

49. Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

49. Krkine nagrade | 49th Krka Prizes

29. simpozij

Zbornik povzetkov

Poslanstvo

Mlade raziskovalce spodbujamo k ustvarjalnosti, raziskovanju in razvoju.

Vizija

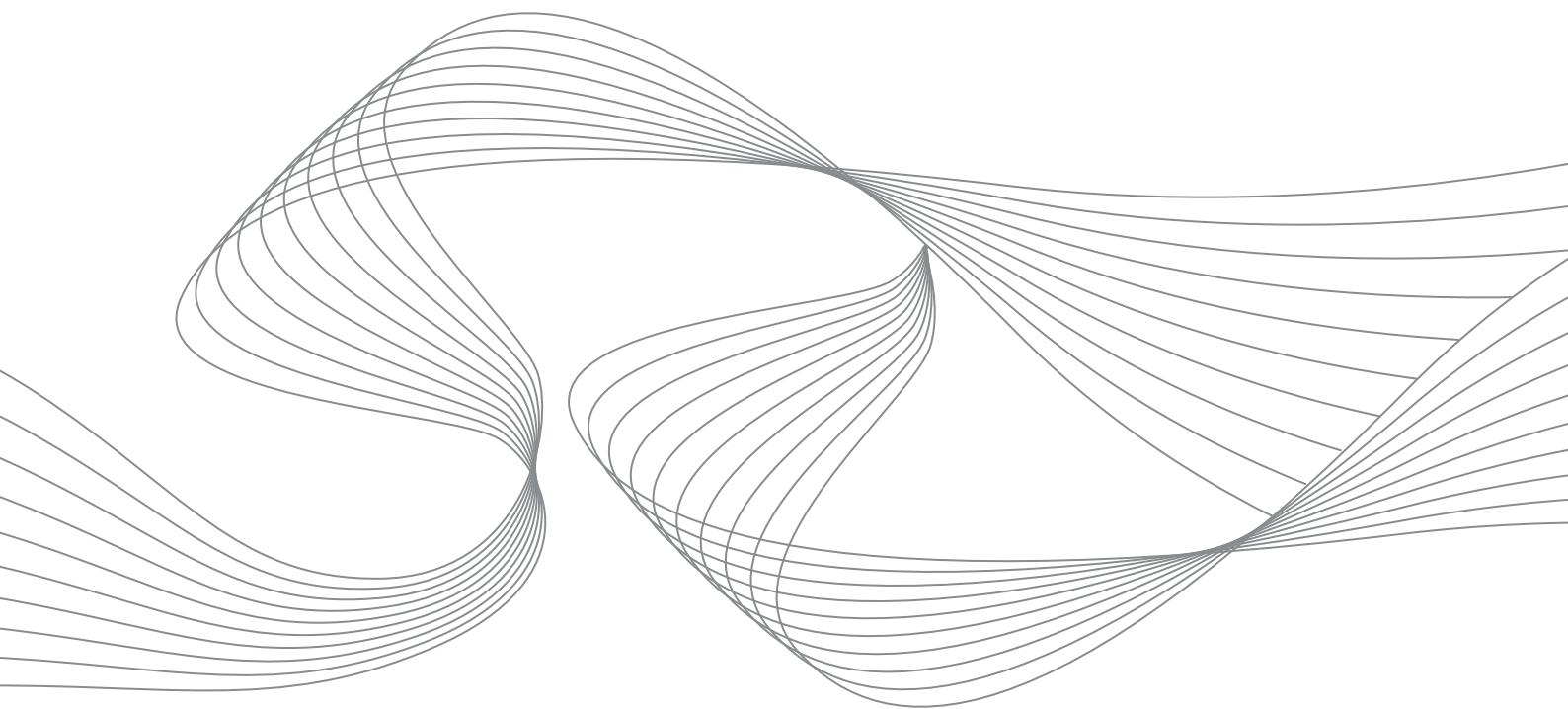
Spodbujamo mladostno zagnanost in stremljenje k odličnosti v raziskovalnem delu. Tlakujemo pot novim spoznanjem, ki bodo prispevala k novim izdelkom prihajajočih generacij.



49. Krkine nagrade
ZNANOST POVEZUJE.

29. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 18. oktober 2019



Častni odbor 49. Krkinih nagrad	Jože Colarič , predsednik uprave in generalni direktor Krke akad. prof. dr. Tadej Bajd , predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti prof. dr. Igor Papič , rektor Univerze v Ljubljani prof. dr. Zdravko Kačič , rektor Univerze v Mariboru mag. Matjaž Tuš , predsednik Slovenskega farmacevtskega društva dr. Albin Pintar , predsednik Slovenskega kemijskega društva prof. dr. Radko Komadina , predsednik Slovenskega zdravniškega društva
Svet Sklada Krkinih nagrad	dr. Aleš Rotar , predsednik prof. dr. Mihail Japelj , častni predsednik
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 , predsednica Simona Kastelic mag. Simona Torkar Flajnik dr. Jernej Zadnik
Glavni in odgovorni urednik	dr. Miha Plevnik
Recenzenti	Teja Barle Hus, dr. Primož Benkič, Marko Benkovič, dr. Jure Bezenšek, dr. Marko Bitenc, Tanja Blatnik, dr. Sergeja Bombek, dr. Rok Borštnar, dr. Polona Bukovec, dr. Irena Čarman, mag. Angela Čuk, dr. Alen Čusak, dr. Katarina Dobrovoljc, Rok Dragovan, Tina Ekar Likar, Blanka Emeršič, Vesna Flis, dr. Maja Florjanič, mag. Mihael Florjanič, Barbara Gartner, dr. Aleš Gasparič, mag. Alenka Glavač Povhe, dr. Ivan Gobec, Jana Golob, mag. Mojca Golob, Lidija Grčman, mag. Mateja Grošelj, Peter Hančič, dr. Ana Herman, dr. Žiga Hodnik, dr. Grega Hudovornik, Tina Hvala, mag. Miran Hvalec, dr. Špelca Jenko, dr. Boštjan Jerman, Aleš Judež, dr. Jože Kastelic, Milena Kastelic, dr. Davor Kiđemet, Ksenija Kikelj, dr. Maja Kincl Skube, dr. Dejan Klement, Živa Klobočar, Tanja Kohek, dr. Tanja Koleša Dobravc, Ina Kosmač, Primož Košir, Nina Kotar, mag. Helena Kotnik, dr. Borut Kovačič, Irena Kovačič, Simon Kovačič, dr. Nevenka Kožuh Eržen, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, dr. Vesna Krošelj, Andreja Kuhar, dr. Barbara Kunič Tešović, dr. Jernej Kužner, dr. Brigit Lapornik, dr. Roman Lenaršič, mag. Denise Leskovar, Irena Lindič, dr. Gregor Lorbek, mag. Matej Luštek, mag. Bronja Manček, Jelena Mandić, dr. Tatjana Mateovič Rojnik, dr. Primož Meh, Berta Mešnjak, Eva Mežnar, dr. Špela Miklič, Darja Milovanovič Jarh, Aleksander Miložič, dr. Anita Mlakar, Miha Mrzlikar, mag. Tamara Nemeč, Dušanka Oblak Božič, mag. Vesna Pahor, dr. Anica Pečavar, Mitja Pelko, Deja Petrovič Kuclar, Boštjan Piltaver, dr. Andreja Plaper, dr. Miha Plevnik, Luka Prem, Maja Preskar, mag. Aleša Punčuh Kolar, dr. Eva Pušavec Kirar, mag. Ivan Radež, dr. Nataša Rebolj, Vojko Rebolj, Marjeta Redek, dr. Matej Repič, Urška Ribič, dr. Aleš Rotar, mag. Martina Rozman, dr. Saša Rozman, Miloš Ružič, Mirjam Simčič Milharčič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, dr. Marko Slana, Janika Slanc Vovk, dr. Janez Smolič, Matej Stergar, Katarina Svetičič Gobec, dr. Leon Ščuka, dr. Vida Škrabanja, dr. Natalija Škrbina Zajc, dr. Anton Štimac, dr. Jaroslav Tihi, dr. Tanja Trafela, dr. Elizabeta Tratar Pirc, mag. Robert Ucman, Nataša Uranič, mag. Aleš Urbančič, dr. Darko Uršič, mag. Iztok Vidic, dr. Ana Vidmar, dr. Tina Virant Celestina, dr. Miha Vrbinc, Tomaž Vrbinc, dr. Franc Vrečer, mag. Tatjana Vrščaj Žunič, dr. Jernej Zadnik, Martina Zobarič, David Zupančič, mag. Janja Zupančič, mag. Polonca Zupančič, dr. Silvo Zupančič, mag. Vojko Zupančič, Nika Žerdoner Šinkovec, mag. Tanja Žibert, Saša Žikič, Luka Žnideršič

VSEBINA | CONTENT

49. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad
10 | Krkini nagrajenci 2019

29. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

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

VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 20 | Klemen Korasa, Krka, d. d., Novo mesto
Vrednotenje uporabnosti orodij procesne analizne tehnologije pri spremljanju filmskega oblaganja pelet
26 | Nika Kruljec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje in razvoj peptidnih ligandov za afinitetno čiščenje protiteles
32 | Katja Škrlec, Institut Jožef Stefan
Površinska predstavitev evazinov in bepecina na bakterijah *Lactococcus lactis* NZ9000 in *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ter vrednotenje njihovega protivnetnega delovanja
38 | Darja Gramec Skledar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
In vitro preučevanje metabolizma ter endokrinskih učinkov izbranih bisfenolov in novejših bromiranih zaviralcev gorenja
44 | Rok Narobe, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Klasično in fotokatalitsko oksidativno jodiranje arenov

49. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 53 | Urša Lamprecht Tratar, Onkološki inštitut Ljubljana
Elektrogenska terapija z interlevkinom 12 za zdravljenje kožnih in oralnih tumorjev pri psih
54 | Davide Benedetto Tiz, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj novih N-fenilpirolamidov kot zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV
55 | Dunja Urbančič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,
Farmakogenomsko vrednotenje dovzetnosti za tiopurine
56 | Hristina Kocić, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru
Vpliv mleka, mlečnih bioaktivnih peptidov in L-arginina na celično signalizacijo v kožnih fibroblastih
57 | Maruša Bizjak, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani
Vpliv metformina na rakave celice v kulturi v odvisnosti od razpoložljivih hranil
58 | Blaž Regina, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj kontinuirnega procesa sinteze in ekstrakcije izbrane aktivne farmacevtske učinkovine

59 | Matic Kovačič, Kemijski inštitut Ljubljana

Določanje struktur G-kvadrupleksov, stabiliziranih s pirenskimi skupinami

60 | Tina Brec, Krka, d. d., Novo mesto

Vpliv procesnih parametrov kompaktiranja in sestave kompaktata na sproščanje karvedilola iz ogrodnih tablet s hipromelozo

61 | Jan Štos, Kemijski inštitut Ljubljana

Razvoj in validacija GC-FID/MS analiznega postopka za določitev maščobnih kislin v žiru in polhovi masti

62 | Andrej Grobin, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Razvoj in validacija stabilnostno indikativne metode za vrednotenje fotostabilnosti vodotopnih vitaminov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

63 | Danijel Videc, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Študij sferične kristalizacije laktoze s pristopom načrtovanja eksperimentov

64 | Ula Savšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Vpliv sestave formulacij in procesnih pogojev na fizikalne lastnosti liofiliziranih nanokristalov paliperidon palmitata

65 | Tina Barborič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Sinteza predzdravila simvastatina za limfatično absorpcijo

66 | Sara Hrovat, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Večkratna katalitska C–H funkcionalizacija dihidropirazinskega derivata v vodi

67 | Tjaž Kobal, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Kinetika Diels–Alder reakcije med N-fenilmaleimidom in benzoksazinom na osnovi furana v talini

68 | Nika Strašek, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sinteza in testiranje potencialnih inhibitorjev *Plasmodium falciparum* dihidroorotat dehidrogenaze

69 | Kaja Lenarčič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadnih vodah

70 | Žan Hribar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sinteza in uporaba izbranih terminalnih acetilenov

71 | Nina Podjed, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Študij diketonatnih ligandov in pripadajočih kovinskih kompleksov

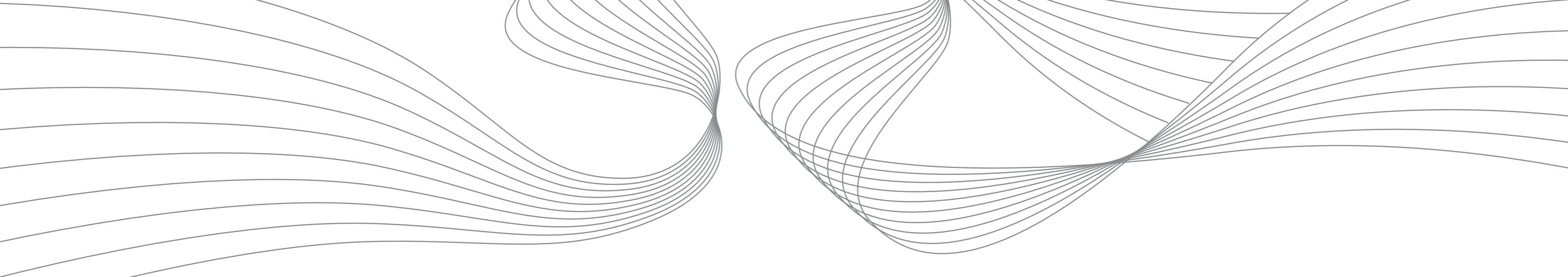
72 | Ema Guštin, Institut Jožef Stefan

Lipidne kapljice in transport maščobnih kislin v celicah raka dojke

73 | Lidija Kač, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Citotksično in genotksično delovanje bisfenolov A, S, F in AF ter njihovih mešanic v celični liniji HepG2

- 74 | **Maša Sterle**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Sinteza in vrednotenje potencialnih zaviralcev N-acetilglukozaminil transferaze
- 75 | **Lea Benčina**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj in izdelava polimernih nanodelcev za uporabo v ustni votlini
- 76 | **Barbara Ljubec**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Formuliranje farmacevtskih učinkovin v polimere s plini visoke gostote
- 77 | **Eleonora Marini**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela za ustekinumab pri pacientih s Crohnovo boleznjijo
- 78 | **Tamara Jarm, Deja Juriševič**, Gimnazija Vič
Sinteza magnetnih nanoverig za dostavo zdravilnih učinkovin
- 79 | **Ana Šenica, Vanesa Cvelbar, Nika Godec**, Gimnazija Novo mesto
Aspartam in njegovi razpadni produkti
- 80 | **Lara Redek Žnidaršič, Ajda Brkopeč, Špela Grmovšek**, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija
Vpliv uporabe različnih topil na ekstrakcijo kurkuminoidov in njihovo antimikrobnno delovanje na bakterijo *Staphylococcus aureus*
- 81 | **Andrej Planinšek**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana
Prisotnost pesticidov in zdravilnih učinkovin v reki Ledavi
- 82 | **Maj Bavec**, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija
Vpliv genetske variabilnosti glutation S-transferaz na tveganje za pojav malignega mezotelioma
- 83 | **Julija Koletnik**, II. gimnazija Maribor
Biološka aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu na humane celice
- 84 | **Tjaša Luzar, Matevž Turk, Lana Jeglič**, Gimnazija Novo mesto
Optimizacija in primerjava cenovno dostopnih metod za ekstrakcijo klorofila iz raztopine kiefa
- 85 | **Maša Capello, Eva Jeran**, I. gimnazija v Celju
Ugotavljanje vsebnosti artemisinina v različnih pripravkih sladkega pelina
- 86 | **Mitja Denac, Bor Kolar Bačnik**, Gimnazija Vič
Nov način priprave vzorcev in stabilizacije papirja in listin z nanosom pigmenta verdigris
- 87 | **Leon Gorše, Ana Grobler**, Gimnazija Novo mesto
Arzen v rižu na slovenskem trgu
- 88 | **Maša Starman, Tadeja Vidmar**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Ugotavljanje okuženosti domačih dihirjev (*Mustela putorius furo*) z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*
- 89 | **Timotej Šuman**, II. gimnazija Maribor
Ločevanje enantiomerov s pomočjo kristalizacije
- 90 | **Aleksandra Vujanovič**, II. gimnazija Maribor
Antioksidativna učinkovitost ekstraktov rožmarina in navadne melise ter vpliv na spomin in stres
- 91 | **Žiga Česen, Ana Mestinšek Mubi**, Biotehniški center Naklo
Antibakterijsko delovanje rastlinskih in čebeljih pripravkov na bakterijo *Staphylococcus aureus*
- 92 | **Blaž Gubič, Niko Farič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Priprava in površinska funkcionalizacija silikonskih filmov s hitozanom
- 93 | **Lana Krmelj, Nuša Kos Thaler**, II. gimnazija Maribor
Bakteriofagi – naravnvi sovražniki bakterij
- 94 | **Kaja Zupančič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Imobilizacija lipaze na GMA poliHIPE monolit in uporaba za hidrolizo 4-nitrofenil butirata
- 95 | **Lan Vukolič**, Gimnazija Vič
Posledice delovanja brioporina in hidralizina 2 na različne celice
- 96 | **Ana Brence**, II. gimnazija Maribor
Primerjava antimikrobne učinkovitosti evgenola, indol-3-karbinola in karvana s triklosanom
- 97 | **Nik Vidmar**, Gimnazija Novo mesto
Ozkolistni trpotec
- 98 | **Neža Zanjkovič**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Odstranjevanje Cu²⁺ iz modelnih vodnih raztopin z magnetnim nanoadsorbentom na osnovi razvejanega aminopolimera polietilenimima
- 99 | **Imam Hussein, Teja Šuštaršič, Tea Pirc**, Gimnazija Novo mesto
Vpliv mil z dodatkom ricinusovega olja na barierno funkcijo kože
- 100 | **Urška Sever**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Funkcionalizacija PE/PP folij s koloidno formulacijo hitozan/naravni ekstrakt in določitev njihove protimikrobne učinkovitosti
- 101 | **Ula Dragman, Laura Drašler**, Gimnazija Vič
Koloidno srebro v dentalnih produktih
- 102 | **Tajda Koblar**, Gimnazija Poljane
Primerjava laserja in vodne kopeli pri odmrzovanju krvi
- 103 | **Maja Gril, Jakob Šivavec**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Priprava ekstraktov navadne smreke (*Picea abies*), bogatih z aktivnim borneolom ter njihova aktivnost in delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*)



Spoštovane nagrajenke in nagrajenci!

Bližamo se polovici stoletja Krkinih nagrad. Svet se je spremenil, preobrazil, danes živimo v drugačnem okolju kot pred desetletji, ko smo začeli podeljevati nagrade. Stalnici tega obdobja sta znanstveni in tehnološki razvoj, ki sta dala zagon neslutenim globalnim spremembam. Rasla je tudi Krka in z njo Krkine nagrade. Z njimi kot zanesljiv in uspešen gospodarski partner slovenskemu akademskemu prostoru sporočamo, katere in kakšne znanstvene dosežke potrebujemo, da lahko delamo v dobro desetin milijonov bolnikov. Akademska odličnost, združena z znanjem in delom, predstavlja tisto, kar vsi skupaj potrebujemo: z novim znanjem, z mladimi močmi, združenimi z izkušnjami mentorjev, doseči uspeh, ki bo temeljil na inovativnem in kakovostnem raziskovalno-razvojnem delu.

Čestitamo vsem, ki ste sprejeli izziv in dosegli cilj.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

Dear Prize winners,

An important anniversary to mark the 50th Krka Prizes is drawing close. The world and our living environment have changed and been transformed greatly since fifty years ago when we first started giving out the prizes. Continuous development of technology and science throughout the period incited unprecedented changes. Krka has become greater, and so have Krka Prizes. We are a reliable and thriving business partner, who informs Slovenian academic public through Krka Prizes about the scientific achievements that we need to be of service to tens of millions of patients. Academic excellence combined with knowledge and work are what we all need, namely success based on innovative and high-quality research and development, fresh knowledge, and young workforce under tutelage of experienced mentors.

We would like to congratulate all of you who have taken on the challenge and reached the finish line.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2019 | KRKA PRIZE WINNERS 2019

VELIKE KRKINE NAGRADE ZA RAZISKOVALNO DELO | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Klemen Korasa	doktor znanosti s področja farmacije	Franc Vrečer Grega Hudovornik	2752
Nika Kruljec	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Tomaž Bratkovič	2753
Katja Škrlec	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Aleš Berlec	2754
Darja Gramec Skledar	doktorica znanosti s področja toksilogije	Lucija Peterlin Mašič	2755
Rok Narobe	magister kemije	Jernej Iskra Burkhard König	2756

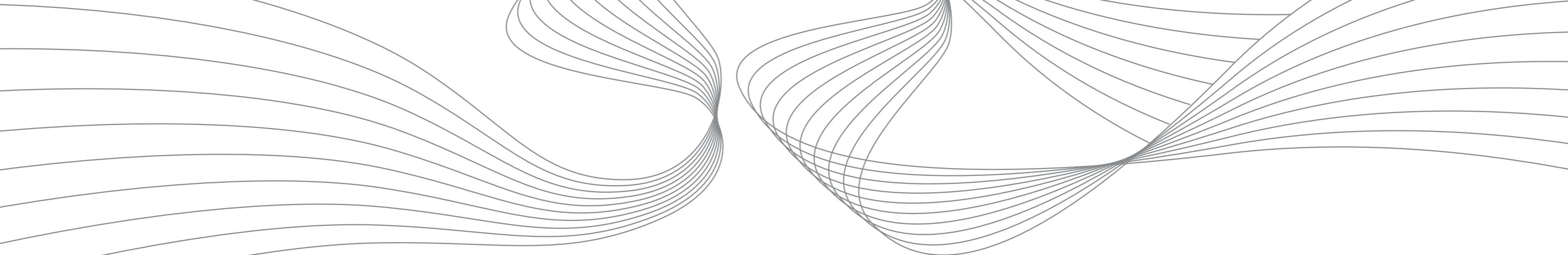
Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Maruša Bizjak	doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije	Mojca Pavlin Sergej Pirkmajer	2761
Blaž Regina	magister inženir kemijoškega inženirstva	Polona Žnidaršič Plazl	2762
Matic Kovačič	magister biokemije	Janez Plavec	2763
Tina Brec	magistrica industrijske farmacije	Franc Vrečer Aleša Dular Vovko	2764
Jan Štos	magister kemije	Matjaž Finšgar Samo Andrenšek	2765
Andrej Grobin	magister farmacije	Robert Roškar	2766
Danijel Videc	magister farmacije	Odon Planinšek Dejan Lamešić	2767
Ula Savšek	magistrica farmacije	Julijana Kristl Wolfgang Frieß	2768
Tina Barborič	magistrica farmacije	Janez Mravljak	2769
Sara Hrovat	magistrica kemije	Franc Požgan	2770
Tjaž Kobal	magister inženir kemijoškega inženirstva	Urška Šebenik	2771
Nika Strašek	magistrica biokemije	Jurij Svetec	2772
Kaja Lenarčič	magistrica farmacije	Marija Sollner Dolenc Ester Heath	2773
Žan Hribar	magister kemije	Janez Košmrlj	2774
Nina Podjed	magistrica kemije	Iztok Turel	2775
Ema Guštin	magistrica biokemije	Toni Petan Miha Pavšič	2776

KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka
Urša Lamprecht Tratar	doktorica znanosti s področja medicine	Maja Čemažar Nataša Tozon	2757
Davide Benedetto Tiz	doktor znanosti s področja farmacije	Nace Zidar Danijel Kikelj	2758
Dunja Urbančič	doktorica znanosti s področja farmacije	Irena Mlinarič Raščan	2759
Hristina Kocić	doktorica znanosti s področja medicine	Tomaž Langerholc Aleksandar Godić	2760

Nagrajenec	Naziv	Mentor, somentor	Številka	Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Lidija Kač	<i>magistrica farmacije</i>	Marija Sollner Dolenc Bojana Žegura	2777	Tamara Jarm Deja Juriševič	dijakinja dijakinja	Slavko Kralj Gašper Pernek Črt Dragar	2782 2783
Maša Sterle	<i>magistrica farmacije</i>	Marko Anderluh Matjaž Weiss	2778	Ana Šenica Vanesa Cvelbar Nika Godec	dijakinja dijakinja dijakinja	Janja Pust	2784 2785 2786
Lea Benčina	<i>magistrica farmacije</i>	Mirjana Gašperlin Marianne Hiorth	2779	Lara Redek Žnidaršič Ajda Brkopeč Špela Grmovšek	dijakinja dijakinja dijakinja	Vojka Zupančič	2787 2788 2789
Barbara Ljubec	<i>magistrica inženirka kemijske tehnike</i>	Maša Knez Hrnčič Zoran Novak Darija Cör	2780	Andrej Planinšek	dijak	Robert Roškar Darja Silan	2790
Eleonora Marini	<i>magistrica industrijske farmacije</i>	Beatrice Perissutti Iztok Grabnar	2781	Maj Bavec	dijak	Katja Goričar Marjeta Prašnikar	2791
				Julija Koletnik	dijakinja	Uroš Maver Petra Kotnik Katja Holnhaner Zorec	2792
				Tjaša Luzar Matevž Turk Lana Jeglič	dijakinja dijak dijakinja	Tanja Gačnik Uroš Ocepek Eva Tavčar Benković	2793 2794 2795
				Maša Capello Eva Jeran	dijakinja dijakinja	Mojca Plevnik Žnidarec Katarina Vogel Mikuš	2796 2797
				Mitja Denac Bor Kolar Bačnik	dijak dijak	Alenka Mozer Jana Kolar Jasna Malešič	2798 2799
				Leon Gorše Ana Grobler	dijak dijakinja	Zdenka Šlejkovec Marinka Kovač	2800 2801
				Maša Starman Tadeja Vidmar	dijakinja dijakinja	Gašper Jan Simon Katja Strašek Smrdel	2802 2803
				Timotej Šuman	dijak	Zdenka Keuc	2804
				Aleksandra Vujanović	dijakinja	Darja Kravanja Irena Dogša	2805

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Žiga Česen Ana Mestinšek Mubi	dijak dijakinja	Marjetka Kastelic Švab	2806 2807
Blaž Gubič Niko Farič	dijak, dijak	Mateja Godec Urban Ajdnik	2808 2809
Lana Krmelj Nuša Kos Thaler	dijakinja dijakinja	Sandra Janežič Katja Holnhaner Zorec	2810 2811
Kaja Zupančič	dijakinja	Peter Krajnc Muzafera Paljevac Nina Žuman	2812
Lan Vukolić	dijak	Marjetka Podobnik Maja Čemažar Sonja Artač Maja Gerden	2813
Ana Brence	dijakinja	Zdenka Keuc Tamara Šiško	2814
Nik Vidmar	dijak	Branka Klemenčič	2815
Neža Zanjkovič	dijakinja	Mateja Godec Olivija Plohl	2816
Imam Hussein Teja Šuštaršič Tea Pirc	dijak dijakinja dijakinja	Branka Klemenčič	2817 2818 2819
Urška Sever	dijakinja	Mateja Godec Sanja Potrč	2820
Ula Dragman Laura Drašler	dijakinja dijakinja	Alenka Mozer Anja Drame	2821 2822
Tajda Koblar	dijakinja	Rok Rudež Nina Kostevšek	2823
Maja Gril Jakob Šivavec	dijakinja dijak	Marko Jeran Robert Susić Irena Kralj Cigić	2824 2825



Odziv mladih raziskovalcev, tako dijakov srednjih šol kot študentov, na razpis za že 49. Krkine nagrade je bil ponovno zelo dober oziroma je pri dijakih presegel vsa pričakovanja članov Znanstvenega odbora Sveta Sklada Krkinih nagrad. Posebej nas razveseljuje stalno rastoče število prijav raziskovalnih nalog dijakov in seveda, da se na razpis prijavljajo dijaki iz vedno novih srednjih šol.

