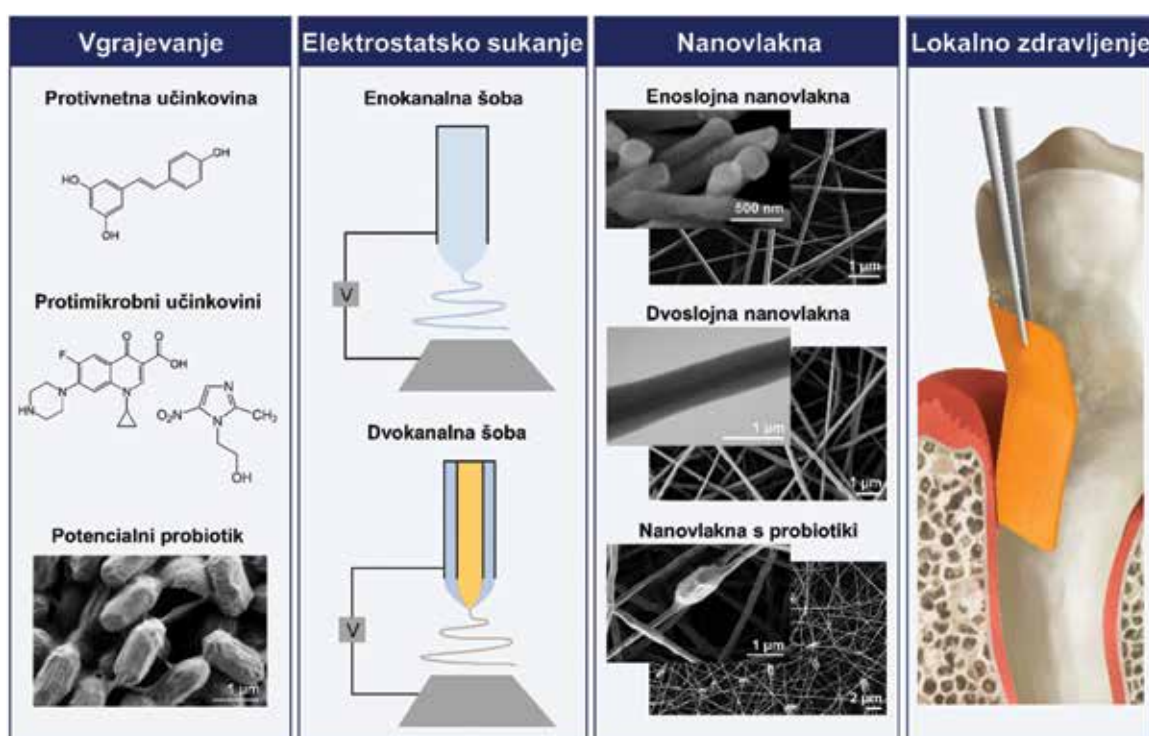
Glavni namen doktorske naloge je bil razvoj naprednih nanodostavnih sistemov za inovativno lokalno terapijo parodontalne bolezni (slika 1), ki temelji na (i) spreminjanju vnetnega odgovora organizma, (ii) antibiotičnem zdravljenju za odstranitev parodontalne patogene bakterije in (iii) dajanju probiotikov za vzpostavitev normalne ustne flore.

Razvoj inovativnega dostavnega sistema, ki bi lokalno vplival na imunski sistem gostitelja in tako zmanjšal razgradnjo obzobnega tkiva, je temeljil na izdelavi nanovlaken s protivnetno in antioksidativno učinkovino. Izbrali smo trans-resveratol, za katerega je dokazano pozitivno delovanje pri zdravljenju parodontalne bolezni, dostavni sistem za njegovo lokalno dostavo pa še ni bil razvit. Na začetku smo opravili temeljne raziskave o stabilnosti in topnosti trans-resveratrola pri različnih pogojih in ga nato z elektrostatskim sukanjem uspešno vgradili v nanovlakna iz polikaprolaktona (PCL). Ugotovili smo, da uporaba polimernih raztopin iz različnih topil pomembno vpliva na morfologijo nanovlaken ter vgradnjo in sproščanje trans-resveratrola.

Največji izziv pri raziskovalnem delu je bil razvoj nanovlaken iz preferenčno biorazgradljivih in bioadhezivnih polimerov s podaljšanim sproščanjem kombinacije hidrofilnih protimikrobnih učinkovin, kar je pomembno za uspešno lokalno zdravljenje parodontalne bolezni. Metronidazol in ciprofloksacin smo vgradili v različna eno- in dvoslojna nanovlakna iz hidrofilnih in hidrofobnih polimerov in dokazali 7- ali večdnevno podaljšano sproščanje. Pri razvoju različnih nanovlaken smo s sistematičnim proučevanjem ugotovili ključne parametre, ki vplivajo na kinetiko in mehanizem sproščanja zdravilnih učinkovin. Razumevanje procesov vgrajevanja in sproščanja učinkovin iz nanovlaken je pripomoglo, da smo razvili najobetavnejši lokalni dostavni sistem v obliki dvoplastnih nanovlaken iz plasti PCL-nanovlaken z vgrajenim 5-odstotnim metronidazolom in plasti nanovlaken iz zmesi hitosana in polietilen oksida (PEO) v razmerju 92,5 : 7,5 s 30 % ciprofloksacina. Iz razvitih nanovlaken sta se obe protimikrobni učinkovini sproščali vsaj 12 dni v koncentraciji nad minimalno inhibitorno koncentracijo, določeno na sevu parodontalne patogene bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ki je eden od najbolj pogostih patogenov, povezanih s parodontalno boleznijo. Sproščanje je bilo opravljeno *in vitro* na novopretočni aparaturi, ki smo jo razvili zato, da smo lahko simulirali specifične pogoje v obzobnem žepu, idealnem mestu za zdravljenje parodontalne bolezni. Razviti lokalni dostavni sistem bi se zaradi nanovelikosti in bioadhezivnosti nanovlaken iz hitosana lahko dalj časa zadržal v obzobnem žepu in zagotovil lokalno visoke koncentracije metronidazola in ciprofloksacina, kar bi pričakovano izboljšalo prodiranje zdravilnih učinkovin v biofilm, povečalo učinkovitost protimikrobnega zdravljenja in zmanjšalo verjetnost pojava odpornih sevov bakterij.

Glede na razpoložljive podatke iz literature smo potencialne probiotike, izolirane iz ustne flore zdravih prostovoljcev, prvi vgradili v nanovlakna za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni. Elektrostatsko sukanje se je pokazalo kot zelo obetavna metoda, ki sočasno omogoča visoko učinkovitost vgradnje, enkratno preživelost in sušenje bakterijskih spor ter pripravo bolniku prijaznega lokalnega dostavnega sistema. Izdelali smo nanovlakna, ki vsebujejo do $10^{10,5}$ CFU/g bakterij. Teoretično bi potrebovali manj kot 10 mg nanovlaken, da bi dosegli optimalno količino bakterij za rekolonizacijo obzobnega žepa. Dokazali smo tudi izjemno preživelost spor med 6-mesečnim shranjevanjem pri sobnih pogojih. Spore iz hitosan/PEO-nanovlaken so se sprostile in se v primerjavi s PEO-nanovlakni izražale kasneje, kar pomeni, da lahko z izbiro vrste nanovlaken nadzorujemo sproščanje bakterij. Potencialni probiotiki, vgrajeni v nanovlakna, so delovali protimikrobno proti sevu *A. actinomycetemcomitans* in so bili sposobni preraščati območja, ki so bila prej naseljena s patogenom. Razvit nanodostavni sistem predstavlja velik potencial za lokalno dostavo potencialnih probiotikov v obzobni žep, kjer se lahko trajno naselijo in tako potencialno pripomorejo k dolgotrajnejši zaustavitvi bolezni.

Doktorska naloga predstavlja razvoj različnih inovativnih formulacij nanovlaken s protivnetno in protimikrobnimi učinkovinami ter potencialnimi probiotiki za lokalni vnos v obzobne žepa, kar omogoča možnost za izboljšanje trenutnega zdravljenja parodontalne bolezni.



Slika 1. Shematski prikaz vgrajevanja protivnetne učinkovine in protimikrobnih učinkovin ter potencialnega probiotika z elektrostatskim sukanjem z uporabo eno- in dvokanalne šobe v nanovlakna za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni.

Development of Core-Shell Nanofibers for Innovative Periodontal Disease Treatment

ŠPELA ZUPANČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Julijana Kristl**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Periodontal disease is one of the most common conditions suffered by European populations, but among the least acknowledged. It is a chronic inflammatory disease of the periodontium, which starts with bleeding gums in the initial stage, and degradation of periodontal tissue, formation of dental pockets, loose teeth and tooth loss in advanced phases. In addition to local effects, periodontal disease presents a potential risk factor for the development of systemic diseases and complications, such as cardiovascular disease, diabetes, respiratory diseases, and premature birth. Consequently, this disease can considerably impair the overall quality of a patient's life. The presence of Gram-negative periodontopathogenic bacteria and patient's immune response are two most critical factors for the development and progression of the disease. The treatment is demanding due to complex disease pathogenesis, and the main disadvantage of treatment approaches available is that the disease can only be temporarily cured or the health status can only be partially improved. Therefore, there is a great need to develop new therapeutic approaches and medicines for an effective treatment.

The main aim of this doctoral thesis was the development of advanced nanodelivery systems for local treatment of periodontal disease (Figure 1) that can (i) modulate host immune responses, (ii) locally reduce the number of periodontal pathogenic microorganisms with antimicrobials, and, (iii) with the application of probiotics, restore normal oral flora.

The development of the delivery system that would locally modulate the host immune system and thus reduce the decay of periodontal tissue was based on the formulation of nanofibers with an anti-inflammatory and antioxidative active substance. Trans-resveratrol was chosen, which has a proven positive effect in the treatment of periodontal disease; however, a local delivery system for this disease has not been developed yet. At first, fundamental research was carried out on the stability and solubility of trans-resveratrol under different conditions, and then, trans-resveratrol was successfully incorporated into nanofibers from polycaprolactone (PCL). The electrospinning of polymer solutions prepared from various solvents affected the nanofiber morphology, trans-resveratrol incorporation and release.

The biggest challenge was to develop nanofibers from preferably biodegradable and bioadhesive polymers that would enable prolonged release of hydrophilic antimicrobials, which is crucial for an effective treatment of periodontal disease. Metronidazole and ciprofloxacin were incorporated into monolithic, blended and core-shell nanofibers, and a prolonged drug release of more than seven days was confirmed. The variation of process and solution parameters led to important findings on the kinetics and mechanisms related to the release of active substances. The understanding of the incorporation and drug release processes contributed to the development of the most promising local delivery system in the form of a double layer nanofiber mat. The first layer was composed of PCL nanofibers with 5% metronidazole, and the second layer from nanofibers from a mixture of chitosan and poly(ethylene oxide) (PEO) in a 92.5 : 7.5 ratio with 30% ciprofloxacin. Both antimicrobials were released from the double-layer nanofiber mat for at least 12 days in concentration above the minimum inhibitory concentration, based on the periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, one of the most frequently present pathogens connected with periodontal disease. The release was evaluated in a new flow-through *in vitro* apparatus, which we have developed to simulate specific conditions in a periodontal pocket, the ideal site for local treatment. The nanodelivery system could potentially be retained in the periodontal pocket for a prolonged time due to the nanosize and bioadhesiveness of nanofibers from chitosan and at the same time provide locally high concentrations of metronidazole and ciprofloxacin, which can

improve the penetration of active substances into the biofilm, increase the effectiveness of antimicrobial treatment, and decrease the probability of resistant bacteria strains arising.

To locally treat periodontal disease, nanofibers with new potential probiotics, isolated from the oral flora of healthy volunteers, were developed for the first time to the best of our knowledge. Electrospinning proved to be an effective method that enables high loading, exceptional survival and drying of spores with simultaneous formulation of a patient-friendly nanodelivery system for local use. Nanofibers with spore loading of up to $10^{10.5}$ CFU/g were developed and theoretically less than 10 mg of nanofibers would be sufficient for periodontal pocket recolonisation. The remarkable spore viability was proven during storage for six months at room temperature. The release and outgrowth of probiotic from chitosan/PEO nanofibers was slower compared to PEO nanofibers, which implies that probiotic release from nanofibers can be regulated by the selection of appropriate nanofibers. In particular, all our nanofibers containing probiotics had antibacterial action on the periodontal pathogen, *A. actinomycetemcomitans*, and the ability to overgrow areas previously colonised by pathogenic bacteria. Therefore, developed nanofibers present a great potential for the local delivery of potential probiotics into the periodontal pocket, where they can be permanently inhabited, and thus potentially contribute to the improved therapeutic outcome.

This doctoral thesis presents the development of various innovative formulations of nanofibers loaded with an anti-inflammatory active substance, antimicrobials and potential probiotics for local administration into periodontal pockets, which holds much promise for improving the current treatment of periodontal disease.

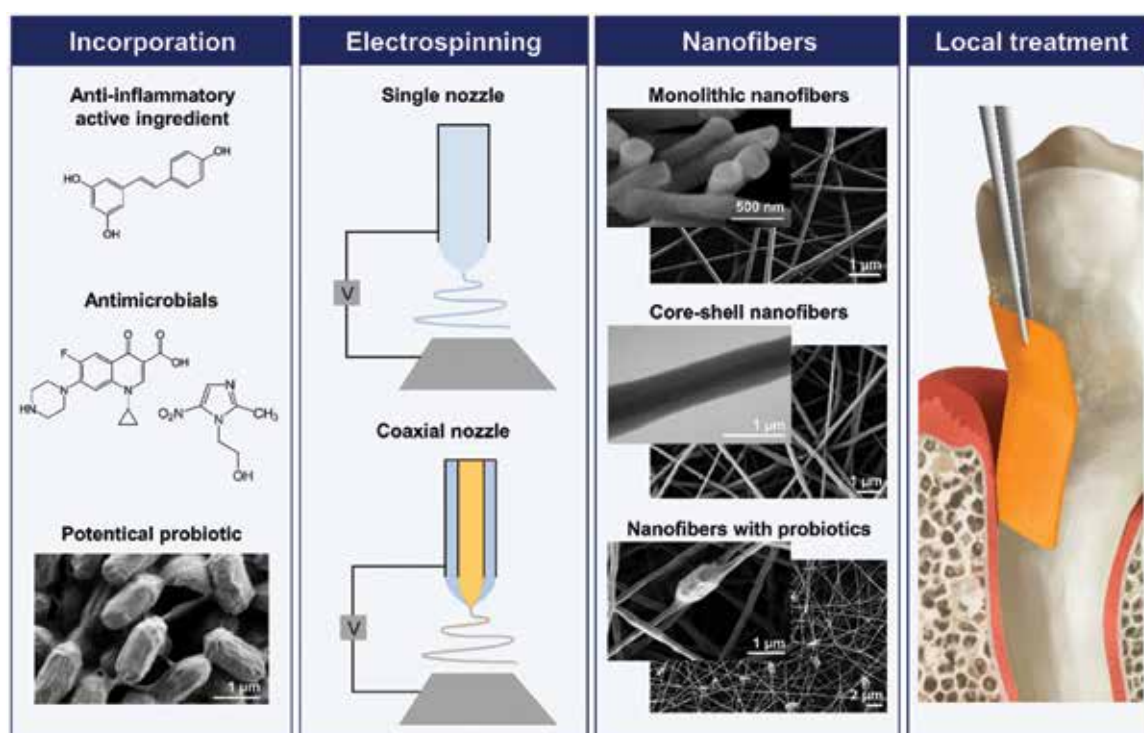


Figure 1: Incorporation of an anti-inflammatory active ingredient, antimicrobials and a potential probiotic using electrospinning through a single or coaxial nozzle to develop nanofibers for local treatment of periodontal disease.



**Dr. ANDREJ
EMANUEL COTMAN**

*Težki izzivi dajo
največje zadovoljstvo*

Andrej Emanuel Cotman, ki prihaja iz Zgornjih Jarš v občini Domžale, je svojo raziskovalno strast prebudil v osnovni šoli, ko je napisal prvo raziskovalno nalogo na temo eksplozivov. Njegovo navdušenje nad naravoslovjem, zlasti kemijo in farmacijo, se je na Škofijski klasični gimnaziji še poglobilo, zato se je odločil za študij na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Za magistrsko delo s področja novih protibakterijskih učinkov je prejel prvo Krkino nagrado. Med doktorskim študijem kemijskih znanosti je bil kot mladi raziskovalec zaposlen na Kemijskem inštitutu, zdaj pa s primarnim področjem svojega raziskovanja, tj. organsko kemijo, nadaljuje na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Že med študijem farmacije me je očaralo, kako je možno iz enostavnih gradnikov sintezno pripraviti poljubno, še tako kompleksno molekulo z biološkim delovanjem. Izziv, ki pri tem ostaja, pa je, kako poljubno molekulo učinkovito pripraviti. Z razvojem organske kemije, zlasti katalitskih in enantioselektivnih reakcij, se čedalje bolj odstira nabor orodij za enostavno pripravo navidez nedostopnih molekulskih skeletov, ki so neposredno zanimivi za industrijo finih kemikalij.

Namen moje doktorske naloge je bil katalitska redukcija ketonov do sekundarnih alkoholov z več zaporednimi kiralnimi ogljikovimi atomi. Naš pristop do takšnih produktov je uporaba topnih rutenijevih(II) katalizatorjev, ki prek predvidljivih medmolekulskih interakcij vodijo redukcijo le do ene stereomerne oblike produkta od do šestnajstih možnih. Glavna prednost razvitih sinteznih pristopov je, da so konceptualno sveži in da je praktična izvedba tovrstnih kemijskih reakcij enostavna in izvedljiva na večgramskem merilu. Verjamem, da bo strokovna javnost prepoznala uporabno vrednost naših temeljnih raziskav in jih uporabila pri reševanju konkretnih problemov v organski sintezi.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu me navdihujejo odkritja preteklih generacij znanstvenikov. Če so oni pred desetletji z improvizirano opremo lahko prišli do dihalnih odkritij, potem danes za kaj drugega kot odlično znanost nimamo izgovorov. Najboljše ideje se mi porodijo tik za tem, ko se o osnovni ideji pogovorim s sodelavci. To je pravi način zorjenja uspešnih konceptov.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Ključno za dobre rezultate moje doktorske naloge je bilo, da sem delo začel na odličnih preteklih rezultatih raziskovalne skupine, ki jo je vodila moja mentorica dr. Barbara Mohar. Na začetku mi je nakazala smer, v kateri se raziskovanje najbolj izplača, in bila pozneje vedno na voljo za kritično razpravo o nenavadnih ugotovitvah. Posebej dragocen je bil čas, ki ga je namenila skupnemu delu v laboratoriju, saj se številnih skrivnosti sintezne kemije ne da naučiti iz knjig.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Povezovanje akademskega sveta z gospodarstvom je vsekakor vzajemna korist. Gospodarstvo na ta način pridobi drzne in inovativne ideje, akademske raziskave pa se lažje prilagajajo neposrednim, četudi srednjeročnim, potrebam gospodarstva in tako niso le same sebi namen. Raziskovalci radi vidimo potrditev svojega dela. Če potrditev pride od enega od vodilnih generičnih farmacevtskih podjetij, ima neko težo. Počaščen sem, da je Krka prepoznala pomembnost mojega področja raziskovanja.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Znanstvenoraziskovalno delo zahteva celostnega človeka. Razgibano življenje hitreje pripelje do prebojnih rezultatov kot pretirano obremenjevanje le znanstvene polovice možganov, zato čas zunaj laboratorija namenjam družini, polprofesionalnemu ukvarjanju z glasbo in (manj kot bi si želel) rekreativnemu športu. Spoznal sem, da ko gre dobro kemija, gredo dobro tudi ostale stvari v življenju, nisem pa še ugotovil, kaj je vzrok in kaj posledica.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Rad imam težke izzive, saj je po začetnem trpljenju končno zadovoljstvo večje. Premorem zdravo mero lenobe, da stvari počnem učinkovito. Pri znanstvenem delu mi pomaga prek glasbe pridobljena sposobnost abstraktnega mišljenja in iskanja vzorcev.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Kot je dejal nobelovec Ivan Petrovič Pavlov: »Prvi pogoj za plodovito znanstveno delo je postopnost. Nikoli ne naredite naslednjega koraka, dokler ne obvladate predhodnega. Skromno in potrpežljivo zbirajte dejstva, a ne bodite arhivarji podatkov; skušajte prodreti do skrivnosti njihovega izvora in vztrajno iščite zakone, ki jih uravnavajo.« (Science 1936, 83(2155), 369)

Najboljši nasvet

Ne ponavljaj istega eksperimenta v upanju na drugačen rezultat.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Vse je hitro narejeno, le delo vzame nekaj časa.

Asimetrične redukcije ketonov, katalizirane s kovinskimi kompleksi

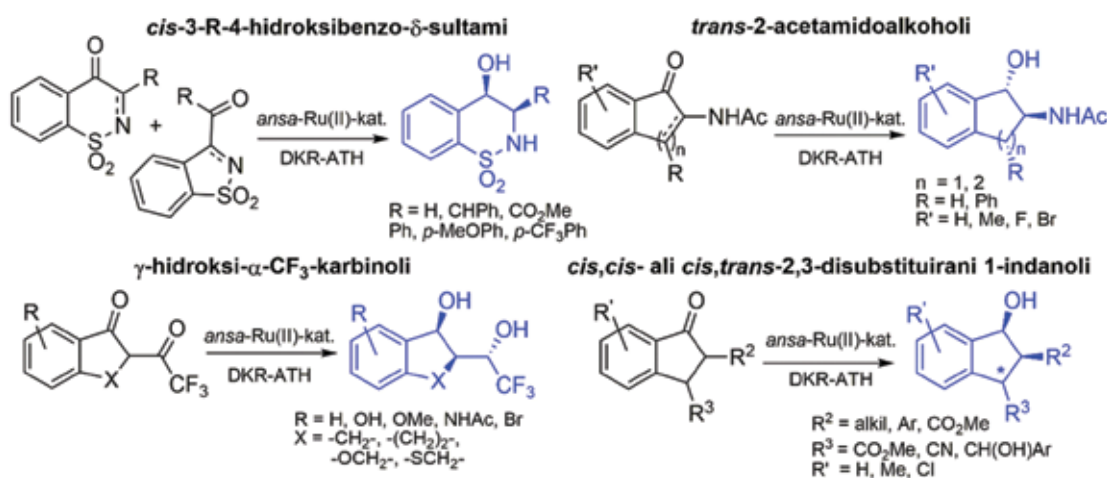
ANDREJ EMANUEL COTMAN, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Mentorica: **Barbara Mohar**, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Somentor: **Boris Šket**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

Stereomerno čisti alkoholi z več (n) zaporednimi stereogenimi ogljikovimi atomi so pogosti gradniki biološko aktivnih spojin ali reagentov za asimetrično sintezo. Priprava zgolj enega od 2^n možnih stereomerov predstavlja velik izziv, saj je za zdaj razvitih malo učinkovitih in praktičnih metod za njihovo sintezo.