Kakovost letošnjih nalog je bila zelo dobra. Na vseh ravneh, tako na srednješolski stopnji kot v magistrskih in doktorskih študijskih programih, je bilo bodisi po znanstveni ali aplikativni vrednosti nekaj res izstopajočih nalog. V Znanstvenem odboru si želimo, da bi bile te naloge in njihovi avtorji zgled mladim, ki se odločajo za raziskovalno delo, da si postavijo jasne in ambiciozne cilje ter se dela lotijo z vso predanostjo. Na tak način bodo ob zaključku nalog oziroma projekta doživeli veliko zadovoljstvo in samopotrditve ter hkrati osebnostno in strokovno rast. Prav to dolgoročno zagotavlja posameznikovo uspešnost in s tem zadovoljstvo – bolj kot uresničeni posamezni cilji.

V imenu članov Znanstvenega odbora in seveda v svojem imenu bi se rad iskreno zahvalil vsem mentorjem in somentorjem ter vsem drugim, ki ste mladim omogočili, da so uresničili svoje raziskovalne cilje. Upam, da lahko na vašo pomoč računajo tudi nove generacije mladih, ki si želijo vstopiti v svet znanosti in raziskovalnega dela.

Vsem mladim, ki ste se prijavili na letošnji razpis, iskreno čestitam in vam želim, da vas želja po doseganju visoko postavljenih ciljev ne zapusti, ampak da se ji boste predali s še večjim zanosom in na svoji življenjski poti tudi v prihodnje dosegali še boljše rezultate. Še posebej pa čestitam vsem letošnjim prejemnikom Krkinih nagrad in priznanj. Bodite svetla luč in opora mladim ter jih s svojim zgledom in pomočjo usmerjajte na njihovi poti ter s tem širite kulturo znanstvenoraziskovalnega dela.

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

Once again, a good many secondary school and university students followed our call to the 49th Krka Prizes, and the response of the secondary school students exceeded even the expectations of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council. We are very pleased with the growing number of application forms filed by secondary school students and the fact that they come from new schools.

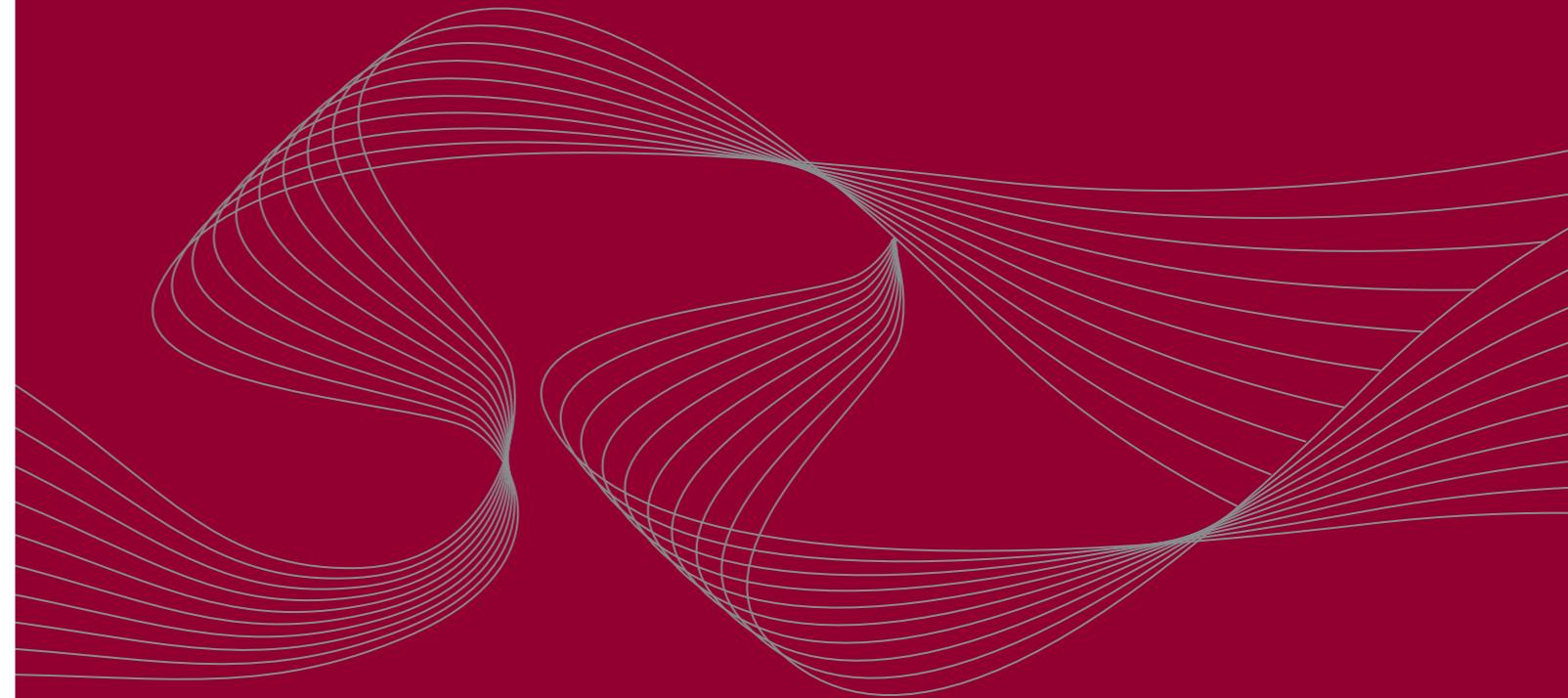
This year, the research papers were of very high quality. In terms of their scientific or applicative value, a few research papers stood out on all levels, from secondary and master's to doctoral programmes. We at the Scientific Committee of the Krka Prizes Council hope that the assignments and the authors set a good example for all young people about to embark on research work so that they would set clear and ambitious goals and put themselves to work with dedication. A great deal of satisfaction, self-affirmation, personal and professional growth will follow. All this, even better than fulfilled individual goals, guarantees success in the long-term and through that a person's satisfaction.

I would like to express sincere thanks on behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council an on my own behalf to all supervisors, co-supervisors, and all those who have made it possible for the young people to bring their research objectives to life. I hope that also new generations of researchers, who wish to enter the world of science and research, can count on your assistance.

I would like to congratulate sincerely to all young people who entered the contest this year. I wish you all to abide by your aspirations towards the highest goals, zealously follow your dreams, and achieve even better results in your lives in the future. I would especially like to congratulate 2019 winners of Krka prizes and recognitions. May you be a guiding light and counsel for the young people, set a good example for them, and guide them on their scientific path to spread the culture of research and development.

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

49.



Velike Krkine nagrade za raziskovalno naloge
Krka Grand Prizes for Research

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners



**Dr. KLEMEN
KORASA**

*Rad se soočam
s težkimi izzivi*

Klemen Korasa se je z raziskovanjem prvič srečal v srednji šoli, ko je v Krkinih razvojnih laboratorijih pod mentorstvom dr. Aleša Gaspariča izvajal poskuse v okviru raziskovalne naloge, za katero je dobil Krkino nagrado za srednješolce. To ga je dokončno prepričalo, da je po končani Gimnaziji Novo mesto izobraževanje nadaljeval na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Njegovo navdušenje nad raziskovanjem se je med študijem le še poglobilo in za diplomsko delo je vnovič prejel Krkino nagrado. Bil je Krkin štipendist. Po študiju se je zaposlil v Farmacevtskem razvoju v Krki in ob delu uspešno opravil še doktorat na področju Biomedicine na Fakulteti za farmacijo. Je vodja Farmacevtske tehnologije in skupaj s sodelavci skrbi za razvoj novih, sodobnih in visokakovostnih zdravil, ki so ključna za nadaljnji uspeh podjetja.

Osnovno področje mojega raziskovanja zajema farmacevtsko tehnologijo in farmacevtske oblike. S sodelavci natančno definiramo sestavo zdravila in način njegove priprave. Naš cilj je zdravilo, ki bo s čim večjo verjetnostjo dosegalo ustrezeno kakovost, varnost in učinkovitost ter bo hkrati procesibilno na proizvodni ravni. Z raziskavami na tem področju sem se začel ukvarjati že pri pripravi diplomske naloge in nadaljeval kot raziskovalec v Krkinem Farmacevtskem razvoju. Raziskoval sem orodja procesne analizne tehnologije, ki merijo ključne lastnosti zdravila med njegovo izdelavo. To omogoča stalno kontrolo kakovosti izdelka ter daje podatke, na osnovi katerih lahko naredimo popravke v procesu, da bi dosegli čim boljše končne lastnosti zdravila. Takšna orodja so pomembna tudi za bolnika, saj omogočajo še večjo dostopnost zdravil in še boljšo in bolj ponovljivo kakovost končnega izdelka. V nalogi sem proučeval predvsem možnosti novih aplikacij orodij procesne analizne tehnologije ter poenostavitev, ki bi olajšale njihovo uvedbo v farmacevtski razvoj, proizvodnjo in kontrolo kakovosti. Moje raziskave so neposredno povezane z mojim delom v Krki. Nekatere ugotovitve so že zaživele v vsakdanji praksi, za nekatere pa bomo potrebovali še nekaj raziskovalnega vložka.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA
Pri raziskovanju me navdihujejo priložnosti, da lahko stvari spreminja na bolje. Pri delu vedno iščem pomanjkljivosti ter načine, kako jih odpraviti. Tako razmišljanje je na trenutke utrujajoče, a ob vsaki najmanjši izboljšavi imamo vsi nekaj od tega. Najboljše ideje se mi porodijo, ko najmanj razmišljam o njih – na poti domov, med sprehodom v naravi, pod prho ... Menim, da znanost ni nerešljiva uganka, ampak le objektivno odgovarja, če in kako je uganko možno rešiti.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA
Že pri mojih prvih raziskovalnih korakih so imeli mentorji pomembno vlogo. Se je pa z leti spremenila. V srednji šoli je mentor dejavno sodeloval in soustvarjal rešitev problema, kasneje pa me je predvsem z nasveti usmerjal in spodbujal, da sem sam prišel do rešitve. Na moji raziskovalni poti, ki so jo spremljale številne ovire, sta bila mentor

prof. dr. Franc Vrečer in somentor dr. Grega Hudovornik vseskozi odlična sogovornika.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE
Srednješolska Krkina nagrada je bila zelo pomembna za mojo odločitev, da kariero posvetim raziskovanju. V 49 letih se je verjetno odvilo že veliko podobnih zgodb, kar potrjuje izjemno velik pomen Krkinih nagrad in njihov vpliv na širšo okolico. Krkina nagrada posameznika nedvomno motivira k raziskovanju in je hkrati potrditev njegove uspešnosti. Kot srednješolec niti pomisli nisem, da bom nekoč prejel še dve Krkini nagradi. Zato je težko opisati, kako dobro se počutim, ko se ozrem na minula leta in se hkrati zavem, da sem danes eden izmed srečnih prejemnikov velike Krkine nagrade za raziskovalno nalogu.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO
Spopadanje z izzivi pri raziskovalnem delu ti lahko vzame veliko energije, a največji del energije mi vrne trenutek, ko s sodelavci uspešno pridemo do rešitve problema. Iskanje rešitve pa je bistveno lažje ob podpori najblžjih, med večernim tekom, potepanjem po gorah, poslušanju glasbe in prebiranju knjig. Prosti čas rad namenim tudi pridobivanju znanja, ki ni neposredno povezano z mojim delom. Tako v zadnjem času spoznavam osnove programiranja.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI
Zelo sem vztrajan in se nikoli ne predam – tudi pri stvareh, ki lahko človeka hitro izčrpajo. To je lastnost, ki je pomembna predvsem pri soočanju s težkimi izzivi.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM
Na svoji poti se ne ustrašite novih izzivov in drzno razmišljajte o možnih rešitvah. S takšnim pristopom boste razvili najbolj prodrorne ideje, ki bodo koristne in opažene.

Najboljši nasvet
Profesorica kemije na Gimnaziji Novo mesto mi je svetovala, naj študij nadaljujem v naravoslovni smeri.

Misel, ki vas vodi skozi življenje
V težkih trenutkih ne izgubljaj energije s skrbmi, ampak jo porabi za iskanje rešitve.

Vrednotenje uporabnosti orodij procesne analizne tehnologije pri spremļjanju filmskega oblaganja pelet

KLEMEN KORASA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentor: **Grega Hudovornik**, Krka, d. d., Novo mesto

Razvoj sodobnih farmacevtskih oblik in kompleksnih tehnoloških procesov je v začetku 21. stoletja vodil tudi do hitrega razvoja tehnologij in sistemov za obvladovanje proizvodnje zdravil. Sistem za načrtovanje, analizo in kontrolo proizvodnje, ki s pomočjo medprocesnih meritev kritičnih lastnosti materialov in procesnih parametrov zagotavlja končno kakovost izdelka, je v farmacevtski industriji znan pod imenom procesna analizna tehnologija (PAT). PAT sestavljajo različna orodja, kot so statistični in matematični pristopi za obdelavo podatkov, procesni analizatorji, sistemi za kontrolo procesov in pristopi za učinkovito obvladovanje znanja.

V doktorski disertaciji smo največ pozornosti namenili študiju uporabnosti različnih procesnih analizatorjev za spremļjanje in kontrolo procesa filmskega oblaganja pelet. Pri tem smo se v prvi vrsti osredotočili na bližnjo infrardečo (NIR) spektroskopijo, ki je tudi sicer najpogosteje uporabljen način spremļjanja procesa oblaganja pelet v realnem času. V drugem delu naloge smo ovrednotili uporabnost druge spektroskopske tehnike za merjenje ključnih karakteristik pelet – ramanske spektroskopije. Vzporedno smo preverili možnost uporabe dveh različnih tehnik za merjenje velikostnih atributov pelet med procesom oblaganja – tehnike prostorskega filtriranja (SFT) in slikovne analize delcev. Za doseganje čim večje vrednosti zajetih podatkov smo si pomagali z multivariatno analizo podatkov.

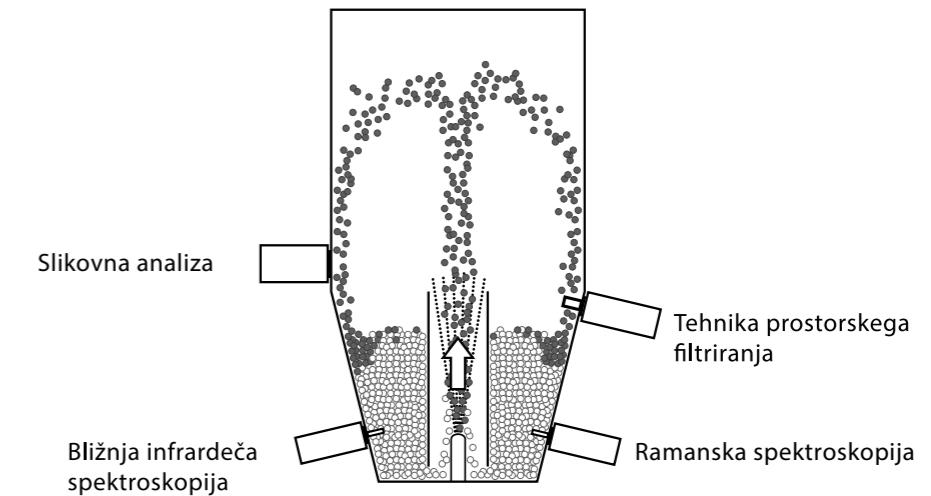
V prvem delu naloge smo proučevali uporabnost SFT-sonde za vrednotenje velikosti delcev ter NIR-spektroskopije za določanje vsebnosti vode in debeline filmske oblage v realnem času. Pokazalo se je, da je SFT-sonda učinkovito sredstvo za spremļjanje procesa oblaganja, saj je ob vsakem povečanju hitrosti razprševanja oblagalne disperzije zaznala večjo hitrost rasti pelet. Poleg tega je izmerjena velikost delcev zelo dobro korelirala z referenčnima metodama sejalne analize in statične slikovne analize. Največja slabost SFT je bila nezmožnost detekcije aglomeracije, saj meritve niso korelirale s številom dejanskih aglomeratov. Zanimivi so tudi izsledki vrednotenja procesa oblaganja pelet z NIR-sondo. Spektri, posneti med oblaganjem pelet, so zelo dobro korelirali z referenčnima metodama izgube pri sušenju (LOD) in titracije po Karlu Fischerju (KF), postavljeni multivariatni modeli pa so omogočali napoved vsebnosti vode tudi v peletih s spremenjeno kvalitativno sestavo oblage – drugi tip polimetakrilatnega polimera. NIR-sonda se je dobro obnesla tudi pri vrednotenju debeline oblage med procesom oblaganja. Model, postavljen na spektralnem območju izven vrhov vode, je učinkovito napovedal debelinu oblage pelet med oblaganjem neodvisne serije.

Raziskavo NIR-spektroskopije smo nadaljevali z vrednotenjem procesa temperiranja filmske oblage s podaljšanim sproščanjem. Ugotovili smo, da NIR-spektri različno temperiranih vzorcev korelirajo z upadanjem intenzitete vrhov komponent, prisotnih pod filmsko oblogo s podaljšanim sproščanjem. Sklepalci smo, da je zmanjševanje intenzitete teh vrhov posledica prepletanja polimernih verig in koalescence polimernih delcev. Uporabnost pristopa smo preverili tako, da smo spektralne podatke umerili s podatki sproščanja zdravilne učinkovine ter nato model uporabili za napoved hitrosti sproščanja zdravilne učinkovine neodvisnih vzorcev v treh časovnih točkah. Razen v vzorcih, v katerih je bila vsebnost vode zelo velika (večja od 4,5 %), so se napovedane vrednosti dobro ujemale z dejansko hitrostjo sproščanja zdravilne učinkovine. Slabša napovedna moč modela pri vzorcih z veliko vsebnostjo vode je bila najverjetnejše posledica direktnega vpliva vode na spektralne podatke ali posrednega vpliva prek sprememb strukture filmske oblage. Zgornjim zaključkom vrednotenja procesa temperiranja pelet daje dodano vrednost dejstvo, da gre za prvo objavljeno tovrstno raziskavo.

V zadnjem delu naloge smo predstavili možnost umeritve modela za spremļjanje vsebnosti vode in debeline filmske oblage pelet v realnem času v napravi (*in-line*) z merjenjem

NIR-spektrov laboratorijskih vzorcev izven naprave (*off-line*). Učinkovitost predstavljenega pristopa, ki lahko močno zmanjša vložek v kalibracijo modelov za spremļjanje procesa v napravi, smo potrdili z napovedjo debeline oblage in vsebnosti vode na treh neodvisnih pilotnih serijah. Sledila je obširna študija uporabnosti ramanske spektroskopije za spremļjanje procesa oblaganja pelet, s katero smo vrednotili tako analizator za merjenje spektrov ob napravi (*at-line*) kot analizator za analizo procesa v napravi. Izsledki vrednotenja *at-line* procesnega analizatorja so pokazali, da je ramanska spektroskopija zelo učinkovito orodje za vrednotenje debeline oblage pelet in da, nekoliko presenetljivo, omogoča tudi solidno oceno vsebnosti vode v peletih sicer niso korelirali spektri, posneti z *in-line* različico ramanskega analizatorja, ki pa je omogočal točno in natančno napoved debeline oblage in količine razpršene disperzije med procesom oblaganja pelet. V okviru te študije smo na treh pilotnih serijah oblaganja pelet vrednotili tudi robustnost slikovne analize za merjenje debeline oblage pelet v realnem času. V napravi izmerjeni velikostni parametri so bili skladni s potekom procesa, kar smo med drugim potrdili s primerjavo meritev z metodo dinamične slikovne analize, ki je pokazala, da med metodama ni bistvenih razlik v izmerjeni debelini oblage.

V doktorski disertaciji smo podrobno ovrednotili kar štiri različne procesne analizatorje. Izsledki dopolnjujejo obstoječe znanje o uporabi PAT-rodij in hkrati ponujajo nekatere vidike, ki pred tem še niso bili raziskani in objavljeni. Predstavljena vsebina tako lahko pripomore k hitrejši in učinkovitejši implementaciji tovrstnih orodij v razvoj in proizvodnjo zdravil ter hkrati odpira zanimiva področja, ki so lahko predmet prihodnjih raziskav.



Slika 1. Shematski prikaz spremļjanja procesa oblaganja pelet v zvrtinčenih plasteh z različnimi procesnimi analizatorji.

Assessing the Applicability of Process Analytical Technology Tools in Pellet Film-Coating Process

KLEMEN KORASA, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Grega Hudovornik, Krka, d. d., Novo mesto

The emergence of novel pharmaceutical dosage forms and complex technological processes in the beginning of the 21st century has led to a rapid development of systems and technological solutions for enhanced control of medicine manufacturing. A system for designing, analysing, and controlling manufacturing through timely measurements (i.e. during processing) of critical material attributes and critical process parameters with the goal of ensuring final product quality is known as process analytical technology or PAT. Different tools, such as statistical and mathematical data management approaches, process analysers, process control tools, and efficient knowledge management tools are used within the PAT framework.

The main focus of our doctoral thesis was to evaluate the applicability of different process analysers in the monitoring and control of the pellet film-coating process. Firstly, near-infrared (NIR) spectroscopy, which is the most commonly used real-time analyser for the monitoring of pellet coating processes, was investigated. In the second part of the thesis, applicability in determination of crucial pellet attributes of another spectroscopic technique, Raman spectroscopy, was evaluated. In addition, two different approaches to measuring particle size parameters during the coating process were examined, i.e. spatial filtering technique (SFT) and image analysis. Multivariate data analysis was used to achieve high usability of the collected process data.

In the first part of the thesis, the applicability of the SFT probe in particle size determination and applicability of the NIR spectroscopy in water content and film coating thickness measurement was investigated. The SFT probe proved as an efficient tool for the monitoring of the coating process, which was capable of determining the increase in pellet size growth rate after each increase of the coating dispersion spray rate. In addition, measured particle size correlated very well with the reference methods of sieve analysis and static image analysis. The biggest drawback of this measuring approach was its inability to detect agglomeration phenomenon, since the SFT in-line measurements did not correlate with the actual number of agglomerates. The results of the NIR probe evaluation were also interesting. The NIR spectra collected during the pellet coating process correlated very well with the reference methods of loss on drying (LOD) and Karl Fischer titration. Consequently, calibrated multivariate models enabled water content prediction in the pellets with altered qualitative composition, where a different type of the polymethacrylic polymer was used. In addition, the NIR probe proved as a suitable analyser for measuring coating thickness during the coating process. The model, calibrated outside the spectral bands characteristic for water, enabled efficient prediction of the pellet coating thickness when coating of an independent batch was performed.

A study of the NIR applicability was extended by evaluating the possibility of monitoring the curing process of the prolonged release film coating. It was shown that curing of the coated pellets led to decreased peak intensities of the components located below the prolonged release polymer coating. A possible explanation for such results was that increased inter-diffusion of the polymer chains and coalescence of the polymer particles caused reduced intensities of the observed peaks. The NIR spectral data was calibrated with the drug release profiles – measured in three time points – and the calibrated model was later used for the prediction of the active ingredient release rate of the independent sample cluster to evaluate the applicability of the tested approach. The predicted values correlated well with the actual drug release rate with the exception of samples with high water content (i.e., higher than 4.5%). A direct effect of water on spectral data or an indirect effect of water on the structure of the polymer

film was identified as the most probable cause for a reduced predictive power of the model in the case of samples with high water content. The presented results have a high scientific added value, since such findings of the pellet curing process evaluation have so far not been presented in any other published work.

In the last part of the thesis, the possibility to calibrate the model for in-line monitoring of water content and film coating thickness in real-time by measuring the NIR spectra of laboratory samples off-line was presented. The effectiveness of such an approach, which can significantly reduce the effort needed to calibrate a model for in-line monitoring, was confirmed by coating thickness and water content prediction of three independent pilot scale batches. In the second part of this study, extensive evaluation of the applicability of Raman spectroscopy in both modes, in-line and at-line, was presented. The findings of the at-line process analyser evaluation showed that Raman spectroscopy was a very effective tool for coating thickness determination and, surprisingly, was capable to assess water content in the tested pellets quite accurately. On the other hand, in-line Raman spectroscopy was not capable to predict water content in the pellets. However, the in-line analyser proved as an effective tool for accurate coating thickness prediction and amount of sprayed coating dispersion prediction during the pellet coating process. Finally, a robustness of a novel image analyser was evaluated by monitoring pellet coating process of three pilot scale batches in real-time. Particle size parameters measured in-line were consistent with the course of the process. In addition, measured coating thickness in real-time was compared with the coating thickness measured off-line using a dynamic image analysis and no significant difference was observed between both measuring principles.

An extensive evaluation of four different process analysers was carried out in the present doctoral thesis. The findings of the thesis are an important extension of the existing knowledge about the PAT tools applicability and they simultaneously present some new aspects that had not been explored before in the existing scientific publications. The presented knowledge can thus help enhance and more effectively implement such tools in the development and manufacturing of medicines. Moreover, it opens up some new perspectives, which could be a subject of future studies.

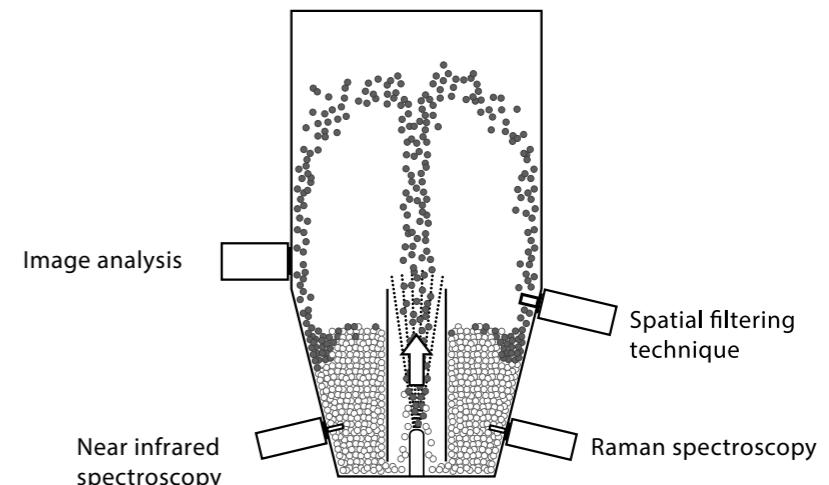


Figure 1: Graphic presentation of fluid bed film coating process monitoring with various process analysers.



Dr. NIKA KRULJEC

Pri raziskovanju me vodi otroška radovednost

Nika Kruljec iz Moravč je kemijo in biologijo vzljubila že kot osnovnošolka, saj ji je bila narava vedno zelo blizu. Prve korake v svet raziskovanja je naredila na Gimnaziji Ledina v Ljubljani, kjer je pod vodstvom profesorice Nike Cebin raziskovala naravno sladilo stevia. Zaradi velikega zanimala za človeško telo in navdušenja nad kemijo se je po koncu srednje šole odločila za študij na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Tu se je prvič srečala z biotehnologijo in biološkimi zdravili, ki so postali temelj njenega dodiplomskega in poddiplomskega raziskovalnega dela. To področje ostaja zanjo velik izzik, zato se je odločila, da raziskovalno pot nadaljuje zunaj akademskega sveta. Pred kratkim se je zaposlila v farmacevtski družbi Lek, kjer se ukvarja z biofarmacevtiko.

Osnovno področje mojega raziskovanja je farmacevtska biotehnologija. Gre za hitro razvijajočo se vedo, ki se ukvarja z razvojem bioloških zdravil. Ključni dejavniki, ki so me pripeljali na to področje, so hiter razvoj in napredok medicine v zadnjih letih ter velika priložnost za odkrivanje novega in še neznanega. Namen moje doktorske naloge je bil razviti in pripraviti afinitetne ligande do fragmenta Fc protiteles, ki bi izboljšali in olajšali prvi korak čiščenja monoklonskih protiteles (to je ena od skupin bioloških zdravil). Z rezultati sem želela prispevati k racionalizaciji proizvodnje monoklonskih protiteles. S sodelavci sem uspešno razvila afinitetne ligande in pripravila model oziroma prototip afinitetne kromatografske kolone, ki je primerljiva z uveljavljenimi afinitetnimi kolonami. Inovativni ligandi so v praksi zelo uporabni tako v farmacevtski industriji kot tudi v raziskovanju.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu je zame največji navdih otroška radovednost, ki se nikoli ne konča zgolj z enim zakaj. Raziskovanje neznanega oziroma nepričakovanega prinaša vznemirjenje, zagon in motivacijo za iskanje rešitev in pojasnjevanje na videz nerešljivih težav. Najboljše ideje se mi največkrat porodijo med sproščenim klepetom s sodelavci. Izkušnje in različni pogledi na izzive ter iskrivi nasveti spodbujajo drzne zamisli, ki jih lahko razvijamo in uresničujemo le skupaj.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor ima izjemno pomembno vlogo na poti vsakega mladega raziskovalca, saj ga z nasveti usmerja in mu pomaga, hkrati pa mu omogoča, da na svoji raziskovalni poti samostojno krmari. Svojemu mentorju izr. prof. Tomažu Bratkoviču se zahvaljujem za uspešno »krmarjenje« med nastajanjem doktorata ter za podporo in vodenje pri raziskovalnem delu.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Prijavo za Krkino nagrado sem oddala predvsem zato, da bi širila znanje, ki sem ga dobila med

doktoratom, svoje znanstveno delo pa sem želela predstaviti tudi zunaj akademskega sveta. In Krkine nagrade so izjemna priložnost za to. Še več, so osrednji steber povezovanja med gospodarstvom in akademskim svetom, za marsikaterega raziskovalca začetnika so tudi odskočna deska za prepoznavnost zunaj akademskega sveta. Krkina nagrada je zame izjemna čast in priznanje za dobro opravljeno delo.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Vse življenje me spremlja šport, h kateremu se najraje zatečem tudi ob nerešljivih ugankah. Na ta način se oddaljam od problema in ga velkokrat vidim z drugrega zornega kota. Takrat še tako težavna uganka postane bistveno bolj enostavna. V zadnjih letih večino prostega časa zapolnim z gorništвom in dejavnostmi, povezanimi z njim. Preplezane smeri, osvojeni vrhovi in neokrnjena narava mi prinašajo sprostitev in osebno zadovoljstvo. Seveda pa si življenja ne znam predstavljati brez družine in priateljev, ki mi polepšajo še tako naporen dan.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Zame velja, da se izzivov ne ustrašim tako zlahka. Zavedam pa se tudi, da je težave bistveno lažje reševati v skupini. S komunikativnostjo in pozitivno naravnostjo sem tudi pri raziskovalnem delu povezala sodelavce z različnih oddelkov na fakulteti.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Mladim raziskovalcem svetujem, naj ohranijo otroško radovednost. Vedno znova naj iščejo nove poti, širijo svoja obzorja in se nikoli ne predajo. Velkokrat se zgodi, da skoraj obupamo tik pred uspehom.

Najboljši nasvet

Pri uspehu gre predvsem za to, da vztrajamo tudi po tem, ko so ostali obupali. (William Feather)

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Carpe diem.

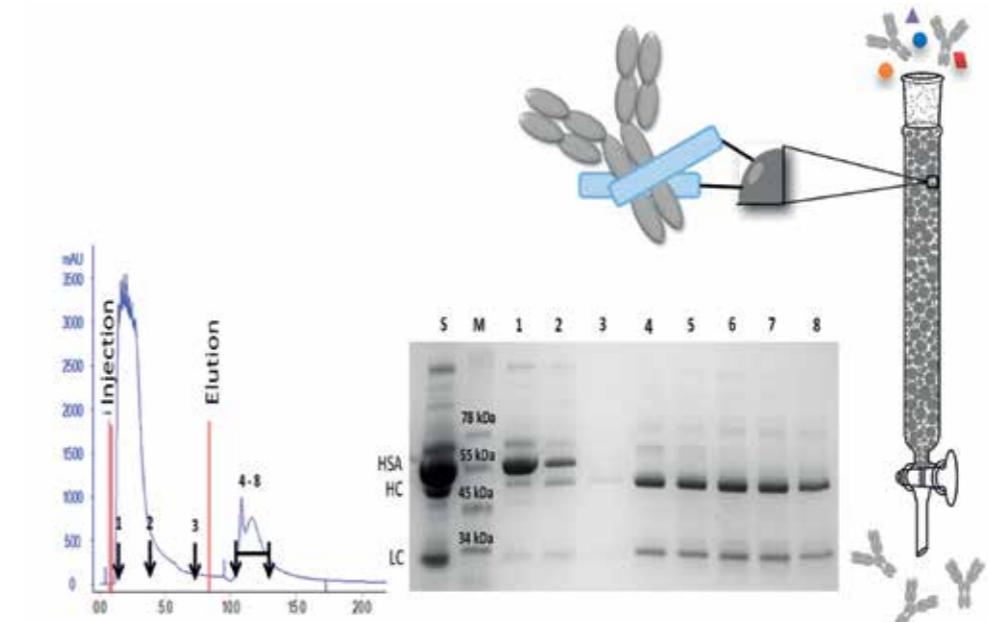
Načrtovanje in razvoj peptidnih ligandov za afinitetno čiščenje protiteles

NIKA KRULJEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Tomaž Bratkovič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Monoklonska protitelesa spadajo med najpomembnejše biološke učinkovine z velikim razponom terapevtskih indikacij. Prvi korak v izolaciji in čiščenju monoklonskih protiteles je njihovo zajetje iz procesne tekočine z afinitetno kromatografijo. Najpogosteje uporabljamo bakterijske proteine, ki se vežejo z imunoglobulinom (npr. stafilokokni protein A, SpA). Ker imajo številne slabe lastnosti, je vse večja težnja po razvoju novih afinitetnih ligandov. Ena od perspektivnejših skupin so peptidi.

V okviru doktorskega dela smo s presejanjem kombinatornih bakteriofagnih predstavitevnih knjižnic peptidov identificirali skupino peptidnih ligandov z afiniteto do fragmenta Fc imunoglobulinov G. Med petimi peptidnimi ligandi z dvema različnima aminokislinskima motivoma je imel najboljše vezavne lastnosti peptidni ligand 19Fc. Na osnovi kompeticije s SpA za vezavo na regijo Fc predvidevamo, da je vezavno mesto peptidnega liganda na stiku domen CH2 in CH3. Da bi določili minimalni motiv in ključne aminokislinske ostanke peptida 19Fc za vezavo na fragment Fc, smo skrajšali peptid na N- in/ali C-koncu ter izvedli alaninsko rešetanje. Dobili smo minimalizirano različico peptidnega liganda, imenovano min19Fc. Interakcijo med sinteznim biotiniliranim peptidom b-min19Fc in humanim fragmentom Fc smo potrdili s površinsko plazmonsko resonanco (SPR). V nadaljevanju smo, da bi povečali topnost in morebitno občutljivost interakcije min19Fc:regija Fc za spremembe vrednosti pH, v peptidu min19Fc zamenjali za vezavo neesencialen aminokislinski ostanek z nabitimi aminokislinami (glutamat, aspartat in lisin). Mutantam smo ovrednotili afiniteto vezave do različnih podrazredov humanih IgG in do izbranih terapevtskih monoklonskih protiteles. Nato smo pripravili dve skupini peptidnih mutant z zamenjavami izbranih aminokislinskih ostankov s sorodnimi in tako skušali dobiti boljši vpogled v odnos med zgradbo peptidov in njihovimi vezavnimi lastnostmi. Interakcijo izbranega peptidnega afinitetnega liganda min19Fc ter izboljšane mutante min19Fc Q6D do humanih IgG smo ovrednotili tudi z mikrotermoforezo (MST). Sposobnost izolacije in čiščenja protiteles s sinteznimi peptidi smo ocenili s t. i. testi *pull down*. Tako smo simulirali razmere, ki so jim protitelesa izpostavljena pri potovanju skozi afinitetno kromatografsko kolono.

Končni cilj doktorskega dela je bila priprava afinitetne kromatografske kolone z izbranim peptidnim ligandom min19Fc Q6D. Sintezni peptid smo prek kratkega distančnika vezali na sefarozni matriks, aktiviran s cianogen bromidom. Tako pripravljena kolona je kazala dinamično vezavno kapaciteto 11 mg IgG/ml afinitetnega nosilca. Iz kompleksnih zmesi, kot sta celično gojišče in humani serum, smo izolirali humana IgG (hIgG) z ocenjeno čistoto, ki presega 95 %, in s tem potrdili visoko specifičnost afinitetne kolone (Slika 1). Izpostavili smo jo več kot 25 poskusom izolacije hIgG in pri tem nismo zaznali znatnega zmanjšanja funkcionalnosti. Med preizkušenimi pogoji regeneracije kromatografske kolone smo uporabili tudi raztopino 6 M gvanidinijevega klorida, 30% izopropanol ter 1 M NaOH, kar ni bistveno vplivalo na kapaciteto afinitetne kolone, s čimer smo potrdili njeno stabilnost. Učinkovito elucijo IgG iz kolone smo dosegli z glicinskim pufrom pri pH 2,5.



Slika 1. Izolacija hIgG iz humanega seruma. A – krivulja prikazuje absorbenco pri 280 nm in pripadajoči gel SDS-PAGE, obarvan z modrim barvilm Coomassie. B – po analizi vzorcev, zbranih med kromatografsko ločitvijo IgG iz seruma z uporabo z min19Fc Q6D-funkcionalizirane afinitetne kolone; S – 10-kratna razredčitev injiciranega vzorca; M – proteinski označevalec; 1 do 3 – nevezana frakcija; 4 do 8 – eluirani material; HSA – humani serumski albumin.

Design and Development of Peptide Ligands for Antibody Affinity Purification

NIKA KRULJEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Tomaž Bratkovič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Monoclonal antibodies (mAb) have emerged as dominant biopharmaceuticals for the treatment of various diseases. The initial step of therapeutic antibody downstream processing is antibody capture which typically relies on affinity chromatography. The most commonly used affinity matrices are based on bacterial immunoglobulin binding proteins such as staphylococcal protein A (SpA). However, such affinity ligands suffer from several drawbacks. Therefore, there is a pressing need for new alternative affinity ligands. One of the most promising groups of alternative affinity ligands are short peptides.

In this work, we have identified a new group of peptide affinity ligands from screening commercial phage display random peptide libraries. Among five peptide ligands with two different amino acid consensus motifs, the clone 19Fc was chosen for further characterisation. Phage clone displaying the lead peptide 19Fc competed with immunoglobulin-binding staphylococcal protein A (SpA) for hFc binding, which indicates that the 19Fc peptide's binding site at least partially overlaps with that of SpA (located at the CH2 and CH3 domain interface). Trimming analysis and alanine scanning revealed the minimal structural requirements of the peptide, termed min19Fc, for Fc binding. The interaction of the human Fc fragment with synthetic biotinylated peptide b-min19Fc was confirmed by surface plasmon resonance. With the goal of augmenting peptide's solubility and possibly potentiating the pH-dependence of its interaction with the Fc fragment, we focused on modifying position 6 occupied by glutamine in the parental peptide min19Fc. Gln6 was substituted with charged residues (aspartate, glutamate, or lysine) yielding peptides min19Fc Q6D, min19Fc Q6E, and min19Fc Q6K, respectively. We analysed the binding properties of modified peptides and compared them with the parental peptide min19Fc. In order to gain a better insight into the relationship between the structure and binding properties of the peptides, we prepared two sets of peptide mutants with structurally similar amino acid substitutions at chosen positions.

We used a microscale thermophoresis (MST) method to quantitate the binding affinity of peptides min19Fc and min19Fc Q6D to human IgG pool. Pull-down assays with synthetic peptides were undertaken for simulation of column conditions to confirm that their interactions with IgGs are strong enough to support antibody isolation from complex mixtures, as well as to assess the peptides' specificity.

The ultimate goal of this PhD thesis was the construction of affinity chromatographic column based on the optimised peptide affinity ligand min19Fc Q6D. Peptide min19Fc Q6D with the amidated GGDDK-NH₂ C-terminal extension was coupled to a CNBr-activated Sepharose matrix. The dynamic binding capacity of the affinity column was estimated at $11.0 \pm 1.5\text{mg IgG/mL}$ affinity matrix. We subjected the column to human IgG purification from complex protein mixtures, consistently attaining antibodies with purities exceeding 95%, thus confirming high specificity for human Fc fragment (Figure 1). We observed no significant reduction of column's functional performance over more than 25 chromatographic runs. We tested several cleaning-in-place (CIP) conditions, washing the column with 6 M guanidine chloride, 30% isopropanol, and 1 M NaOH, and observed no significant differences in DBC values, thus confirming the stability of the developed affinity column. Efficient elution from the column was achieved with glycine buffer of pH 2.5.

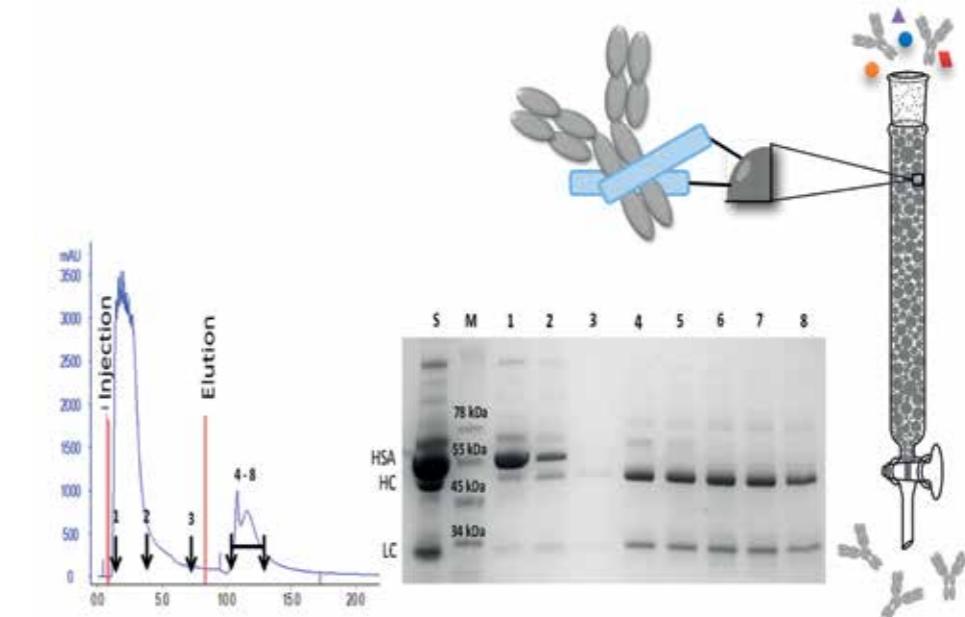


Figure 1: Isolation of IgG from human sera. Chromatogram A represents absorbance at 280 nm and corresponding Coomassie stained SDS-PAGE gel B, after SDS-PAGE analysis of fractions collected during chromatographic separation of human IgG from human serum using min19Fc Q6D-functionalised affinity matrix. Lane S – 1:10 dilution of loading material; lane M – protein marker; lanes 1 and 2 – flow-through; lines 3 to 7 – eluted material corresponding to antibody heavy (HC) and light chains (LC).



Dr. KATJA ŠKRLEC

*Sodelovanje in
združevanje znanja
z več področij*

Katjo Škrlec so naravoslovni predmeti zanimali že v osnovni šoli v Sevnici, kjer je znanje nadgrajevala na različnih tekmovanjih. Po končani Gimnaziji Celje – Center, kjer je izpeljala dve raziskovalni nalogi, se je vpisala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko ter Katedri za farmacevtsko biologijo se je srečala s pravim raziskovalnim delom. Po magistrski nalogi, ki jo je pripravila na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, je kot mlada raziskovalka na Oddelku za biotehnologijo Instituta Jožef Stefan vpisala doktorski študij v programu Biomedicina, smer Biokemija in molekularna biologija. V svojem doktorskem delu se je posvetila biotehnologiji mlečnikislinskih bakterij za zdravljenje vnetnih bolezni. Kot raziskovalka je zaposlena na oddelku Farmacevtska tehnologija v Krki.

Kronična vnetna črevesna bolezen je velik znanstveni iziv, saj je zaradi številnih dejavnikov, ki vplivajo na njen razvoj, zahtevna za zdravljenje. Glavni cilj doktorske disertacije je bil razvoj mlečnikislinskih bakterij (MKB), ki bi imele na površini ustrezne vezavne proteine, s katerimi bi bilo mogoče doseči protivnetno delovanje in omiliti simptome vnetja. V doktorski nalogi predstavljamo rezultate površinske predstavitev kemokin vezavnih proteinov evazinov in ILP-vezalcev citokina IL-23 na MKB ter razvoj dostavnega sistema za peptid bepecin. Razvili smo nov pristop k zdravljenju vnetnih bolezni z inovativnim dostavnim sistemom na osnovi nanovlaken, ki vsebujejo MKB in omogočajo njihovo dostavo na ustno ali vaginalno sluznico.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA
Najbolj me navdihuje sodelovanje in združevanje znanja z več področij. Prepričana sem, da je ravno povezovanje različnega znanja, izkušenj in zamisli ključ do uspeha. Običajno se mi najboljše zamisli porodijo v pogovorih z izkušenimi sodelavci in ob prebiranju znanstvenih člankov. Pogosto tudi ponoči razmišjam o poskusih. V prihodnje želim znanje, sposobnost in zagnanost izkoristiti v čim večji meri in postati še uspešnejša tehnologinja.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA
Na doktorski študij sem prvič pomisnila ob spodbudah prof. dr. Saše Baumgartner, ki je bila moja mentorica pri magistrski nalogi. Priložnost za doktorski študij mi je omogočil prof. dr. Borut Štrukelj, ki me je izbral za mlado raziskovalko. Neprecenljivo vlogo med raziskovanjem pa je imel mentor izr. prof. dr. Aleš Berlec, ki me je usmerjal, podpiral, mi zaupal in me spodbujal, naj sledim željam in razvijam lastne zamisli.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE
Posebno vrednost Krkinih nagrad vidim v povezovanju akademskega sveta in gospodarstva. To je pomembno, saj je za kakovostne rešitve sodobnih izzivov potrebna večdisciplinarnost. Verjamem, da

ima znanstveni dosežek še večjo moč, če ga lahko gospodarstvo uporabi. V izjemno čast mi je, da sem prejemnica Krkine nagrade, kar pomeni, da je moje raziskovalno delo kakovostno, hkrati pa mi to strokovno priznanje daje zagon in motivacijo za nadaljnje delo. Krkina nagrada je odlična priložnost, da svoje delo predstavim tudi širši javnosti.