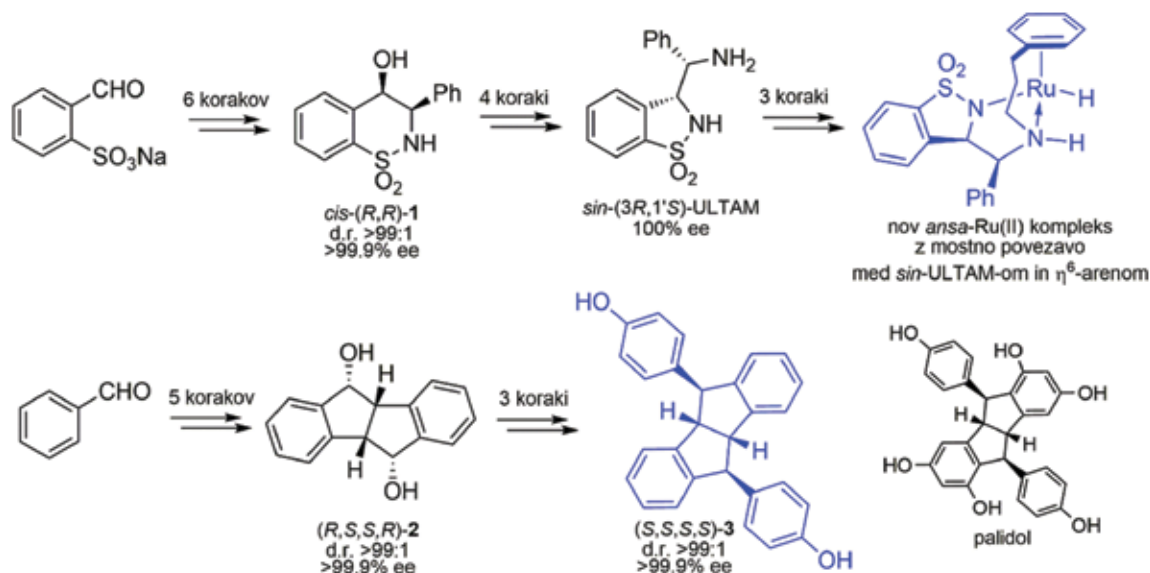
Uporabne asimetrične kemijske pretvorbe do kiralnih sekundarnih alkoholov so asimetrične redukcije ustreznih ketonov. Takšne redukcije se lahko izvedejo katalitsko z uporabo topnih kiralnih organokovinskih kompleksov, sestavljenih iz prehodne kovine in enantiomerno čiste organske molekule (kiralnega liganda). Z vidika čistosti reakcije ter enostavnosti izvedbe in izolacije sta cenjena asimetrično hidrogeniranje (AH), pri katerem se kot vir vodika uporablja plinast vodik, in asimetrično transferno hidrogeniranje (ATH), kjer se kot vir vodika uporabljajo 2-propanol ali soli metanojske kisline. Metodi sta komplementarni in izvedljivi v industrijskem merilu. Poleg tega ju lahko kombiniramo z dinamično kinetično resolucijo (DKR), kar predstavlja učinkovit način priprave sekundarnih alkoholov z dvema ali več stereogenimi ogljikovimi atomi iz racemnih ketonov, ki vsebujejo stereolabilne ogljikove atome na α -, α' - in/ali β -mestu ketona, na eni sami sintezni stopnji. Izbira metode je odvisna od dostopnosti in učinkovitosti katalizatorja, proizvodnih stroškov, varnostnih vidikov itd. Prednosti ATH v primerjavi z AH so uporaba varnejših reducirnih reagentov, enostavnejša oprema brez tlačnih reaktorjev in v nekaterih primerih boljša stereoselektivnost katalizatorjev. Na Kemijskem inštitutu Ljubljana sta bili od 2012 do 2014 razviti dve seriji *ansa*-Ru(II)-katalizatorjev za ATH, ki temeljita na homokiralnih *N*-sufamoil-DPEN ligandih (DPEN = 1,2-difeniletildiamin), od katerih sta najbolj aktivna predstavnika {Ru[DPEN-SO₂N(Me)(CH₂)₃*p*-Tol]} in {Ru[*N*-Piperidino-SO₂-DPEN(CH₂)₃Ph]}. Slednjega smo uporabili pri študiju novih principov dinamične kinetične resolucije, povezane z asimetričnim transfernim hidrogeniranjem (DKR-ATH) racemnih ketonov. Na ta način smo v visoki diastereo- in enantiomerni čistosti (d. r. > 99 : 1, > 99 % ee) pripravili štiri skupine doslej nedostopnih benzocikličnih alkoholov z dvema do štirimi zaporednimi stereogenimi ogljikovimi atomi (Slika 1).



Slika 1. Novi principi Ru(II)-katalizirane DKR-ATH za pripravo stereomerno čistih benzocikličnih alkoholov z več zaporednimi kiralnimi centri.

Prek DKR-ATH α -(*N*-sulfonilimino) ali α -(*N*-sulfonilamino) aril ketonov s kompleksom *ansa*-Ru(II)-kataliziranih v zmesi HCO₂H/Et₃N smo pripravili *cis*-3-substituirane 4-hidroksibenzo- δ -sultame

z vicinalnima stereogenima ogljikovima atomoma. Tudi če smo izhajali iz zmesi pet- in šestčlenskega strukturnega izomera, smo po končani dvostopenjski redukciji dobili le en izomer, saj je po prvi redukciji kvantitativno potekla razširitev obroča od γ - do δ -sultama. Pri DKR-ATH 2-acetamido-indanonov in -tetralonov so nepričakovano nastali *trans*-2-acetamidoalkoholi, pri čemer diastereoselektivnost usmerja vodikova vez med acetamidno skupino ketona in skupino SO_2 katalizatorja v prehodnem stanju. Med ATH α - $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})$ -substituiranih benzocikličnih ketonov do γ -hidroksi- α - CF_3 -karbinolov s tremi zaporednimi stereogenimi ogljikovimi atomi je potekla dvojna DKR, kar v literaturi še ni bilo opisano. Najprej se trifluorometilketon regiospecifično reducira do *sin*-monoalkohola, ta pa se prek druge DKR pretvori do 1,3-diola z obrnjeno konfiguracijo na obročnem metinskem ogljiku. DKR-ATH α,β -disubstituiranih indanonov je bila bodisi visoko *cis,cis*- ali *cis,trans*-diastereoselektivna, kot posledica 1,2-*cis* usmerjanja katalizatorja $\text{Ru}(\text{II})$ z visoko sposobnostjo kiralne prepoznave v prehodnem stanju, konfiguracija na C3 pa je bila termodinamično kontrolirana. Takšna sintezna metodologija je omogočila tudi pripravo konformacijsko rigidnih stereomerno čistih 1,4-diolov z indanoindanskim ali indanotetralinskim skeletom in štirimi zaporednimi stereogenimi centri, ki do sedaj še niso bili pripravljeni v stereomerno čisti obliki. Uporabnost razvitih metod smo demonstrirali z izvedbo reakcije na večgramskem merilu z razmerjem med substratom in katalizatorjem do 10.000 ter pretvorbo izbranih stereomerno čistih alkoholov do uporabnih kiralnih spojin (Slika 2). Tako smo iz stereomerno čistega 4-hidroksi-3-fenilbenzo- δ -sultama *cis*-(*R,R*)-1 v štirih stopnjah asimetrično sintetizirali homokiralni ligand »*sin*-ULTAM«, ki je bil v naši skupini že pripravljen, vendar prek ločevanja racemne zmesi liganda z uporabo preparativne kiralne HPLC. Nadalje smo pripravili nov kompleks *ansa*- $\text{Ru}(\text{II})$ s kovalentno mostno povezavo medaminskim delom liganda in η^6 -arenom. Ta se je pri DKR-ATH zgoraj omenjenih 2-acetamido-indanonov izkazal za bolj učinkovitega od dotlej znanih katalizatorjev. Iz 1,4-diola (*R,S,S,R*)-2 z indanoindanskim skeletom pa smo prek diastereoselektivnega Friedel-Crafts benziliranja 2-kloroanizola z naslednjo odščito pripravili analog palidola, naravnega dimera resveratrola.



Slika 2. Uporaba predstavljenih metod za asimetrično totalno sintezo novega kompleksa *ansa*- $\text{Ru}(\text{II})$ in analoga naravnega produkta palidola.

Opisani sintezni pristopi razširjajo nabor orodij organske kemije za pripravo prostorsko urejenih skeletov z več zaporednimi stereogenimi ogljikovimi atomi. Izhodni prokiralni ketoni so dostopni prek klasičnih kemijskih pretvorb, visokoaktivni homokiralni katalizatorji *ansa*- $\text{Ru}(\text{II})$ pa poskrbijo za kontrolirano tvorbo zaporednih stereogenih centrov v enem sinteznem koraku. Tako pripravljene sekundarne alkohole je mogoče prek diastereoselektivnih kemijskih reakcij brez padca stereomerne čistosti pretvoriti v kompleksnejše molekule, kar dodatno poveča nabor produktov, dostopnih prek DKR-ATH.

Asymmetric Reductions of Ketones Catalysed by Metal Complexes

ANDREJ EMANUEL COTMAN, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Barbara Mohar, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Boris Šket, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Stereopure alcohols possessing multiple (n) stereogenic carbon atoms are common building blocks of bioactive compounds and reagents for asymmetric synthesis. Accessing only one out of 2^n possible stereoisomers still presents a major challenge due to the lack of efficient and practical methods for their preparation.

Chiral secondary alcohols can be prepared via asymmetric reduction of corresponding ketones. Such reductions can be performed in a catalytic manner using soluble chiral organometallic complexes, comprising a transition metal and an enantiomerically pure organic molecule (chiral ligand). Valuable reactions regarding operational simplicity and ease of isolation are asymmetric hydrogenation (AH) and asymmetric transfer hydrogenation (ATH). Hydrogen gas is used as the source of hydrogen for the former and 2-propanol or formic acid salts for the latter. These methods are complementary and scalable. They can be coupled by dynamic kinetic resolution (DKR), which offers a straightforward access to secondary alcohols containing multiple stereogenic carbons, starting from racemic ketones which bear stereolabile α -, α' - and/or β -carbons. The choice of a method depends on catalyst availability and efficiency, production cost, safety concerns, etc. Compared to AH, ATH avoids the use of molecular hydrogen and the special handling concerns involved. In addition, higher stereoselectivity is obtained in some cases. Between 2012 and 2014, two series of efficient *ansa*-Ru(II) catalysts for ATH, based on homochiral *N*-sulfamoyl-DPEN ligands (DPEN = 1,2-diphenylethylenediamine), were developed at the National Institute of Chemistry, for example {Ru[DPEN-SO₂N(Me)(CH₂)₃*p*-Tol]} and {Ru[*N*-Piperidino-SO₂DPEN(CH₂)₃Ph]}. The latter was used in the present study of the dynamic kinetic resolution, coupled with asymmetric transfer hydrogenation (DKR-ATH) of racemic ketones. In this way, four new classes of benzofused cyclic alcohols bearing two to four contiguous stereogenic carbons were successfully prepared in excellent diastereo- and enantiomeric purity ($dr > 99$, $> 99\%$ ee) (Figure 1).

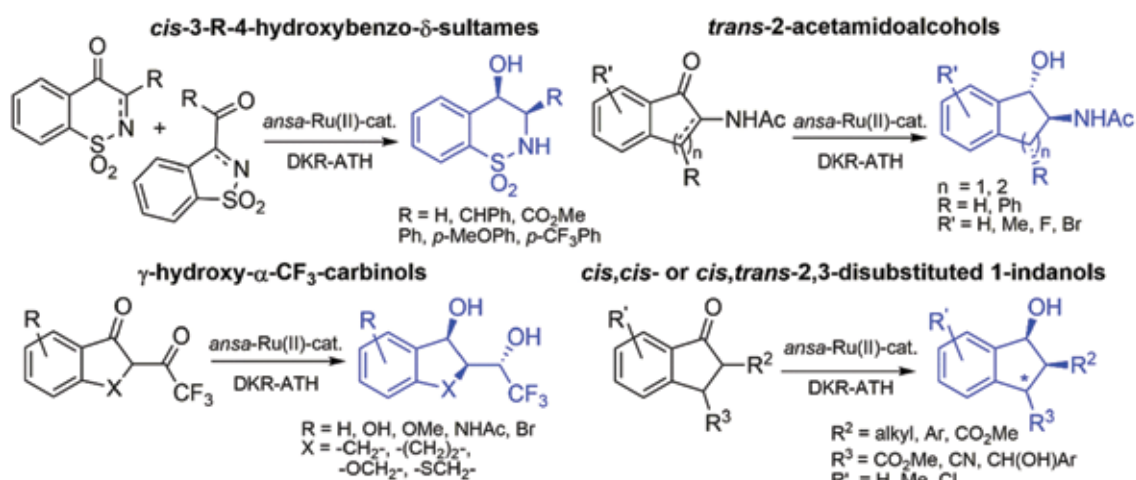


Figure 1. New principles of Ru(II)-catalysed DKR-ATH for preparation of stereopure benzofused alcohols containing multiple stereogenic carbons

Thus, subjecting α -(*N*-sulfonylimino) or α -(*N*-sulfonylamino) aryl ketones to Ru(II)-catalysed ATH in a $\text{HCO}_2\text{H}/\text{Et}_3\text{N}$ mixture, these underwent DKR leading to *cis*-3-substituted 4-hydroxybenzo- δ -sultams possessing two vicinal stereogenic carbons. Even if starting from a mixture of five- and six-membered structural isomers, only one isomer was obtained after two-step reduction involving a quantitative ring expansion after the first reduction step. DKR-ATH of 2-acetamido-indanones and -tetralones resulted in the unexpected *trans*-configured 1-hydroxy-2-acetamides, where diastereoselectivity was driven by hydrogen bonding between the acetamido group of the ketone and the SO_2 group of the catalyst. Moreover, α - $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})$ -substituted benzofused cyclic ketones underwent unprecedented two consecutive DKR during their reduction, which led to γ -hydroxy- α - CF_3 -carbinols containing three contiguous stereogenic carbons. After regiospecific reduction of trifluoromethylketone to *syn*-monoalcohol, the manifestation of a 2nd DKR gave rise to a diol whereby the methine configuration (in the cycle) was inverted. DKR-ATH of α,β -disubstituted indanones to 2,3-disubstituted indanols was either highly *cis,cis*- or *cis,trans*-diastereoselective as a result of 1,2-*cis* directivity of the Ru(II) catalyst in the reduction step, whereas configuration at C3 was thermodynamically controlled. Such synthetic methodology allowed us to prepare conformationally rigid chiral 1,4-diols with indanoindan or indanotetraline scaffold, possessing four contiguous stereocentres. The synthetic utility of the developed methods was demonstrated by gram-scale reductions applying substrate to catalyst ratio of up to 10,000 and further conversion of stereopure alcohols to more complex structures. For example, stereopure alcohol *cis*-(*R,R*)-1 was transformed in a stereo-controlled manner to chiral 'syn-ULTAM' ligand, which had been previously prepared by our group via chiral HPLC separation of its racemic mixture. This was embedded in a new *ansa*-Ru(II) catalyst design wherein the η^6 -arene moiety was intra-covalently tethered to the ligand amine terminal, and was successfully applied to the DKR-ATH of the above presented 2-acetamido-indanones. 1,4-Diol with indanoindan scaffold (*R,S,S,R*)-2 was transformed to an analogue of pallidol, a naturally occurring resveratrol dimer, via diastereoselective FeCl_3 -catalysed Friedel-Crafts benzylation of 2-chloroanisole.

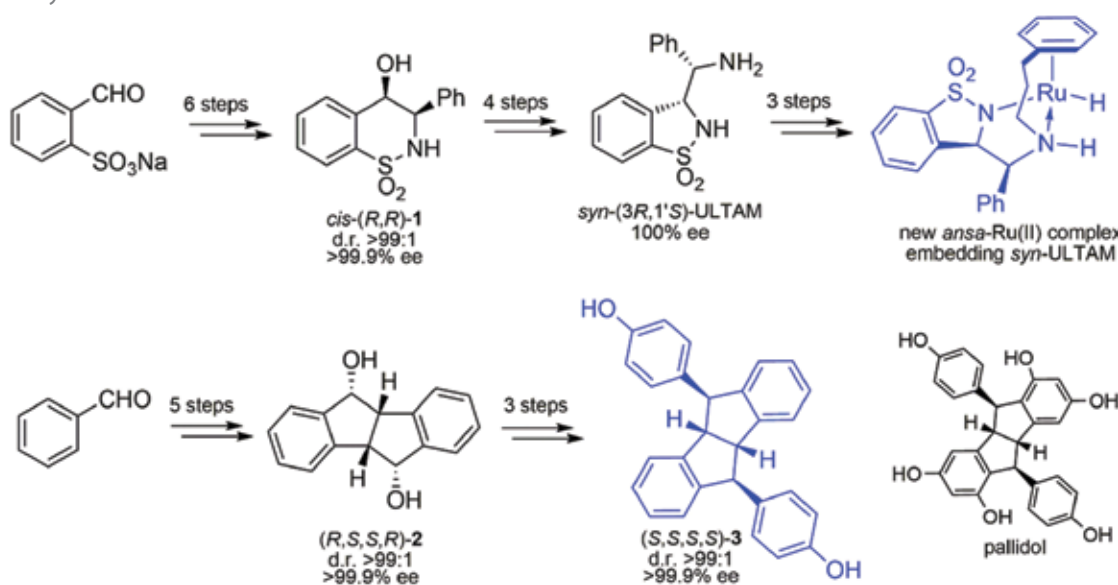
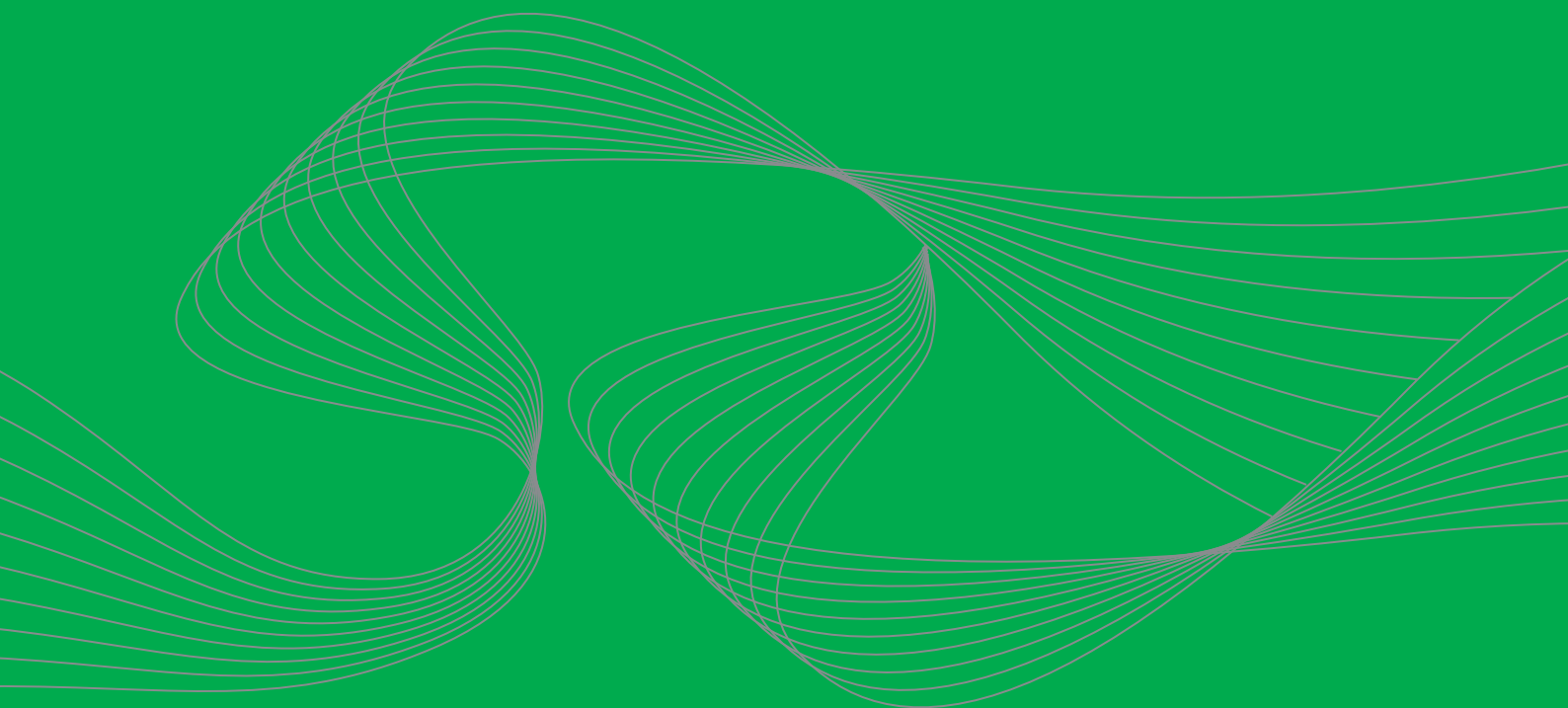


Figure 2. Application of the methods presented for the total synthesis of a new *ansa*-Ru(II) complex and an analogue of pallidol

The synthetic approaches presented expand the reaction toolbox of organic chemistry for the preparation of stereoarrayed scaffolds with multiple stereogenic carbons. The starting racemic ketones are accessible via classical chemical transformations and the controlled one-pot formation of the contiguous stereogenic carbon atoms is achieved using highly selective homochiral *ansa*-Ru(II) catalysts. The secondary alcohols thus prepared can be converted into more complex molecular structures without loss of stereomeric purity, which additionally extends the range of chemicals accessible via DKR-ATH.

48.



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

Povzetki
Abstracts

Priprava, karakterizacija in uporaba enaminonskih ligandov

URŠA ŠTANFEL, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

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

3-(dimetilamino)propenoati in sorodni enaminoni so znani kot lahko dostopni gradniki za pripravo raznolikih heterocikličnih spojin. Pri našem delu pa smo se osredotočili na lastnosti teh spojin ter na njihovo uporabo na drugih področjih kemije. Najprej smo pripravili novo kombinatorno knjižnico bisenaminonov, ki smo jih nato kot ligande za vezavo različnih kovin uporabili v koordinacijski kemiji. Iz rezultatov smo ugotovili, da je uspešnost vezave znatno odvisna od strukture bisenaminona. Pripravljene bakrove komplekse smo nato uporabili kot katalizatorje pri z bakrom kataliziranih reakcijah cikloadicije med azometin imini in inoni. Podobno kot pri koordinaciji smo tudi tu opazili, da so bile razlike v katalitski učinkovitosti odvisne od strukture enaminona. Znatno izboljšanje učinkovitosti pa smo dosegli z vezavo kompleksov na netopni nosilec. Pri izvedbi reakcij med bis-(N,N-dimetil)enaminoni in diamini dihidrokloridi smo v odvisnosti od reakcijskih pogojev lahko pripravili makrocikel ali polimerne spojine. Novopripravljeni polimerni materiali so hidrolitsko stabilni in absorbirajo UV-svetlobo ter prepuščajo vidno, kar omogoča uporabo polimernih enaminonov tudi za pripravo svetlobnih filtrov.