PROFESSIONALNO IN ZASEBNO
Ves čas doktorskega študija sem živila doma, v Sevnici, kar je pomenilo, da sem se z vlakom vsak dan vozila v Ljubljano. Dolgo pot sem izkoristila za pisanje dnevnikov in načrtovanje poskusov. Brez podpore družine bi težko zmogla, saj sem med doktorskim študijem postala mamica dveh fantkov. Z družino, ki me podpira in verjame vame, je bila pot lažja, sinova pa mi vedno znova polepšata dan in me spomnita na to, kaj je v življenju resnično pomembno.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI
Sem zelo vztrajna in vodoželjna – sodelavci bi zagotovo potrdili, da veliko sprašujem. Raziskovanje me hitro pritegne, ogromno je stvari, ki me zanimajo. Nikoli ne obupam, verjamem, da se vedno najde pot, pa čeprav je kdaj vijugasta. Iznajdljivost, vztrajnost, delavnost in pogovor s sodelavci so rešitev za marsikatero na videz težko rešljivo uganko.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM
Novim generacijam raziskovalcev sporočam, naj sledijo svojim ciljem. Vztrajajte in predano delajte, saj se bo to gotovo obrestovalo.

Najboljši nasvet
Sledim zgledu staršev, ki dokazujejo, da ni nikoli nič pretežko.

Misel, ki vas vodi skozi življenje
Omnia mea tecum porto, kar v prevodu pomeni vse svoje nosim s seboj. Bogastvo izkušenj, znanja, vrednot in talentov ves čas nosimo s seboj – in to je najpomembnejše.

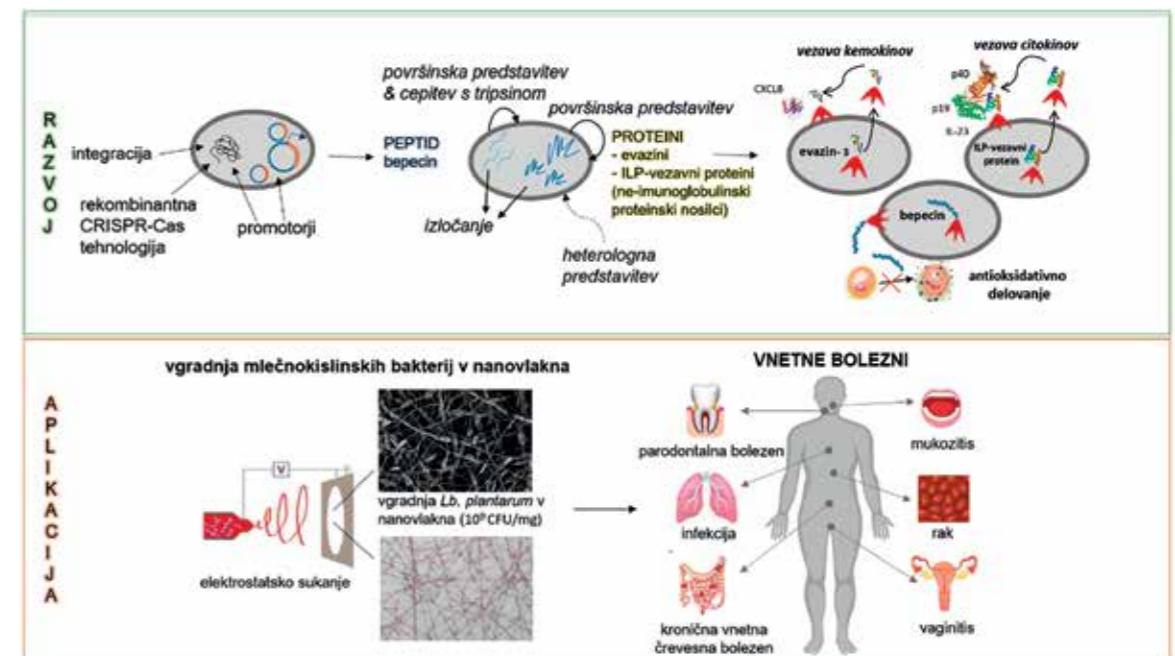
Površinska predstavitev evazinov in bepecina na bakterijah *Lactococcus lactis* NZ9000 in *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ter vrednotenje njihovega protivnetnega delovanja

KATJA ŠKRLEC, Institut Jožef Stefan
Mentor: Aleš Berlec, Institut Jožef Stefan

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je vse večji zdravstveni problem, saj incidenca in prevalenca bolezni naraščata, obenem pa je zdravljenje z biološkimi zdravili draga in povzroča neželene učinke. Razvoj novih načinov zdravljenja je zato velik znanstveni iziv. Kemokini in citokini imajo ključno vlogo pri vnetnem odzivu v gastrointestinalnem traktu, zato so nova možna tarča zdravljenja vnetnih bolezni.

Glavni namen doktorske disertacije je bil razvoj mlečnikislinskih bakterij (MKB) *Lactococcus lactis* NZ9000 in *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741, ki bi imeli na površini predstavljene ustrezne vezavne proteine, s katerimi bi bilo moč doseči protivnetno delovanje in izboljšati simptome vnetja. Potrdili smo, da so kemokin vezavni kloplni proteini evazini primerni za površinsko predstavitev na MKB *Lactococcus lactis* NZ9000 in *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741. Kot alternativni način protivnetnega delovanja pri vnetnih črevesnih boleznih smo s fuzijo z ustreznim nosilnim površinskim proteinom razvili dostavni sistem za protivnetni peptid bepecin (BPC-157). Nadzorovano sproščanje bepecina smo dosegli s pomočjo v črevesju prisotne proteaze tripsin ali s pomočjo signalnega peptida. Razvili smo tudi sistem spremljanja in kvantifikacije izločenega bepecina. Učinkovitost obeh novih pristopov k zdravljenju vnetnih črevesnih bolezni smo potrdili na celičnih modelih, in sicer zmožnost vezave kemokina CXCL8 na modelu črevesnega epitelja, antioksidativno delovanje bepecina pa na celičnem modelu fibroblastov. Poleg vezave kemokinov bi lahko k zdravljenju vnetnih črevesnih bolezni pristopili tudi z vezavo citokinov, zato smo na površini bakterije *Lactococcus lactis* NZ9000 predstavili neimunoglobulinske proteinske nosilce, pripravljene na osnovi albumin vezavne domene, ki so sposobni vezati podenoto p19 človeškega IL-23 (ILP-vezavni proteini). Z vezavo bi lahko preprečili interakcijo med IL-23 in receptorjem ter tako zaustavili z IL-23 posredovano provnetno signaliziranje. Neimunoglobulinski proteinski nosilci so alternativa protitelesom. S pregledom njihovih tarč smo izpostavili primerne vezavne proteine za površinsko predstavitev na MKB z namenom protivnetnega delovanja. Za učinkovito protivnetno delovanje je pomembna zadostna količina protivnetnih proteinov ali peptidov na mestu delovanja. Na količino izraženih proteinov lahko vplivamo z optimizacijo gostiteljskega seva MKB, pri katerem lahko z inaktivacijo ali utišanjem določenih genov vplivamo na povečano tvorbo rekombinantnih proteinov ali njihovo zmanjšano razgradnjo. Predhodno razviti plazmid pNZDual z dvema nizinskima promotorjema smo uporabili za razvoj enoplazmidnega inducibilnega sistema CRISPR-Cas9, ki omogoča inaktivacijo ali utišanje genov z uporabo tehnologij CRISPR in CRISPRi, in bo v nadaljevanju uporaben za inaktivacijo kandidatnih genov za povečanje izražanja protivnetnih proteinov. Želeno protivnetno delovanje bakterij bi lahko izboljšali z uvedbo ustreznega dostavnega sistema, s katerim bi bakterije zaščitili in dostavili na mesto vnetja. Novejši dostavni sistem predstavlja nanovlakna, ki bi lahko omogočala vgradnjo MKB in njihovo dostavo na ustno ali vaginalno sluznico, s čimer bi razširili možnosti zdravljenja vnetnih bolezni. V okviru doktorskega dela smo proučili vpliv procesnih parametrov elektrostatskega sukanja in parametrov polimerne raztopine na morfologijo nanovlaken ter sposobnost preživetja vgrajene modelne MKB *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Učinkovita vgradnja probiotičnih bakterij v nanovlakna nam omogoča sočasno sušenje bakterij in pripravo za bolnika primerenega lokalnega dostavnega sistema z dolgim rokom uporabnosti in hitrim sproščanjem, s katerim bakterije zaščitimo ter dostavimo na mesto vnetja.

Čeprav so bile MKB s površinsko predstavljenimi evazini, bepecinom in ILP-vezavnimi proteini razvite za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni, bi jih z vključitvijo v novorazvita nanovlakna lahko uporabili tudi za zdravljenje drugih vnetnih bolezni, kot so vaginitis, mukozitis ali parodontalna bolezen. Opisani dosežki predstavljajo nov pristop k zdravljenju vnetnih bolezni.



Slika 1. Razvoj mlečnikislinskih bakterij s površinsko predstavljenimi evazini, bepecinom in ILP-vezavnimi proteini, ki bi jih z vgraditvijo v nanovlakna lahko uporabili za zdravljenje različnih vnetnih bolezni.

Surface Display of Evasins and Bepecin on Bacteria *Lactococcus lactis* NZ9000 and *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 and Evaluation of Their Anti-Inflammatory Action

KATJA ŠKRLEC, Jožef Stefan Institute
Supervisor: Aleš Berlec, Jožef Stefan Institute

Inflammatory bowel disease (IBD) is a growing health problem, as incidence and prevalence of the disease are increasing, while treatment with biological agents is expensive and causes undesirable side effects. Therefore, the development of new treatments is a major scientific challenge. Chemokines and cytokines play a key role in the inflammatory response in the gastrointestinal tract, and hence represent a new target for the treatment of inflammatory diseases.

The main aim of the doctoral dissertation was the development of lactic acid bacteria (LAB) *Lactococcus lactis* NZ9000 in *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 that would display on the surface appropriate binding proteins, which could achieve anti-inflammatory activity and improve the symptoms of inflammation. We have confirmed that the chemokine-binding proteins evasins from ticks are suitable for surface display on LAB *Lactococcus lactis* NZ9000 and *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741. As an alternative approach to achieving anti-inflammatory activity in IBD, we successfully developed the delivery system for anti-inflammatory peptide bepecin (BPC-157) in fusion with a suitable surface carrier protein. The controlled release of bepecin was achieved with the help of intestinally located protease trypsin, or with the signal peptide. We also developed a system for monitoring and quantification of released bepecin. The effectiveness of both new approaches for the treatment of IBD was confirmed on cell models. The ability to bind chemokine CXCL8 was confirmed on a gut epithelial cell model, and the antioxidant activity of bepecin on a fibroblast cell model. In addition to the binding of chemokines, cytokine binding could also be used for the treatment of inflammatory bowel diseases. Therefore, we displayed on the surface of *Lactococcus lactis* NZ9000 non-immunoglobulin protein scaffolds prepared from the albumin-binding domain and capable of binding the p19 subunit of human IL-23 (ILP-binding proteins). By binding p19, the interaction between IL-23 and its receptor could be prevented, thereby blocking IL-23-mediated signalling. Non-immunoglobulin scaffolds are an alternative to antibodies. We identified binding proteins with anti-inflammatory activity suitable for surface display on LAB by reviewing their possible targets. In any case, an adequate amount of anti-inflammatory proteins or peptides at their site of action is important to produce anti-inflammatory effects. The amount of expressed proteins can be influenced by the optimisation of the LAB host strain, whereby the inactivation or silencing of certain genes can increase the expression of recombinant proteins or reduce their degradation. The pre-developed plasmid pNZDual with two nisin promoters was used to develop the CRISPR-Cas9 single-plasmid inducible system, which enables the inactivation or silencing of genes using CRISPR and CRISPRi technologies, and will be used to inactivate candidate genes in order to increase the expression of anti-inflammatory proteins. The desired anti-inflammatory activity of bacteria can be improved by introducing an appropriate delivery system, by which the bacteria are protected and delivered to the site of inflammation. Nanofibers are a more recent delivery system that could enable the incorporation of LAB and their delivery to the oral or vaginal mucosa, thus expanding the possibilities of treating inflammatory diseases. Within the doctoral thesis, the influence of process parameters of electrospinning, and parameters of the polymer solution were studied, and their effect on the morphology of nanofibers and the viability of the model LAB *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 assessed. The incorporation of probiotic bacteria into nanofibers enables us to simultaneously dry the bacteria, incorporate them with high efficiency, and prepare a patient-friendly local delivery system with a long shelf life and fast release that enables protection and delivery of bacteria to the site of inflammation.

Although LAB with surface-displayed evasins, bepecin, and ILP-binding proteins have been developed to treat chronic inflammatory bowel disease, they can also be used to treat other inflammatory diseases, such as vaginitis, mucositis, or periodontal diseases, by incorporation into newly developed nanofibers. The described achievements represent a new approach to the treatment of inflammatory diseases.

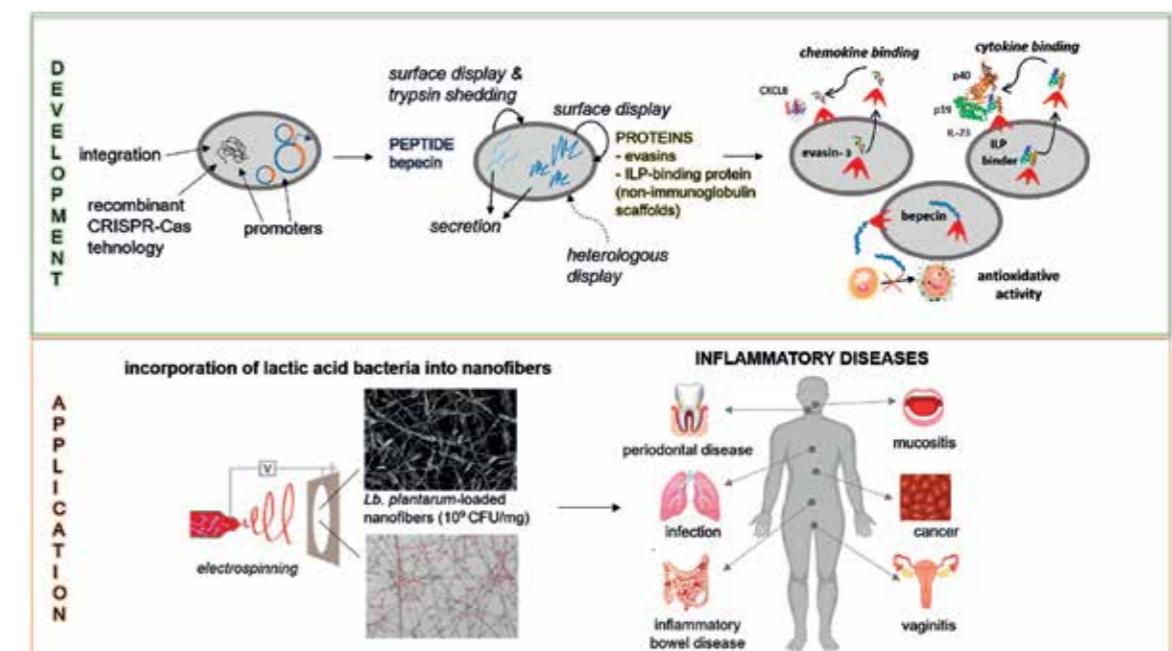


Figure 1: Development of lactic acid bacteria with surface-displayed evasins, bepecin and ILP-binding proteins, which could be used to treat different inflammatory diseases following incorporation into nanofibers.



Dr. DARJA GRAMEC SKLEDAR

*Nepričakovani
rezultati vodijo
do svežih zamisli*

Darja Gramec Skledar se je po končani Gimnaziji Brežice zaradi veselja do naravoslovja in dela z ljudmi vpisala na ljubljansko Fakulteto za farmacijo. Navdušena nad raziskovalnim delom je študij nadaljevala v interdisciplinarnem doktorskem programu Biomedicina, smer Toksikologija, hkrati pa se je na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo zapošlila kot mlada raziskovalka. Med doktorskim študijem je raziskovalno delo opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih, kjer se je posvetila proučevanju metabolizma izbranih bisfenolov. Doktorsko nalogu je uspešno zagovarjala oktobra 2018. Tudi v prihodnje želi delovati na toksikološkem področju, zanima jo zlasti razvoj novih metod in silico ter in vitro.

Za raziskovalno delo sem se navdušila ob koncu študija farmacije, ko sem v okviru magistrske naloge na Institutu Jožef Stefan razvijala metodo za določevanje bisfenola A in triklosana v urinu. Prav bisfenol A in njegovi analogi so me spremljali tudi pozneje, saj sem se osredotočila predvsem na njihov metabolismus in vpliv na endokrine receptorje v telesu. Tako smo v sklopu doktorske naloge želeli proučiti vpliv metabolizma na endokrino aktivnost. S sodelavci smo bili prvi, ki smo postavili fiziološki farmakokinetični model za analoge bisfenola A (BPA). Ugotovili smo, da določeni analogi BPA močneje delujejo na endokrine receptorje kot BPA, zato niso primerna alternativa. Naša spoznanja o škodljivosti teh spojin lahko pripomorejo, da se bodo v proizvodnji izdelkov za vsakdanjo rabe manj uporabljale ali postopno celo opuščale oziroma zamenjale z varnejšimi spojinami. Pri vrednotenju motilcev endokrinskega sistema smo uporabili izvireni pristop, ki ima številne prednosti, saj upošteva tako metabolizem kot koncentracije spojin in metabolitov v plazmi in endokrinih žlezah.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovalnem delu me najbolj navdušujejo nepričakovani rezultati, ki običajno odprejo veliko novih vprašanj v vodijo do svežih zamisli. Te se mi porodijo tudi ob prebiranju člankov in v pogovorih z mentorico ob jutranji kavi. Ko naletim na raziskovalni problem, najprej pregledam literaturo, skušam ugotoviti, kaj je bilo na tem področju že narejeno, posvetujem se z drugimi raziskovalci in poiščem rešitev.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Dober mentor ima ključno vlogo na začetku raziskovalne poti, saj raziskovalca usmerja tako pri laboratorijskem delu kot pri predstavitvi rezultatov v strokovnih člankih. Zelo sem hvaležna svoji mentorici prof. dr. Luciji Peterlin Mašič za podporo, nasvete in spodbudo. Spoznala me je s številnimi laboratoriji v tujini, kjer se ukvarjajo s podobnimi temami in s katerimi smo kasneje uspešno sodelovali.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADA

Krkine nagrade so dober primer sodelovanja akademskoga sveta in gospodarstva. V raziskovalnem

okolju so zelo cenjene, kar je bil tudi povod za prijavo moje doktorske naloge na razpis za 49. Krkine nagrade. To je hkrati priložnost, da delo predstaviš širšemu občinstvu, in včas mi je, da se lahko pridružim številnim odličnim raziskovalcem, ki so to nagrado prejeli v preteklih letih. To je potrditev in priznanje za moje dosedanje delo, hkrati pa spodbuda za naprej. Ponosna sem, da je bila doktorska naloga opažena in prepoznana kot pomemben in izviren prispevek k znanosti.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Trudim se najti ravnotežje med delom in zasebnim življenjem. Sinova, petletni Nik in dveletni Jakob, poskrbita, da je tudi čas po službi poln izzivov in presenečenj. Živimo v Škofji Loki, in če se le da, večino prostega časa preživimo v naravi: radi kolesarimo, večkrat se povzpnemo na bližnji Lubnik, pozimi se radi sankamo in smučamo, poleti pa se hladimo ob Sori. Trenutki z družino in prijatelji me sprostijo in napolnijo z energijo, ki je pri raziskovalnem delu zelo potrebna.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Sem optimistična in pozitivna oseba, zame je kozarec vedno na pol poln. Prava mera vztrajnosti in potprežljivosti mi pomaga, da uspešno krmam med službenim in družinskim življenjem.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Raziskovalno delo je v marsičem prav posebno. Novim generacijam raziskovalcev bi želela sporočiti, naj uživajo v svojem delu, naj ne obupajo ob ovirah in na videz nerešljivih ugankah. Izkoristijo naj možnosti za mednarodne izmenjave, saj lahko prinesejo veliko znanja in nova poznanstva ter so pomembna izkušnja za nadaljnjo pot. In najpomembnejše, kljub vsemu veselju, ki ga daje raziskovalno delo, naj ne pozabijo na življenje zunaj laboratorijev.

Najboljši nasvet

Osredotoči se na iskanje rešitve in ne na problem.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Všeč mi je misel Nelsona Mandele: »Vedno je videti nemogoče, dokler tega ne narediš.«

In vitro preučevanje metabolizma ter endokrinih učinkov izbranih bisfenolov in novejših bromiranih zaviralcev gorenja

DARJA GRAMEC SKLEDAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Lucija Peterlin Mašič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Svetovna zdravstvena organizacija je leta 2002 motilce endokrinega sistema opredelila kot od zunaj vnesene kemične snovi oziroma mešanice snovi, ki prek sprememb v delovanju hormonov povzročajo neželene učinke na zdravje posameznega organizma ali njegovega potomstva oziroma (sub)populacije. Izpostavljenost motilcem endokrinega sistema je povezana s številnimi boleznimi današnjega časa, kot so metabolni sindrom, srčno-žilne bolezni, neplodnost in rak. V zadnjih letih so bile opravljene številne raziskave, vendar ostaja še veliko negotovosti, kot so učinki izredno majhnih odmerkov, učinki mešanic, izpostavljenost v kritičnih obdobjih razvoja in vpliv metabolizma na delovanje teh motilcev. V okviru doktorske naloge smo zeleli raziskati vpliv metabolizma na endokrino aktivnost pri dveh skupinah spojin: strukturnih analogih bisfenola A (BPA) in novejših bromiranih zavircih gorenja. Izbrane spojine se množično uporabljajo pri proizvodnji izdelkov za vsakdanjo rabi, kot so plastika, termalni papir in pohištvo. V študijah humanega biomonitoringa so bile izbrane spojine določene v različnih bioloških vzorcih, kar pomeni, da smo jim ljudje dejansko izpostavljeni, vendar so podatki o njihovi varnosti pomanjkljivi.

Podrobno smo raziskali metabolism izbranih strukturnih analogov BPA, kot so bisfenol F (BPF), bisfenol AF (BPAF) in bisfenol S (BPS). Pokazali smo, da je glukuronidacija najpomembnejša pot metabolizma za izbrane bisfenole, izpostavili pa smo tudi pomen zunajjetrnih tkiv pri glukuronidaciji bisfenolov.

Z raziskovalci Švicarskega inštituta za tehnologijo (ETH, Zürich) smo postavili fiziološki farmakokinetični model (PBPK) za strukturne analoge BPA. Obstojec model PBPK za BPA smo nadgradili, tako da smo upoštevali tudi dermalno izpostavljenost, optimizirani model pa smo potem parametrizirali za bisfenole S, AF in F. Dodatno vrednost modelu prinašajo študije jetrne in intestinalne glukuronidacije izbranih bisfenolov, ki so potekale in vitro. Model PBPK je prvi, ki opisuje kinetiko strukturnih analogov BPA, in predstavlja pomemben prispevek k znanosti na področju farmakokinetike bisfenolov, zelo pomemben pa je tudi pri oceni tveganja za izbrane analoge BPA. Uporabili smo ga pri določanju interne izpostavljenosti izbranim bisfenolom po peroralni in dermalni izpostavljenosti za različne starostne skupine, pri čemer smo ugotovili, da zamenjava BPA s strukturimi analogi ne zmanjša tveganja za motnje endokrinega sistema.

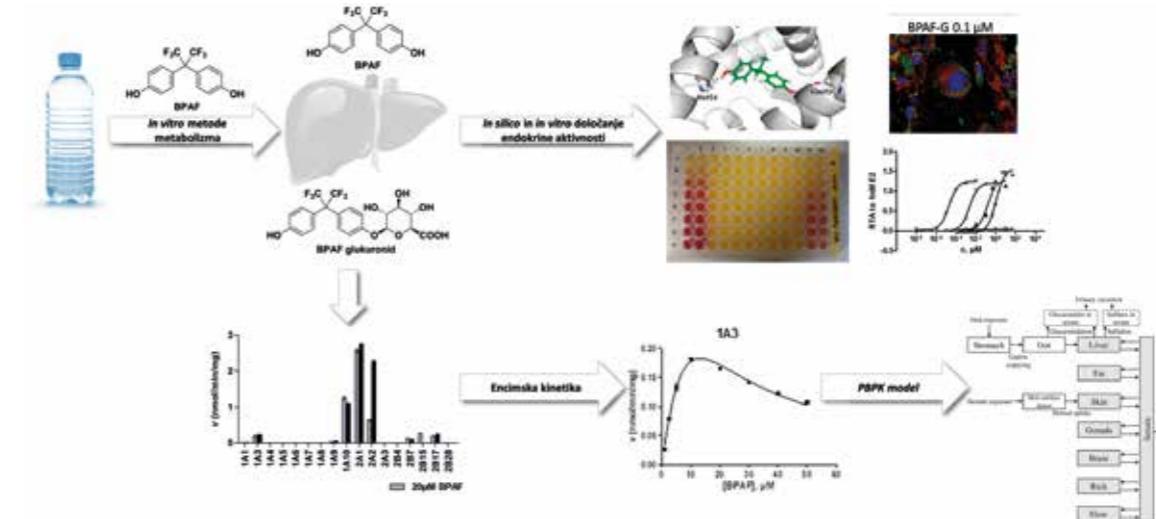
Poseben poudarek smo namenili določanju vpliva metabolizma na endokrino aktivnost izbranih spojin. Ovrednotili smo delovanje izbranih spojin in njihovih metabolitov na številnih jedrilih receptorjih v telesu: estrogenskih, androgenskih, tiroidnih, glukokortikoidnih, pregnanskem receptorju X (PXR), farnezoidnem receptorju X (FXR) ter na jedrilih receptorjih, aktiviranih s peroksisomskim proliferatorjem (PPAR α in PPAR γ).

Ugotovili smo, da določeni analogi BPA močneje delujejo na endokrine receptorje kot BPA, zato niso primerna alternativa zanj. Pri določanju estrogenne aktivnosti smo uporabili validirano celično linijo (OECD 455), zato so rezultati ustrezni tudi za regulatorne organe.

Pri bisfenolih so metaboliti šibkeje endokrino delovali kot izhodne spojine ali pa niso endokrino delovali. Metabolizem je zaščitni sistem, ki zmanjša biološko aktivnost in pospeši izločanje iz telesa. Pri novejših zavircih gorenja pa smo ugotovili, da metabolita na estrogenskih in androgenskih receptorjih delujeta močneje kot izhodne spojine. Med metabolizmom sta torej nastala metabolita s povečano biološko aktivnostjo. Vidimo lahko, da je učinke metabolizma na endokrino aktivnost težko predvideti, zato bi bilo testiranje endokrinih učinkov metabolitov smiselno pri določanju endokrino aktivnosti izhodnih spojin.

Glukuronidi bisfenolov kot glavni metaboliti so do sedaj veljali za neaktivne spojine. To je temeljilo na dejstvu, da niso estrogeno aktivni, kar je bilo potrjeno v predhodnih študijah. V raziskavah smo to prepričanje ovrgli, potrdili smo namreč tako antagonistično aktivnost glukuronidov na receptorjih PXR in PPAR γ kot tudi njihovo vpletenost v proces adipogeneze. Glukuronid BPAF je povečal akumulacijo lipidov in ekspresijo ključnih adipogenih markerjev, kar bi lahko pojasnilo povezavo med izpostavljenostjo bisfenolom ter razvojem debelosti in metabolnega sindroma, ki je bila potrjena v epidemioloških študijah. Glukuronidacija res pospeši izločanje spojin iz telesa, vendar se je pokazalo, da imajo glukuronidi še vedno določeno biološko aktivnost.

Z raziskavami v okviru doktorske naloge smo predstavili izviren pristop k vrednotenju motilcev endokrinskega sistema (Slika 1), ki zajema celostno ovrednotenje metabolizma (določitev metabolitov, encimov, kinetičnih parametrov, postavitev fiziološkega farmakokinetičnega modela), sintezo metabolitov ter vrednotenje spojin in metabolitov na endokrinih receptorjih, ki poteka in silico ter in vitro. Ta pristop ima številne prednosti pred drugimi, saj upošteva tako metabolizem kot koncentracije spojin in metabolitov v plazmi in endokrinih žlezah. Raziskave so dobro izhodiče za oceno tveganja izbranih spojin, hkrati pa rezultati koristijo tudi splošni populaciji. Ozaveščanje o škodljivem delovanju izbranih spojin na endokrini sistem lahko dolgoročno vodi k manjši uporabi teh spojin pri izdelavi plastike, kot smo videli že pri BPA, vendar pa bo treba zanje najti ustrezne in varnejše alternative.



Slika 1. Izviren pristop pri vrednotenju motilcev endokrinskega sistema.

In Vitro Study of Metabolic and Endocrine Effects of Selected Bisphenols and Novel Brominated Flame Retardants

DARJA GRAMEC SKLEDAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Lucija Peterlin Mašič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Endocrine disruptors are defined, according to the World Health Organization (2002), as exogenous substances or mixtures that alter function(s) of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations. Exposure to endocrine disruptors is associated with numerous diseases of our time, such as metabolic syndrome, cardiovascular disease, infertility and cancer. Extensive research was performed in recent years in the area of endocrine disruptors. However, many questions remain open, like effects of endocrine disruptors at extremely low doses, effects of mixtures, exposure in critical periods of development or the impact of metabolism on the endocrine activities. In this doctoral thesis, two groups of potential endocrine disruptors were evaluated: structural analogues of bisphenol A (BPA) and new brominated flame retardants. The selected compounds are widely used in the manufacture of everyday products such as plastics, thermal paper and furniture. In human biomonitoring studies, they have been identified in different biological samples, meaning that humans are actually exposed to those compounds. However, their impact on human health is still largely unknown.

In the first part of our research, the metabolism of selected bisphenols (i.e. BPA, bisphenol F (BPF), bisphenol AF (BPAF), and bisphenol S (BPS)) was evaluated. We showed that glucuronidation represents the most important metabolic pathway for selected bisphenols, and we highlighted the importance of non-hepatic tissues in the glucuronidation of bisphenols.

A physiologically based pharmacokinetic model (PBPK) for structural analogues of BPA was established in collaboration with researchers from the Swiss Federal Institute of Technology (ETH, Zurich). The existing PBPK model for BPA was extended to include also dermal exposure, and the optimized model was further parameterised for bisphenols S, AF, and F. To characterise the metabolic behaviour of the BPA analogues, *in vitro* experiments on their hepatic and intestinal glucuronidation were conducted. The built-in physiological pharmacokinetic model is the first that describes the kinetics of structural analogues of BPA, and thus represents an important contribution in the field of pharmacokinetics. With the model, we found out that the replacement of BPA with structural analogues does not necessarily lower the risk of endocrine activity.

In the second part of our research, we wanted to determine the influence of metabolism on endocrine activities of selected bisphenols and new brominated flame retardants. For that purpose, we evaluated endocrine activities of both, parent compounds and their metabolites on different endocrine receptors in the body: estrogen, androgen, thyroid, glucocorticoid, pregnane X receptor (PXR), farnesoid X receptor (FXR), and on peroxisome proliferator-activated nuclear receptors (PPAR α and PPAR γ).

We discovered that certain BPA analogues, like BPAF, exhibited stronger activities on endocrine receptors than BPA and are therefore not a suitable alternative to BPA. A validated transactivation assay using HeLa9903 cell line (OECD 455) was used for the evaluation of estrogenic activity and therefore the results can also be relevant to regulatory authorities.

In the case of bisphenols, the metabolites showed weaker endocrine activity than the parent compounds, or metabolites were even without endocrine activity. Metabolism is in this case considered a protective system that reduces biological activity and accelerates the elimination of the substance from the body. Newer flame retardants, however, showed lower activities on estrogen and androgen receptors from

their metabolites. During metabolism, metabolites with an increased biological activity were formed. We can conclude that it is difficult to predict the effects of metabolism on endocrine activities of a substance. Therefore, the testing of the endocrine effects of metabolites would be reasonable when we determine the endocrine activity of the starting compounds.

Bisphenols are metabolised mainly to glucuronide conjugates, which were considered as inactive metabolites. That assumption was based on the fact that their glucuronides lack estrogenic activity, which had been confirmed in previous studies. We refuted the long-standing belief that glucuronides are only inactive metabolites. We found out that BPAF glucuronides act as antagonists on PXR and PPAR γ receptors and we also determined involvement of BPAF glucuronide in the process of adipogenesis. BPAF glucuronide increased lipid accumulation and expression of key adipogenic markers, which could elucidate the link between bisphenol exposure and the development of obesity and metabolic syndrome, confirmed in epidemiological studies. Glucuronidation indeed accelerates the elimination of compounds from the body, but glucuronides have been shown to still have some biological activity.

In our work we presented an original approach to the evaluation of endocrine disruptors (Figure 1), which includes a comprehensive evaluation of metabolism (determination of metabolic enzymes, kinetic parameters, physiologically based pharmacokinetic modelling), synthesis of metabolites, and *in silico* and *in vitro* evaluation of compounds and their metabolites on endocrine receptors. This approach has many advantages over existing approaches as it takes into account both metabolism and concentrations of compounds and metabolites in the plasma and endocrine glands. The extensive research conducted here represents a good starting point for the risk assessment of the selected compounds. Additionally, these results can be valuable for the general population. Raising awareness about the harmful effects of selected compounds on the endocrine system can in the long run lead to a lower use of products containing these substances as it was already observed with BPA.

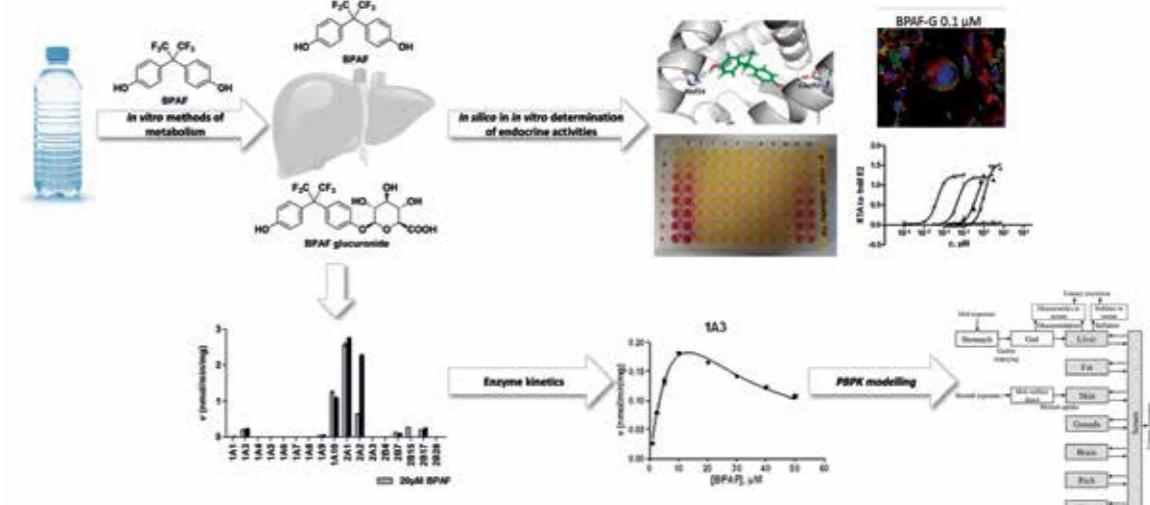


Figure 1: An original approach to the evaluation of endocrine disruptors.



ROK NAROBE

*Raziskovalno delo je
polno presenečenj*

Rok Narobe iz Bizovika pri Ljubljani se za kemijo navdušuje že od najstniških let. Njegovo zanimanje so povečali dobitni mentorji v osnovni in srednji šoli ter spodbudni rezultati na različnih naravoslovnih tekmovanjih. Po končani gimnaziji Ledina se je vpisal na študij kemije na Univerzi v Ljubljani. V tem času je bil pol leta na Univerzi v Regensburgu v Nemčiji, kjer je po magisteriju leta 2018 vpisal doktorski študij. Raziskuje na področju zelene kemije in fotokemije in se ukvarja s pretvorbo organskih spojin, kataliziranih z uporabo vidne svetlobe. Kot doktorski študent je zaposlen na Univerzi v Regensburgu.

V magistrski nalogi sem razvijal nove metode za pripravo jodiranih aromatov, ki temeljijo na uporabi vidne svetlobe. Takšne spojine so uporabni gradniki pri sintezi kompleksnejših molekul, zato je razvoj novih metod za njihovo pripravo pomemben. Naš pristop k jodiranju aromatskih spojin je konceptualno drugačen od tradicionalnih metod in omogoča dobro regioselektivnost in toleranco različnih funkcionalnih skupin. Osnovno sporočilo mojega dela je, da lahko s primerno izbiro topila in valovne dolžine ter v prisotnosti velike koncentracije joda vzbujamo molekule enostavnega organskega fotokatalizatorja.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Strokovna javnost je naše delo prepoznala kot pomembno, saj je to eden od redkih primerov uporabe enostavnih jodovih zvrsti (I in I_2) na področju fotokatalize. Fotoni so namreč za okolje neškodljiv in poceni reagent, ki za sabo ne pušča sledi in omogoča enostaven dostop do zelo reaktivnih radikalnih zvrsti. Verjamem, da bodo naše ugotovitve vodile do razvoja sintetsko uporabnih metod, ki v kemiji radikalov izkoristiščajo katalitsko aktivne jodove zvrsti.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Izr. prof. dr. Jernej Iskra me je usmeril na perspektivno področje raziskovanja, pri eksperimentih je bil pripravljen razpravljati o dodatnih idejah in predlogih. Ko sem izrazil zanimanje za mednarodno študijsko izmenjavo, me je usmeril k somentorju naloge prof. dr. Burkhardu Königu, s katerim je že prej sodeloval. Prof. König mi je dal priložnost, da sem nadgradil idejo magistrskega dela, in me je spodbujal k drznim eksperimentom. Oba mentorja sta mi pomagala pri predstavljivosti končnih rezultatov, ki so bili objavljeni v znanstveni publikaciji, zato njuno vlogo ocenjujem kot ključno.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Dolga tradicija Krkinih nagrad, ki so v slovenski javnosti ene najbolj prepoznavnih nagrad za raziskovalno delo, govori o kakovostnem delu Sklada. Všeč mi je, da industrija kaže zanimanje za akademske raziskave mladih. Na razpis za Krkine nagrade sem se prijavil tudi zato, ker me je zanimal odziv industrije na moje rezultate. Veseli me, da

ste moje delo prepoznali kot kakovostno, hkrati pa v tem vidim edinstveno priložnost za širjenje svojih raziskovalnih rezultatov. V ponos mi je, da sem član skupine Krkinih nagrajencev.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Ta čas se vse vrati okoli laboratorija, v katerem z dekletom Evo, ki tudi dela doktorat iz kemije, preživiva veliko časa. Vsak večer se skupaj spreghodiva domov. V prostem času kolesariva ob Donavi, plezava ali gledava serije pod pretvezo učenja nemščine. Počitnice rada preživljava v Sloveniji, včasih pa tudi Slovenija obišče naju, saj so vrata za družino in prijatelje vedno odprta, njihovega obiska sva vedno vesela.

OSEBNOSTNE LASTNOSTI

Sem radoveden in vztrajen, včasih tudi trmast. Sodelavci mi pravijo, da sem precej pozitivno naravnani, ker tudi v množici na videz brezupnih rezultatov pogosto iščem priložnosti. Najboljše zamisli se mi porodijo zvečer, po teku ali kaki drugi športni dejavnosti, ko se umirim in se v mislih vrnem k eksperimentalnim rezultatom, prebrani literaturi ali k pogovoru s sodelavci. Pri raziskovalnem delu me najbolj navdihujo nepričakovani rezultati, ki so plod mojega dela ali dela drugih raziskovalcev. Presenečenj nikoli ne zmanjka. Ko pa znanost postane nerešljiva uganka, največkrat pomaga dober spanec. Naslednji dan naredim pregled (negativnih) rezultatov, in če še vedno ne vidim rešitve, se obrnem k mentorju in kolegom.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Ne pričakujte, da bo vedno lahko, a trud se običajno izplača. To v veliki meri velja tudi za študiranje literature, saj lahko prihranimo veliko energije in volje, če ne odkrivamo že znanih konceptov. Tu in tam pa je dobro izzvati splošno sprejete zamisli in se zavedati, da so bili tudi raziskovalci prejšnjih generacij le ljudje.

Najboljši nasvet

Vnesi del sebe v svoje delo, a rezultatov ne jemlji preveč osebno.

Misel, ki vas vodi skozi življenje

Ne boj se neuspeha, ampak neposkusa.

Klasično in fotokatalitsko oksidativno jodiranje arenov

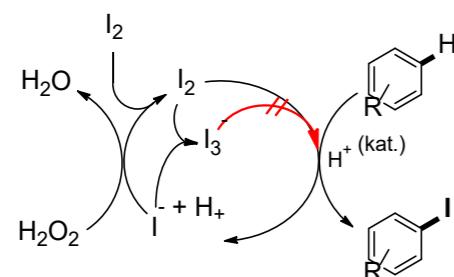
ROK NAROBE, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Jernej iskra, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: Burkhard König, Inštitut za organsko kemijo, Univerza v Regensburgu

V organski kemiji so jodoareni pomembni gradniki, ki se uporabljajo kot intermediati pri različnih reakcijah pripajanja in za pripravo hipervalentnih jodovih reagentov. V medicinske namene se uporabljajo tudi kot radiofarmacevtski izdelki. Interes sintetske skupnosti za pripravo teh spojin je velik, zato je razvoj novih metod jodiranja zelo zaželen. Doslej se je uporaba enostavnih virov jodovih atomov (I_2 ali I^-) v prisotnosti oksidanta pokazala kot eden najbolj obetavnih pristopov pri elektrofilnem jodiranju. V delu smo raziskovali različne vloge oksidanta pri termično in fotokatalitsko aktiviranem jodiranju.

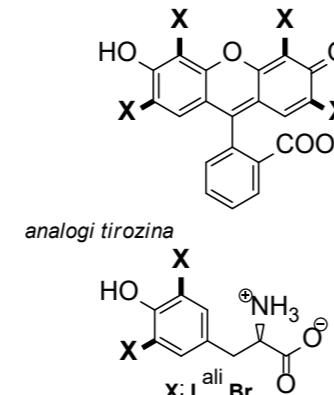
V prvem delu naloge smo raziskovali vlogo, ki jo ima v sistemu za jodiranje za okolje neškodljivi oksidant vodikovega peroksida (H_2O_2), kataliziran s H_2SO_4 . S kinetičnimi meritvami in ramansko spektroskopijo smo ugotovili, da je glavna vloga oksidanta v sistemu preprečitev avtoinhibicije reakcije, ki jo povzročijo nereaktivni ioni I_3^- (Shema 1a). Oksidacija ionov od I_3^- do I_2 omogoči potek reakcije s 100-odstotno jodovo atomsko ekonomijo. Proučevani sistem je kazal tendenco za večkratno jodiranje, zato smo ga uporabili za pripravo različnih polijodiranih produktov: 3,5-dijodotirozina in 2,4,5,7-tetrajodofluoresceina (Shema 1b).

Prva spojina je aminokislina, ključna za sintezo hormonov v ščitnici, druga pa prehransko barvilo in biološki marker. Proučevani sistem smo adaptirali s HBr namesto s I_2 in pripravili tudi bromirane analoge omenjenih spojin.

a. Predpostavljena vloga oksidanta

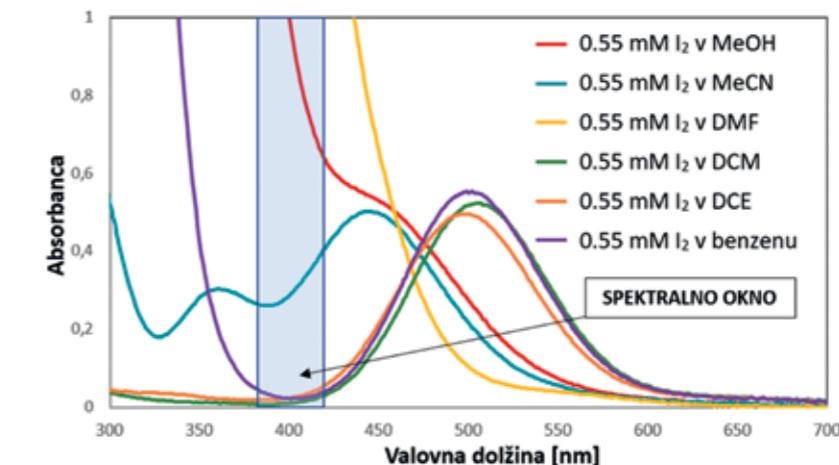


b. Pripravljeni polihalogenirani produkti analogi fluoresceina



Shema 1. Predpostavljena vloga H_2O_2 pri oksidativnem jodiranju in pripravljeni polihalogenirani produkti.

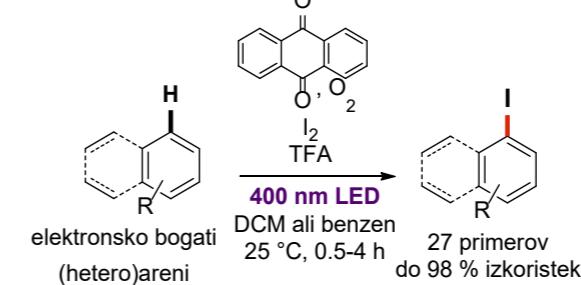
V drugem delu smo razvili novo metodo za jodiranje arenov, ki temelji na uporabi vidne svetlobe za aktivacijo reakcije. Uporaba joda v fotokemiji je težavna, saj tvori obarvane komplekse z veliko zvrstmi, ki lahko donirajo elektrone. Ti kompleksi absorbirajo svetlobo v pomembnem delu vidnega spektra (< 520 nm) in tako preprečujejo efektivno osvetljevanje molekul fotokatalizatorja. V raztopinah joda v topilih, s katerimi ne interagira (DCM, DCE, benzen), je prisotno spektralno okno pri okoli 400 nm (Slika 1), kjer raztopine joda skoraj ne absorbirajo svetlobe. To opažanje je bilo ključno pri razvoju metode za fotokatalitsko jodiranje.



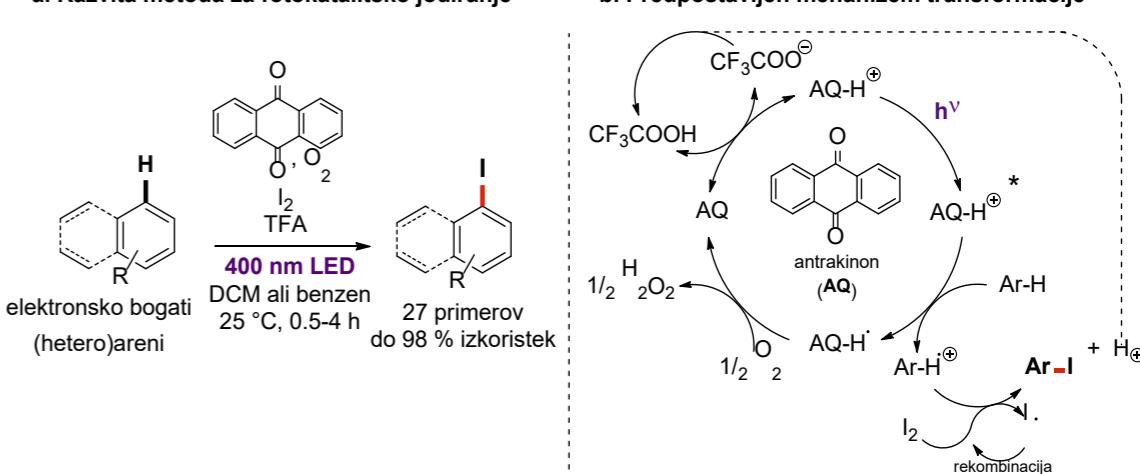
Slika 1. UV-Vis-spektri joda v različnih topilih.

V območju spektralnega okna smo osvetljevali različne fotokatalizatorje, ki lahko oksidirajo jod in izbrano aromatsko molekulo. Pri tej pretvorbi se je kot najbolj učinkovit fotokatalizator pokazal lahko dostopen nesubstituirani antrakinson (AQ). Jodiranje z razvito metodo poteka v rahlo kislem mediju in kot terminalni oksidant uporablja kisik (Shema 2a). Opazili smo odlično regioselektivnost, dobro toleranco različnih funkcionalnih skupin in dobre ali odlične izkoristke pri jodiranju širokega nabora elektronsko bogatih arenov. Z razvitim sistemom smo pripravili tudi nekaj jodiranih biološko aktivnih molekul. Mechanistične študije z lovljenjem reaktivnih radikalnih intermediarov in primerjalnimi eksperimenti nakazujejo potek jodiranja prek enoelektronske oksidacije arena do ustreznega radikal kationa in njegovo reakcijo z jodom (Shema 2b).

a. Razvita metoda za fotokatalitsko jodiranje



b. Predpostavljen mehanizem transformacije



Shema 2. Razvita metoda za fotokatalitsko jodiranje in predpostavljeni mehanizem transformacije.