Preparation, Characterisation and Use of Enaminone Ligands

URŠA ŠTANFEL, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

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

It is known that 3-(dimethylamino)propenoates and related enaminones are easily accessible building blocks for the preparation of various heterocyclic compounds. In our work, however, we focused on the properties of these compounds and their use in other fields of chemistry. Initially, we prepared a new combinatorial library of bis-enaminone compounds, which we then used as ligands for the binding of various metals. The results obtained show that the complex formation is significantly dependent on the structure of bis-enaminone. The catalytic activity of isolated copper complexes was analysed in copper-catalysed cycloadditions between azomethine imines and inons. Similar to coordination properties, it was established that the catalytic efficiency of isolated complexes was closely related to the structure of bis-enaminone ligands. Surprisingly, we achieved a significant improvement in catalytic activity by binding the complexes to an insoluble matrix. When performing reactions between bis-(N,N-dimethylamino) enones and diamines dihydrochlorides, it was observed that changing the reaction conditions allows us to produce a macrocycle as well as polymeric products. These newly prepared polymers are hydrolytically stable and absorb UV light while transmitting the visible light, which means that these new materials could be used in the preparation of light filters.

Matematično modeliranje sprememb električnih lastnosti tkiv in transporta prek celične membrane pri elektroporaciji

JANJA DERMOL-ČERNE, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Damijan Miklavčič**, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Gregor Serša**, Onkološki inštitut Ljubljana

Elektroporacija je začasno neselektivno povečanje prepustnosti celične membrane. Do nje pride, ko biološke celice izpostavimo kratkim visokonapetostnim pulzom. Elektroporacijo uporabljamo pri elektrokemoterapiji, ablaciji tumorjev, vnosu genskega materiala v celice in zdravilnih učinkovin v kožo ter prek nje. Na učinkovitost zdravljenja med drugim vplivamo s parametri električnih pulzov in postavitvijo elektrod, zato ju želimo optimizirati. Ker je izvajanje velikega števila poskusov *in vivo* drago, zamudno in etično sporno, pri optimizaciji uporabljamo matematično modeliranje. Modelirali smo elektroporacijo tkiv, pri čemer smo izhajali iz mehanizmov elektroporacije lipidnih dvoslojev in posameznih celic. Pokazali smo, da bi lahko z modeli prepustnosti celične membrane, celične smrti in depolarizacije oz. akcijskega potenciala nadgradili načrtovanje posegov elektrokemoterapije in ablacije z ireverzibilno elektroporacijo. Elektroporacija spremeni električne lastnosti tkiv, kar lahko uporabimo kot kazalnik njene učinkovitosti. Spremembo električnih lastnosti kože smo opisali z mehanizmi elektroporacije – z nastankom lokalnih transportnih območij v roženi plasti ter por na celičnih membranah. Pri elektrokemoterapiji je za uspešnost zdravljenja najpomembnejši zadosten vnos kemoterapevtika v celice. Razvili smo numerični model, s katerim smo transport kemoterapevtika v tumor izračunali iz poskusov *in vitro*. Z našim modelom zmanjšamo potrebo po poskusih *in vivo*, obenem pa enostavneje raziščemo širši prostor parametrov zdravljenja z elektroporacijo. Z razvitimi modeli bi lahko izboljšali učinkovitost tega zdravljenja, v načrt posega bi lahko vključili izračun znotrajcelične koncentracije kemoterapevtika v tumorjih in spremembe električnih lastnosti tkiv ter zmanjšali krčenje mišic in bolečino, ki sta povezana z dovajanjem visokonapetostnih električnih pulzov.

Mathematical Modelling of Molecular Transmembrane Transport and Changes of Tissues' Dielectric Properties due to Electroporation

JANJA DERMOL-ČERNE, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: **Damijan Miklavčič**, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Gregor Serša**, Institute of Oncology Ljubljana

Electroporation is a temporary non-selective increase in plasma membrane permeability. It occurs when short high-voltage pulses are applied to biological cells. Electroporation is used in electrochemotherapy, tumour ablation, gene electrotransfer, and transdermal drug delivery. Treatment efficacy is affected by the parameters of electric pulses and electrode configuration, both of which need to be optimised. Since performing a large number of experiments is expensive, time-consuming and ethically not always acceptable, we used mathematical modelling. We modelled tissue electroporation by including the mechanisms of electroporation of lipid bilayers and individual cells. We demonstrated that by applying the mathematical models of electroporation, cell death and depolarization, treatment planning of electrochemotherapy and irreversible electroporation could be improved. Electroporation changes the electrical properties of tissues, which could be used as an indicator of tissue electroporation. The change in electrical properties of skin was described with mechanisms of electroporation: the formation of local transport regions in the stratum corneum and pores on the plasma membrane. In electrochemotherapy, a high-enough chemotherapeutic uptake is critical for a successful treatment. We developed a numerical model and described the transport of cisplatin in the tumour by using *in vitro* experiments. Our model reduces the need for *in vivo* experiments, allowing us at the same time to explore a broader range of parameters without ethical considerations. With our models, we could improve the treatment planning, calculate the intracellular concentration of chemotherapeutic *in vivo* or change in electrical properties of the tissues, and reduce muscle contraction and pain associated with the delivery of high-voltage electric pulses.

Nove rutenijeve koordinacijske spojine z N,N-, N,O- in N,N,N-donorskimi ligandi

KATJA TRAVEN, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Mentor: **Iztok Turel**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

V zadnjem času so rutenijevi kompleksi zaradi zanimivih lastnosti in posledično potencialne uporabe na različnih področjih (kataliza, sončne celice, zdravila za raka) pogosto predmet proučevanja. Zato je bil namen našega raziskovalnega dela sintetizirati različne vrste rutenijevih koordinacijskih spojin z naslovnimi ligandi ter jih popolnoma fizikalno-kemijsko okarakterizirati z NMR, IR, UV-Vis, ESI-MS, CHN-elementno analizo in rentgensko strukturno analizo. Z NMR-spektroskopijo smo raziskali stabilnost spojin v vodi in DMSO-ju. V sodelovanju s slovenskimi in tujimi raziskovalnimi skupinami smo proučevali možne interakcije nekaterih sintetiziranih spojin z različnimi encimi, ki jih lahko povezujemo z rakavimi obolenji (aldo-keto reduktaze in 15-lipoksigenaze-1). Rezultati so pokazali, da nekatere rutenijeve koordinacijske spojine inhibirajo delovanje obeh omenjenih encimov ter da pride do nekompetitivne inhibicije, torej do vezave inhibitorja na kompleks substrat-encim. Opažen je bil tudi zanimiv fenomen, ki se imenuje sočasni polimorfizem (različni polimorfi se izkristalizirajo pod istimi pogoji). Ta pojav je pri rutenijevih kompleksih le redko opažen, kljub temu pa njegova vloga ni zanemarljiva.

New Ruthenium Coordination Compounds with N,N-, N,O- and N,N,N-Donor Ligands

KATJA TRAVEN, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*
Supervisor: **Iztok Turel**, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

Ruthenium complexes are currently very intensely studied due to their numerous interesting properties and possible applications in various fields of use (e.g. catalysis, solar cells, or anticancer medicines). Therefore, our goal was to synthesise various types of ruthenium coordination compounds with the title ligands and study their physicochemical properties by using various methods, such as NMR, IR, UV-Vis, ESI-MS, CHN elemental analysis and X-ray structural analysis. The stability of compounds in aqueous and DMSO solutions was studied by means of NMR spectroscopy. Above all, the interactions of appropriate novel compounds with two cancer-related enzymes (aldo-keto reductases and 15-lipoxygenase-1) were studied. The results of the enzyme inhibition tests reveal that some of the novel ruthenium compounds inhibit the activities of both enzymes. The enzyme kinetic analysis showed uncompetitive inhibition, which indicates that the inhibitor binds to the substrate-bound enzyme. An interesting phenomenon called concomitant polymorphism (i.e. simultaneous crystallisation of different polymorphs) was also observed. It is rare in ruthenium complexes, but it can provide useful information for various disciplines if properly recognised and studied.

Ugotavljanje obremenitve pitnih, površinskih in odpadnih vod z zdravilnimi učinkovinami in njihovimi metaboliti v Sloveniji

ANITA KLANČAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Jurij Trontelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Ostanki zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v okolju so opredeljeni kot novodobna mikroonesnažila. V okolje vstopajo predvsem kot posledica uporabe v humani in veterinarski medicini. V okviru doktorske naloge smo razvili ustrezno analitsko metodologijo za spremljanje prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v okolju. Razvili smo dva inovativna pristopa na osnovi ekstrakcije na trdnem nosilcu – SPE-DEX in Twister®. V nadaljevanju smo razvili še dodatni metodi za ekstrakcijo iz površinskih in pitnih vod na osnovi ekstrakcije na trdnem nosilcu. Uporabili smo ročni sistem SPE. Poleg tega smo kot prvi optimizirali metodo QuEChERS za ekstrakcijo zdravilnih učinkovin iz ribjega tkiva. Kot učinkovita se je pokazala pri zmanjšanju učinka matrice, ki je glavni moteči dejavnik pri analizi vzorcev, bogatih z lipidi. Poleg priprave vzorca smo razvili instrumentalno metodo LC-MS/MS, ki v zelo kratkem času (8 minut) omogoča sočasno analizo več kot 100 različnih snovi. Metodologijo smo uporabili za ugotavljanje ostankov zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v okolju. Njihovo prisotnost smo potrdili v odpadnih, površinskih in pitnih vodah, v padajočih koncentracijah v tem vrstnem redu. Prav tako smo jih zaznali v ribjih tkivih. Na koncu smo raziskavo dopolnili z razvojem metode za razgradnjo teh mikroonesnažil na osnovi elektrokemijske oksidacije. Dokazali smo učinkovito razgradnjo tako na laboratorijski ravni kot v realnem okolju. Metodo predlagamo kot dodaten postopek čiščenja v bolj obremenjenih vodah, kakršne so na primer bolnišnične odpadne vode. Menimo, da podatki iz naših raziskav prispevajo k zavedanju o trenutnem stanju in so lahko osnova za uvedbo stalnega spremljanja izpustov zdravilnih učinkovin v okolje ter lahko pomagajo pri oceni njihovega vpliva na okoljske organizme. Poleg tega smo dokazali, da je predstavljena metodologija ključno orodje za natančno spremljanje njihovih koncentracij.

Determination of the Pharmaceuticals and Their Metabolites Burden in Drinking, Surface and Waste Waters in Slovenia

ANITA KLANČAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Jurij Trontelj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Pharmaceuticals have been recently classified as emerging pollutants. They enter the environment mainly as a result of their use in human or veterinary medicine. In the doctoral thesis, we developed sample preparation protocols and instrumental analytical methods. Regarding the sample preparation of waste waters, two innovative approaches based on solid phase extraction were developed: SPE-DEX and Twister®. Subsequently, two more extraction methods were devised. A manual solid phase extraction was used for extraction from surface and drinking waters. This was followed by the optimisation of QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) protocol for extraction from fish tissue. The method proved to be sufficient for matrix reduction, which significantly facilitates the instrumental analysis. In addition to setting up all sample preparation protocols, an advanced instrumental method for simultaneous analysis of over 100 analytes was developed and optimised. The method makes use of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry with a single run of eight minutes per sample. The methodologies presented were used for monitoring pharmaceutical residues in the environment. Their presence was confirmed in all sample types tested, namely in waste water, surface water, drinking water, and fish tissue. In addition, an efficient electrochemical process for oxidative degradation of pharmaceuticals in waste waters was devised and produced good laboratory and non-laboratory results. We presume that this new technology could be a viable and feasible option for upgrading existing wastewater treatment plants in order to achieve a significantly greater cleaning efficiency and reduce the environmental burden, especially in hospital waste waters. The method could also be used as an important tool for systematic monitoring of pharmaceuticals commonly found in the environment. The data presented could serve as a basis for the introduction of routine monitoring and risk assessment.

Samoemulgirajoči dostavni sistemi (SEDDS): novo upanje v srcu oralno dostavljenih makromolekul

OŽBEJ ZUPANČIČ, Center za kemijo in biomedicino, Innsbruck

Mentor: **Andreas Bernkop-Schnürch**, Center za kemijo in biomedicino, Innsbruck

Namen doktorskega dela je bila razširitev uporabe samoemulgirajočih dostavnih sistemov (SEDDS) na oralno dostavo hidrofilnih makromolekul, kot so peptidi in nizkomolekularni heparini (LMWH). Hidrofilne makromolekule lahko raztopimo v lipofilnih SEDDS tako, da jim lipofilnost povečamo s t. i. hidrofbnim ionskim parjenjem, kjer se peptidni protiioni zamenjajo z amfifilnimi surfaktanti, kar privede do bolj lipofilnih kompleksov makromolekula-surfaktant (M/S). Povečano lipofilnost M/S smo izmerili z določitvijo porazdelitvenega koeficienta ($\log P$, $\log D$) nastalih kompleksov. Lipofilnost je bila v nekaterih primerih zadostna, da smo v SEDDS raztopili celo do 10,6 % (m/m) M/S. SEDDS smo primarno ovrednotili glede na emulgirajoče lastnosti, stopnjo lipolize s pankreasno lipazo in citotoksičnost na modelu Caco-2. V nadaljevanju smo SEDDS z vključenim M/S *in vitro* ovrednotili glede na profil sproščanja makromolekule, difuzije skozi mukozno plast ter njihovo sposobnost zaščite M/S pred proteolizo s pankreasnimi proteazami, tiol-disulfidnimi reakcijami in reakcijami deaminacije. Eksperimenti so potrdili kontrolirano sproščanje makromolekule iz SEDDS, pospešeno difuzijo skozi mukozno plast ter upočasnen razpad makromolekule v prisotnosti pankreasnih proteaz in tiolov. Učinkovitost SEDDS kot oralnih dostavnih sistemov za LMWH je bila preizkušena tudi *in vivo* na podganjem modelu. Absolutna biološka uporabnost LMWH v SEDDS po oralni administraciji je bila 2-odstotna, medtem ko v vodni raztopini LMWH učinkovine nismo zaznali v centralnem krvnem obtoku.

Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): New Hope in the Heart of Orally Delivered Macromolecules

OŽBEJ ZUPANČIČ, CCB – Centrum für Chemie und Biomedizin, Innsbruck

Supervisor: **Andreas Bernkop-Schnürch**, CCB – Centrum für Chemie und Biomedizin, Innsbruck

The aim of this dissertation was to expand self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) technology to oral delivery of hydrophilic macromolecular drugs, such as peptides and low molecular weight heparins (LMWHs). In order to incorporate hydrophilic peptides with cationic and anionic net charge as well as LMWH, the lipophilicity of the model drugs was increased via hydrophobic ion pairing, where the counter ions were replaced by amphiphilic surfactants, rendering in a comparatively more lipophilic macromolecule-surfactant complex (M/S). As sufficient lipophilicity of such complexes was required to dissolve M/S in the lipid SEDDS matrix, the partitioning coefficient ($\log P$, $\log D$) of M/S was determined. The lipophilicity of the M/S was sufficient to dissolve even up to 10.6% (w/w) M/S in corresponding SEDDS. Intrinsic characterisation of SEDDS, such as emulsification properties, lipolysis by pancreatic lipase and cytotoxic effects on a Caco-2 model, was performed. Moreover, SEDDS containing M/S were characterised *in vitro* regarding drug release profile, mucus permeation properties and their protective effect against proteolysis by pancreatic proteases, thiol-disulphide reactions and deamination reactions. SEDDS containing M/S showed a sustained release profile, increased mucus permeation and protective effect against pancreatic proteases and thiol-disulphide reactions. Finally, the *in vivo* evaluation of orally administered SEDDS containing LMWH in a rat model demonstrated the proof of concept, where the absolute oral bioavailability of LMWH in SEDDS was 2% compared to LMWH aqueous solution, where no LMWH was detected in the central circulation.

Selektivna katalitska funkcionalizacija vezi C–H dušikovih heterocikličnih substratov

HELENA BRODNIK ŽUGELJ, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Mentor: **Bogdan Štefane**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

Razvili smo učinkovite metode »one-pot«, katalizirane s kovinami prehoda za sintezo izbranih kinolinskih derivatov. Te metode predstavljajo preprost pristop k sintezi molekularno kompleksih kinolinov s potencialnimi biološkimi lastnostmi. 8-arilkinolinske analoge smo uspešno pripravili z dvostopenjsko s paladijem katalizirano metodo »one-pot«, katere reakcijska sekvenca je sestavljena iz Suzuki-Miyaurove reakcije, ki ji sledi neposredno C–H ariliranje, ne da bi bila potrebna izolacija intermediata. Z razvito multikomponentno multikatalizirano reakcijo »one-pot«, ki vključuje kombinacijo z rodijem kataliziranega hidroariliranja (hetero)arilboronskih kislin z 2-vinilpiridini in s paladijem kataliziranega neposrednega intramolekularnega C–H ariliranja, smo pripravili širok nabor dihidro(hetero)arilkinolinov. Obenem smo pokazali, da je v eni reakcijski zmesi mogoče združiti dve katalitski zvrsti, ki lahko neodvisno katalizirata vsaka svojo pretvorbo.

Selective Catalytic Functionalisation of C-H Bonds of Nitrogen Heterocyclic Substrates

HELENA BRODNIK ŽUGELJ, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*
Supervisor: **Bogdan Štefane**, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

A series of quinoline derivatives was prepared through newly developed efficient and step-economic transition-metal catalysed protocols. The methodologies developed present a simple and straightforward approach to the construction of molecularly complex quinoline compounds of biologically potent features. 8-Heteroaryl substituted quinolines were prepared by a palladium-catalysed coupling of organoboron reagents with 8-bromoquinolines, which served as coupling partners for further palladium-catalysed direct C-H functionalisation on the five-membered heteroaryl ring with selected aryl bromides in a one-pot process. The development of a multi-component multi-catalyst one-pot reaction procedure combining rhodium-catalysed hydroarylation of (hetero)arylboronic acids to 2-vinylpyridines followed by a palladium-catalysed direct intramolecular C-H arylation reaction enabled the synthesis of a broad variety of dihydro(hetero)arylquinolines proving that the two catalytic cycles can occur independently within a single vessel.

Vrednotenje imunske modulacije in učinkovitosti agonista receptorja EP4 in monoklonskih protiteles *in vitro*

TIJANA MARKOVIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Irena Mlinarič Raščan**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Ovrednotenje imunomodulatornih učinkov spojin je pomemben del predkliničnega in toksikološkega vrednotenja zdravil. S tem namenom smo najprej vzpostavili nov testni sistem *in vitro* za vrednotenje imunotoksičnih in imunomodulatornih lastnosti spojin na osnovi limfoblastoidnih celičnih linij, nato pa smo ga uporabili za ovrednotenje imunomodulatornega delovanja agonista prostaglandinskega receptorja EP4, PgE1-OH. Nadalje smo raziskali pomen receptorja EP4 kot potencialne terapevtske tarče za zdravljenje B-celičnih levkemij in limfomov. PgE1-OH je zmanjšal aktivnost NF- κ B v celični liniji Ramos Burkittovega limfoma, kar je vodilo v sinergistično delovanje z bortezomibom in doksorubicinom. PgE1-OH je sinergistično deloval tudi z biološkima zdraviloma rituksimabom in ofatumumabom, za katera smo predhodno potrdili, da inducirata s komplementom povzročeno citotoksičnost *in vitro*. Agonist EP4 je induciral apoptozo v primarnih limfocitih B ($EC_{50} = 13,53 \mu M$; $N = 151$), izoliranih iz polne krvi bolnikov z diagnozo kronične limfocitne levkemije (KLL), ki so privolili v sodelovanje v raziskavi. Posebnega pomena je odkritje, da je PgE1-OH deloval selektivno citotoksično *in vitro* tudi pri celicah KLL bolnikov z delecijo gena TP53, ki so odporni proti standardni terapiji. PgE1-OH je pri celicah KLL deloval sinergistično s fludarabinom, kar bi lahko odpiralo nove možnosti za zdravljenje. Receptor EP4 smo tako ovrednotili kot obetavno terapevtsko tarčo za zdravljenje B-celičnih levkemij in limfomov.

Evaluation of Immune Modulation and Efficacy of EP4 Receptor Agonist and Monoclonal Antibodies *In Vitro*

TIJANA MARKOVIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Irena Mlinarič Raščan**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Evaluation of the immunomodulatory effects of compounds is an important part of preclinical and toxicological evaluation of medicines. Hence, we established a novel *in vitro* test system for evaluation of immunotoxic and immunomodulatory properties of compounds based on lymphoblastoid cell lines, which we utilised to evaluate immunomodulatory properties of prostaglandin EP4 receptor agonist, PgE1-OH. Next, EP4 receptor was evaluated as a potential therapeutic target for the treatment of B-cell leukaemia and lymphoma. PgE1-OH reduced the activity of NF- κ B in the Burkitt's lymphoma cell line Ramos, which led to synergistic effects with bortezomib and doxorubicin. PgE1-OH also acted synergistically with monoclonal antibodies rituximab and ofatumumab, for which the induction of complement dependent cytotoxicity *in vitro* was first confirmed. PgE1-OH induced apoptosis in malignant lymphocytes B ($EC_{50} = 13.53 \mu M$, $N = 151$) isolated from whole blood of patients with the diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia (CLL) after their informed consent was obtained. Of particular importance is the discovery that PgE1-OH acted selectively cytotoxic *in vitro* in CLL cells obtained from patients who are resistant to standard therapy and carry the deletion of the TP53 gene. Moreover, PgE1-OH acted synergistically with fludarabine, which might offer novel therapeutic options. In conclusion, EP4 receptor was evaluated as a promising therapeutic target for the treatment of B-cell leukaemia and lymphoma.

Načrtovanje visokotlačnih procesov za predelavo polimerov in izboljšave prenosa toplote

GREGOR KRAVANJA, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

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

Somentorici: Mojca Škerget, Maša Knez Hrnčič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Disertacija je razdeljena na tri osrednja poglavja: procesiranje polimerov in formulacija zdravilnih učinkovin, merjenje transportnih lastnosti iz geometrije kaplje in študij prenosa toplote pri nadkritičnih pogojih. V prvem delu smo uporabili visokotlačni postopek pridobivanja praškastih produktov, ki nadkritični CO₂ izkorišča za formulacijo slabo topnih učinkovin nimodipina, fenofibrata in esomeprazola na biorazgradljive polimere, da bi tako izboljšali topnost in biološko dostopnost omenjenih učinkovin. Uporabili smo biorazgradljiva polimera polioksietilen stearyl eter in polietilen glikol. Ugotovili smo, da kombinacija zmanjšanja velikosti delcev in vzajemnega vpliva med učinkovino in hidrofilnimi nosilci pripomore k povečanju hitrosti raztapljanja dobljenih praškastih delcev in posledično k večji biološki dostopnosti. V drugem delu smo iz geometrije kaplje proučili vpliv nečistoče argona na medfazno napetost, difuzijske koeficiente in kapaciteto skladiščenja. Ugotovili smo, da sočasno skladiščenje argona in CO₂ zmanjša varnost in kapaciteto skladiščenja in poveča difuzijo skozi geološke pregrade. V tretjem delu doktorske naloge smo proučevali povečano učinkovitost prenosa toplote v bližini kritične točke CO₂, etana in njune azeotropne mešanice.