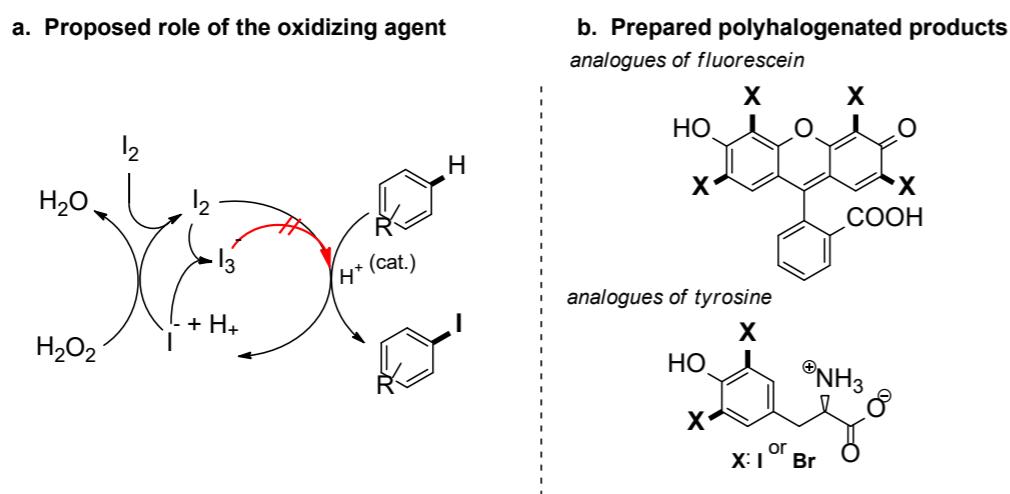
Prikazani pristop osvetljevanja fotokatalizatorja v jodovem spektralnem oknu ima potencialno pomembno vlogo pri razvoju novih fotokatalitskih metod jodiranja in reakcij, ki so katalizirane z enostavnimi jodovimi zvrstmi (I^- in I_2).

Classical and Photocatalytic Oxidative Iodination of Arenes

ROK NAROBE, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
 Supervisor: **Jernej Iskra**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
 Co-supervisor: **Burkhard König**, Institute of Organic Chemistry, University of Regensburg

Iodoarenes are valuable building blocks in organic chemistry, as they are widely used as synthetic intermediates in various C-C couplings and for the preparation of hypervalent iodine reagents. Furthermore, they are also used for medicinal purposes as radiopharmaceuticals. Consequently, the preparation of iodoarenes attracts attention within the synthetic community and the development of new methods for their synthesis is highly desired. So far, methods employing simple iodine sources (I_2 or I^-) and different oxidants have shown the most promising potential in electrophilic iodination. In the presented work, we investigated different roles of oxidising agent in thermally- and photocatalytically-activated iodination systems.

In the first part of the thesis, we investigated the role of environmentally benign oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2) in the iodination system employing H_2SO_4 as the catalyst. Kinetic studies and Raman spectroscopy revealed that H_2O_2 in the system prevents autoinhibition of the reaction caused by the formation of unreactive triiodide I_3^- (Scheme 1a). Oxidation of I_3^- to I_2 promotes reaction to completion with 100% iodine atom economy. The studied system showed tendency towards polyiodination and was therefore used to prepare different polyiodinated products: 3,5-diiodotyrosine and 2,4,5,7-tetraiodofluorescein (Scheme 1b). The former is a crucial precursor in the synthesis of thyroid hormones, and the latter is a food colouring agent and biological marker. Moreover, the studied system was adapted for bromination, using HBr instead of I_2 , and was also used to prepare brominated analogues of the aforementioned compounds.



Scheme 1: a. Proposed role of the oxidising agent in electrophilic iodination, b. Prepared polyhalogenated products.

In the second part, we developed a new visible light-driven method for iodination of arenes. The use of iodine in photochemistry is challenging due to its tendency to form coloured complexes with many electron-donating species. The formed complexes absorb light in an important region of visible light spectrum (< 520 nm) and thus hinder efficient excitation of a photocatalyst. In solutions of iodine in non-interacting solvents (DCM, DCE and benzene), a spectral window with low absorption at 400 nm can be observed (Figure 1). This turned out to be a crucial observation for the development of the photocatalytic iodination method.

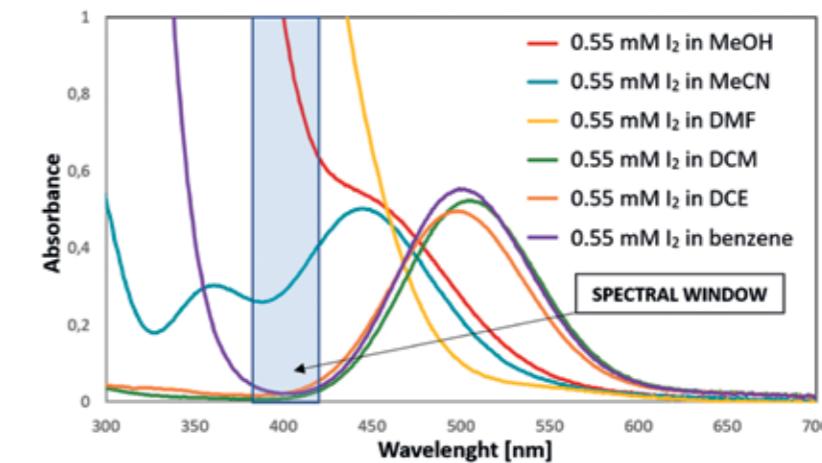
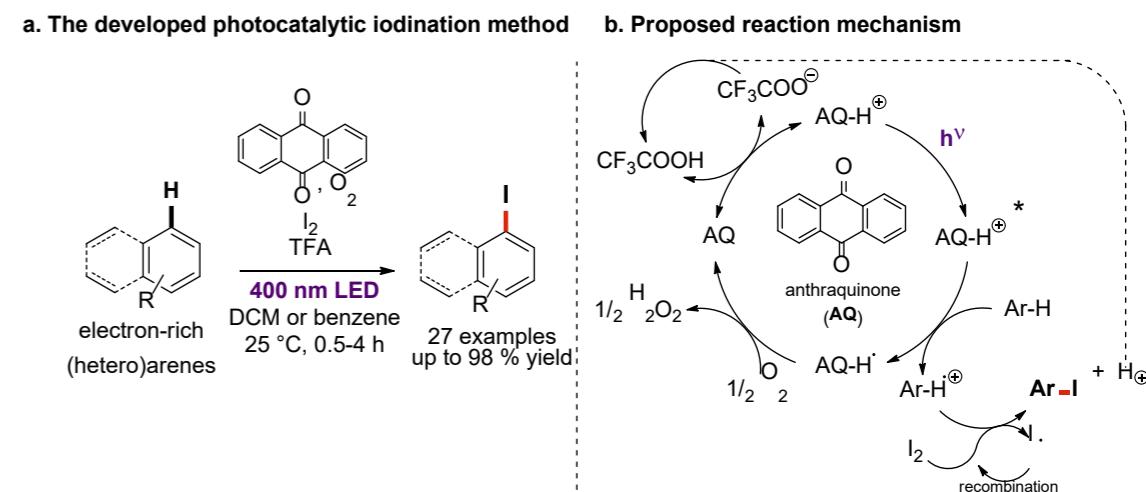


Figure 1: UV-Vis spectra of iodine in different solvents.

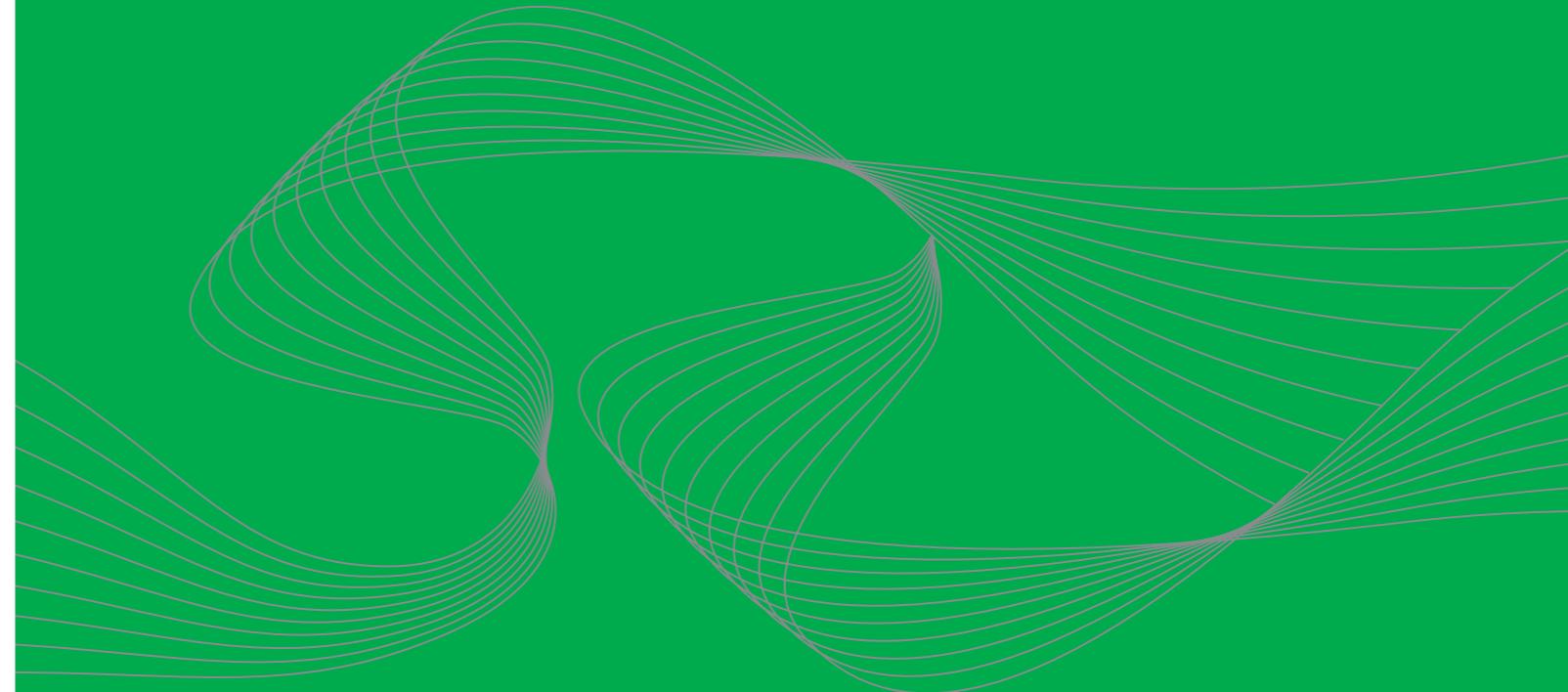
In the spectral window at 400 nm, we irradiated different photocatalysts that are capable of oxidising selected arene as well as an iodine atom source. Readily accessible unsubstituted anthraquinone as photocatalyst proved to be the most effective for this transformation. The developed iodination method utilises oxygen as the terminal oxidant in slightly acidic medium (Scheme 2a). We observed excellent regioselectivity, good functional group tolerance, and good to excellent yields for many electron-rich arenes. Mechanistic investigation by intermediate trapping and competition experiments indicates a photocatalytic arene SET oxidation and the subsequent reaction with iodine as a likely mechanistic pathway (Scheme 2b).



Scheme 2: a. Developed method for photocatalytic iodination, b. Proposed reaction mechanism.

The demonstrated approach of irradiation of a photocatalyst within the solvent dependent iodine spectral window might be important in the development of new light promoted iodination and simple iodine species (I_2 and I^-) catalysed methods.

49.



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

*Povzetki
Abstracts*

Elektrogenska terapija z interlevkinom 12 za zdravljenje kožnih in oralnih tumorjev pri psih

URŠA LAMPREHT TRATAR, Onkološki inštitut Ljubljana

Mentorica: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

Somentorica: Nataša Tozon, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Spontani tumorji pri psih so odličen model za preizkušanje novih vrst zdravljenja in za njihov prenos v humano onkologijo. Za izredno učinkovito lokalno zdravljenje tumorjev pri psih in ljudeh se je pokazala elektrokemoterapija. Poleg lokalnega zdravljenja pa je potrebno tudi sistemsko, kar lahko dosežemo z elektrogensko terapijo z interlevkinom 12 (IL-12), ki ima znano protitumorsko učinkovitost. V kliničnih študijah, v katerih so za zdravljenje spontanih tumorjev pri psih uporabili kombinacijo elektrokemoterapije in elektrogenske terapije z IL-12, so dokazali dobro protitumorsko učinkovitost s plazmidom, ki je nosil zapis za humani IL-12 ter gen za odpornost proti ampicilinu, ki ga pristojne organizacije ne odobravajo. Zato smo v pogojih *in vitro* ter *in vivo* pripravili in ovrednotili plazmid, ki nosi zapis za pasji IL-12 in gen za odpornost proti kanamycinu. Nato smo v okviru klinične študije kombinacijo elektrokemoterapije in elektrogenske terapije z IL-12 preizkusili za zdravljenje kožnih in oralnih tumorjev pri psih. Rezultati v pogojih *in vitro* ter *in vivo* so pokazali, da sta pri novo pripravljenem plazmidu stopnja izražanja IL-12 in protitumorski učinek enaka kot pri plazmidu, ki nosi zapis za humani IL-12. Pri zdravljenju spontanih kožnih in oralnih tumorjev pri psih se je uporaba novega plazmida v kombinaciji z elektrokemoterapijo pokazala za varno in učinkovito.

Electrogene Therapy with Interleukin 12 for the Treatment of Skin and Oral Tumours in Dogs

URŠA LAMPREHT TRATAR, Institute of Oncology Ljubljana

Supervisor: Maja Čemažar, Institute of Oncology Ljubljana

Co-supervisor: Nataša Tozon, Veterinary Faculty, University of Ljubljana

Spontaneous tumours in dogs represent an excellent model for testing new therapies and for their translation into human oncology. One of new therapies, which has proven to be an effective local treatment for tumours in dogs and humans, is electrochemotherapy. In addition to local treatment, treatment on a systemic level is also necessary and can be achieved by electrogene therapy with interleukin 12, which has known antitumour effectiveness. In clinical studies on spontaneous tumours in dogs, the combination of electrochemotherapy and electrogene therapy with IL-12 demonstrated a good antitumour response. The plasmid used in these clinical studies encoded human IL-12 and an ampicillin-resistant gene, which is not approved by the competent organizations. Therefore, a plasmid encoding canine IL-12 with kanamycin resistance gene was constructed and evaluated in *in vitro* and *in vivo* conditions. Further on, this plasmid was used in treating spontaneous tumours on dogs with the combination of electrochemotherapy and electrogene therapy. Our results showed that newly constructed plasmid was as equally or even more effective in *in vitro* and *in vivo* conditions compared to the plasmid used in previous clinical studies on dogs. Moreover, the use of a new plasmid in combination with electrochemotherapy for the treatment of spontaneous skin and oral tumours in dogs has proven to be safe and effective.

Razvoj novih N-fenilpirolamidov kot zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV

DAVIDE BENEDETTO TIZ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Nace Zidar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Danijel Kikelj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Množična uporaba antibiotikov je privedla do razvoja odpornih bakterij, zato je nujno odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin. V doktorski nalogi smo opisali načrtovanje, sintezo in vrednotenje novih N-fenilpirolamidnih zaviralcev ATP-aznih podenot DNA-giraze in topoizomeraze IV, ki sta ključna encima za normalno delovanje bakterijskih celic. Strukturalna podobnost med obema encimoma omogoča razvoj protibakterijskih učinkovin z delovanjem na obe tarči. Poseben poudarek smo namenili strukturnim spremembam, ki bi povečale vstop zaviralcev v bakterijske celice, kot so uvedba izosternih zamenjav karboksilne skupine z manj kislimi skupinami ali heterocikli. Pripravljene spojine smo ovrednotili glede na zaviralo delovanje na DNA-girazo in topoizomerazo IV bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Njihovo protibakterijsko delovanje smo vrednotili na bakterijah družine ESKAPE, nekatere pa smo dodatno testirali na mutirana seva *E. coli* s povečano prepustnostjo zunanje membrane in z oslabljeno izlivno črpalko. Odkritje novih N-fenilpirolamidov kot močnih zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV z dobrim delovanjem proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam je dobro izhodišče za nadaljnje raziskave, ki bodo skupaj s širšim razumevanjem zahtev, potrebnih za vstop majhnih molekul v bakterije, privedle do novih širokospektralnih protibakterijskih učinkovin.

Discovery of Novel N-Phenylpyrrolamides as Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV

DAVIDE BENEDETTO TIZ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Nace Zidar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Danijel Kikelj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

With the intensive use and misuse of antibiotics, the bacterial resistance to these agents increased and thus the discovery of novel antibacterial agents is considered essential. This doctoral thesis describes the design, synthesis and evaluation of novel inhibitors of ATPase subunits of DNA gyrase and topoisomerase IV that are essential for the normal function of bacterial cells. Structural similarity between these two enzymes provides the opportunity for designing dual targeting antibacterial compounds. A focus was placed on structural modifications that would increase the entry of inhibitors into the bacterial cells, such as isosteric replacement of the terminal carboxylic group with less acidic groups or heterocycles. The prepared compounds were evaluated for their inhibitory activities against DNA gyrase and topoisomerase IV from *E. coli* and *S. aureus*. Antibacterial activities of the prepared inhibitors were evaluated against the ESKAPE panel of bacteria. Some of the compounds were additionally tested against two *E. coli* mutant strains possessing impaired outer membrane or defective efflux pump. The discovery of new N-phenylpyrrolamides as potent inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV with good antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria provides a good starting point for obtaining new broad-spectrum antibacterial agents in the future.

Farmakogenomsko vrednotenje dozvetnosti za tiopurine

DUNJA URBANČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Irena Mlinarič-Raščan, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Ozko terapevtsko okno tiopurinov, imunosupresivnih in citostatičnih zdravilnih učinkovin, narekuje potrebo po natančnem odmerjanju, a zapletena metabolizem in mehanizem delovanja te k posamezniku usmerjene terapije predstavlja kompleksen izviv. V sklopu raziskovalnega dela smo najprej identificirali selenocistein, substrat encima tiopurin S-metiltransferaza (TPMT), ki bi lahko bil pomemben pri njegovi endogeni vlogi. Nato smo se osredotočili na iskanje novih bioloških označevalcev odziva na tiopurine. Z vrednotenjem genskih lastnosti TPMT smo na zdravi slovenski populaciji ter na populaciji pacientov z akutno limfoblastno levkemijo ali vnetno črevesno bolezni ugotovili, da so specifična tandemova zaporedja v genu za TPMT povezana s klinično že uveljavljenimi genskimi polimorfizmi. Njihova prisotnost pri pacientih je povezana z življjenje ogrožajočimi neželenimi učinki tiopurinov. Pri odkrivanju od TPMT neodvisnih dejavnikov odziva na tiopurine smo na modelu limfoblastoidnih celičnih linij različnih posameznikov pokazali, da zvišana raven izražanja gena za prenašalni P-glikoprotein napoveduje rezistenco celic proti tiopurinom. V nadaljevanju smo s sodobnimi metodami *in silico* raziskovali mehanizme interakcij znanih substratov in inhibitorjev TPMT. Na podlagi teh izsledkov smo na celičnih modelih potrdili inhibicijo TPMT mešanega mehanizma s sulfasalazinom in dokazali, da sulfasalazin poveča citotoksičnost tiopurinov. Rezultati raziskovalnega dela so povečali nabor potencialnih označevalcev dozvetnosti za tiopurine ter prikazali relevantnost interakcij med zdravilnimi učinkovinami, kar bo pripomoglo k izboljšanju napovedi in izida zdravljenja s temi zdravilnimi učinkovinami.

Pharmacogenomic Evaluation of Susceptibility to Thiopurines

DUNJA URBANČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Due to a narrow therapeutic index of immunosuppressive and cytostatic thiopurine drugs, their accurate administration is of crucial importance. However, complex metabolism and mode of action of these drugs underlies a multifaceted challenge in the individualized therapy. In the course of our study we first identified a substrate of thiopurine S-methyltransferase (TPMT), selenocysteine, which could be importantly involved in the biological role of the enzyme. We next aimed to identify novel biological markers of the response to thiopurines. Studying genetic variations in healthy Slovenian population and patients with acute lymphoblastic leukaemia or inflammatory bowel disease, we found specific tandem repeats in the gene for TPMT that are linked with clinically established genetic polymorphisms. The presence of such genetic variants predisposes life-threatening thiopurine related toxicities. By employing *in vitro* model of lymphoblastoid cell lines derived from several different donors, we further explored TPMT-independent factors of thiopurine response. We learnt that a higher expression of transporter P-glycoprotein in cells predicted the resistance to thiopurines. Additionally, we examined the mechanisms of interactions between substrates and inhibitors of TPMT using *in silico* approach. Based on the conclusions obtained by molecular docking analysis, we experimentally determined the mixed inhibition mechanism of TPMT by sulfasalazine and showed that sulfasalazine enhanced thiopurine toxicity on different cell models. The results of our research broadened the selection of potential biomarkers of response to thiopurines and indicated the importance of drug-drug interactions, contributing to future improvements of thiopurine treatment.

Vpliv mleka, mlečnih bioaktivnih peptidov in L-arginina na celično signalizacijo v kožnih fibroblastih

HRISTINA KOĆIĆ, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Mentor: **Tomaž Langerholc**, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemsko vedo, Univerza v Mariboru

Somentor: **Aleksandar Godić**, Visoka šola za storitve, Ljubljana

Namen študije je bil raziskati učinke različnih vrst mleka, bioaktivnih proteinov, peptidov in aminokisline L-arginin na metabolizem in signalizacijo kožnih fibroblastov (L929). To je bila osnova za razlaganje potencialno koristnih učinkov mleka v dermatologiji in kozmetologiji ter ugotavljanje možnosti njegove uporabe. Poskus na področju celične signalizacije fibroblastov pri izpostavitvi človeškemu, osličjemu ali kravjemu mleku in njihovim vrstnospecifičnim kolostrumom, komercialnim formulam mleka v prahu, betakazeinom, betakazomorfinom in L-argininu naj bi odgovoril na vprašanje, katera od omenjenih snovi kaže največji proliferativni, (proti)apoptotični in (proti)vnetni učinek v primerjavi s kontrolnimi celicami. Po izpostavitvi smo opazovali jedrni transkripcijski faktor NF- κ B p65, signalne molekule celične proliferacije (kinaze Akt-1, fosfo-Akt-1, Erk-1, fosfo-Erk-1, JNK, fosho-JNK in fosho-STAT-1), faktor migracije (CD26) in proteine na notranji poti apoptoze (Bcl2 in Bax). Pridobljeni podatki so lahko začetna osnova za razumevanje njihove morebitne dermatološke uporabe. Na področju praktične biotehnologije pa smo na podlagi opazovanja učinkov različnih vrst mleka proučevali možnosti enkapsuliranja osličjega mleka v nanoliposome, sproščanje ftalatov iz plastičnih mas ter praktično pripravo kozmetičnih formulacij (krem) na osnovi nanoliposomov, v katere sta enkapsulirana osliče mleko in L-arginin. Pripravljen in registriran je patent za postopek proizvodnje kozmetičnih krem različne konsistence za nego obraza in telesa, ki vsebuje enkapsulirano osliče mleko in L-arginin v fosfolipidnih nanosferah. Poleg patenta so bili objavljeni tudi mednarodni članki.

Effects of Milk, Milk-Derived Bioactive Peptides and L-Arginine on Cell Signalling in Skin Fibroblasts

HRISTINA KOĆIĆ, Faculty of Medicine, University of Maribor

Supervisor: **Tomaž Langerholc**, Faculty of Agriculture and Life Sciences, University of Maribor

Co-supervisor: **Aleksandar Godić**, Higher School of Applied Sciences, Ljubljana

The aim of the study was to investigate the effects of different types of milk, bioactive proteins, peptides and amino acid L-arginine on metabolism and signalling of commercial skin fibroblasts (L929). This was the basis for explanation of the potentially beneficial effects of milk in dermatology and cosmetology and the possibility of its practical use. The aim of the thesis included three areas: i) Research in the field of skin fibroblasts cell signalling after exposure to donkey, human or cow's milk and their species-specific colostra, commercial milk powder formulas, beta-casein, beta-cacomorphin and L-arginine. This experiment aimed to give the answers as to which of the above mentioned substances may exhibit the greatest proliferative, (anti)apoptotic and (anti)inflammatory effect compared to the control cells. Following the cell exposure, we observed the nuclear transcription factor NF- κ B p65, the signalling cell proliferation molecule (Akt-1, phospho-Akt-1 kinase, Erk-1, phospho-Erk-1 kinase, JNKA, phospho-JNK kinase and phospho-STAT-1 kinase), the migration factor (CD26), and proteins involved in the internal pathway of apoptosis (Bcl2 and Bax). The obtained data may be the starting point for understanding their possible dermatological use; ii) Research in the field of practical biotechnology based on i) the study of the possibility of encapsulating donkey milk in nanoliposomes; ii) the observation of the effects of different types of milk on the release of phthalates from plastics; iii) Practical preparation of cosmetic formulations (creams) based on nanoliposomes encapsulated with milk and L-arginine. A patent for the production process of cosmetic creams has been prepared and registered for a variety of facial and body-care products consisting of encapsulated skimmed donkey milk and L-arginine in phospholipid nanospheres. In addition to the patent, the articles were published in international journals.