High-Pressure Process Design for Polymer Treatment and Heat Transfer Enhancement

GREGOR KRAVANJA, *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor*

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

Co-supervisors: Mojca Škerget, Maša Knez Hrnčič, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

The thesis is divided into three main parts: polymer processing and formulation of active substances, measurements of transport properties from pendant drop geometry, and study of heat transfer under supercritical conditions. In the first part, high-pressure spraying process involving green solvent supercritical CO₂ was applied to the biodegradable materials polyoxyethylene stearyl ether and polyethylene glycol for the incorporation of the insoluble active substances nimodipine, fenofibrate, and esomeprazole with the purpose of improving their bioavailability and dissolution rate. It was observed that a combination of process parameters, including particle size reduction and interactions between active substances and hydrophilic carriers, contributed to enhancing the dissolution rates of precipitated solid particles. In the second part, the effect of argon as a co-contaminant in a CO₂ stream on the interfacial tension, diffusion coefficients, and storage capacity was studied from drop geometry. It was found that co-injecting argon with CO₂ stream decreases storage capacity, increases diffusivity through the caprock, and affects safety. In the third part, enhanced heat transfer performance of CO₂, ethane and their azeotropic mixture at high pressures and temperatures was studied.

Gvanidinijski iminosladkorji kot inhibitorji glikozidaz

ALEN SEVŠEK, *Univerza v Utrechtu*

Mentor: Roland J. Pieters, Univerza v Utrechtu

Somentor: Nathaniel I. Martin, Univerza v Utrechtu

Gaucherjeva bolezen (GD) je prevladujoča bolezen lizosomskega shranjevanja, ki jo povzroča mutacija v genu GBA. Zaradi okvarjenega gena se zmanjša aktivnost encima β -glukocerebrosidaza (GBA), ki hidrolizira substrat glukozilceramid (GlcCer). Zmanjšana aktivnost GBA zato povzroči postopno kopičenje nerazgrajenega GlcCer, kar ima resne klinične simptome. V terapevtskih strategijah za zdravljenje takšnih bolezni je poudarek na zmanjšanju koncentracije glikosfingolipidov (npr. GlcCer) v lizosomu. Učinkovito zdravljenje s t. i. farmakološkimi šaperoni (PC) večinoma vključuje inhibitorje encimov, ki se vežejo na napačno sestavljeni encim in ga stabilizirajo, s čimer omogočijo njegov prenos do lizosoma, preprečijo predčasno razgradnjo potrebnega encima in tako sprožijo nujno potrebno razgrajevanje presežnega substrata. Iminosladkorji so močni in selektivni zaviralci glikozidnih encimov in se v nekaterih primerih reverzibilno vežejo na aktivno mesto njihovega tarčnega encima na način, ki je odvisen od pH. Analoge različnih sladkornih gradnikov in njihovih modifikacij smo sintetizirali in ovrednotili z različnimi biološkimi tehnikami. Pokazali smo, da so selektivni in izjemno potentni za encim GBA ter da v nekaterih primerih povečajo njegovo koncentracijo v lizosomu. Naša raziskava jasno kaže, da dodatek gvanidinijevega motiva v serijo preiskovanih iminosladkorjev v primerjavi s spojinami na trgu okrepi inhibicijo GBA, in dokazuje, da je eleganten pristop s farmakološkimi šaperoni privlačna tema za razvoj novih terapevtskih sredstev za zdravljenje lizosomskih bolezni. V raziskavi, ki jo predstavlja ta doktorska disertacija, smo odkrili serijo specifičnih iminosladkornih inhibitorjev, ki dajejo odlično izhodišče za izboljšanje kvalitete življenja bolnikov z Gaucherjevo boleznijo.

Guanidinium Iminosugars as Glycosidase Inhibitors

ALEN SEVŠEK, *Utrecht University*

Supervisor: Roland J. Pieters, Utrecht University

Co-supervisor: Nathaniel I. Martin, Utrecht University

Gaucher disease (GD) is a dominant lysosomal storage disease. The condition is caused by a mutation in the glucocerebrosidase gene, which can lead to a reduced activity of β -glucocerebrosidase (GBA), the enzyme responsible for the hydrolysis of glucosylceramide (GlcCer) substrate. A deficiency in the GBA activity can result in a progressive accumulation of the non-degraded GlcCer, leading to serious clinical symptoms. The primary focus of therapeutic strategies has been to reduce the concentration of glycosphingolipids within the lysosome (i.e. GlcCer). Among the different therapeutic approaches for restoring the balance of the accumulated substrate is also the pharmacological chaperone therapy (PCT). Pharmacological chaperones (PC) are primarily small inhibitors that are capable of stabilising a misfolded enzyme and thus prevent its ultimate degradation. Certain iminosugars are highly potent and selective inhibitors of glycosidases that can reversibly bind to the active site of their target enzyme in a pH-dependent manner. It may seem paradoxical to use an inhibitor to enhance enzyme activity; however, positive outcomes of such therapeutic approaches, discussed in this doctoral thesis, have been observed. A series of iminosugar modifications have been investigated and evaluated using different biological techniques, which exhibited a strong inhibition of the targeted enzyme and resulted in the final enzyme enhancements. In this study, guanidinium iminosugars proved to have superior effects over the current therapeutics on the market, offering great prospects for this technique. Research in this doctoral thesis has revealed a series of promising pharmacological chaperones that could potentially improve the quality of life of Gaucher patients in the future.

Strukturne študije z gvanini in citozini bogatih oligonukleotidov, povezanih z nevrodegenerativnimi obolenji

JASNA BRČIČ, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Mentor: **Janez Plavec**, *Kemijski inštitut Ljubljana*

Z gvanini bogate nukleinske kisline lahko v prisotnosti ionov K^+ tvorijo nenavadne štirivijačne strukture, imenovane G-kvadrupleksi. Najpogostejši genetski vzrok za dedno obliko dveh nevrodegenerativnih obolenj, amiotrofične lateralne skleroze (ALS) in frontotemporalne demence (FTD), je močno povečano število ponovitev zaporedja $d(G_4C_2)$, ki se nahaja v nekodirajočem območju gena C9orf72. Ključno vlogo v bolezenskem mehanizmu ALS in FTD naj bi imele nenavadne strukture, med njimi G-kvadrupleksi, ki jih te ponovitve zavzamejo. Z uporabo NMR-spektroskopije in komplementarnih metod smo pokazali, da oligonukleotidi, ki vsebujejo ponovitve $d(G_4C_2)$, v prisotnosti ionov K^+ tvorijo več različnih G-kvadrupleksnih struktur. Z zamenjavo ostanka dG z gvaninskim analogom 8Br-dG smo pri oligonukleotidu, ki vsebuje štiri ponovitve $d(G_4C_2)$, ravnotežje potisnili proti dvema G-kvadrupleksoma, ki ustrezata strukturama z največjo populacijo pri naravnem oligonukleotidu. Na razmerje med populacijama dveh G-kvadrupleksnih zvrsti vplivajo pogoji zvijanja. Ena zvrst prevladuje v rahlo kislem okolju in je favorizirana kinetično, druga pa prevladuje v nevtralnem okolju in je termodinamično bolj stabilna. Z NMR-spektroskopijo smo določili njuni prostorski strukturi. G-kvadrupleksa imata podobno topologijo, vendar se razlikujeta tako po strukturalnih kot dinamičnih lastnostih. Strukturi bi lahko predstavljali potencialni tarči za ligande, usmerjene proti pomnoženim ponovitvam $d(G_4C_2)$ pri ALS in FTD.

Structural Study of Guanine and Cytosine Rich Oligonucleotides Linked to Neurodegenerative Disorders

JASNA BRČIČ, *National Institute of Chemistry Ljubljana*

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

Guanine rich nucleic acids can, in the presence of K^+ ions, form unusual four-stranded structures called G-quadruplexes. The most common genetic cause of two neurodegenerative disorders, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD), is a large increase in the number of $d(G_4G_2)$ repeats located in the C9orf72 gene. Formation of non-canonical structures including G-quadruplexes within expanded $d(G_4G_2)$ repeats is considered crucial in the disease mechanism of ALS and FTD. With NMR and complementary methods, we showed that oligonucleotides with $d(G_4G_2)$ repeats form multiple G-quadruplex structures in K^+ solution. Single substitution of dG with its analogue 8Br-dG in oligonucleotide with four $d(G_4G_2)$ repeats directs its folding towards two G-quadruplex structures, which correspond to the two structures formed with the highest population in the natural oligonucleotide. Both G-quadruplex species exhibit high thermal stability; however, their relative populations in solution depend on folding conditions. One G-quadruplex structure is kinetically favoured and forms at low pH, whereas the other is favoured thermodynamically and at neutral pH. Although the two G-quadruplex structures are topologically very similar, they exhibit unique structures and distinct dynamic properties. The structures could represent potential targets for small molecules directed toward ALS and FTD related $d(G_4C_2)$ 4 repeats.

Iskanje novih biokemijskih označevalcev endometrioze in raka endometrija s pristopi proteomike in metabolomike

TAMARA KNIFIC, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Tea Lanišnik Rižner, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Endometrioza in rak endometrija sta hormonsko odvisni, pogosti ženski ginekološki bolezni. Namen naših študij na področju endometrioze je bila identifikacija biokemijskih označevalcev, ki skupaj s kliničnimi podatki bolnic predstavljajo osnovo za statistično analizo, modeliranje in gradnjo diagnostičnih modelov, ki bi jih lahko prenesli v klinično prakso. Pri bolnicah z rakom endometrija pa je bila namen naših študij identifikacija tako diagnostičnih kot tudi prognozičnih biokemijskih označevalcev. Diagnostični biokemijski označevalci endometrioze in raka endometrija bi omogočili zgodnejše odkritje bolezni. To bi vodilo v zgodnejše zdravljenje, kar bi preprečilo napredovanje bolezni. S prognozičnimi biokemijskimi označevalci raka endometrija pa bi lahko identificirali bolnice z bolj ali manj agresivno obliko bolezni ter temu ustrezno prilagodili obseg in vrsto operativnega posega. Biokemijske označevalce endometrioze in raka endometrija smo iskali med posameznimi proteini (CA-125, HE4, ARX) in s pristopi tarčne »omike« med številnimi proteini (od 40 do 900 različnih proteinov) in metaboliti (od 163 do 188 različnih metabolitov). Na osnovi posameznih rezultatov smo oblikovali več različnih diagnostičnih in/ali prognozičnih modelov za bolnice z endometriozo ali rakom endometrija. S študijami smo tako prispevali k identifikaciji biokemijskih označevalcev endometrioze in raka endometrija, ki bi jih lahko po dodatnih validacijskih študijah prenesli v klinično prakso.

Identification of Novel Biomarkers for Endometriosis and Endometrial Cancer Using Proteomic and Metabolomic Approaches

TAMARA KNIFIC, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Supervisor: Tea Lanišnik Rižner, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Endometriosis and endometrial cancer are hormone-dependent, common gynaecological diseases. The aim of our studies on endometriosis and endometrial cancer was the identification of biomarkers that can be combined with patients' clinical data as the starting point for statistical analysis and construction of diagnostic models, which can be translated into clinical practice. Diagnostic biomarkers of endometriosis and endometrial cancer will enable their earlier detection, allowing earlier treatment to prevent the progression of these diseases. Similarly, we aimed to identify prognostic biomarkers of endometrial cancer, through which it would be possible to better define the aggressive nature of these cancers, and hence to adjust the treatment approaches for these patients. We searched for biomarkers of endometriosis and endometrial cancer among individual proteins (i.e. CA-125, HE4, ARX) as well as in a panel of proteins (i.e. from 40 to 900 different proteins) and metabolites (i.e. from 163 to 188 different metabolites). Based on the results, we constructed several different diagnostic and/or prognostic algorithms for patients with endometriosis or endometrial cancer. These studies have contributed to the identification of biomarkers of endometriosis and endometrial cancer, which could be translated into clinical practice following additional validation studies.

Ugotavljanje obhodnih časov mini tablet v vrtninoslojnih oblagalnikih z metodo fotoluminiscence

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

Vrtninoslojna tehnologija je najpogostejša metoda za oblaganje majhnih delcev. Potek in optimizacija procesa oblaganja sta navadno odvisna od operaterjevih izkušenj, kakovost obloge pa v veliki meri tudi od funkcionalnosti in zasnove oblagalnika. Podrobno poznavanje prednosti in slabosti posameznega oblagalnika je navadno manjkajoči člen znanja tako uporabnika kot tudi proizvajalca procesne opreme. Poznavanje vpliva procesnih parametrov, tudi konstrukcijskih modifikacij opreme, na potek procesa in na njegove osnovne mehanizme je nujno, če želimo procesno opremo uporabiti na optimalen način. Z optičnim sistemom za zaznavo prehodov fotoluminiscenčno označene mini tablete smo določali variabilnost obhodnih časov mini tablet v posameznih modifikacijah Wursterjeve procesne komore za oblaganje delcev. Eksperimentalni načrt je zajemal vpliv procesnih parametrov, velikosti mini tablet, mase polnitve in vpliv konstrukcijskih modifikacij komore na porazdelitev obhodnih časov mini tablet. Vsi preizkušani parametri procesa so pokazali signifikanten vpliv na porazdelitev obhodnih časov mini tablet. Z enostavnimi simulacijami oblaganj smo razjasnili razliko med klasično in modificirano (swirl) Wursterjevo komoro. Porazdelitev števila prehodov posamezne mini tablete med oblaganjem v modificirani Wursterjevi komori je ožja, pomaknjena k nižjim vrednostim in med serijami mnogo bolj ponovljiva v primerjavi s klasično Wursterjevo komoro, kjer je porazdelitev širša in med serijami neponovljiva. Analiza meritev obhodnih časov omogoča vpogled v proces in njegovo razumevanje. Tako industrijsko gledano omogoči določanje kritičnih parametrov procesa, hkrati pa lahko olajša nadaljnje optimizacije in načrtovanje procesa oblaganja mini tablet v novih napravah po principu vrtninoslojne tehnologije.

Determination of Mini-Tablet Cycle Times in Fluid-Bed Coaters Using a Photoluminescence Method

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

Fluid-bed coating is the preferred method for coating small particles. The process and its optimisation are often based on the operator's experience, but the product quality also depends in a great deal on the design and functionality of the coating apparatus. The missing link is usually the understanding of the advantages and weaknesses of a specific type of a fluid-bed coater. In order to ensure optimal process development, the influence that process parameters (their design and functioning) have on the fundamental mechanisms controlling the process has to be well understood. The purpose of this work was to evaluate the effect of changes in the design of the distribution plate and different process variables on the mini-tablet circulation pattern in a fluidised bed coating chamber, and to understand the origin of the variability of the coating thickness of mini-tablets that appears during a fluid-bed coating process. A photoluminescence detection system for tracing mini-tablet cycle times was used to determine the cycle time distribution in different types of bottom-spray fluid-bed coaters. The influence of mini-tablet size, batch size, fluidisation air flow rate and partition gap on the cycle time distributions of mini-tablets was investigated. A significant impact of all process variables on the cycle time distributions of mini-tablets was observed. To explicitly present the impact of fluid-bed coater modifications on the circulation-time distribution, simple coating simulations were performed. Mainly, conventional Wurster and swirl Wurster process chambers were compared. A swirl Wurster chamber was found to ensure cycle time distributions without outliers and greater batch-to-batch consistency. The cycle time distribution analysis offers a great insight into the coating process. It serves as a powerful tool to characterise and optimise critical process parameters. In addition, it enables further process optimisations and designs of new bottom-spray fluid-bed coaters.

Navidezna topnost učinkovin v bioloških medijih s slikovno analizo posameznih delcev

JERNEJ ŠTUKELJ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: **Julijana Kristl**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorja: **Jouko Yliruusi**, **Sami Svanbäck**, Univerza v Helsinkih

Dve fizikalno-kemijski lastnosti, topnost in stabilnost, sta ključni za uspešen razvoj zdravilne učinkovine v končno farmacevtsko obliko. Obe lastnosti sta tesno povezani s trdnim stanjem učinkovine. Hitra in natančna določitev topnosti in trdnega stanja učinkovine v začetnih fazah razvojnega procesa sta torej ključnega pomena za sprejemanje optimalnih odločitev. Nova metoda slikovne analize posameznih delcev (SPA), s katero lahko v nekaj minutah določimo topnost posameznih kristalov (μg) učinkovine, ima velik potencial za vključitev v razvojni proces zdravil. V nalogi smo raziskali možnosti uporabe SPA-metode, ki presega določitev zgolj absolutne topnosti indometacina γ . Najprej smo preverili uporabnost metode za določanje navidezne topnosti oblike α in amorfnе oblike indometacina v biorelevantnih medijih. Rezultati so pokazali, da je z metodo možno izmeriti topnost oblik α in γ ter amorfnе oblike indometacina v petih medijih, ki se razlikujejo po vsebnosti surfaktantov, ionski moči in pH-vrednosti. Razmerje povprečnih topnosti delcev α v primerjavi z delci γ je bilo v vseh medijih konstantno ($3,33 \pm 0,47$). Nasprotno pa razmerje povprečne topnosti amorfnе oblike v primerjavi z obliko γ ni bilo konstantno. Najvišje (229,6) je bilo v neteščem simuliranem črevesnem mediju, kjer je vsebnost surfaktantov presegala njihovo kritično micelarno koncentracijo, najnižje (18,6) pa v acetatnem pufru brez surfaktantov. V nadaljevanju nam je z metodo slikovne analize uspelo določiti in razlikovati med topnostmi dveh različno pripravljenih amorfnih oblik. Na koncu smo metodo slikovne analize združili s časovno pogojeno Ramansko spektroskopijo, vendar sočasno zajemanje slik in Ramanskega signala ni bilo mogoče zaradi premočne laserske svetlobe. Rezultati kažejo, da bi metodo slikovne analize lahko uporabili za hitro oceno obnašanja zdravilne učinkovine v gastrointestinalnem traktu. Prav tako je z metodo slikovne analize posameznih delcev mogoče določiti pravo navidezno topnost delno stabilnih (α) in nestabilnih (amorfnih) oblik učinkovin. Z nekaj izboljšavami pa bi bilo moč opazovati tudi spremembe trdnega stanja, ki se dogajajo med raztapljanjem amorfnih oblik učinkovin.

Apparent Solubility of Active Substances in Biorelevant Media Using Image-Based Single-Particle Analysis

JERNEJ ŠTUKELJ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Julijana Kristl**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisors: **Jouko Yliruusi**, **Sami Svanbäck**, University of Helsinki

Two physicochemical properties, solubility and stability of active substances, play a major role in the development process of medicinal products. These two properties are highly dependent on the solid-state form of an active substance. Therefore, rapid and accurate solubility measurements and solid-state characterisation in the early stages of the development process of medicinal products are crucial for optimal decision making. A newly developed image-based single-particle analysis (SPA) method capable of acquiring solubility from individual crystals (μg) of an active substance within a few minutes has a great potential for being integrated in the development process of medicinal products. In this thesis, possibilities for using the SPA method beyond equilibrium solubility measurements of γ indomethacin were investigated. First, the applicability of the SPA method for measuring apparent solubility of α and amorphous form of indomethacin in biorelevant media was tested. The method was capable of measuring α , γ and amorphous solubility of indomethacin in five buffers that differ in surfactant concentration, ionic strength and pH value. The average solubility ratio of α -to- γ form particles was constant in all solvents (3.33 ± 0.47). On the contrary, the average solubility ratio of amorphous-to- γ form was not constant. It was the highest (229.6) in a fed-state simulated intestinal fluid, where the concentration of surfactants was above their critical micellar concentration, and lowest (18.6) in acetate buffer without surfactants. Moreover, the method was also able to measure and distinguish between true apparent solubility of two differently prepared and stored amorphous forms of indomethacin. Next, the image based method was coupled with Time-Gated Raman spectroscopy but the simultaneous acquisition of image data and Raman spectra was not achieved as the laser light was too strong. These results show that the SPA method could be used for a quick estimation of active substance behaviour in the gastrointestinal tract. Furthermore, the true apparent solubility of metastable and unstable forms and, with some improvements, also solvent-mediated solid-state changes during dissolution of amorphous forms, could be assessed with the SPA method.

Evaluacija virusne TAR RNA in humane mikro RNA hsa-miR-20a-5p kot biooznačevalcev za telesne rezervoarje HIV-1

ANŽEJ HLADNIK, *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Metka Lenassi, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Jana Ferdin, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Že zgodaj po začetku okužbe s HIV-1 se vzpostavijo telesni rezervoarji virusa, v katerih kljub zelo učinkovitemu zdravljenju ostane prisotna latentna okužba. Ti rezervoarji so ob prekinitvi zdravljenja vir ponovnega vznika okužbe in so zato največja ovira do popolne ozdravitve. Trenutne metode za oceno velikosti telesnih rezervoarjev HIV-1 niso primerne za klinično uporabo, saj imajo številne pomanjkljivosti in dajo nezanesljive ocene. Zunajcelične mikro RNA in eksosomi so še neraziskan vir biooznačevalcev telesnega rezervoarja HIV-1. Proučili smo možnost uporabe virusnega RNA elementa TAR in humane mikro RNA hsa-miR-20a-5p kot biomarkerjev za oceno telesnih rezervoarjev HIV-1. V raziskavo smo vključili 55 posameznikov iz prospektivne opazovalne raziskave SCOPE in jih razdelili v skupine glede na stanje okužbe s HIV-1. Detekcijo smo izvedli na dveh tipih vzorcev – skupni krvni plazmi in eksosomih, izoliranih iz plazme. Prisotnost RNA elementa TAR smo določili s PCR v povezavi z gelsko elektroforezo, izražanje hsa-miR-20a-5p pa smo izmerili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo. RNA elementa TAR smo detektirali v plazmi 63,2 % aviremičnih okuženih preiskovancev. Razlika v izražanju RNA elementa TAR med skupinami preiskovancev je bila statistično značilna, prisotnost RNA elementa TAR pa je bila povezana z višjim razmerjem CD4/CD8 ($p = 0,047$). V plazmi preiskovancev smo detektirali hsa-miR-20a-5p, vendar nismo pokazali statistično značilne razlike v izražanju med skupinami. Omenjena miRNA je obogatena v eksosomih v plazmi preiskovancev, RNA element TAR pa smo detektirali v eksosomih pri 23,7 % aviremičnih preiskovancev. S tem smo pokazali, da ima RNA elementa TAR potencial kot biooznačevalec za oceno velikosti telesnega rezervoarja HIV-1, za boljše razumevanje razmerja pa bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Evaluation of Biomarker Potential of Viral TAR RNA and Human Micro RNA has-miR-20a-5p for HIV-1 Reservoir Size

ANŽEJ HLADNIK, *Faculty of Medicine, University of Ljubljana*

Supervisor: Metka Lenassi, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: Jana Ferdin, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Early in the course of HIV-1 infection, the virus accumulates in reservoirs in the body and latent infection persists in them despite a highly effective therapy. Upon discontinuation of the antiretroviral therapy, these reservoirs represent the source of recurrence of the infection and are therefore the greatest obstacle on the path to a complete cure. Current methods for evaluating the size of HIV-1 reservoirs are not suitable for clinical use as they have numerous drawbacks and give unreliable results. Small extracellular RNAs and exosomes are an unexplored source of biomarkers for reservoirs of HIV-1 in the human body. In this study, we explored the use of viral TAR RNA and human micro RNA hsa-miR-20a-5p as biomarkers for HIV-1 reservoirs. Our study included 55 samples from the SCOPE cohort study, which were separated into groups according to the status of their infection with HIV-1. The RNA detection was performed on two types of samples: whole blood plasma and the exosomes isolated from it with PCR in the case of RNA TAR and qPCR hsa-miR-20a-5p. The RNA TAR element was detected in 63.2% of samples from aviremic subjects. The difference in the expression of TAR RNA among compared groups was statistically significant. The presence of TAR RNA in plasma was associated with a higher CD4/CD8 ratio ($p=0.047$). We detected hsa-miR-20a-5p in the plasma of subjects, but the difference between various groups was not statistically significant. The mentioned miRNA was enriched in exosomes, and TAR RNA was detected in the exosomes of 23.7% aviremic subjects. With this study, we have shown that TAR RNA has some potential as a biomarker for the size of HIV-1 reservoirs, but further studies would be needed to better understand the relationship.

Sklopitev mikroemulzijske elektrokinetične kromatografije brez surfaktantov (SF-MEEKC) z ESI-MS in UV-detekcijo za določitev hidrofilnih in hidrofobnih vitaminov

URŠKA MOHORIČ, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: Mitja Kolar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Frank-Michael Matysik, Faculty of Pharmacy and Chemistry, University of Regensburg

Predstavljena je nova metodologija kapilarne elektroforeze (CE), kjer smo kot pufer uporabili mikroemulzijo brez surfaktantov (SF-MEEKC). MEEKC je najpogostejše sklopljena z UV/VIS-detekcijo, kjer glavno oviro za dobro občutljivost metode predstavlja kratka pot svetlobe skozi vzorec. Možnost sklopitve MEEKC z masno detekcijo (MS) bi bila zaradi povečane občutljivosti metode preferirana, a do sedaj to ni bilo mogoče zaradi uporabe nehlapnih pufrskih raztopin v MEEKC. Najpogostejše uporabljene mikroemulzije vsebujejo surfaktante, kot so SDS, ki v ESI-MS-sistemu povzročijo ionizacijske in spektralne interference, velik signal ozadja in ionsko supresijo. V sklopu magistrske naloge je bila izbrana mikroemulzija pripravljena z mešanjem vode, etanola in 1-oktanola v pravih razmerjih. Mikroemulziji je bil dodan amonijev acetat, ki je služil kot elektrolit in je omogočil nastanek elektroosmotskega toka za separacijo analitov. Amonijev acetat je prav tako primeren za uporabo z UV- in MS-detekcijo. Za potrditev optimizirane metodologije so bili izbrani vodotopni in maščobotopni vitamini. Eden izmed njih je bil tudi vitamin D3, ki smo ga pridobili iz komercialne vitaminske tablete (Vitamin D3 Hevert 4000 IE) in določili njegovo vsebnost z ESI-MS-detekcijo. Narejena je bila tudi primerjava osnovnih parametrov med separacijo z uporabo SDS-mikroemulzij z različnimi koncentracijami elektrolita in pa SFME.

Hyphenation of Surfactant-Free Microemulsion Electrokinetic Chromatography (SF-MEEKC) with ESI-MS and UV Detection for Determination of Water- and Fat-Soluble Neutral Vitamins

URŠKA MOHORIČ, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

Supervisor: Mitja Kolar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Frank-Michael Matysik, Faculty of Pharmacy and Chemistry, University of Regensburg

Microemulsion electrokinetic chromatography is a powerful tool to separate neutral species based on their hydrophobic and hydrophilic properties. However, the conventionally used sodium-dodecylsulphate-based (SDS-based) microemulsions are not compatible with electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS), which is a major disadvantage. In this work, a rather new generation of surfactant-free microemulsions consisting of water, ethanol and 1-octanol was used for surfactant-free microemulsion electrokinetic chromatography (SF-MEEKC). Ammonium acetate was added to the surfactant free-microemulsion (SFME) enabling electrophoretic separation. A separation method for separating a model system of hydrophobic and hydrophilic neutral vitamins was developed using UV/VIS detection in the ammonium acetate. The method was characterised regarding the reproducibility of migration times and peak areas, and the linearity of the calibration curves was also tested. Furthermore, SF-MEEKC was coupled to electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). In this part of our work, compatibility between the new microemulsions and the ESI process as well as effect on separation of vitamins compared to using SDS-based microemulsion as separation buffer was investigated. Finally, the content of vitamin D3 in a medicinal product used for treating vitamin D3 deficiency was determined by ESI-MS detection, using 25-hydroxycholecalciferol as internal standard.

Optimizacija metode HPLC za določanje sorodnih substanc prednizolona v učinkovini

NINA LEDINEK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Mentor: **Zoran Novak**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Somentor: **Matjaž Finšgar**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Pri evropski farmakopejski (Ph. Eur.) metodi HPLC za določanje sorodnih substanc prednizolona se v praksi pogosto pojavlja težava z doseganjem kriterija za ustreznost sistema. Težava se pojavlja pri slabi ločbi prednizolona in njegove sorodne substance hidrokortizona (nečistota A), ki sta si strukturno zelo podobna. Ph. Eur. metoda HPLC za določanje sorodnih substanc prednizolona je bila razvita na kromatografski koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3- μ m delci, ki smo jo testirali kot izhodišče naše nadaljnje optimizacije. V nadaljevanju smo poskušali optimizirati Ph. Eur. metodo na kolonah s stacionarno fazo C18 drugega proizvajalca v okviru dovoljenih odstopanj od Ph. Eur. in nato poskušali razviti in predlagati novo metodo. Dosegli smo vse predhodno zastavljene cilje. Prikazana je optimizirana metoda v okviru dovoljenih odstopanj od Ph. Eur., s katero smo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3- μ m delci, dosegli kriterij za ustreznost sistema – razmerje vrh/dolina $H_p/H_v = 10,5$. Z optimizirano metodo dosežemo precej izboljšan rezultat v primerjavi z referenčnim kromatogramom Ph. Eur. na koloni Venusil. V magistrskem delu je predstavljena tudi nova razvita metoda, s katero smo dosegli zelo dobro ločbo sorodnih substanc ter ločitev prednizolona in nečistote A skoraj na bazni liniji ($H_p/H_v = 21,0$).

Optimisation of HPLC Method for Determination of Related Substances of Prednisolone in Active Ingredient

NINA LEDINEK, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Supervisor: **Zoran Novak**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Co-supervisor: **Matjaž Finšgar**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

In the implementation of the Ph. Eur. HPLC method for the determination of related substances of prednisolone we often encounter a problem of meeting system suitability criteria. The problem occurs in the separation of the peaks of prednisolone and its related substance, hydrocortosone (impurity A), which are structurally very similar. The Ph. Eur. HPLC method for the determination of related substances of prednisolone was developed on the Venusil AQ C18 chromatography column (150 mm x 4.6 mm, 3 μ m particles), which we tested as the starting point for our further optimisation. In continuation, we tried to optimise the Ph. Eur. method on the columns with the C18 stationary phase of other manufacturers within the allowable deviations from the Ph. Eur. methods, and then tried to develop a new method. All goals set in this master's thesis have been achieved, and an optimised method (within the allowable deviations from the Ph. Eur. methods) on the Gemini C18 column (150 mm x 4.6 mm, 3 μ m particles) has been developed – this method was used to meet the criteria for system suitability, i.e. the peak-to-valley ratio $H_p/H_v = 10.5$. Using the optimised method, we achieved a significantly improved result compared to the reference chromatogram obtained with the Ph. Eur. method on the Venusil column. This master's thesis also includes a presentation of the newly developed method. Using this method, we achieved a very good separation of related substances and the separation of prednisolone and impurity A, which was almost on the base line ($H_p/H_v = 21.0$).

Vpliv viskoznosti in topila v vzorcu na obliko kromatografskih vrhov pri reverznofazni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti

MATEJA MEŽNAR, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: **Darko Uršič**, Krka, d. d., Novo mesto

Reverznofazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC) je v farmaciji pogosto izbrana metoda za vrednotenje količine raztopljenih zdravilnih učinkovin. Večina zdravilnih učinkovin je v vodnih medijih slabo topna. Da dosežemo njihovo ustrezno topnost, je v nekaterih primerih potrebna uporaba organskih topil. Pri raztapljanju polizdelka ali končne formulacije so poleg analitov, ki jih želimo ovrednotiti, lahko raztopljeni tudi pomožne snovi, ki prav tako vplivajo na končni matriks, v katerem je treba z visoko natančnostjo in točnostjo ovrednotiti koncentracijo želenega analita. Osredotočili smo se predvsem na vpliv sestave vzorca za injiciranje in delno na sestavo mobilne faze ter proučili njun vpliv na obliko kromatografskega vrha. Oblika slednjega je pomemben parameter za natančno kvantifikacijo ter občutljiv kazalec dogajanja v kromatografski koloni. Viskoznost smo določili z metodo, ki smo jo razvili s pomočjo meritev tlaka na HPLC-sistemu, umerili pa z meritvami, določenimi s klasično metodo za vrednotenje viskoznosti. Ugotovili smo, da imata vrsta in količina organskega topila v vzorcu velik vpliv na popačenje oblike, ta vpliv pa lahko zmanjšamo z manjšo količino injiciranja ali redčitvijo vzorca in večjo količino injiciranja redčenega vzorca. Dokazali smo, da ima viskoznost v proučevanem območju ob upoštevanju priporočil in dobrih praks za vrednotenje analitov z RP-HPLC zanemarljivo majhen vpliv na obliko kromatografskega vrha, vpliva na površino kromatografskega vrha pa nismo zaznali.

Effect of Viscosity and Sample Solvent on Peak Shape in Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

MATEJA MEŽNAR, Krka d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: **Darko Uršič**, Krka d. d., Novo mesto

Analytical quantification of a dissolved active ingredient by a reverse phase high performance liquid chromatography is a frequently used pharmaceutical method. Most active pharmaceutical ingredients have low aqueous solubility. To achieve the required concentrations and solubility, it is sometimes essential to use strong organic solvents. Dissolved excipients are present in a final matrix solution when the solution of bulk product or final pharmaceutical formulation is prepared for analysis, during which the concentration of the analyte of interest must be quantified with high precision and accuracy. We focused mainly on the sample composition and partly on the mobile phase composition and their influence on the peak shape, which is an important parameter for precise and accurate quantification. Their viscosities were measured by an HPLC system as a function of the area under the pressure curve, which was correlated with the results obtained by the traditional viscosity method. The results show that the type and quantity of a sample solvent have a significant influence on peak shape distortions, which can be reduced by the injection volume and sample dilution. The viscosity of the injected sample solution in the tested range had only a minor effect on the peak shape whereas no effect on the peak area was observed.

Sinteza modelnih spojin pomalidomida

TILEN VOLČANŠEK, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

Mentor: **Marijan Kočevár**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

V okviru magistrskega dela smo zasnovali in uspešno izvedli večstopenjsko sintezo modelnih spojin pomalidomida iz ustreznih izhodnih piranonskih derivatov. Na prvi stopnji smo izhodni piranon s cikloadicijo pretvorili v ftalni ester. Ciljno estrsko skupino v ftalatu smo najprej selektivno hidrolizirali do karboksilne kisline in to pretvorili v ustrezen benzoksazinonski derivat. S primerno izbiro aminov smo pripravili knjižnico izoindolnih analogov, uspešnost pretvorbe smo nadzorovali s strukturo aminov, pri dokazovanju produktov pa uporabili še 2D NMR-tehnike. Pri reakciji z L-glutaminom, kjer smo želeli tvoriti izoindol, ki bi služil kot prekurzor za modelno spojino pomalidomida, smo ugotovili, da je sintezni postopek neučinkovit, zato smo L-glutamin zaščitili do (S)-5-amino-2-[(terc-butoksikarbonil)amino]-5-oksopentanojske kisline in z intramolekularno ciklizacijo ter odščito aminske skupine ob prisotnosti trifluoroocetne kisline pripravili 2,6-dioksopiperidin-3-il-amonijev trifluoroacetat v obliki soli. Izbrana benzoksazinonska derivata smo ob dodatku pripravljene soli uspešno pretvorili v ustrezna izoindolna analoga, iz njiju pa v zadnji stopnji uspešno pripravili modelni spojin pomalidomida.

Synthesis of Model Compounds of Pomalidomide

TILEN VOLČANŠEK, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

Supervisor: **Marijan Kočevár**, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

During the research work we successfully designed a multi-step synthesis of some model compounds of pomalidomide using pyranone derivatives as starting compounds. In the first stage, the starting pyranone was converted to phthalic ester via cycloaddition. The targeted ester group was hydrolysed and the synthesised carboxylic acid was further converted to the corresponding benzoxazinone derivative; reacting with a selection of amines, it led to an array of isoindole analogues. The rate of conversion was subjected to the structure of each amine, whereas the isoindole analogues were unequivocally confirmed using 2D NMR techniques. When using L-glutamine to give appropriate isoindole, which would subsequently serve as a precursor to a model compound of pomalidomide, the procedure proved ineffective, so an alternative approach was used. Starting with the protection of an amino group in L-glutamine to prepare (S)-5-amino-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoic acid, followed by intramolecular cyclisation and deprotection with TFA, 2,6-dioxopiperidin-3-yl-ammonium trifluoroacetate salt was synthesised. By the reaction with benzoxazinone derivatives, appropriate isoindole analogues were successfully synthesised and in the last stage converted to corresponding model compounds of pomalidomide.

[6]-gingerol kot naravni lovilec kemijskih karcinogenov – računalniški pristop

VERONIKA FURLAN, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

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

Somentorica: **Eva Španinger**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

V magistrski nalogi smo se posvetili proučevanju [6]-gingerola iz ingverja kot polifenolnega lovilca devetih končnih kemijskih karcinogenov: aflatoxin B1 ekso-8,9-epoksida, β -propiolaktona, 2-cianoetilen oksida, etilen oksida, kloroetilen oksida, glicidamida, propilen oksida, stiren oksida in vinil karbamat epoksida. Za oceno učinkovitosti [6]-gingerola smo raziskavo razširili z obravnavo najmočnejšega lovilca kemijskih karcinogenov v naših celicah – glutathiona. S pomočjo računalniških simulacij smo proučili mehanizme reakcij med kemijskimi karcinogeni in [6]-gingerolom oz. glutathionom, pri čemer smo izračune aktivacijskih prostih energij izvedli z uporabo kvantnomehanske metode Hartree-Fock pri treh različnih fleksibilnih baznih setih. Naša raziskava nakazuje, da je [6]-gingerol univerzalen in izredno učinkovit naravni lovilec kemijskih karcinogenov epoksidnega tipa. V primerjavi z glutathionom je [6]-gingerol učinkovitejši lovilec osmih obravnavanih kemijskih karcinogenov, le pri reakciji alkilacije z aflatoxin B1 ekso-8,9-epoksidom sta [6]-gingerol in glutathion enakovredno učinkovita lovilca. Dobljeni rezultati potrjujejo tudi hipotezo, da reakcije alkilacije med obravnavanimi kemijskimi karcinogeni in [6]-gingerolom oz. glutathionom potekajo po mehanizmu nukleofilne substitucije S_N2 . Dobljene aktivacijske proste energije ob upoštevanju solvacijskih efektov potrjujejo, da za preprečitev iniciacije karcinogeneze, ki jo povzročajo obravnavane rakotvorne spojine iz vsakdanjega življenja, potrebujemo dodatno zaščito, ki jo lahko zagotovi [6]-gingerol. Verjamemo, da naša raziskava predstavlja izhodišče za nadaljnje računalniške, eksperimentalne in klinične raziskave antikarcinogenih učinkov [6]-gingerola ter za razvoj novih selektivnih prehranskih dopolnil.

[6]-Gingerol as a Natural Scavenger of Chemical Carcinogens – a Computational Approach

VERONIKA FURLAN, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

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

Co-supervisor: **Eva Španinger**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

In this master thesis, we examined [6]-gingerol from ginger as a polyphenolic scavenger of nine ultimate chemical carcinogens: aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide, β -propiolactone, 2-cyanoethylene oxide, ethylene oxide, chloroethylene oxide, glycidamide, propylene oxide, styrene oxide, and vinyl carbamate epoxide. To evaluate [6]-gingerol efficiency, we expanded our research by investigating glutathione, i.e. the strongest scavenger of chemical carcinogens in human cells. Furthermore, we examined mechanisms of chemical reactions of [6]-gingerol and glutathione with the chemical carcinogens studied. *Ab initio* calculations of activation free energies were performed using the Hartree-Fock method in conjunction with three different flexible basis sets. According to our findings, [6]-gingerol proves to be a universal and extremely efficient natural scavenger of chemical carcinogens of the epoxy type. In comparison with glutathione, [6]-gingerol proved to be a more efficient natural scavenger of eight chemical carcinogens. The only exception was the alkylation reaction with aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide, where [6]-gingerol and glutathione performed equally well. Moreover, the results obtained present strong evidence in favour of the validity of the proposed S_N2 reaction mechanism for the alkylation reactions of [6]-gingerol and glutathione with the chemical carcinogens studied. Our results obtained by implicit solvation methods also imply that additional protection is required for prevention of carcinogenesis triggered with the chemical carcinogens studied. Based on our results, this protection can be ensured with [6]-gingerol. We believe that our research represents a basis for further computational, experimental and clinical studies of anticarcinogenic properties of [6]-gingerol as well as for the development of novel selective dietary supplements.

Analiza neonikotinoidnih pesticidov v medu

MIHA MRZLIKAR, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

Mentorica: Helena Prosen, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Ester Heath, Institut Jožef Stefan

Analiza medu je neinvaziven način, s katerim lahko preverimo izpostavljenost čebel ostankom pesticidov v naravnem okolju. Pri analizi kompleksnih vzorcev z ekstremno nizkimi koncentracijami analitov (kot so neonikotinoidni pesticidi v medu) je učinkovita priprava vzorca ključnega pomena. Cilj raziskave je bil razvoj zanesljive analizne metode za določanje izbranih neonikotinoidnih pesticidov v slovenskem medu. V ta namen smo primerjali dve različni ekstrakcijski tehniki, to je ekstrakcijo na trdno fazo SPE in ekstrakcijo QuEChERS. Analize smo izvajali z LC-MS/MS (SRM). Validacijo smo izvedli na dveh koncentracijskih nivojih (10 µg/kg in 50 µg/kg). Obe metodi dajeta zadovoljive izkoristke ekstrakcij (68–110 %), dobro ponovljivost (0,92–8,0 %) ter nizke meje zaznave in določitve. Določili smo merilno negotovost ($k = 2$, stopnja zaupanja 95-odstotna) obeh analiznih postopkov. Metoda QuEChERS-LC-MS/MS je imela nižjo stopnjo negotovosti, boljšo točnost in je bila bolj učinkovita pri odstranitvi matrice vzorca kot SPE, zato je bila uporabljena za analizo 51 vzorcev medu, zbranih iz celotne Slovenije. Rezultati so razkrili nizko kontaminacijo medu z izbranimi neonikotinoidi, kar kaže na to, da so čebele (še vedno) izpostavljene tem pesticidom. Ta raziskava slovenskega medu je pomemben prispevek k svetovni bazi podatkov o neonikotinoidni kontaminaciji in grožnji, ki jo le-ta predstavlja za čebele.

Analysis of Neonicotinoid Pesticides in Honey

MIHA MRZLIKAR, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

Supervisor: Helena Prosen, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Ester Heath, Jožef Stefan Institute

The analysis of honey is a non-invasive way of checking for residues of pesticides to which bees could be exposed. When analysing complex samples with extremely low concentrations of analytes (such as neonicotinoid pesticides in honey), effective sample preparation is of crucial importance. The aim of this study was to develop a reliable analytical method in order to monitor the presence of selected neonicotinoid pesticides in Slovenian honey. To do that, we compared two different extraction techniques: Solid Phase Extraction (SPE) and QuEChERS extraction. Analyses were carried out using the LC-MS/MS (SRM) method. Validation was performed at two spiking levels (10 µg/kg and 50 µg/kg). Both methods showed satisfactory recoveries (68–110%), good precision (RSDs between 0.92–8.0%), and low limits of detection and quantification. The uncertainties ($k=2$, 95% confidence level) of both analytical procedures were determined. The QuEChERS-LC-MS/MS method showed lower uncertainty and higher accuracy, and was more effective in the removal of the sample matrix than the SPE method. It was therefore applied for the analysis of 51 honey samples collected from across Slovenia. The research revealed low contamination of Slovenian honey with target neonicotinoids, indicating that bees are (still) exposed to these pesticides. This survey on Slovenian honey is an important contribution to the global database of neonicotinoid contamination and the threat it poses to honeybees.

Razvoj in validacija analizne metode za merjenje koncentracij izbranih učinkovin v površinskih vodah s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo

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

Poraba zdravil se iz leta v leto konstantno povečuje in s tem tudi njihov vnos in pojavnost v okolju. Glavni cilj naloge je bil razviti in ovrednotiti metodo za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda. Najprej smo z delno avtomatizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu v vzorcih odpadne vode ugotavljali prisotnost 111 učinkovin. Na podlagi rezultatov smo izbrali 44 učinkovin, za katere smo razvili postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu. Izbirali smo med štirimi elucijskimi topili, preizkusili tri sorbente, vzorce z različnimi pH-vrednostmi, izbirali med različnimi volumni nanosa in preverili različne volumne topila za raztopitev suhega zaostanka. Najustreznejše pogoje smo izbrali na podlagi izračunanih izkoristkov in ponovljivosti postopka. Instrumentalno analizo vzorcev med razvojem in ovrednotenjem smo izvedli z LC-MS/MS. Novo metodo smo ovrednotili in določili meje določitve, ki so bile v nizkem ng/L koncentracijskem območju. Metodo smo uporabili na petih vzorcih iz rek in enem vzorcu iz jezera. Zaznali smo 43 učinkovin, od tega kar 24 v vsaj štirih vzorcih. Kvantitativno smo ovrednotili 18 učinkovin. Najnižje izmerjene koncentracije so bile v vzorcu iz jezera, v katerem smo izmerili tudi absolutno najnižjo koncentracijo 0,08 ng/L za venlafaksin. Najvišje izmerjene koncentracije so znašale 47,23, 44,57 in 18,56 ng/L za valsartan, gabapentin in tramadol.

Development and Validation of an Analytical Method for Quantification of Selected Pharmaceuticals in Surface Water Samples by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry

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

The consumption of pharmaceuticals increases year by year and, as a consequence, their introduction to and occurrence in the environment is also increasing. The main goal of this master's thesis was to develop and validate the method for the extraction of pharmaceuticals from surface waters. We first performed a screening of 111 pharmaceuticals in samples of wastewater using a semi-automated solid extraction method. Based on its results, we selected 44 pharmaceuticals for which a solid-phase extraction method was developed. We chose among four elution solvents, tested three different cartridges, prepared samples with different pH values, various sample application volumes, and tested different volumes of the reconstitution solvent. The most optimal conditions were selected based on the calculated recovery. The instrumental analysis of the samples during the development and validation was performed by LC-MS/MS. The new method was validated and the limit of quantification was in a low ng/L concentration range. We applied the method to five samples from rivers and to one sample from a lake. We detected 43 pharmaceuticals, 24 of which were present in at least four samples. The concentration in the samples was measured for 18 pharmaceuticals. The lowest measured concentrations were observed in the sample from the lake, where the absolute minimum concentration of 0.08 ng/L for venlafaxine was measured. The highest measured concentrations were 47.23, 44.57 and 18.56 ng/L for valsartan, gabapentin, and tramadol, respectively.