Vpliv metformina na rakave celice v kulturi v odvisnosti od razpoložljivih hranil

MARUŠA BIZJAK, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Mentorka: **Mojca Pavlin**, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Sergej Pirkmajer**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Metformin se uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni in nedavne raziskave so nakazale, da ima morda tudi protirakave učinke. Cilj doktorske disertacije je bil proučiti delovanje metformina na rakave celice v odvisnosti od razpoložljivih hranil in gojišču. Primerjali smo učinke metformina na klasični enoslojni kulturi z učinki na tumorskih sferoidih. Z uporabo različnih metod za določanje števila, proliferacije, živosti celic in deleža mrtvih celic smo določili, da pomanjkanje piruvata in/ali glukoze je pri celicah MDA-MB-231, izpostavljenih metforminu, nastopila energijska kriza, ki je spodbudila aktivacijo AMPK, kar smo določili s prenosom western. Z uporabo različnih protokolov menjave gojišča in meritvami porabe glukoze smo pojasnili nasprotujoče si rezultate nekaterih raziskav, ki so proučevale učinek majhnih koncentracij glukoze (5–5,6 mM) na delovanje metformina na celice MDA-MB-231. Poleg tega smo učinek metformina na celice MDA-MB-231, MCF-7 in PC-3 povečali z uporabo inhibitorja glikolize, 2-deoksi-D-glukoze (2-DG). Nepričakovano smo opazili, da kombinacija 2-DG in metformina pri glukozi 5,6 mM poveča delež živih odluščenih celic MDA-MB-231 in MCF-7, kar bi bilo lahko pomembno pri razumevanju vpliva presnovnih sprememb na proces metastaziranja rakavih celic.

Effect of Metformin on Cancer Cells *In Vitro* as a Function of the Available Nutrients

MARUŠA BIZJAK, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: **Mojca Pavlin**, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Sergej Pirkmajer**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Metformin is a commonly used drug to treat type II diabetes. Recent studies have indicated that it might also have anti-cancer effects. This doctoral dissertation aims to show that depletion of pyruvate, non-essential amino acid and glucose increases the effects of metformin on MDA-MB-231 cells. The effects of metformin differ also between monolayer culture and tumour spheroids. Our results indicate that in glucose-depleted media metformin suppressed MDA-MB-231 cell proliferation and reduced their survival due to the inhibition of oxidative phosphorylation. In the absence of glucose, MDA-MB-231 cells were unable to adapt to energy crises induced by metformin via upregulation of glycolysis. Thus, metformin probably suppressed cellular proliferation in an AMPK-independent manner. Since the absence of glucose increases the effects of metformin on MDA-MB-231 cells, metformin could target cancer cells in a poorly perfused core of the tumour. Medium renewal blocked the anti-proliferative effects of metformin in the presence of 5.6-mM glucose, which might explain inconsistent results in previous studies. Metformin reduces the number of MDA-MB-231 cells synergistically with 2-DG, which is a competitive inhibitor of glycolysis. Finally, we observed that combined treatment with metformin and 2-DG induces detachment of viable MDA-MB-231 and MCF-7 cells from the bottom of cell culture wells, which might be important to better understand the effects of changes in metabolic pathways on the process of cancer cell metastasation.

Razvoj kontinuirnega procesa sinteze in ekstrakcije izbrane aktivne farmacevtske učinkovine

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

V industriji finih kemikalij in zdravil je zaradi številnih prednosti v primerjavi s šaržnimi procesi vse več zanimanja za kontinuirne procese oz. t. i. pretočno kemijo (angl. flow chemistry). Za razvoj in izvedbo takšnega obratovanja se v zadnjem času vse bolj uveljavljajo mikro- in mezopretočni sistemi, katerih prednosti so dober prenos topotne in snovi, manjša poraba kemikalij, varnejše izvajanje nevarnih reakcij, možnost avtomatizacije procesov in učinkovit nadzor reakcij. V magistrskem delu smo razvijali kontinuirni proces sinteze izbrane farmacevtske učinkovine, ki se pridobiva s šaržno proizvodnjo. Obravnavali smo dvostopenjsko sintezo produkta z vmesno ekstrakcijo in separacijo intermedijata. V mezopretočnem sistemu nam je uspelo izvesti obe stopnji sinteze z zelo spodbudnimi rezultati, ki kažejo na to, da je tako obratovanje zelo primerno. Volumetrična produktivnost pri istih izkoristkih prve stopnje sinteze se je povečala za 12-krat, produktivnost druge stopnje sinteze pri podobnih konverzijah intermedijata pa celo za 137-krat. Z vpeljavo ekstrakcije *in situ* smo odpravili težave z obarjanjem produkta, z nadaljnjo vezavo membranskega separatorja pa smo dosegli kontinuirno separacijo dvo faznega sistema. Kljub dobrim rezultatom še vedno ostaja nerešena zaporedna povezava obeh stopenj sinteze, za kar bo treba doseči zadostno koncentracijo produkta prve stopnje in uskladiti pretoke v drugi stopnji. Ugotovili smo, da bi kontinuirna proizvodnja v modularnem mezopretočnem sistemu lahko močno skrajšala čas in število korakov za sintezo izbrane farmacevtske učinkovine.

Development of Continuous Synthesis and Extraction of Selected Active Pharmaceutical Ingredient

BLAŽ REGINA, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Polona Žnidaršič Plazl**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

In pharmaceutical and fine chemical industries, there is an increasing interest in the continuous processes and flow chemistry due to many advantages compared to batch processes. Micro- and meso-flow systems, characterised by good heat and mass transfer, low chemicals consumption, safe handling of hazardous reactions, process automation and effective screening of reactions, are increasingly being used to develop and perform such operations. In this thesis, a continuous synthesis and extraction of a selected active pharmaceutical ingredient, currently manufactured using batch production, were developed. In this paper, two stages of synthesis with intermediate extraction and separation of the intermediate were discussed. Both stages of synthesis were successfully carried out in a mesoscale flow system with encouraging results indicating the benefit of continuous operation mode. In the first stage of synthesis, an increase of volumetric productivity by 12-times was obtained at the same product yield, while in the second stage, the volumetric productivity compared to same conversion increased even by 137 times. With the introduction of *in situ* extraction, the problem with product precipitation was solved. By further integration of a membrane separator, continuous separation of the two-phase system was achieved. Despite good results, integration of both synthesis steps still needs to be accomplished. To do so, it is necessary to achieve sufficient concentration of the first-stage product and to adjust the flow rates in the second stage. It was found that production in continuous flow could greatly reduce the required time and steps for the synthesis of the selected pharmaceutical ingredient.

Določanje struktur G-kvadruplexov, stabiliziranih s pirenskimi skupinami

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

G-kvadruplexi so strukturno raznolike nekanonične strukture nukleinskih kislin z visokim deležem gvaninskih nukleotidov. V celicah so pogosto prisotni v promotorskih regijah genov, kjer lahko kot sterične ovire ali vezavna mesta za transkripcijske faktorje regulirajo izražanje genov. G-kvadruplexi so tako pomembne tarče učinkovin za zdravljenje različnih bolezni, zlasti rakavih. Umetno sintetizirani G-kvadruplexni aptameri z afiniteto do določene biološke molekule bi lahko tudi sami delovali kot aktivne farmacevtske učinkovine. Z različnimi kemijskimi modifikacijami lahko G-kvadruplexnim aptamerom dodatno izboljšamo ključne kemijske lastnosti, kot so afiniteto do tarčne molekule, termična stabilnost in odpornost proti razgradnji nukleaz. V naši raziskavi smo uporabili trombin vezavni aptamer (TBA), sintetičen oligonukleotid z zaporedjem 5'-GTTGGTGTGGTTGG-3', ki se ob prisotnosti kationov zvije v G-kvadruplex s topologijo stola. Posamezne dT-nukleotide v TBA zaporedju smo zamenjali z dU-nukleotidom, ki ima kovalentno vezano pirenско skupino. S pomočjo NMR-spektroskopije in komplementarnih metod smo pokazali, da prisotnost pirenke skupine na specifičnih mestih termično stabilizira G-kvadruplexne strukture zaradi dodatnih aromatskih interakcij z bližnjimi dušikovimi bazami. Topologija G-kvadruplexa se pri tem lahko ohrani, v določenem primeru pa vgraditev pirenke skupine omogoči dimerizacijo modificiranega TBA-zaporedja v bimolekularno strukturo, ki vsebuje dva različna G-kvadruplexa. Tak pristop bi se lahko uporabil za optimizacijo različnih terapevtsko pomembnih G-kvadruplexnih aptamerov, ki bi bili zaradi fluorescenčnih lastnosti pirenke skupine dodatno uporabni tudi v diagnostiki.

Structure Determination of G-Quadruplexes Stabilised with Pyrene Moieties

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

G-quadruplexes are structurally diverse non-canonical structures formed by guanine rich nucleic acids. In cellular environment, they are often present in gene promoter regions, where they can regulate gene expression through acting as sterical obstacles or through binding of transcription factors. This makes them important potential drug targets in the treatment of different diseases, most notably cancer. Artificially synthesised G-quadruplex aptamers with affinity towards specific biological molecule could themselves act as an active pharmaceutical ingredient. Crucial chemical properties of G-quadruplex aptamers, such as affinity towards target molecule, thermal stability and resistance against nuclelease degradation, can be fine-tuned with various chemical modifications. In our research work, we used thrombin-binding aptamer or TBA, a synthetic 5'-GGTTGGTGTGGTTGG -3' oligonucleotide, which folds into a chair-type topology G-quadruplex in the presence of cations. We replaced individual dT nucleotides with dU nucleotide that has covalently bound pyrene moiety. With NMR spectroscopy and complementary methods, we showed that incorporation of modified dU nucleotide into specific positions stabilises G-quadruplex structure through additional aromatic stacking between pyrene moiety and neighbouring nitrogen bases. This can have little to no effect on overall G-quadruplex topology, however, in one case this modification enabled dimerisation of modified TBA oligonucleotide into bimolecular structure comprised of two distinct G-quadruplexes. We believe that our approach could be used for optimisation of various therapeutically important G-quadruplex aptamers, which could also be additionally applied in diagnostics due to fluorescent properties of pyrene moiety.

Vpliv procesnih parametrov kompaktiranja in sestave kompaktata na sproščanje karvedilola iz ogrodnih tablet s hipromelozo

TINA BREC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Somentorica: Aleša Dular Vovko, Krka, d. d., Novo mesto

Kompaktiranje je enostaven in hiter postopek suhega granuliranja, ki izboljša fizikalne, mehanske in/ali kemijske lastnosti zmesi. Zaradi napredka v opremi in številnih prednosti z vidika proizvodnih stroškov in stabilnosti izdelkov postaja v farmacevtski industriji vse bolj popularno. V magistrski nalogi smo proučevali vpliv procesnih parametrov kompaktiranja (sila stiskanja, hitrost valjev, tip sejalnika, velikost odprtin sita in površina mreže sita) in sestave kompaktata (različni deleži hipromeloze z vsebnostjo pretežno fragmentirajočega ali plastičnega polnila) na izbrane fizikalne in mehanske lastnosti granulata ter na sproščanje modelne zdravilne učinkovine karvedilol iz ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem na osnovi hipromeloze, izdelanih s postopkom kompaktiranja. Ugotovili smo, da lahko s sestavo zmesi in s procesnimi parametri kompaktiranja vplivamo na partikulatne lastnosti granul in da je vpliv procesnih parametrov kompaktiranja odvisen od mehanskih lastnosti materialov. Vpliv partikulatnih lastnosti granul se pokaže tudi pri sproščanju karvedilola iz ogrodnih tablet na osnovi hipromeloze, na sproščanje karvedilola iz ogrodnih tablet pa vpliva tudi sila tabletiranja.

Effects of Roller Compaction Process Parameters and Compactat Composition on Release of Carvedilol from Matrix Tablets with Hypromellose

TINA BREC, Krka, d. d., Novo mesto

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

Co-supervisor: Aleša Dular Vovko, Krka, d. d., Novo mesto

Roll compaction is a simple and quick process of dry granulation that improves the physical, mechanical and/or chemical properties of the mixture. Due to the advancement in equipment and numerous advantages in terms of production costs and stability of products, it is becoming increasingly popular in the pharmaceutical industry. The effects of roller compaction process parameters (compaction force, roll speed, type of mill, screen size of sieve, and surface of the screen) and the composition of ribbons (compactat) (different proportions of hypromellose with content of predominantly fragmenting or plastic filler) on the selected physical and mechanical properties of granulates and on the release of the active ingredient carvedilol from sustained release matrix tablets with hypromellose were studied in the present thesis. We have discovered that the composition of the mixture and the roller compaction process parameters can influence the particulate properties of the granules and that the influence of roller compaction process parameters depends on the mechanical properties of the materials. The influence of the particulate properties of granules is also expressed in the release of carvedilol from matrix tablets with hypromellose, the release of carvedilol from matrix tablets is also affected by tablet force.

Razvoj in validacija GC-FID/MS analiznega postopka za določitev maščobnih kislin v žiru in polhovi masti

JAN ŠTOS, Kemijski inštitut Ljubljana

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

Somentor: Samo Andrenšek, Kemijski inštitut Ljubljana

Namen magistrskega dela je bil poenostaviti farmakopejski analizni postopek za določanje srednje verižnih trigliceridov, ki se uporablja v farmacevtski industriji, in ugotoviti korelacijo med žirovim oljem in polhovo mastjo. Razvili in validirali smo poenostavljen in za izvajalca boljši analizni postopek za določitev maščobnih kislin v vzorcih žira in polhove masti z esterifikacijo. Primerjali smo tudi analizne postopke in s tem zagotovili enakovrednost optimiziranega analiznega postopka s farmakopejskimi postopki (USP29, <401> Fats and fixed oils in PhEur 9.0 Composition of fatty acids by GC). Sledile so še modifikacija in poenostavitev analiznega postopka ter validacija. Z modifikacijo in poenostavitev smo skrajšali pripravo standardov in vzorca. Za pripravo standardov smo uporabili postopek iz evropske farmakopeje in hkrati spremenili kromatografske pogoje (temperaturni program in dodan gradientni program za pretok), da bi izboljšali ločljivost med kromatografskimi vrhovi in skrajšati analizo. Pri validaciji optimiziranega analiznega postopka smo izvedli teste stabilnosti standardnih raztopin in vzorca, linearnosti in natančnosti sistema in metode, meje zaznavnosti, meje določljivosti in selektivnosti. Ugotovili smo, da med maščobnikislinsko sestavo žirovega olja in polhovo mastjo obstaja zelo velika podobnost.

Development and Validation of GC-FID/MS Analytical Procedure for Fatty Acids Determination in Beechnuts and Fat of Edible Dormouse

JAN ŠTOS, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Matjaž Finšgar, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

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

The purpose of this master's thesis was to simplify the pharmacopoeial analytical procedure for determination of medium-chain triglycerides used in pharmaceutical industry and to find out the correlation between beechnuts and fat of edible dormouse. With this master's thesis, we developed and validated the simplified and user-friendly analytical procedure for determination of fatty acids in samples of beechnuts and edible dormouse with the derivatization procedure of sample esterification. We also performed a comparison of analytical procedures to prove the equivalence of the optimized analytical procedure with existing pharmacopoeia's procedures (USP29, <401> Fats and fixed oils, and PhEur 9.0 Composition of fatty acids by GC). Afterwards, the analytical procedure was modified, simplified and validated. With optimization of the analytical procedure, we shortened the preparation of standards and samples and achieved a significantly simplified sample preparation as well. For the preparation of standards in the optimized analytical procedure, we applied the PhEur standard preparation and at the same time we changed the chromatographic conditions (temperature programme and gradient programme for a mobile phase flow was added) in order to improve the resolution between peaks and shorten the time of the chromatographic run and analysis in general. In the validation process, we performed testing of: stability of standard solutions and the sample, linearity, precision of the system and the method, determination of detection and quantitation limit and selectivity. We found that there is a sufficient similarity between the beechnut oil and the dormouse fatty acids composition.

Razvoj in validacija stabilnostno indikativne metode za vrednotenje fotostabilnosti vodotopnih vitaminov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

ANDREJ GROBİN, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Robert Roškar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Fotostabilnost vitaminov do sedaj še ni bila sistematično in kvantitativno raziskana. Glavni cilj naloge je bil celovito raziskati fotostabilnost devetih vodotopnih vitaminov v njihovih najpogostejših oblikah. Razvili smo novo stabilnostno indikativno analizno metodo UHPLC, jo ovrednotili v skladu s smernicami ICH ter potrdili njeno primernost na multivitaminskih izdelkih. Ugotovili smo, da vsebnost vitaminov odstopa od navedenih v vseh šestih testiranih izdelkih. Med različnimi izdelki in oblikami ni bilo značilnih razlik v odstopu vsebnosti. Fotostabilnostno študijo vodotopnih vitaminov v raztopinah in izdelkih smo izvajali s pomočjo klimatske komore s svetlobnim modulom v skladu s smernicami ICH. Ugotovili smo, da so vitamini B_1 , B_3 , B_5 , B_6 , B_7 in B_{12} v velikih koncentracijah fotostabilni tudi do en mesec, vitamini C, B_2 in B_9 pa manj kot en dan. V zmesih so se vitamini C, B_2 in B_9 pretvarjali še hitreje, prav tako je v zmesi zelo nestabilen vitamin B_{12} . Fotostabilnost v zmesi je zelo odvisna od sestave vitaminov. Vitamin C povečuje fotostabilnost drugih vitaminov, B_2 pa jo izrazito zmanjšuje. Kvantitativno smo določili, da je hitrost fotolize B_2 močno odvisna od koncentracije in pH-ja medija, medtem ko je hitrost fotolize B_9 skoraj neodvisna od koncentracije in temperature, pri višjem pH-ju pa je počasnejša. Fotostabilnost vitaminov v raztopinah izdelkov je primerljiva, a zelo odvisna od tega, kateri vitamini so v njih prisotni. Najbolj so fotolabilni vitamini C, B_2 , B_9 in B_{12} . V primeru šumečih tablet lahko koncentracija nekaterih vitaminov v pripravljeni raztopini že po eni uri pada bistveno pod 50 %.

Development and Validation of a Stability Indicating Method for the Evaluation of Photostability of Water Soluble Vitamins with High Performance Liquid Chromatography

ANDREJ GROBİN, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Robert Roškar, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The photostability of vitamins in literature has not yet been researched systematically and quantitatively. The main goal of the thesis was a thorough research of the photostability of nine water soluble vitamins in their most common forms. We developed a stability-indicating UHPLC analytical method, evaluated it in accordance with ICH guidelines, and confirmed its suitability on multivitamin products. We discovered that contents of vitamins deviate from the ones stated in all six of the tested products. There were no noticeable differences in content deviation between different products and forms. We conducted the photostability study of water soluble vitamins in solutions and products in a climate chamber with a light module in accordance with ICH guidelines. We discovered that vitamins B_1 , B_3 , B_5 , B_6 , B_7 and B_{12} are stable in high concentrations up to a month, while vitamins C, B_2 and B_9 are stable less than a day in the same conditions. In mixtures, vitamins C, B_2 and B_9 convert even faster. Vitamin B_{12} is very unstable in a mixture. The photostability of a mixture is largely dependent on its vitamin content. B_2 exceptionally reduces the photostability of other vitamins, while C increases it. We quantitatively discovered that the speed of photolysis of B_2 is very dependent on its concentration and the pH value of the media, while the speed of B_9 photolysis is mainly independent of its concentration and temperature, and is even slower at higher media pH. The photostability of products in solutions is similar, but is very dependent on their vitamin content. The most photolabile vitamins are C, B_2 , B_9 and B_{12} . In the case of effervescent tablets, the concentration of vitamins can fall significantly below 50% in a prepared solution in less than an hour.

Študij sferične kristalizacije lakoze s pristopom načrtovanja eksperimentov

DANIJEL VIDEC, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Odon Planinšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentor: Dejan Lamešić, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Sferična kristalizacija je metoda načrtovanja delcev, s katero lahko izboljšamo pretočne lastnosti delcev in njihovo stisljivost. Znanje o procesu lahko naučinkovitejše pridobimo z načrtovanjem eksperimentov, pri čemer je priporočljiv pristop dokončni presejalni načrt (angl. definitive screening design, DSD). V študiji smo DSD načrtovali za proces sferične kristalizacije lakoze, pri čemer smo kot netopilo uporabili aceton. Proučevali smo vplive koncentracije raztopine lakoze, volumskega razmerja med netopilom in celotnim kristalizacijskim sistemom, temperature kristalizacijskega sistema, hitrosti dodajanja raztopine v netopilo, hitrosti mešanja in časa mešanja po celotnem dodatku raztopine (faktorji) na izkoristek procesa, parametre velikosti delcev D10, D50 in D90, porazdelitev velikosti delcev in morfološke (ovalnost in hrapavost delcev) ter pretočne lastnosti (odzivi). Določili smo faktorje z največjim vplivom (koncentracija lakoze, temperatura sistema, volumska razmerje in hitrost mešanja) na posamezne odzive in za vsak odziv naredili statistični model. Vplive faktorjev lahko razlagamo z njihovim vplivom na prenasičenje in na sile, ki delujejo na delce v kristalizacijskem sistemu. Glede na obliko osnovnih kristalov smo sferične agglomerate razdelili v štiri morfološke skupine. Ugotovili smo, da oblika osnovnih kristalov lahko vpliva na strukturo sferičnih agglomeratov in posledično na njihove lastnosti.

Study of Lactose Spherical Crystallisation with the Design of Experiments Approach

DANIJEL VIDEC, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Odon Planinšek, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: Dejan Lamešić, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Spherical crystallisation is a method for particle engineering, which enables the improvement of flowability and compressibility of particles. Process knowledge is most efficiently obtained by implementing the design of experiments approach, among which the definitive screening design (DSD) has gained considerable attention in recent time. In our study, we designed the DSD for the process of lactose spherical crystallisation, wherein acetone was used as antisolvent. We studied the effects of lactose solution concentration, the volume ratio between antisolvent and the whole crystallisation system, temperature of the crystallisation system, velocity of the lactose solution addition to the antisolvent, the agitation speed and agitation time after the complete addition of the lactose solution (factors) on process yield, particle size parameters D10, D50, D90, particle size distribution, and on the morphological (roundness, solidity) and flowability properties (responses). We determined the factors with the most influence (lactose concentration, system temperature, volume ratio and agitation speed) on individual responses and made a statistical model for each response. Based on the crystal habit, we classified spherical agglomerates into four morphological groups. We found that the crystal habit can influence the structure of the spherical agglomerates and consequently also their properties.

Vpliv sestave formulacij in procesnih pogojev na fizikalne lastnosti liofiliziranih nanokristalov paliperidon palmitata

ULA SAVŠEK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Somentor: **Wolfgang Frieß**, Oddelek za farmacijo, Univerza Ludwig-Maximilian v Münchnu

Izziv, s katerim se sooča farmacija pri uporabi nanokristalov, je njihova fizikalna nestabilnost. Znano je, da je liofilizacija odlična tehnika za izboljšanje dolgoročne stabilnosti koloidnih sistemov. Kljub temu pa je slabo raziskana medsebojna odvisnost sestave formulacij, procesnih pogojev in lastnosti liofiliziranih nanokristalov. Namen naloge je bil raziskati vpliv različnih formulacij in procesnih pogojev na fizikalne lastnosti liofiliziranih nanokristalov paliperidon palmitata. Predhodna študija je obsegala cikle zamrzovanja/odmrzovanja. Raziskan je bil vpliv različnih pufov in izbran najprimernejši krioprotектant, ki je nanokristale med procesom zamrzovanja uspešno zaščitil. Na podlagi teh rezultatov je sledila liofilizacija nanokristalov paliperidon palmitata, s čimer je bil raziskan vpliv nastajanja ledenih kristalov z uporabo konzervativnega zamrzovanja, temperiranja ali nadzorovane nukleacije. Liofilizirani je bilo šest različnih formulacij nanokristalov, ki so vsebovale tri različne koncentracije saharoze in poloxamera 407 ali polisorbata 20 kot steričnih stabilizatorjev. Stabilnost nanokristalov je bila raziskana z uporabo obsežnega analitičnega postopka. Rezultati so pokazali, da režim zamrznitve ne vpliva pomembno na stabilnost nanokristalov, medtem ko je kombinacija steričnega stabilizatorja in krioprotektanta bistveno prispevala k stabilnosti liofiliziranih nanokristalov.