Transformacije trifluorometiltioliranih organskih spojin

GREGOR KODRIČ, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*

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

Somentor: Jernej Iskra, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V nalogi smo raziskali selektivne pretvorbe SCF_3 substituiranih organskih molekul v sulfokside ali sulfone z vodikovim peroksidom kot oksidantom. Vodikov peroksid je primeren oksidant, njegova pomanjkljivost pa je, da počasi reagira z organskimi spojinami, zato ga je treba aktivirati. Najprej smo na modelnem substratu fenil trifluorometil sulfidu z oksidacijami v različnih topilih preverili, katera aktivirajo vodikov peroksid. Z uporabo katalizatorjev prehodnih kovin ali katalitskih količin Brønstedovih ali Lewisovih kislin smo v nadaljevanju dosegli učinkovitejšo aktivacijo H_2O_2 in boljšo pretvorbo substrata. Katalitske količine močnih kislin so uspešno aktivirale H_2O_2 , zato smo preverili potek reakcij ob uporabi kislin kot topil. Eksperimenti so pokazali, da je za oksidacije z vodikovim peroksidom zelo dober aktivirajoč medij TFA. Na podlagi teh eksperimentov smo optimizirali reakcijske pogoje za selektivno pretvorbo fenil trifluorometil sulfida v sulfoksid ali sulfon. V nadaljevanju smo optimizirano metodo za sintezo sulfoksidov testirali še na nekaterih funkcionaliziranih sulfidih in iz njih sintetizirali ustrezne sulfokside. V zadnjem delu smo raziskali »one-pot«² sintezo, s katero smo izbrani fenol trifluorometil tiolirali z elektrofilnim reagentom in ga nato oksidirali z vodikovim peroksidom, v enem koraku, brez vmesne izolacije trifluorometil sulfidnega produkta, do ustreznega sulfoksida.

Transformation of Trifluoromethylthiolated Organic Compounds

GREGOR KODRIČ, *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana*

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

Co-supervisor: Jernej Iskra, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In this thesis, we studied the selective conversion of SCF_3 substituted organic molecules to the sulfoxide or sulfone with hydrogen peroxide as the oxidant. Hydrogen peroxide is a suitable oxidising agent. However, owing to slow reactions with organic compounds, additional activation is needed. Firstly, we tested the oxidation of phenyl trifluoromethyl sulfide as a model substrate with hydrogen peroxide in various solvents. In continuation, we achieved more effective activation of H_2O_2 and better conversion of the substrate when transition metal catalysts or catalytic amounts of Brønsted or Lewis acids were used. The catalytic amounts of strong acids activated H_2O_2 , so we checked the course of reactions using acids as solvents. Experiments have shown that TFA is a very good activating medium for oxidation with hydrogen peroxide. Based on these experiments, the reaction conditions for selective conversion of phenyl trifluoromethyl sulfide into sulfoxide or sulfone were optimised. In continuation, we tested the optimised synthesis method for sulfoxides on some functionalised sulfides and obtained corresponding sulfoxides. In the last part of our research, we studied one-pot synthesis, by which the selected phenol was trifluoromethylthiolated with an electrophilic reagent and then oxidised with hydrogen peroxide to the corresponding sulfoxide in the one-pot procedure without intermediate isolation of the trifluoromethyl sulfide product.

Pretvorba tekočega samomikroemulgirajočega sistema s karvedilolom v trdno obliko s tehnologijo sušenja z razprševanjem

INA KOSMAČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Slaba vodotopnost je omejujoč dejavnik za absorpcijo, dobro biološko uporabnost in klinično učinkovitost številnih zdravilnih učinkovin po peroralni aplikaciji. Da bi izboljšali topnost in hitrost raztapljanja modelne učinkovine karvedilol, smo ga v okviru raziskovalnega dela vgradili v predhodno razviti tekoči samomikroemulgirajoči sistem (SMES) in ga nato s tehnologijo sušenja z razprševanjem uspešno pretvorili v trdno obliko. Za pretvorbo smo uporabili porozne (Neusilin® US2, Syloid® 244FP, Syloid® XDP 3050) in neporozne (kombinacija Avicel® PH-101 in Aerosil® 200) trdne nosilce ter variirali razmerje med SMES in nosilcem. Ugotovili smo, da je pri uporabi poroznih nosilcev pomemben dejavnik procesa pretvorbe tudi čas mešanja disperzije pred razprševanjem, ki vpliva na izkoristek procesa in hkrati tudi na učinkovitost desorpcije formulacije iz por nosilca. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo smo dokazali, da se po redispergiranju trdnih SMES spontano tvorijo mikroemulzije. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo potrdili odsotnost kristalinične oblike karvedilola, s preizkusi sproščanja *in vitro* pa smo dokazali, da se je karvedilol iz izdelanih trdnih SMES sprostil hitreje in v večjem obsegu, kot se je raztapljala kristalinična učinkovina. Predvidevamo, da bi zaradi hitrega sproščanja karvedilola *in vivo* prišlo do bistvenega povečanja biološke uporabnosti, saj bi z nasičenjem metabolnih encimov lahko deloma zaobšli tudi obsežen predsistemiški metabolizem karvedilola.

Transformation of Liquid Carvedilol-Loaded Self-Microemulsifying System into Solid Dosage Form by Spray Drying Technology

INA KOSMAČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Making clinically effective oral dosage forms using poorly water soluble active substances is very challenging due to slow rates of absorption, resulting in low oral bioavailability. During our research work, carvedilol (as a poorly water soluble model active substance) was incorporated into a pre-developed liquid self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) in order to improve its solubility and dissolution rate. Carvedilol-loaded liquid SMEDDS was then successfully transformed into a solid dosage form by a spray-drying technology. Various porous (Neusilin® US2, Syloid® 244FP, Syloid® XDP 3050) and non-porous (combination of Avicel® PH-101/Aerosil® 200) solid carriers with different SMEDDS-to-carrier ratios were examined. The mixing duration of the dispersion before spraying was found to have an important role in the process of solidification, because it affects the process recovery and also the desorption of the formulation from pores. Photon correlation spectroscopy proved that the self-microemulsifying ability was preserved. The absence of carvedilol crystalline form was confirmed by differential scanning calorimetry. *In vitro* dissolution tests confirmed that the dissolution rate and the extent of release of carvedilol from solid SMEDDS were significantly increased compared to its crystalline form. It is assumed that rapid release of carvedilol would most certainly cause a significant increase in bioavailability *in vivo*, as the saturation of the metabolic enzymes could result in the bypassing of the extensive pre-systemic metabolism of carvedilol.

Stabilnost in ekspresija plazmidov z zapisom IL-12 za različne vrste

KAJETANA BEVC, *Onkološki inštitut Ljubljana*

Mentorica: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

Somentorica: Urška Kamenšek, Onkološki inštitut Ljubljana

IL-12 je citokin, ki ga je mogoče uporabljati v imunoterapiji raka. Deluje tako, da izzove imunski sistem gostitelja, ki prepozna in ubije rakave celice. Vendar pa ima IL-12 zelo ozek terapevtski indeks, zaradi česar moramo poskrbeti, da se izraža lokalno in ne sistemsko, da ne pride do hematološke toksičnosti. To lahko dosežemo z uporabo elektrogenske terapije, ki nam omogoča vnašanje genov v celice. Plazmidna DNA je trenutno edina alternativa virusnim vektorjem, vendar njeno uporabo v genski terapiji omejuje prisotnost gena za odpornost proti antibiotikom. Ta lahko sproži aktivacijo imunskega sistema in predstavlja tveganje za horizontalni prenos v naravno prisotne bakterije v telesu, zato je njegova raba odsvetovana. Tako so se razvile nove tehnologije za pripravo plazmidov brez gena za antibiotično odpornost, na primer ORT-tehnologija, ki smo jo uporabili v raziskavi. Naš namen je bil preveriti stabilnost ORT-plazmidov z zapisom IL-12 in učinkovitost transfekcije. Stabilnost plazmidov smo preverjali s precepljanjem bakterijske kulture in izolacijo plazmida po vsaki pasaži. Uporabili smo plazmide pCol mL-12 ORT, p21 hIL-12 ORT in pORF calL-12 ORT in njihov donos primerjali z donosom komercialno dostopnega plazmida pORF mL-12 z zapisom za odpornost proti ampicilinu. Opazili smo razlike med pasажami plazmidov in to, da bakterijska rast od druge pasaže naprej ni bila več zanesljiva. pORF-mIL-12 je imel največji donos, približno enkrat večji od ORT-plazmidov. Da bi določili učinkovitost transfekcije plazmidov in njihovo citotoksičnost, smo celične linije transfecirali s temi plazmidi s pomočjo genskega elektroprenosa. Poskus elektroprenosa je bil izveden na celičnih linijah humanega, mišjega in pasjega melanoma. Izražanje IL-12 je bilo določeno na ravni mRNA s pomočjo qRT-PCR in na proteinski ravni s pomočjo preiskave ELISpot. Rezultati so nam pokazali, da je bil vnos plazmidov v celice s pomočjo GET močno citotoksičen in da je bil IL-12 izražen v preživelih celicah po GET.

Stability and Transfection Efficiency Plasmids Encoding IL-12 of Different Species

KAJETANA BEVC, *Institute of Oncology Ljubljana*

Supervisor: Maja Čemažar, Institute of Oncology Ljubljana

Co-supervisor: Urška Kamenšek, Institute of Oncology Ljubljana

IL-12 is a cytokine that can be used in cancer immunotherapy. It acts by boosting the host immune system to recognise and kill cancer cells. However, IL-12 has a very narrow therapeutic index. It should therefore be expressed and released locally without systemic spillover so that it does not result in toxic side effects. This can be achieved by using electrogene therapy which has the ability to deliver genes in a localised manner. Owing to the stringent regulatory requirements, antibiotics that were traditionally used for the production of plasmid DNA in bacteria are no longer allowed in the manufacture of plasmids intended for clinical use. Therefore, different antibiotic-free selection strategies are currently under development. One such strategy is Operator-Repressor Titration (ORT), which we used in the evaluation of plasmids. Our aim was to evaluate the stability of the antibiotic-free plasmids prepared by the ORT technology and to evaluate their transfection efficiency. The stability of the plasmids was evaluated by passaging the bacterial culture and plasmid isolation after each passage. We used pCol mL-12 ORT, p21 hIL-12 ORT and pORF calL-12 ORT plasmids and compared their yields to commercially available pORF mL-12 with the ampicillin resistance gene. We noticed that there were differences between the passages and that bacterial growth from the second passage on was not reliable anymore. pORF-mIL-12 produced the highest yield, about twice higher than the ORT plasmids. To determine the plasmids transfection efficiency and cell survival, cell lines were transfected with plasmids encoding IL-12 protein using the electroporation method. The evaluation of the plasmids was carried out on human, mouse and canine malignant melanoma cells. The IL-12 expression was determined at mRNA level by the qRT-PCR and at protein level with the ELISpot assay. The results obtained showed that the GET was highly toxic for the cells and that IL-12 was expressed in the surviving cells treated with GET.

Formuliranje farmacevtskih učinkovin s procesom PGSS

UROŠ FILIPIČ, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

Mentorica: Maša Knez Hrnčič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

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

V delu je predstavljeno formuliranje farmacevtskih učinkovin s procesom PGSSTM. Mikronizacijo smo izvedli s pomočjo superkritičnega CO₂ in treh različnih aktivnih učinkovin (fenofibrata, nimodipina in O-vanilina) ter dveh polimerih nosilcev (Brij S100 in PEG 4000). Vzorce smo pršili skozi šobo s premerom 1 mm pri naklonu 60° po 1 uri homogenizacije. Eksperimente smo izvajali pri štirih tlakih (10 MPa, 15 MPa, 20 MPa in 25 MPa) in dveh koncentracijah (2 g učinkovine in 4 g učinkovine na 20 g nosilca). Po končani mikronizaciji smo izračunali izkoristek pršenja in vzorce poslali na analizo velikosti mikrodlecev s postopkom CILAS, kjer smo dobili podatke o velikosti srednjega zrna, najmanjših in največjih delcih ter graf njihove porazdelitve. Nato smo vzorce analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo, kjer smo kot rezultat dobili masne spektre in kvantitativne vrednosti učinkovin znotraj vsakega posameznega vzorca, iz katerih smo izračunali dejansko prisotnost učinkovine v vzorcu po procesu PGSSTM. Vzorce smo analizirali tudi z elektronskim mikroskopom (SEM), da smo dobili podatke o morfološki sestavi in formulaciji učinkovine v nosilcu.

Formulation of Pharmaceutical Substances Using PGSSTM Process

UROŠ FILIPIČ, *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor*

Supervisor: Maša Knez Hrnčič, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Co-supervisor: Gregor Kravanja, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

This thesis focuses on the formulation of pharmaceutical substances using the PGSSTM process. Micronisation of three different active substances (fenofibrate, nimodipine, o-vaniline) with supercritical CO₂ was investigated. Two different polymers (Brij S100 and PEG 4000) were used as carriers. Samples were sprayed through a nozzle with a 1-mm diameter at 60° inclination after one hour of homogenisation. Experiments were carried out at four different pressures (10 MPa, 15 MPa, 20 MPa, and 25 MPa) and two different concentrations (2 g or 4 g of active substance per 20 g of carrier). After completed micronisation, process efficiency was evaluated and the samples were sent for particle size analysis following the CILAS procedure to obtain data on the size of the middle grain, sizes of the smallest and the largest particles, and also particle distribution diagrams. Micronised samples were analysed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry, resulting in mass spectra and quantitative evaluation of active substances present in the samples after the PGSSTM process. Two samples were also analysed with a scanned electron microscope (SEM) to obtain images of a sample by scanning its surface.

Ocena vpliva cinkovega piritiona na izbrane vrste rastlin in živali

SATJA ŠKOBALJ, KAJA KEGLEVIČ, *Il. gimnazija Maribor*
Mentorica: **Katja Holnthaner Zorec**, *Il. gimnazija Maribor*

V prosti prodaji najdemo izdelke, ki vsebujejo škodljive kemikalije. Ena izmed teh je tudi cinkov pirition, učinkovina v šamponih proti prhljaju in sestavina premazov za ladje. Z izpiranjem las po uporabi šampona in barvanjem ladijskih trupov ta kemikalija prehaja v vodno okolje in prihaja v stik s številnimi netarčnimi organizmi. Z različnimi testi smo želeli proučiti vpliv cinkovega piritiona na različne organizme in oceniti njegovo potencialno toksičnost. Test z vrtno krešo je pokazal, da cinkov pirition ni zaviralno vplival na kalitev semen, ampak zgolj na dolžino korenčic. S testom *Allium* smo ugotovili, da je povečana koncentracija cinkovega piritiona povzročila krajšanje korenin čebul in nižji mitotski indeks. Ob povečani koncentraciji kemikalije se je število preživelih solinskih rakcev zmanjševalo. V javanskem mahu smo ob prisotnosti cinkovega piritiona izmerili povečanje količine klorofila a in b ter zmanjšanje količine karotenoidov.

Impact of Zinc Pyrithione on Selected Plant and Animal Species

SATJA ŠKOBALJ, KAJA KEGLEVIČ, *Il. Gimnazija Maribor Grammar School*
Supervisor: **Katja Holnthaner Zorec**, *Il. Gimnazija Maribor Grammar School*

Many over-the-counter products contain harmful chemicals. One of them is zinc pyrithione, the active substance found in anti-dandruff shampoos and protective coatings for ships. When we rinse our hair after using the shampoo or paint the hulls of ships, this chemical passes into the aquatic environment and comes into contact with many organisms. This research project focuses on the assessment of the impact this chemical has on various living organisms. We used different tests to determine the influence of zinc pyrithione on various organisms and to evaluate its potential toxicity. The *Lepidium* test showed that zinc pyrithione did not inhibit the germination of seeds of garden cress, but merely the growth and length of their roots. The *Allium* test proved that increased concentrations of zinc pyrithione cause decreased growth of onion roots and a lower mitotic index. Increased concentrations of the chemical resulted in a reduced number of surviving *Artemia salina*. In the presence of zinc pyrithione, increased quantities of chlorophyll a and b, and a decreased quantity of carotenoids were measured in java moss.

Priprava vodotopne fluorescenčne učinkovine za označevanje normalnih in rakavih celic urotelija sečnega mehurja *in vitro*

PATRIK PEČAVAR NEŽMAH, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Marko Jeran**, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: **Mateja Erdani Kreft**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Rak sečnega mehurja je deveto najpogostejše rakavo obolenje na svetu. Njegova incidenca naj bi se v Sloveniji do leta 2020 povečala za 45 % pri moških in za 105 % pri ženskah. Zato so nujne nove metode zgodnjega odkrivanja tega raka. Primerno orodje predstavljajo fluorescenčna barvila, ki oddajajo hladno svetlobo in jih lahko uporabljamo za označevanje celic v tumorjih. Raziskovalno delo je bilo usmerjeno v raziskavo razlikovanja med zdravimi in rakavimi urotelijskimi celicami sečnega mehurja. Pripravili smo vodotopni fluorescenčni derivat fluoresceina, natrijev disulfonat (SUF), ki je organska spojina in oddaja intenzivno fluorescenco. Testirali smo njegov vpliv na preživetje normalnih in rakavih urotelijskih celic ter s fluorescenčnim mikroskopom poskušali ločiti med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami sečnega mehurja. Želeli smo preveriti, ali je SUF mogoče uporabljati v diagnostiki rakavih celic in potencialni tarčni terapiji kot alternativo težje dostopnim in cenovno manj ugodnim fluorescenčnim barvilom, ki so v uporabi, ter s tem povečati dostopnost tovrstnih raziskav. Rezultati so pokazali, da SUF na urotelijske celice sečnega mehurja ne učinkuje toksično ter po načinu obarvanja ločuje med zdravimi in rakavimi celicami. Po testiranjih se je pokazal kot učinkovita fluorescenčna sonda, njegov skelet je med drugim dopuščal vezavna mesta s sodobnimi sintezniimi strategijami. Na strukturni skelet učinkovine bi lahko vezali še dodatne aktivne funkcionalne skupine ali pa protirakave učinkovine.

Synthesis of a Water-Soluble Fluorescent Dye for Labelling Normal and Cancerous Urothelial Cells of the Urinary Bladder *In Vitro*

PATRIK PEČAVAR NEŽMAH, Biotechnical Education Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Marko Jeran**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Co-supervisor: **Mateja Erdani Kreft**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Bladder cancer is the ninth most common cancerous disease in the world. Its incidence in Slovenia is expected to increase by 45% in men and 105% in women by 2020. Therefore, new methods for early diagnosis of bladder cancer are essential. Fluorescent dyes are an appropriate tool because they emit cold light and can be used for labelling tumour cells. Our research was aimed at differentiating between healthy (normal) and cancerous urinary bladder urothelial cells. We developed a water-soluble fluorescence derivative of fluorescein – sodium disulfonate (SUF) – which is an organic compound that emits intense fluorescence. Next, we tested its influence on the viability of normal and cancerous urothelial cells and tried to distinguish between the normal and cancerous urothelial cells using a fluorescence microscope. We analysed whether SUF can be used in cancer cell diagnostics and examined its potential for targeted therapy as an alternative to the currently used fluorescent dyes, which are more expensive and harder to obtain. This approach would also make such research more accessible. The results of the study have shown that SUF is not toxic to urothelial cells of the urinary bladder and that SUF labelling may be used to distinguish between healthy and cancerous urothelial cells. SUF was proven to be a useful fluorescent marker. Importantly, its structure also allows other functional groups or anti-cancerous substances to be added through advanced synthesis strategies.

Vpliv steroidogenega dejavnika 1 na izražanje gonadotropinov v hipofizi miši

ANA BABNIK, GRETA JUNGER, Gimnazija Vič

Mentorica: **Neža Grgurevič**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

Steroidogeni dejavnik 1 (SF-1) je prepisovalni dejavnik, ki uravnava številne pomembne gene in je nujen za normalno reprodukcijo. Mutacije gena *sf-1* pogosto vodijo v težave z neplodnostjo, čeprav njegova funkcionalna vloga pri neplodnosti in še nekaterih drugih boleznih ni popolnoma pojasnjena. Rezultati prejšnjih raziskav, izvedenih na novorojenih miših, kažejo, da je SF-1 ključen pri izražanju obeh gonadotropinov, zato je bil cilj naše raziskave ugotoviti, ali pride do izražanja folikel stimulirajočega hormona (FSH) in luteinizirajočega hormona (LH) tudi v odsotnosti dejavnika SF-1. Uporabili smo hipofize odraslih genetsko spremenjenih miši – miši z izbitim genom *sf-1* (miši knockout, SF-1KO) – ter jih primerjali s hipofizami miši divjega tipa (WT) z normalno delujočim genom *sf-1*. Izraženost FSH- in LH-pozitivnih celic smo analizirali z metodo imunohistokemije ter nato kvantitativno primerjali izraženost obeh gonadotropinov pri hipofizah obeh skupin miši. Obe sta imeli izražene FSH- in LH-imunopozitivne celice, statistična analiza rezultatov pa je pokazala, da je izraženost gonadotropinov v hipofizi miši SF-1KO bistveno manjša kot v hipofizi miši WT. Rezultati naše raziskave torej jasno kažejo, da produkcija in izločanje obeh gonadotropinov ne temeljita samo na prisotnosti gena *sf-1*.

Influence of Steroidogenic Factor 1 on Mouse Pituitary Gonadotrope Expression

ANA BABNIK, GRETA JUNGER, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: **Neža Grgurevič**, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič Grammar School

Steroidogenic factor 1 (SF-1) is a transcription factor which regulates many important genes and is essential for normal reproductive function. Mutations of the SF-1 gene often result in fertility issues; however, its functional role in infertile patients and some other human diseases is still not fully understood. Previous studies, carried out on newborn mice, showed that SF-1 is crucial for the production of both gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), therefore our goal was to test whether FSH and LH could be synthesised in the absence of SF-1. We used pituitaries of adult genetically modified mice lacking the SF-1 gene (SF-1 knockout mice; SF-1KO) and compared them with wild type mice (WT) with a normally functioning SF-1 gene. FSH and LH expression was analysed by means of the immunohistochemical method; the expression of both gonadotropins in SF-1KO mice pituitaries was then quantitatively compared to that in WT mice pituitaries. Statistical analysis showed that pituitaries of SF-1KO mice do exhibit FSH and LH immunopositive cells, despite their expression being markedly diminished when compared to WT mice. Our results suggest that the production and secretion of both gonadotropins does not depend entirely on the SF-1 gene.

Superhidrofobne sol-gel prevleke za tkanino, steklo, papir in aluminij

KATARINA KOKALJ, Gimnazija Jurija Vege Idrija

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

Somentorja: **Peter Rodič**, **Ingrid Milošev**, Institut Jožef Stefan

Superhidrofobnost je pojav, pri katerem kapljica vode na površini dobi obliko sfere, pri čemer je kontaktni kot večji od 150° . Ker se kapljica površine ne oprime, se pri nagibu odkotali s površine. V naravi takšen pojav najpogosteje vidimo na listih rastlin, saj njihovo površino prekrivajo organske molekule, ki v kombinaciji z nanohrapavostjo ustvarijo superhidrofobno površino. Namen raziskovalne naloge je bil sintetizirati superhidrofobno prevleko, ki po nanosu poveča hidrofobnost površine. Prevleke smo sintetizirali po sol-gel postopku iz alkil, perfluoroalkil silanskih in cirkonijevih alkoksidov. Sinteze smo ovrednotili z infrardečo spektroskopijo *in situ*. Prevleko smo nanесли in testirali na različnih materialih: tkanini, steklu, papirju in aluminiju. Hidrofobnost smo ovrednotili z merjenjem kontaktnih kotov in kotov zdrsa. Prevleke smo ovrednotili z različnimi tehnikami (FTIR, kontaktni profilometer, vrstični elektronski mikroskop – SEM). Pred nanosom prevleke so bile površine hidrofilne (kontaktni koti so bili manjši od 20°), po nanosu pa se je hidrofobnost znatno povečala. Na vseh proučevanih površinah smo izmerili kontaktne kote, večje od 140° . Sintetizirane prevleke torej učinkovito povečajo hidrofobnost različnih površin. Uporabljajo se lahko v številnih primerih, saj ima površina s takšnimi lastnostmi sposobnost samočiščenja.

Superhydrophobic Sol-Gel Coatings for Fabric, Glass, Paper and Aluminium

KATARINA KOKALJ, Gimnazija Jurija Vege Idrija Grammar School

Supervisor: **Valerija Šemrl Kosmač**, Gimnazija Jurija Vege Idrija Grammar School

Co-supervisors: **Peter Rodič**, **Ingrid Milošev**, Jožef Stefan Institute

Superhydrophobicity is a phenomenon in which a drop of water on the surface takes the shape of the sphere with a contact angle exceeding 150° . In this case, the water-drop does not adhere to the surface but slides from the inclined surface. Superhydrophobicity is also found in nature, most commonly in plant leaves. Such leaves are covered by hydrophobic organic molecules, which, in combination with nano-roughness, create a superhydrophobic surface. The purpose of this research work was to synthesise coatings that increase the hydrophobicity of specific materials and possibly make them superhydrophobic. The coatings were synthesised by the sol-gel process from alkyl, perfluoroalkyl silane and zirconium alkoxides. The synthesis was evaluated by *in-situ* infrared spectroscopy. The coating was applied and tested on various materials: fabric, glass, paper and aluminium. The evaluation of hydrophobicity was performed by measuring contact and sliding angles. The coatings were further characterised by various techniques, such as the Fourier-Transform-Infrared (FTIR) spectroscopy, contact profilometry and scanning electron microscopy (SEM). Pristine surfaces of tested materials are all hydrophilic and their contact angles are below 20° , but after the deposition of the coating, the surfaces become either hydrophobic or even superhydrophobic. Some of the synthesised coatings perform quite well and display contact angles exceeding 140° on all materials studied. These coatings have a realistic potential for practical applications, especially due to the self-cleaning properties of the (super)hydrophobic surfaces.

Vpliv mikrovalov na zvijanje β -peptidov

MAŠA PREDIN, II. gimnazija Maribor

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

Somentorica: **Zdenka Keuc**, II. gimnazija Maribor

Ko vsak deseti človek, starejši od 65 let, zboli za Alzheimerjevo boleznijo, se je smiselno vprašati, ali je porast nevrodegenerativnih bolezni v sodobnem času res zgolj odraz staranja prebivalstva. Namen te raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali mikrovalovi vplivajo na zvijanje β -peptidov. S simulacijami molekularne dinamike v polju sil GROMOS smo primerjali vpliv klasičnega in mikrovalovnega segrevanja na zvijanje β -peptida. Ugotovili smo, da so se pri mikrovalovnem segrevanju zaradi oteženega vzpostavljanja vodikovih vezi med β -peptidom in molekulami vode okrepile elektrostatske interakcije znotraj β -peptida. Struktura β -peptida je bila pri mikrovalovnem segrevanju bolj kompaktna in obstojna kot pri klasičnem. Pri mikrovalovnem segrevanju na 700 K sta se pojavili dve napačno zviti strukturi β -peptida z obliko lasnice. Zaradi spodbujanja napačnega zvijanja β -peptida smo mikrovalovno sevanje prepoznali kot dejavnik tveganja za razvoj nevrodegenerativnih bolezni.

Microwave-Induced β -Peptide Folding

MAŠA PREDIN, II. Gimnazija Maribor Grammar School

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

Co-supervisor: **Zdenka Keuc**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Since every tenth person aged 65 years or older suffers from Alzheimer's disease, it seems reasonable to wonder whether this steep increase in the frequency of neurodegenerative diseases in the modern age is really only due to the ageing of the population. The aim of this research paper was to establish whether microwaves affect β -peptide folding. Using GROMOS molecular dynamics simulations, we compared the effect of conventional and microwave heating on β -peptide folding. Our results showed that the intramolecular electrostatic interactions within the β -peptide strengthened under microwave heating, presumably due to the decreased strength of the hydrogen bond between the β -peptide and water molecules. The structure of the β -peptide was more compact and durable under microwave heating compared to conventional heating. Two misfolded β -hairpin structures formed during microwave heating at 700 K. Since microwave radiation promotes the misfolding of β -peptides, we have recognised it as a risk factor in the progression of neurodegenerative diseases.

Vplivi bakterij v probiotičnih kapsulah na simptome prebavnih motenj pri pacientih s putiko

ANJA MOŠKRIČ, NINA SELAN, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Ljubljana
Mentorica: **Vesna Grgur**, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Ljubljana

Putika ali protin je vedno bolj razširjena bolezen, pri kateri je zaradi hiperurikemije, to je povečane koncentracije sečne kisline v krvi, povečano izločanje te kisline v črevesje. Tam so različni mikroorganizmi, tudi probiotične bakterije. Nekatere lahko izločajo encim urikazo, ki sečno kislino razgradi na allantoin in ogljikov dioksid. Encim smo ljudje z evolucijo izgubili (zanj imamo le psevdogen). Sečna kislina, ki je končni produkt razgradnje purinov v našem telesu, je za razliko od allantoina slabo topna, zato se ob hiperurikemiji v obliki uratov nalaga v organizmu (predvsem v sklepih okončin). Kljub temu ima v našem organizmu pomembno vlogo antioksidanta, saj nase veže radikale. V raziskavah so ugotovili, da se črevesna mikrobiota pacientov s putiko razlikuje od mikrobiote zdravih ljudi. Prevladujejo le določene vrste bakterij, medtem ko je drugih manj. Zato lahko pride do prebavnih motenj in s tem do prebavnih težav. V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti, zaradi česa pride do prebavnih težav oziroma kaj vpliva na to. Predpostavljali smo, da na to vpliva tudi encim urikaza. Uporabljali smo probiotične bakterije iz kapsul in ugotovili, da omenjeni encim izloča le *Bacillus subtilis*. Glede na poskuse ga izloča konstitutivno. Pri gojenju *E. coli* in *B. subtilis* na gojiščih s sečno kislino je bilo vidno, da *B. subtilis* v boljših pogojih zavira rast *E. coli*, ki smo jo uporabili kot predstavnico normalne človeške mikrobiote. Na podlagi tega sklepamo, da ob povečani koncentraciji sečne kisline v okolju *Bacillus subtilis* z izločanjem encima urikaze negativno vpliva na normalno črevesno mikrobioto. Zato v probiotičnih kapsulah za paciente s putiko odsvetujemo prisotnost bakterij iz rodu *Bacillus*.

Effects of Probiotic Bacteria on Digestive Symptoms of Gout Patients

ANJA MOŠKRIČ, NINA SELAN, Secondary School for Pharmacy, Cosmetics and Health Care, Ljubljana
Supervisor: **Vesna Grgur**, Secondary School for Pharmacy, Cosmetics and Health Care, Ljubljana

The prevalence of gout appears to be rapidly increasing. Hyperuricemia, its underlying metabolic disorder, is an abnormally high level of uric acid in the blood, which is also excreted through the intestinal tract. The gastrointestinal tract contains various microorganisms, including probiotic bacteria. Some of these can secrete the uricase enzyme that breaks down uric acid to allantoin and carbon dioxide. The uricase enzyme in humans was lost during evolution (only its pseudogene has been preserved). Uric acid is a poorly soluble final product of purine metabolism in humans (unlike allantoin), causing the formation and deposition of urate crystals in all tissues (especially in the joints of our limbs). Nevertheless, uric acid is a powerful antioxidant binding free radicals in our organism. Studies show that the gut microbiota of gout patients differs from that of healthy people. Only certain types of bacteria dominate, while others are in a minority. This may lead to digestive disorders and, consequently, digestive problems. In our research paper, we wanted to determine whether the composition of probiotic capsules can worsen digestive problems in patients with gout. We assumed that the uricase enzyme can be associated with digestive problems. We used probiotic bacteria from capsules and found that among these only *Bacillus subtilis* secreted the uricase enzyme. Experiments showed that it is eliminated constitutively. The cultivation of *E. coli* and *B. subtilis* in uric acid media showed that under better conditions, *B. subtilis* inhibits the growth of *E. coli*, which was used as a representative of the normal human microbial flora. Based on this, we can conclude that by secreting the uricase enzyme and in an environment with elevated levels of uric acid, *Bacillus subtilis* negatively affects normal intestinal microbial flora. Therefore, the presence of the genus *Bacillus* in probiotic capsules used by gout patients is not recommended.

Izboljšava PET-skenerja z zmožnostjo meritve časa preleta

MIHA POMPE, Gimnazija Vič

Mentor: **Rok Pestotnik**, Institut Jožef Stefan

Somentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič

Pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) uporabljamo za lociranje rakavih tkiv in diagnosticiranje Alzheimerjeve bolezni. S to raziskavo smo izboljšali delovanje PET-skenerja, s čimer smo povečali možnosti za zgodnejšo diagnozo in natančnost lociranja ciljnega tkiva. Zato lahko bolnika zdravimo bolj ciljno ter mu omogočamo hitrejšo okrevanje in manjši poseg v njegovo telo. Celoten proces PET-slikanja je za bolnika manj stresen, saj z boljšo resolucijo skrajšamo čas slikanja. Pred slikanjem bolniku vbrizgajo majhno količino radioaktivnega sevalca (kontrasta), ki se v večji meri veže na ciljno tkivo in razpade na dva gamažarka. Skener zazna njuno pozicijo v dveh točkah, med katerima poteka črta, na kateri je prišlo do anihilacije. Več takšnih dogodkov uporabimo za konstruiranje 3D-razporeditve kontrasta. Z novo tehniko merjenja TOF (time-of-flight), s katero merimo časovno razliko med dvema zadetkoma, lahko z manj meritvami dosežemo boljšo ločljivost. V kombinaciji z novo tehniko merjenja je k boljši ločljivosti prispevala nova tehnologija, ki je ne uporabljajo v komercialnih PET-skenerjih. Izdelali smo TOF PET-modul, ki vsebuje kristale PbF_2 , prevlečene s črno barvo, silicijeve fotopomnoževalke in elektroniko. Razvoj zelo hitre elektronike nam je omogočil, da smo dosegli časovno ločljivost 190 ps, kar je znatna izboljšava v primerjavi z najnaprednejšimi komercialnimi PET-skenerji, ki dosegajo 500 ps. TOF PET-modul je tudi do 70 % cenejši od najboljših komercialnih alternativ.

Positron Emission Tomography with Time-of-Flight Capabilities

MIHA POMPE, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: **Rok Pestotnik**, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič Grammar School

Positron emission tomography (PET) scanners are used for locating cancerous tissues and diagnosing Alzheimer's disease. In this research, we improved the operation of a PET scanner, thereby increasing the chances of early diagnosis and the accuracy of the targeted tissue location. The result is a more focused treatment yielding faster recovery and fewer changes to the patient's body. The whole process of a PET scan is less stressful for the patient, since a higher resolution decreases the scanning time. Patients undergoing a PET scan receive an injection of a very small amount of a radioactive material or tracer, a compound that mostly settles in the targeted tissue and decays into two gamma rays. Two detection points define the line of response on which annihilation of a positron took place. Several measurements taken in this manner can be combined and used to construct a 3D distribution of positron emitters. A new measurement technique TOF (time-of-flight) measures the difference in time between two detectors and provides a better resolution with fewer measurements. Higher accuracy was achieved with a combination of this new measurement technique and a new technology not used in commercial PET scanners. A TOF PET module, containing PbF_2 crystals coated with black paint as Cherenkov radiators, silicon photomultipliers and fast electronics, was developed. This allowed us to achieve a timing resolution of 190 ps, which is a significant improvement in comparison to the most advanced commercial PET scanners that can achieve 500 ps. A TOF PET module also costs up to 70% less than the best commercial alternative.

Uporaba natrijevega tetrafluoroborata pri sintezi stabilnih diazonijevih soli; preučitev, optimizacija in generalizacija reakcije

DAVID RIBAR, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

Mentorica: **Irena Drofenik**, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

Arildiazonijevi tetrafluoroborati so intermediati, ki so izolirani pri reakciji diazotiranja aromatskih aminov. Zaradi velikega števila raznovrstnih nadaljnjih reakcij, v katerih lahko sodelujejo kot čisti reaktanti, predstavljajo velik potencial za sintezne aplikacije. V tej raziskovalni nalogi sta proučena diazotiranje in obarjanje treh aromatskih aminov: anilina, 4-aminofenola in 4-aminobenzojske kisline. Diazonijev ion, ki je nastal z reakcijo z anilinom, se uspešno sintetizira in izolira. Karakterizira se z določanjem tališča, IR in protonske NMR-analize. Uporabi se lahko v treh nadaljnjih Sandmeyerjevih reakcijah.

Use of Sodium Tetrafluoroborate in the Synthesis of Stable Diazonium Salts; Study, Optimisation and Generalisation of Reaction

DAVID RIBAR, School Centre Celje, Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering

Supervisor: **Irena Drofenik**, School Centre Celje, Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering

Aryldiazonium tetrafluoroborates are isolated intermediates from the reaction of aromatic amine diazotisation. They have a significant synthetic potential because of their possible use in further syntheses as purified reactants. This research paper studies the reaction of diazotization and precipitation of three aromatic amines: aniline, 4-aminophenol and 4-aminobenzoic acid. The diazonium ion, created in the reaction with aniline, is successfully isolated and characterised with melting point determination, IR and proton NMR analysis. It is also used in three successive Sandmeyer reactions.

Akumulacija in izločanje mineralov, zaužitih s prehranskim dopolnilom – analiza krvi, urina in las

NUŠA AVGUŠTINČIČ, JAN VAN ELTEREN, JAKOB VID ZUPANČIČ, *Gimnazija Novo mesto*

Mentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

Mentor: Vid Simon Šelih, Kemijski inštitut

Mentorica: Ingrid Falnoga, Inštitut Jožef Stefan

Namen našega dela je bil pri treh 17-letnih prostovoljcih spremljati akumulacijo in izločanje mineralov po 27-dnevem jemanju vitaminsko-mineralnega prehranskega dopolnila Supradyn energija Q10. Uporabili smo tehniki ICP-MS in LA-ICP-MS, s katerima smo v polni krvi, serumu, urinu in lasih spremljali koncentracije izbranih elementov. Da bi preverili pravilnost rezultatov, smo rezultate analiz za posamezne elemente v standardnih referenčnih materialih primerjali z njihovimi certificiranimi vrednostmi. V polni krvi smo spremljali koncentracije Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Se in Pb pred jemanjem prehranskega dopolnila in po njem. V serumu smo poleg teh elementov določili še vsebnost As, Mo in Hg. V urinu smo določali koncentracije esencialnih elementov Mg, Zn, Mo, Co, Cu in Se ter toksičnih As, Cr, Pb in Cd. V vzorcih krvi, seruma in urina so se povečevale koncentracije vseh elementov, ki so jih prostovoljci prejeli z vitaminsko-mineralnim izdelkom. Posebej opazno je bilo povečanje koncentracij v urinu po vnosu treh tablet hkrati na 19. dan raziskave. V lasih smo spremljali skupne koncentracije Mg, Ca, Co, Cu, Zn in Hg, izmerjene z ICP-MS. Koncentracije so primerljive z izsledki raziskav za neizpostavljeno populacijo. Poleg skupnih koncentracij smo z analizo tehniko LA-ICP-MS v lasih spremljali tudi longitudinalno porazdelitev Mg, Cu, Hg, Pb in Zn po lasu.

Accumulation and Excretion of Minerals after Exposure to a Dietary Supplement – Blood, Urine and Hair Analysis

NUŠA AVGUŠTINČIČ, JAN VAN ELTEREN, JAKOB VID ZUPANČIČ, *Gimnazija Novo mesto Grammar School*

Supervisor: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Vid Simon Šelih, National Institute of Chemistry

Supervisor: Ingrid Falnoga, Jožef Stefan Institute

The purpose of our work was to monitor the accumulation and excretion of minerals in three 17-year-old volunteers after 27 days of receiving the vitamin-mineral dietary supplement Supradyn Energy Q10. ICP-MS and LA-ICP-MS techniques were used to monitor the concentrations of selected elements in whole blood, serum, urine and hair. In order to check the accuracy of the results, the results of analyses for individual elements in standard reference materials were compared to their certified values. In whole blood, the concentrations of Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Se and Pb were monitored before and after taking a dietary supplement. In addition to these elements, the concentrations of As, Mo and Hg were determined. The concentrations of essential elements Mg, Zn, Mo, Co, Cu and Se, as well as toxic As, Cr, Pb, and Cd were determined in urine. In blood, serum and urine samples, the concentrations of all elements that were obtained with the vitamin-mineral preparation were found to be higher after the conclusion of this study. Particularly noticeable was the increase in urine concentrations following the administration of three tablets at once on day 19 of the study. In hair, the total concentrations of the following elements were monitored with ICP-MS: Mg, Ca, Co, Cu, Zn and Hg. Concentrations are comparable with the results of studies performed for an unexposed population. In addition to the total concentrations, the longitudinal distribution of Mg, Cu, Hg, Pb and Zn was monitored in hair with the LA-ICP-MS analytical technique.

Vpliv naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto

ANJA KORES, II. gimnazija Maribor

Mentorica: **Maja Rupnik**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

Somentorica: **Valerija Tkalec**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

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

V raziskovalni nalogi smo preizkušali, kako se črevesna mikrobiota *in vitro* spreminja v prisotnosti naravnih učinkovin (česna, borovnic, korenike srčne moči in industrijske konoplje), ki naj bi pozitivno vplivale na prebavo. Za testiranje smo uporabili gojeno črevesno mikrobioto otroka in odraslega. Inkubirali smo ju v prisotnosti izbranih učinkovin. Nato smo na selektivnih gojiščih določali število dveh skupin bakterij: enterobakterij in laktobacilov. V črevesni mikrobioti odraslega sta tako korenika srčne moči kot česen povečala število enterobakterij in laktobacilov, česen za več kot 10-krat, industrijska konoplja pa je bistveno zmanjšala število obeh skupin bakterij. Na rast enterobakterij so negativno vplivale tudi borovnice, vendar je število laktobacilov v primerjavi s kontrolo ostalo enako. Rezultati testiranja na otroški mikrobioti so se skladali le delno; število enterobakterij pri borovnici in industrijski konoplji je namreč ostalo nespremenjeno. V poskusu z otroško mikrobioto nismo zaznali laktobacilov.

The Effect of Natural Substances on Gut Microbiota

ANJA KORES, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Maja Rupnik**, National Laboratory of Health, Environment and Food

Co-supervisor: **Valerija Tkalec**, National Laboratory of Health, Environment and Food

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

The aim of this research project was to assess the effect of various natural substances (garlic, blueberries, *Potentilla erecta* root and industrial hemp) on gut microbiota *in vitro*. The listed substances have been generally considered to have a positive effect on digestion; however, the number of studies is limited. Testing was performed on cultured adult and child gut microbiota, which were incubated in the presence of selected substances. The effect was measured by the difference in numbers of two bacterial groups, enterobacteria and *Lactobacillus* that were cultured on appropriate selective media. In the presence of *Potentilla erecta* root and garlic, the number of both enterobacteria and *Lactobacillus* in adult gut microbiota increased, especially in the presence of garlic, where the number was ten times higher in comparison to control. In the presence of industrial hemp, numbers of both bacterial groups decreased. Blueberries negatively affected the growth of enterobacteria; however, there was no difference in the number of *Lactobacillus* when compared to control. The testing results for child gut microbiota overlapped only partially with those for adult microbiota; blueberries and industrial hemp did not affect the number of enterobacteria.

Analiza citotoksičnosti divje ščetine (*Dipsacus sylvestris*)

MINEJA LEBAN, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Mentorica: **Magdalena Klasinc**, Gimnazija Jurija Vege Idrija

Somentorja: **Aljaž Gaber**, **Berta Košmrlj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Divja ščetina (*Dipsacus sylvestris*) se v tradicionalni kitajski medicini že dolgo uporablja, v zahodnem svetu pa je postala znana šele v zadnjem obdobju. Priporočajo jo za zdravljenje zastarane borelioze. Lajmska boreliozna je posledica okužbe z bakterijo *Borrelia burgdorferi*, prenaša pa se s pikom okuženega klopa *Ixodes ricinus*. V raziskovalni nalogi sem proučevala citotoksičnost izvlečkov divje ščetine iz korenine in listov. Ker je borelija zelo patogena bakterija, sem poskuse protibakterijskega delovanja izvedla na po Gramu negativni bakteriji *E. coli*. Izvlečke sem pripravila na osnovi ekstrakcije s topili diklorometan, etilacetat in aceton ter preverila njihove antibakterijske učinke na bakterije najprej na trdnem, nato pa še v tekočem gojišču. Rezultati niso pokazali antibakterijskega delovanja na paličasti bakteriji *E. coli*, izvlečki so celo pospešili rast bakterij. Na osnovi rezultatov sem postavila hipotezo, da bi izvlečki divje ščetine lahko ustvarjali ugodne pogoje za pretvorbo mirujočih spor v aktivne spirohete bakterij *Borrelia burgdorferi*, ki bi jih potem imunski sistem in antibiotiki uničili. Za preverjanje postavljenih hipotez sem predlagala nadaljnje raziskave, ki pa so zahtevne, saj bi jih bilo treba izvesti na bakterijah *Borrelia burgdorferi*.

Cytotoxicity Analysis of Wild Teasel (*Dipsacus sylvestris*)

MINEJA LEBAN, Gimnazija Jurija Vege Idrija Grammar School

Supervisor: **Magdalena Klasinc**, Gimnazija Jurija Vege Idrija Grammar School

Co-supervisors: **Aljaž Gaber**, **Berta Košmrlj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Wild teasel (*Dipsacus sylvestris*) has been used for a long time in traditional Chinese medicine, but has only become known in the western world recently as the treatment for late disseminated Lyme disease. Lyme disease or Lyme borreliosis, an infectious disease caused by *Borrelia burgdorferi*, is transmitted by bites of infected *Ixodes ricinus* ticks. This research paper studies the cytotoxicity of extracts obtained from wild teasel's roots and leaves. As the *Borrelia* bacterium is highly pathogenic, testing of the antibacterial activity was conducted using a gram-negative *E. coli* bacterium. Extracts obtained from wild teasel's roots and leaves were prepared on the basis of solvent extraction using dichloromethane, ethyl acetate and acetone. The antibacterial effects of the extracts on the bacteria were first tested on the solid, and then in the liquid medium. The results did not show any antibacterial activity of extracts obtained from wild teasel on the *E. coli* bacillus. On the contrary, the extracts encouraged the growth of bacteria. Based on the results, it can be hypothesised that the extracts obtained from wild teasel can create suitable conditions for the conversion of latent cyst forms into active *Borrelia burgdorferi* spirochetes, which are then destroyed by the immune system and antibiotics. For the purpose of verifying this hypothesis, further research on *Borrelia burgdorferi* bacteria would need to be undertaken.

Fotokatalitska razgradnja reaktivnega barvila reactive blue 19 s TiO_2 , dopiranim s cirkonijem in bakrom

CHRIS ČERNE, TOMAŽ GRAVNAR, Gimnazija Nova Gorica

Mentorica: **Olena Pliekhova**, Univerza v Novi Gorici

Somentorica: **Silvana Štucin**, Gimnazija Nova Gorica

V okviru predmeta Projektno delo z osnovami raziskovalnega dela sva izdelala raziskovalno nalogo s področja ekologije z varstvom okolja. Ukvarjala sva se z optimizacijo fotokemične razgradnje reaktivnega barvila reactive blue 19. To barvilo se v obliki vodne raztopine uporablja za barvanje blaga v tekstilni industriji, ostanke pa prek čistilne naprave izpuščajo v reko. Ker se v čistilnih napravah ne razgradi v celoti, prehaja v reko in škodljivo vpliva na vodne organizme. Za fotokemično razgradnjo barvila se uporablja titanov dioksid. Ker pa njegova fotokatalitska učinkovitost na sončni svetlobi ni zadovoljiva, sva jo želela izboljšati tako, da sva ga dopirala z bakrom oz. cirkonijem v majhnih koncentracijah (0,5 % in 1 %). Uporabila sva metodo sežiganja raztopin. Fotokatalizo sva izvedla v simulatorju sončne svetlobe. Zmanjševanje koncentracije reaktivnega barvila sva spremljala s spektrofotometrom. Po končanem obsevanju sva izvedla tudi analizo skupnega organskega ogljika (TOC).

Photocatalytic Decomposition of Reactive Blue 19 Reactive Dye with TiO_2 Doped with Copper and Zirconium

CHRIS ČERNE, TOMAŽ GRAVNAR, Gimnazija Nova Gorica Grammar School

Supervisor: **Olena Pliekhova**, University of Nova Gorica

Co-supervisor: **Silvana Štucin**, Gimnazija Nova Gorica Grammar School

Our research in the field of ecology and environmental protection was conducted within the scope of the *Project work with basics of research work* (PDzORD) course. We focused on the optimisation of photocatalytic decomposition of Reactive Blue 19 reactive dye. This colorant in the form of a solution is used in the textile industry for textile dyeing. Its residues flow into rivers after being processed in water treatment plants. However, the dye does not decompose completely and therefore has a detrimental effect on aquatic organisms. TiO_2 is used as a photocatalyst for photochemical decomposition of the dye. Since the photocatalytic activity of TiO_2 is very low under sunlight, we tried to improve it by doping the photocatalyst with low concentrations of copper or zirconium (0.5% and 1%) using the solution combustion method. The experiment was performed in a solar light simulator. The reduction of the reactive dye concentration was monitored with the spectrophotometer. After radiation, an analysis of total organic carbon (TOC) was performed.

Delovanje modelnih učinkovin družine benzosultamov na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

ANA GABROVŠEK, NIKA TAŠLER, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: **Marko Jeran**, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentorica: **Tjaša Klemen**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Saharin je organska spojina, ki se pogosto uporablja kot nekalorično umetno sladilo. Njegove soli se za trg proizvajajo že več kot 80 let. Zaradi velike aplikativnosti saharina in njegovih derivatov raziskovalci pripravljajo vse več učinkovin, s katerimi želijo doseči boljše delovanje. V raziskovalnem delu je opisan prispevek k biološki aktivnosti novega derivata saharina, imenovanega metil 4-hidroksi-1,1-dioksi-2H-1,2-benzotiazin-3-karbooksilat (6Sac), na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, predstavljena pa je tudi kvalitativna primerjava preiskovane aktivnosti in aktivnosti natrijevega saharinata (natrijeva sol saharina). Živost modelnega organizma smo določali s štetjem celic pod mikroskopom, pri čemer smo si pomagali z metilenskim modrilom in kultiviabilnostjo. Raziskava je pokazala, da ciklični derivat saharina z estrsko funkcionalno skupino na modelni organizem učinkuje zaviralno. Pri kvalitativni primerjavi se je pokazalo, da je aktivnost testirane učinkovine in vsem poznanega natrijevega saharinata na podobni stopnji kot pri modelnem organizmu *Saccharomyces cerevisiae*.

Biological Activity of Model Compounds of Benzosultam Analogues on *Saccharomyces cerevisiae* Yeast

ANA GABROVŠEK, NIKA TAŠLER, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Marko Jeran**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

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

Saccharine is an organic compound often used as a calorie-free artificial sweetener. Its salts have been present in the market for more than 80 years. Due to the high applicatory factor of saccharine and its derivatives, researchers are synthesising more and more active ingredients with the aim of increasing its performance. Our research focused on the contribution of the biological activity of a newly synthesised saccharine derivative, methyl 4-hydroxy-1,1-dioxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate (6Sac), on *Saccharomyces cerevisiae* yeast, and on a qualitative comparison of the researched activity to that of the saccharine sodium salt. The activity of saccharine sodium salt was measured using two different approaches: a) counting live/dead yeast cells with methylene blue, and b) counting colony-forming units (CFUs). Our research showed that the saccharine derivative with an ester functional group negatively affects the growth and reproduction of the model organism. The qualitative comparison of the tested substance activity to the known activity of saccharine sodium salt is within a comparable range for the model organism *Saccharomyces cerevisiae*.

Izražanje rekombinantnega proteina iz družine aktinoporinov

NINA PUST, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentorica: **Marjetka Podobnik**, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: **Tomaž Švigelj**, Kemijski inštitut Ljubljana

Potencial aktinoporinov za uporabo v biotehnologiji še ni dobro raziskan, zato smo izolirali aktinoporin Halt-6, da bi na njem opravili nadaljnje raziskave. Na začetku je bilo treba v bakterije *E. coli* s toplotnim šokom vstaviti plazmid za Halt-6, bakterije vzgojiti na selektivnem gojišču (plazmid je bil odporen proti kanamicinu) in z IPTG inducirati sintezo proteina. Celično membrano smo razbili s sonikatorjem. Protein Halt-6 ima His-tag, zato smo ga izolirali z nikljevo afinitetno kromatografijo. S tem smo ga ločili od proteinov, ki se na nikelj niso vezali. Ko smo ugotovili, v kateri frakciji prve kromatografije je največ proteina, smo s TEV-proteazo odrezali His-tage in protein spet dali na kolono nikljeve afinitetne kromatografije, le da se sedaj na nikelj ni vezal, torej se je spral z drugim pufrom. S tem smo ga ločili od proteinov, ki so se na nikelj močno vezali. Frakcijo z največ proteina iz druge kromatografije smo nato dali še na gelsko kromatografijo, ki je protein po velikosti ločila od drugih proteinov. Po vsaki kromatografiji smo naredili hemolizo, ki je pokazala, v kateri frakciji je največ proteina, ter gelsko elektroforezo, ki je pokazala, kako čista je frakcija. Potrdili smo dve od treh hipotez, ene pa nismo mogli ne potrditi ne ovreči.

Expression of Recombinant Protein from the Actinoporins Family

NINA PUST, Biotechnical Educational Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

Supervisor: **Marjetka Podobnik**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

Co-supervisor: **Tomaž Švigelj**, National Institute of Chemistry, Ljubljana

The potential use of actinoporins in biotechnology has not yet been well researched, therefore the Halt-6 protein was isolated in order to obtain a clean protein for further research. First, we placed a plasmid for Halt-6 into the *E. coli* bacteria using temperature shock. We then grew the bacteria in a selective growth medium (the plasmid contained the kanamycin resistance gene) and induced the synthesis of the protein using IPTG. Then, we broke the cell membrane using sonication. The Halt-6 protein has a His-tag that we separated using nickel-affinity chromatography. Halt-6 was now separated from proteins with a weak affinity for nickel. We then cut off the His-tags with TEV and put the protein on chromatography again. This time, its affinity for nickel was weak because of the missing His-tags, so we were able to separate it from proteins with a strong affinity for nickel. We then put the fraction with the most Halt-6 protein on a size exclusion chromatography to separate the proteins by size. After each chromatography, we performed a haemolysis test to determine which fraction contained the most Halt-6 and/or a gel electrophoresis to determine how clean the fractions were. The isolation was successful and we were able to confirm two out of three hypotheses; however, we were unable to confirm or deny the remaining one.

Primerjava alternativnih celuloznih odpadnih materialov kot substratov za gojenje trosnjakov bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*)

CIRIL CEROVŠEK, LUKA OSREDKAR, GREGOR OSREDKAR, Gimnazija Želimlje

Mentorica: **Vida Šinkovec**, Gimnazija Želimlje

Somentor: **Andrej Gregori**, MycoMedica, d. o. o.

V raziskovalnem delu smo se posvetili gojenju gob. Zanimalo nas je, kakšne so možnosti za njihovo gojenje na preprostih celuloznih substratih. Primerjali smo rast trosnjakov bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) na kartonu, reklamnih letakih in razrezanem potiskanem pisarniškem papirju. Primerjali smo maso trosnjakov, opazovali njihove lastnosti in spremljali biološko učinkovitost micelijev, iz katerih so trosnjaki rasli. V analizi smo ugotavljali, kateri papirnati substrat je najprimernejši za gojenje. Ugotovili smo, da podgobje bukovega ostrigarja raste na vseh celuloznih substratih, največji pridelek trosnjakov pa je bil na razrezanem pisarniškem papirju, na katerem je micelij dosegel kar 40-odstotno biološko učinkovitost. Z delom smo želeli dokazati, da je gojenje gob na papirnatih substratih zanimivo tako zaradi prehranskih možnosti kot zaradi ekoloških rešitev, ki jih ponuja.

Alternative Cellulose Waste Materials as Substrates for Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Fruit Body Cultivation

CIRIL CEROVŠEK, LUKA OSREDKAR, GREGOR OSREDKAR, Gimnazija Želimlje Grammar School

Supervisor: **Vida Šinkovec**, Gimnazija Želimlje Grammar School

Co-supervisor: **Andrej Gregori**, MycoMedica d.o.o.

Our research work was dedicated to the fascinating process of mushroom cultivation. We were interested in the possibilities of mushroom growth on simple cellulose-based substrates. We compared the growth of fruit bodies of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on cardboard, commercial flyers and used shredded office paper. The mass and characteristics of fruit bodies were observed along with the biological efficiency of the mycelium forming them. In our analysis, we tried to determine which paper substrate is best suitable for cultivation. We discovered that the mycelium of the oyster mushroom grows on all cellulose substrates. The largest biological efficiency of the mycelium (40%) forming the fruit bodies was recorded on used shredded office paper. We tried to show that mushroom cultivation on paper-based substrates is an interesting opportunity for nutritional as well as ecological reasons.

Smrekova kresilača (*Fomitopsis pinicola*) – zdravilna ali radioaktivna?

KATJUŠA KRUPENKO, NEŽA RIBNIKAR, KAJA LIČEF, Gimnazija Jesenice

Mentorica: **Katarina Trontelj**, Gimnazija Jesenice

Somentor: **Andrej Gregori**, Mycomedica, d. o. o.

Somentor: **Alen Šest**, SIJ Acroni, d. o. o., Jesenice

Glive opravljajo več pomembnih vlog ne samo v ekosistemu, ampak tudi v človeškem življenju. Med njimi so tudi zdravilni učinki sekundarnih metabolitov, zlasti polifenolov. Hkrati pa je znano, da absorbirajo in akumulirajo številne škodljive snovi, tudi radioaktivne. V raziskovalni nalogi smo se osredotočile na drevesno gobo smrekovo kresilačo (*Fomitopsis pinicola*), ki raste tudi v naših gozdovih. Vzorce smo nabrale z debel poškodovanih smrek oz. panjev na Pokljuki, v Gorjušah, na Kofcah in v Radovni. Določale in primerjale smo vsebnost polifenolov in cezija v temno obarvani skorji in svetlo obarvani sredici. Ugotavljale smo količino skupnih fenolov v vodnem in metanolnem ekstraktu ter ugotovile, da je vsebnost polifenolov večja v vodnem ekstraktu. Ker smo vzorce nabrale na Pokljuki, ki je znana po kontaminaciji z radioaktivnim črnobilskim cezijem (^{137}Cs), glive pa so znane kot bioakumulatorji radionuklidov, smo določale vsebnost ^{137}Cs v trosnjakih in ugotavljale, ali obstaja povezava med vsebnostjo cezija in polifenolov. Rezultati so pokazali, da se cezij ne veže na polifenole, kot smo na začetku predvidevale, kar je ugodno za uporabo ekstraktov polifenolov v zdravilne namene. Ugotovile smo tudi, da je pri ekstrakciji polifenolov z metanolom prenos ^{137}Cs iz trosnjaka v ekstrakt bistveno manjši kot pri ekstrakciji z vodo. Zato priporočamo metodo ekstrakcije z metanolom, zlasti na kontaminiranih območjih.

Red Belt Conk (*Fomitopsis pinicola*) – Medicinal or Radioactive?

KATJUŠA KRUPENKO, NEŽA RIBNIKAR, KAJA LIČEF, Gimnazija Jesenice Grammar School

Supervisor: **Katarina Trontelj**, Gimnazija Jesenice Grammar School

Co-supervisor: **Andrej Gregori**, Mycomedica d.o.o.

Co-supervisor: **Alen Šest**, SIJ Acroni d.o.o., Jesenice

Fungi play an important role not only in the ecosystem, but also in many aspects of human life. These include the medicinal effects of secondary metabolites, especially polyphenols. At the same time, they are known to absorb and accumulate a number of harmful substances, including radioactive ones. This research project focused on the red belt conk (*Fomitopsis pinicola*), which also grows in Slovenian forests. Samples were collected from trunks of damaged spruces or their stumps on Pokljuka, Gorjuše, Kofce and in Radovna. The content of polyphenols and caesium in the dark coloured crust and the light coloured core was determined and compared. The quantity of total polyphenols in the aqueous and methanolic extract was determined – higher polyphenol content was recorded in the aqueous extract. Since samples were collected on Pokljuka, which is known for being contaminated with radioactive Chernobyl caesium (^{137}Cs), and since fungi are known to be bio accumulators of radionuclides, we determined the ^{137}Cs content in fruiting bodies and tried to establish a link between the content of caesium and polyphenols. Our results showed that caesium does not bind to polyphenols, as was initially predicted, which is advantageous for the use of polyphenol extracts for healing purposes. Our results also showed that when extracting polyphenols with methanol, the transfer of ^{137}Cs from the fruiting body into the extract is significantly lower compared to extraction with water. Therefore, the methanol extraction method is recommended, especially in contaminated areas.

Proučevanje antioksidativnih in protimikrobnih učinkov nekaterih rastlinskih ekstraktov in vitamina C v kozmetičnih izdelkih

ZALA BOŽANIČ, JANA UŠEN, I. gimnazija v Celju

Mentorica: **Mojca Alif**, I. gimnazija v Celju

Somentorica: **Polona Jamnik**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Raziskali smo tri naravne snovi – hmelj, granatno jabolko in vitamin C, ki bi jih lahko zaradi njihovih antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti uporabljali kot konzervanse v naravni kozmetiki. V ta namen smo izdelali kreme z dodanimi naravnimi snovmi in kot kontrolo še kremo s sintetičnim konzervansom. Z inokulacijo z *E. coli* smo preverjali protimikrobne učinke, na napravi Rancimat pa smo preizkušali antioksidativne lastnosti teh snovi. Rezultati so pokazali nezanemarljive antioksidativne lastnosti ekstrakta hmelja in granatnega jabolka ter protimikrobno delovanje vitamina C.

Antioxidative and Antimicrobial Effects of Certain Plant Extracts and Vitamin C in Cosmetic Products

ZALA BOŽANIČ, JANA UŠEN, I. Gimnazija Celje Grammar School

Supervisor: **Mojca Alif**, I. Gimnazija Celje Grammar School

Co-supervisor: **Polona Jamnik**, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

We analysed three different substances that could be used as preservatives in natural cosmetic products: vitamin C, hops extract and pomegranate extract. We made creams, and added these substances to them. One of the creams contained only a synthetic preservative. We tested the antimicrobial effects by inoculating creams with *E. coli* and analysed the antioxidative properties with the 892 Professional Rancimat device. Results showed that hops and pomegranate extracts have excellent antioxidative properties. The best antimicrobial agent proved to be vitamin C.

Sinteze nanodelcev z ujetimi ekstrakti ter določitev koloidnih lastnosti disperzij

NIKO FARIČ, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

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

Somentorica: **Tjaša Kraševac Glaser**, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

V raziskovalni nalogi sem skušal pripraviti antioksidativno in uporabno disperzijo, ki bi lahko bila alternativa obstoječim sintetičnim formulacijam. Disperzije sem pripravil z ionotropnim geliranjem, in sicer sem 1-odstotni raztopini hitozana dodal 0,2-odstotno raztopino TPP-ja. Da bi dosegel antioksidativnost, sem skušal v nastajajoče nanodelce ujeti ekstrakte hmelja in grenivkinih pečk, ki imajo antibakterijske lastnosti ter so lahko dostopni in cenovno ugodni. Antioksidativnost sem določil z metodo ABTS. Uporabnost je odvisna od stabilnosti, ki sem jo določil na podlagi PDI (polidisperzni indeks), zetapotenenciala, velikosti delcev ter razmerja med največjimi in najmanjšimi delci. Ugotovil sem, da so hitozanski nanodelci z ujetimi ekstrakti hmelja manj antioksidativni kot hitozanski nanodelci z ujetimi ekstrakti grenivkinih pečk, vendar so bolj stabilni. Njihov PDI je manjši, zetapotenencial je večji, razmerje med najmanjšimi in največjimi delci pa je manjše. Hitozanski nanodelci z ujetimi ekstrakti hmelja so torej boljše opcija. Za uporabo pa bi bilo treba izvesti dodatne raziskave, ki bi pokazale, ali se antibakterijske lastnosti ekstraktov ohranijo in ali imajo ekstrakti v kombinaciji s hitozanom kakšne neželene učinke.

Nanoparticle Syntheses Using Trapped Extracts and Determination of Colloidal Properties of Dispersions

NIKO FARIČ, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

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

Co-supervisor: **Tjaša Kraševac Glaser**, Faculty of Engineering, University of Maribor

The object of my research was the preparation of an antioxidant and useful dispersion that could serve as an alternative to synthetic formulations. The dispersion was prepared using the ionotropic gelation technique by adding a 0.2% TPP (sodium tripolyphosphate) solution to a 1% chitosan solution. To make the dispersion antioxidant, grapefruit seed and hops extracts (both easily attainable, affordable and with anti-bacterial properties) were trapped in the newly formed nanoparticles. The antioxidant activity was determined using the ABTS method. The usefulness of the dispersion depends on its stability, which was determined on the basis of the PDI (polydispersity index), zeta potential, particle sizes and the ratio between the biggest and the smallest particles. The research showed that hops extracts encapsulated with chitosan nanoparticles are less antioxidant than grapefruit seed extracts encapsulated with chitosan nanoparticles. The latter are, however, more stable. Their PDI and the ratio between the biggest and the smallest particles are smaller, and their zeta potential is bigger. Hops extracts encapsulated with chitosan nanoparticles are a better option. Additional research should be conducted to determine whether antibacterial properties of extracts used with chitosan nanoparticles are preserved and whether the combined use of extracts and chitosan nanoparticles can cause any side effects.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

32	Špela Alič	68	Nina Ledinek
86	Nuša Avguštinčič	93	Kaja Ličef
80	Ana Babnik	59	Tijana Markovič
76	Kajetana Bevc	69	Mateja Mežnar
94	Zala Božanič	67	Urška Mohorič
62	Jasna Brčić	83	Anja Moškrič
58	Helena Brodnik Žugelj	72	Miha Mrzlikar
92	Ciril Cerovšek	92	Gregor Osredkar
89	Chris Černe	92	Luka Osredkar
54	Janja Dermol-Černe	79	Patrik Pečavar Nežmah
44	Andrej Emanuel Cotman	84	Miha Pompe
86	Jan van Elteren	82	Maša Predin
95	Niko Farič	91	Nina Pust
77	Uroš Filipič	64	Gregor Ratek
71	Veronika Furlan	85	David Ribar
90	Ana Gabrovšek	93	Neža Ribnikar
89	Tomaž Gravnar	20	Kaja Rožman
66	Anžej Hladnik	83	Nina Selan
26	Gabrijela Horvat	61	Alen Sevšek
80	Greta Junger	78	Satja Škobalj
78	Kaja Keglevič	53	Urša Štanfel
56	Anita Klančar	65	Jernej Štukelj
63	Tamara Knific	90	Nika Tašler
74	Gregor Kodrič	55	Katja Traven
81	Katarina Kokalj	73	Janja Umnik
87	Anja Kores	94	Jana Ušen
75	Ina Kosmač	70	Tilen Volčanšek
60	Gregor Kravanja	86	Jakob Vid Zupančič
93	Katjuša Krupenko	57	Ožbej Zupančič
88	Mineja Leban	38	Špela Zupančič

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

94	Mojca Alif	90	Tjaša Klemen
57	Andreas Bernkop-Schnürch	70	Marijan Kočevar
71, 82	Urban Bren	67	Mitja Kolar
76	Maja Čemažar	88	Berta Košmrlj
34	Tanja Dreo	60, 77	Maša Knez Hrnčič
64	Rok Dreu	28, 60	Željko Knez
85	Irena Drofenik	95	Tjaša Kraševac Glaser
79	Mateja Erdani Kreft	77	Gregor Kravanja
86	Ingrid Falnoga	40, 65	Julijana Kristl
66	Jana Ferdin	63	Tea Lanišnik Rižner
68	Matjaž Finšgar	66	Metka Lenassi
88	Aljaž Gaber	61	Nathaniel I. Martin
22	Stanislav Gobec	67	Frank-Michael Matysik
95	Mateja Godec	54	Damijan Miklavčič
92, 93	Andrej Gregori	81	Ingrid Milošev
83	Vesna Grgur	59	Irena Mlinarič Raščan
80	Neža Grgurevič	46	Barbara Mohar
72	Ester Heath	80, 84	Alenka Mozer
78, 87	Katja Holnthaner Zorec	28, 68	Zoran Novak
74	Jernej Iskra	84	Rok Pestotnik
94	Polona Jamnik	61	Roland J. Pieters
79, 90	Marko Jeran	62	Janez Plavec
74	Marjan Jereb	89	Olena Pliekhova
76	Urška Kamenšek	91	Marjetka Podobnik
82	Zdenka Keuc	72	Helena Prosen
88	Magdalena Klasinc	86	Janja Pust

34	Maja Ravnikar
81	Peter Rodič
56, 73	Robert Roškar
87	Maja Rupnik
54	Gregor Serša
65	Sami Svanbäck
53	Jurij Svete
22	Matej Sova
86	Vid Simon Šelih
81	Valerija Šemrl Kosmač
93	Alen Šest
92	Vida Šinkovec
46	Boris Šket
60	Mojca Škerget
71	Eva Španinger
58	Bogdan Štefane
89	Silvana Štucin
91	Tomaž Švigelj
87	Valerija Tkalec
56	Jurij Trontelj
93	Katarina Trontelj
55	Iztok Turel
69	Darko Uršič
75	Alenka Zvonar Pobirk
65	Jouko Yliruusi

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Maja Oberstar Falkner

Jezikovni pregled (slovenski jezik) Ksenija Kosem, Marta Anžlovar

Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik) Karmen Ulčnik, Meta Hauptman, Katarina Tomc

Produkcija Tanja Balantič, Klaudija Sečen

Fotografije Andrej Križ

Tisk BIROGRAFIKA BORI d.o.o.

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

www.krkinenagrade.si

48