Effect of Formulation Composition and Process Conditions on Physical Properties of Lyophilized Paliperidone Palmitate Nanocrystals

ULA SAVŠEK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: **Wolfgang Frieß**, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians University Munich

A vital problem that limits the use of drug nanocrystals in pharmaceuticals is their physical instability. Freeze-drying is known to be an excellent technique to improve long-term stability of colloidal systems. But still there is little known about the mutual dependency of formulation and process design as well as particle properties when freeze-drying drug nanocrystals. The purpose of the present study was to investigate the influence of different formulations and process conditions on freeze-dried paliperidone palmitate nanocrystals. As a preliminary study, freeze-thawing was performed in order to investigate the influence of buffer and to screen for the most appropriate cryoprotectant, which protects drug nanocrystals during the freezing step. On the basis of the previous results, freeze-drying was performed to investigate the impact of ice crystal formation applying conservative ramp freezing, annealing or controlled nucleation. Six different drug nanocrystal formulations containing three different sucrose concentrations and poloxamer 407 or polysorbate 20 as steric stabilizers, were lyophilized. Drug nanocrystal stability was monitored using a comprehensive set of analytical techniques. The freezing regime showed no significant influence on drug nanocrystal stability. In contrast, the combined effect of steric stabilizer and cryoprotectant significantly contribute to drug nanocrystal stability.

Sinteza predzdravila simvastatina za limfatično absorpcijo

TINA BARBORIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

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

Po peroralni aplikaciji zdravil lahko jetnji metabolizem zelo omeji biološko uporabnost nekaterih zdravilnih učinkovin in je tako pomembna ovira za klinični in komercialni uspeh. Ena izmed teh zdravilnih učinkovin je tudi simvastatin, ki se uporablja za zdravljenje hiperoleolemije oziroma dislipidemije. Te so pomemben dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni, ki spadajo med velike javnozdravstvene probleme. V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali dve predzdravili simvastatina ter mu tako zagotovili ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti za selektivni transport iz tankega črevesa v okolno limfno žilo. Predzdravili sta gliceridna mimetika, ki naj bi posnemala prebavo, ponovno esterifikacijo in limfatični transport prehrambnih triglyceridov. Gliceridna mimetika se tako združita z lipoproteini in se, namesto da bi se absorbirala v portalno kri, absorbirata v limfo. Z limfatično absorpcijo se tako izognemo metabolizmu prvega prehoda v jetrih, posledično pa se poveča tudi biološka uporabnost. Eksperimentalni načrt je zajemal optimizacijo sinteze glicerol 1,3-distearata, nato smo nanj pripeli ustrezna distančnika iz glutarne in jantarne kisline, končni korak naše sinteze pa je bil pripenjanje glicerol 1,3-distearata z ustreznim distančnikom na prosto -OH skupino simvastatina. Predzdraviloma smo ovrednotili metabolno pretvorbo predzdravila v simvastatin in ugotovili, da se obe metabolizirata pod vplivom jetrnih mikrosomalnih encimov. Na podlagi dobljenih rezultatov smo tudi ugotovili, da izbira distančnika, ki smo ga uvedli za sterično stabilizacijo labilnega estra med zdravilom in gliceridnim delom, vpliva na sproščanje simvastatina.

Synthesis of Simvastatin Prodrug for Lymphatic Absorption

TINA BARBORIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

After oral drug administration, the first-pass hepatic metabolism can limit the exposure in the systemic circulation representing a significant potential barrier to clinical and commercial success for many marketed drugs. One of these drugs is simvastatin, which is used in the treatment of hypercholesterolemia or dyslipidaemia. These are important risk factors for the development of cardiovascular diseases, which are among major public health problems. Within the master's thesis, two simvastatin prodrugs were synthesised to provide a prodrug with appropriate physicochemical properties for selective transport through the intestinal lymph vessels. Simvastatin prodrugs are glyceride mimetics, which are supposed to mimic the digestion, re-esterification, and lymphatic transport pathways of dietary triglycerides. The glyceride-mimetic prodrugs would then combine with lipoproteins and instead of being absorbed into portal blood they would be absorbed into the lymph. By lymphatic absorption, first-pass hepatic metabolism could be avoided and, as a consequence, bioavailability of the drug would increase. For the purpose of this master's thesis, we first optimised the synthesis of glycerol 1,3-distearate. Then the appropriate spacer from glutaric and succinic acids was bound and as a final step prodrugs were synthesised by binding simvastatin and glycerol 1,3-distearate with the appropriate spacer. Both prodrugs were evaluated for the release of simvastatin from the prodrug, and we found that both are metabolised by liver microsomal enzymes. The obtained results showed that the type of spacer, which was introduced to sterically stabilise the labile ester between the drug and glyceride part, affects the release of simvastatin from the prodrug.

Večkratna katalitska C–H funkcionalizacija dihidropirazinskega derivata v vodi

SARA HROVAT, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Franc Požgan**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Na področju reakcij tvorbe C–C vezi smo raziskali katalitsko neposredno ariliranje *ortho*-C–H vezi 5,6-difenil-2,3-dihidropirazina in njegovega aromatskega analoga 2,3-difenilpirazina. Z večkratno C–H aktivacijo in nadaljnjo funkcionalizacijo 5,6-difenil-2,3-dihidropirazina nam je uspelo pripraviti različne, večkrat arilirane produkte. Funkcionalizacijo C–H vezi dihidropirazinskega derivata s 4-bromoacetofenonom in 4-bromo-1-(trifluorometil)benzenom smo izvedli v prisotnosti *in situ* tvorjenega rutenijevega(II)-karboksilat/ PPh_3 katalitskega sistema v vodi. Z izvajanjem reakcij v pogojih mikrovalovnega segrevanja smo v primerjavi s klasičnim segrevanjem v večini primerov dosegli večjo selektivnost in skrajšane reakcijske čase. Posamezne produkte, funkcionalizirane z različnim številom arilnih skupin, smo z izbiro primernih reakcijskih pogojev pripravili na čim bolj selektiven način ob popolni konverziji izhodne spojine in jih izolirali z zadovoljivimi izkoristki. Strukture pripravljenih produktov smo potrdili s pomočjo spektroskopskih metod in v nekaterih primerih z rentgensko struktурno analizo. Ugotovili smo, da je za učinkovito pripravo sterično oviranih multiariliranih produktov ključno, da izhajamo iz bolj fleksibilnega dihidropirazinskega substrata. Poleg tega je treba reakcije C–H ariliranja izvajati s povečanimi količinami arilirnega reagenta, pri večji koncentraciji katalitskega sistema in uporabi vodnega medija.

Multiple Catalytic C–H Functionalisation of Dihydropyrazine Derivative in Water

SARA HROVAT, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Franc Požgan**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

We investigated the catalytic direct *ortho*-C–H arylation of 5,6-diphenyl-2,3-dihydropyrazine and its aromatic analogue, i.e. 2,3-diphenylpyrazine. Multiple C–H activation and further functionalization of 5,6-diphenyl-2,3-dihydropyrazine with para-substituted aryl halides led to various multi-arylated products. C–H bond functionalization of diphenylpyrazine derivative with 4-bromoacetophenone and 4-bromo-1-(trifluoromethyl)benzene was performed in the presence of an *in situ* generated ruthenium(II)-carboxylate/ PPh_3 catalyst system in water as a green solvent. The reactions were strongly accelerated under microwave irradiation, and resulted in higher selectivity in comparison to conventional heating. Selective formation of products functionalized with a different number of aryl groups at *ortho* positions of the benzene rings could be achieved by a subtle change of reaction conditions. The structures of the synthesized products were confirmed by spectroscopic methods and in some cases by X-ray structural analysis. We demonstrated that the use of the more flexible dihydropyrazine substrate was crucial for obtaining sterically hindered tri- and tetra-arylated products. They can be isolated in satisfactory yields only by employing a large excess of arylating reagent and with high catalyst loading in aqueous media.

Kinetika Diels-Alder reakcije med N-fenilmaleimidom in benzoksazinom na osnovi furana v talini

TJAŽ KOBAL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: **Urška Šebenik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Diels-Alder (DA) reakcija je ena od najpogosteje uporabljenih reakcij v organski sintezi, še posebej za tvorbo šestčlenskih obročev z dobrim nadzorom nad stereokemijskimi lastnostmi končnega produkta. Proizvodi, ki nastanejo prek DA reakcije, lahko pri povišani temperaturi razpadajo po obratni reakciji, imenovani retro-Diels-Alder reakcija (r-DA), pri čemer se tvorijo prvotne spojine. Osrednji namen raziskovalnega dela je bil razviti kinetični model Diels-Alder reakcije med N-fenilmaleimidom (PMI) in benzoksazinom na osnovi furana (G-f) v talini. Kinetika DA reakcije je bila proučevana z izotermnim segrevanjem stehiometrične reakcijske zmesi. Eksperimentalni rezultati so pokazali, da reakcija pri nobeni izmed reakcijskih temperatur ne poteče do popolne konverzije, končna dosežena konverzija reaktantov pa se s temperaturo le rahlo spreminja. Omenjeni pojav je mogoče razložiti s povečanjem viskoznosti kot posledico reakcije ali kristalizacije produkta, prisotnostjo stranskih reakcij ali nehomogenosti reakcijske mešanice. Z znanjem, pridobljenim iz literature, in temeljitim proučevanjem reakcijskega sistema se je izkazalo, da je razlog za nepopolno konverzijo reaktantov povečanje viskoznosti in posledično prehod iz kemijsko nadzorovane hitrosti reakcije v difuzijsko nadzorovanu hitrost reakcije. V skladu z eksperimentalnimi rezultati in posledično identificiranimi procesi, ki potekajo v reakcijskem sistemu pri proučevanih reakcijskih temperaturah, je bil razvit kinetični model na osnovi kombinacije Rabinowitcheve enačbe in Chern-Poehlein modela, ki upošteva vpliv DA in r-DA reakcije ter difuzije na hitrost reakcije.

Kinetics of Diels-Alder Reaction between N-Phenylmaleimide and Benzoxazine Containing Furan Group in Molten State

TJAŽ KOBAL, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Urška Šebenik**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The Diels-Alder (DA) reaction is one of the most useful reactions in organic synthesis especially for forming 6-membered systems with good control over regio- and stereochemical properties. The DA reaction can be reversed via retro-Diels-Alder (r-DA) reaction at an appropriate temperature range, resulting in starting reactants. The research focused on kinetic investigation of Diels-Alder (DA) reaction between N-phenylmaleimide (PMI) and benzoxazine containing furan group (G-f) in a molten state. Kinetics of DA reaction was investigated by isothermal heating of stoichiometric reaction mixture. Experimental results showed insignificant changes in maximum conversion, which never reached the value of unity. The increase of viscosity due to the reaction or crystallisation of products, occurrence of side reactions and inhomogeneity were identified as possible reasons for deceleration of a reaction rate and limiting conversion. After a thorough investigation of the studied system, accompanied by the knowledge from literature and additional experiments, the potential reason for the incomplete conversion of reactants was reduced to the crossover between chemically and diffusion-controlled reaction due to the increasing viscosity of reaction system. Rheological data was found to be of significant importance in the kinetic model development and interpretation. Accordingly, the kinetic model incorporating effects of DA reaction, r-DA reaction and diffusion on the rate of reaction was developed based on the combination of Rabinowitch equation and the Chern-Poehlein model.

Sinteza in testiranje potencialnih inhibitorjev *Plasmodium falciparum* dihidroorotat dehidrogenaze

NIKA STRAŠEK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Jurij Splete**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Malaria na leto povzroči približno 200 milijonov okužb in pol milijona smrti. Največja težava je hiter razvoj odpornosti parazita proti vsem novoodobrenim zdravilom. Pri našem delu smo poiskali nove spojine, ki pri organizmu *Plasmodium falciparum* (PfDHODH), glavnem povzročitelju okužb, delujejo kot visokoselektivni inhibitorji dihidroorotat dehidrogenaze. Delo je bilo sestavljeni iz štirih stopenj: iz računalniškega načrtovanja spojin s pomočjo molekulskega sidranja, sinteze spojin, izražanja rekombinantnih encimov ter na koncu testiranja encimske aktivnosti sintetiziranih spojin in preverjanja selektivnosti glede na človeški encim. Najboljše rezultate smo dobili pri dveh tipih spojin, bicikličnih 3-pirazolidinonih in teofillin-7-acetamidih. Biciklične 3-pirazolidinone smo pripravili s trokomponentno reakcijo med 3-pirazolidinonom, aldehydom in akrilatom pod vplivom mikrovalov. Reakcija poteka prek nastanka azometin imina, sledi pa ji 1,3-dipolarna cikloadicija. Teofillin-7-acetamidi so bili pripravljeni s kondenzacijo teofillin-7-ocetne kisline z α-aminoestri. Afiniteta do PfDHODH je bila največja pri bicikličnih 3-pirazolidinonih, ki imajo na mestih 3 in 5 vezani fenilno in metilno skupino v antiorientaciji. Spojina z največjo aktivnostjo ($IC_{50} = 2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$) se je pokazala tudi kot visokoselektivna glede na človeški encim, PfDHODH/HsDHODH > 350.

Synthesis and Testing of Potential Inhibitors of the *Plasmodium Falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase

NIKA STRAŠEK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Jurij Splete**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Malaria annually causes around 200 million infections and half a million deaths. The biggest issue is the rapid development of resistance to all newly approved medicines. In our work, we found new compounds that act as highly selective dehydrogenase dehydrogenase inhibitors of *Plasmodium falciparum* parasite (PfDHODH), which is the main cause of infection. The work was planned in four different stages: the first step was the computer-based design of compounds with molecular docking, it was followed by the synthesis of compounds, the expression of recombinant enzymes (plasmodium and human), and finally the testing of the enzyme activity of synthesized compounds and the determination of selectivity of the parasite enzyme vs. the human enzyme. The best results were obtained with two types of compounds, bicyclic 3-pyrazolidinones and theophylline-7-acetamides. Bicyclic 3-pyrazolidinones were prepared by a microwave-assisted three-component reaction between a 3-pyrazolidinone, an aldehyde, and an acrylate via formation of an azomethine imine, followed by 1,3-dipolar cycloaddition. Theophylline-7-acetamides were prepared by condensation of theophylline-7-acetic acid with α-amino esters. The bicyclic 3-pyrazolidinones with phenyl and methyl groups in anti-orientation at 3 and 5 sites showed the highest affinity for PfDHODH. The compound with the highest activity ($IC_{50} = 2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$) also turned out to be highly selective against human enzyme, PfDHODH / HsDHODH > 350.

Določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadnih vodah

KAJA LENARČIČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorka: **Marija Sollner Dolenc**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorka: **Ester Heath**, Institut Jožef Stefan

Bisfenol A (BPA) in njegovi analogi spadajo v skupino spojin, ki jih imenujemo motilci endokrinega sistema. To pomeni, da jih hormonski receptorji prepoznaajo kot endogene ligande, kar lahko povzroči škodo, saj endokrini sistem uravnava številne telesne funkcije. V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na določitev prisotnosti izbranih analogov BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS in BPZ v slovenskih odpadnih vodah. Optimizirali in validirali smo analizno metodo, ki je vključevala ekstrakcijo na trdnem nosilcu, derivatizacijo in določitev s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrično detekcijo. V procesu optimizacije smo povečali volumen vzorca in pri validaciji uporabili večje število paralel. Z validirano metodo smo analizirali vtoke in izotope petih slovenskih čistilnih naprav, v dveh pa tudi dotoke iz industrijskih čistilnih naprav v bližini. Vsaj enega od analogov BPA smo našli v vseh preiskovanih vzorcih, v večini pa celo kombinacijo več analogov. Na podlagi izsledkov in literature ugotavljamo, da primanjkuje raziskav, ki se ne osredotočajo samo na BPA, saj se BPA danes pogosto zamenjuje z analogi, o katerih vemo dosti manj.

Determination of Concentration of Bisphenol A Analogues in Wastewaters

KAJA LENARČIČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Marija Sollner Dolenc**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-Supervisor: **Ester Heath**, Jožef Stefan Institute

Bisphenol A (BPA) and its analogues are part of a group of compounds called endocrine disrupting compounds (EDCs). This means that hormone receptors mistakenly recognize them as endogenous ligands. This can create lots of problems, because endocrine system regulates many bodily functions. In our master's thesis, we focused on determining the presence of selected analogues of BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS and BPZ in Slovenian wastewaters. To this end, we optimised and validated an analytical method, which included solid phase extraction, derivatisation and an analysis with combination of gas chromatography and mass spectrometry. During the process of optimisation, we increased the volume of analysed samples and number of samples in validation procedures. With a validated method, we analysed influents and effluents of 5 Slovenian wastewater treatment plants (WWTP) and in case of 2 WWTPs also samples of influents that include wastewater that is driven to wastewater treatment plant with cisterns from industrial plants. At least one analogue of BPA was detected in every analysed wastewater sample, and in the majority of samples a combination of several analogues was detected. Based on our results and scientific literature, we conclude that there is not enough research that focuses on bisphenols other than BPA, especially since today, BPA in the industrial use is more and more replaced with its analogues, about which we know less.

Sinteza in uporaba izbranih terminalnih acetilenov

ŽAN HRIBAR, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Janez Košmrlj**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V raziskovalnem delu smo sintetizirali različne terminalne alkine, ki bi jih lahko uporabljali za tvorbo različnih 1,2,3-triazolov. Ti kažejo dobre obete pri antifungicidnih testiranjih. V ta namen smo se lotili sinteze novih molekul prek različnih intermediatov, ki smo jih ustrezeno okarakterizirali in analizirali s pomočjo spektroskopskih tehnik. Pri sintezi 1,2,3-triazolov smo uporabljali postopke "klik" kemije, kar se je pokazalo kot dobra odločitev, saj gre za atomsko ekonomičen proces, ki daje čiste produkte z velikimi izkoristki.

Synthesis and Applications of Selected Terminal Acetylenes

ŽAN HRIBAR, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Janez Košmrlj**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The aim of this research paper was to synthesize different terminal alkynes as precursors for the formation of 1,2,3-triazoles. The molecular modelling experiments of these compounds showed possible antifungal activity. In this manner we synthesized novel molecules, formed via different intermediates, which we characterized with the use of spectroscopic techniques. Our synthesis of 1,2,3-triazoles implemented the so-called "click" chemistry principles, which in practice turned out to be a wise choice. "Click" chemistry is a very economical and efficient process yielding highly pure reaction products.

Študij diketonatnih ligandov in pripadajočih kovinskih kompleksov

NINA PODJED, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Iztok Turel**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Kovinski kompleksi imajo veliko možnih koordinacijskih števil, geometrij, oksidacijskih stanj in ligandov. Ta raznolikost se kaže v različnih lastnostih kompleksov in možnostih uporabe. V magistrskem delu sem se osredotočila na bakrove(II) koordinacijske spojine in na rutenijeve(II) organokovinske spojine. Bakrovi kompleksi se proučujejo kot potencialna terapevtska sredstva, saj kažejo izredno citotoksičnost proti rakavim celicam. Bakrovi(II) kompleksi z β -diketonatnimi ligandi so zanimivi tudi zaradi mehanskih in magnetnih lastnosti, lastnosti tekočih kristalov itd. Rutenijevi kompleksi so pogosto uporabljeni kot katalizatorji, barvila v sončnih celicah in tudi kot potencialna protirakava sredstva. Tudi rutenijevi klorido in pta kompleksi z β -diketonatnimi in kurkuminoidnimi ligandi kažejo potencial za nadaljnje študije zaradi svoje citotoksičnosti, antiproliferativnih ali antimetastatskih lastnosti. Namen magistrskega dela je bila sinteza novih bakrovih(II) kompleksov in organorutenijevih(II) spojin z izbranimi β -diketonatnimi ligandi ter njihova popolna strukturna karakterizacija z NMR-spektroskopijo, masno spektrometrijo, elementno CHN-analizo, IR-spektroskopijo, UV-Vis-spektroskopijo in rentgensko struktorno analizo na monokristalu. Pri proučevanju terapevtske učinkovitosti bakrovih(II) kompleksov so ugotovili, da je pri toksičnem delovanju bistveno sodelovanje bakra(I), zato je pomembno določiti redukcijske potenciale kompleksov. Te sem za izbrane bakrove komplekse določila s ciklično voltametrijo in proučila, kako na redukcijski potencial vplivajo različni ligandi.

Studies of Diketonate Ligands and Associated Metal Complexes

NINA PODJED, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: **Iztok Turel**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Metal complexes have a large number of possible coordination numbers, geometries, oxidation states and ligands. Their diversity is reflected in different properties and possibilities of uses. In my master's thesis, I focused on copper(II) coordination compounds and ruthenium(II) organometallic compounds. Copper complexes have a lot of potential as therapeutic agents, as they exhibit exceptional cytotoxicity against cancer cells. Copper(II) complexes with β -diketonate ligands are also interesting because of their mechanical and magnetic properties, properties of liquid crystals, etc. Ruthenium complexes are widely used as catalysts, dyes in solar cells and, also, as potential anticancer agents. Ruthenium chlorido and pta complexes with β -diketonate and curcuminoid ligands also show potential for further studies due to their cytotoxicity, antiproliferative or antimetastatic properties. The purpose of my master's thesis was the synthesis of novel copper(II) complexes and organoruthenium(II) compounds with β -diketonate ligands and their complete structural characterisation with NMR spectroscopy, mass spectrometry, elemental CHN analysis, IR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy and single crystal X-ray structural analysis. In studying the therapeutic efficiency of copper(II) complexes, it was found that copper(I) is essential for the toxic action, therefore it is important to determine the reduction potentials of the complexes. I determined the latter using cyclic voltammetry for selected copper complexes and examined how different ligands affect the reduction potential.

Lipidne kapljice in transport maščobnih kislin v celicah raka dojke

EMA GUŠTIN, Institut Jožef Stefan

Mentor: Toni Petan, Institut Jožef Stefan

Somentor: Miha Pavšič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Rakave celice so sposobne zmanjšati svoje potrebe po glukozi, saj energijo lahko pridobivajo tudi z oksidacijo maščobnih kislin (MK) v mitohondriih. MK so v celicah shranjene v lipidnih kapljicah (LK), novopriznanih dinamičnih citosolnih organelih. Osrednji encim za sintezo LK je diacylglycerol-aciltransferaza (DGAT), pri njihovi razgradnji z lipolizo pa ima ključno vlogo adipozna trigliceridna lipaza (ATGL). V okviru magistrskega dela smo v naši raziskovalni skupini vpeljali metodo, ki nam omogoča vpogled v morfologijo in dinamiko LK s poudarkom na razmeščanju MK. Gre za novo metodo vizualizacije in kvantifikacije transporta MK na celičnem nivoju s pomočjo lokalizacije fluorescenčno označene MK s konfokalno mikroskopijo. Pokazali smo, da blaže stradanje pri celicah raka dojke povzroči prenos MK iz LK v mitohondrije. Pri izrazitejšem stradanju do tovrstnega prenosa MK ni prišlo, opazili pa smo od DGAT odvisno sintezo LK. Z utišanjem gena za izražanje ATGL smo pokazali, da je delovanje tega encima ključno za sproščanje MK iz LK in za njihov prenos v mitohondrije pri stradanju v odsotnosti serum. Poleg tega smo pokazali, da delovanje ATGL vpliva na velikost in število LK v celicah raka dojke, gojenih v različnih pogojih. Zaključki naše raziskave predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje raziskave pomena LK za preživetje rakavih celic in odpirajo nova vprašanja na področju lipidnega metabolizma v stresu izpostavljenih celicah.

Lipid Droplets and Fatty Acid Trafficking in Breast Cancer Cells

EMA GUŠTIN, Jožef Stefan Institute

Supervisor: Toni Petan, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: Miha Pavšič, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Being capable of mitochondrial energy production by fatty acid (FA) oxidation, cancer cells can minimize their glucose dependency. Cellular FAs are stored in lipid droplets (LDs), newly recognized dynamic cytosolic organelles. The committed step in the synthesis of LDs is catalyzed by diacylglycerol acyltransferase (DGAT), whereas adipose triglyceride lipase (ATGL) has a key role in their lipolytic breakdown. This master's thesis introduces a novel method that allows visualization and quantification of FA transport in live cells and is based on the localization of a fluorescently-labelled FA with confocal microscopy. We found that serum starvation triggers FA transfer from LDs to mitochondria in breast cancer cells. Intriguingly, FA transfer to mitochondria did not occur in cells exposed to serum and amino acid starvation. In these conditions, a DGAT-dependent LD biogenesis occurred instead. Depletion of ATGL by siRNA-mediated gene silencing fully inhibited FA release from LDs and their transfer into mitochondria in serum-starved breast cancer cells. Our results also show that ATGL activity is associated with the regulation of LD size and number in breast cancer cells grown in various conditions. In summary, our findings provide a good starting point for further research into the importance of LDs for protection of cancer cells against stress and raise new questions in the field of lipid metabolism in the context of the cellular stress response in general.

Citotoksično in genotoksično delovanje bisfenolov A, S, F in AF ter njihovih mešanic v celični liniji HepG2

LIDIJA KAČ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Marija Sollner Dolenc, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorka: Bojana Žegura, Nacionalni inštitut za biologijo

Bisfenoli so skupina sintetičnih organskih spojin, ki se uporablja predvsem v industriji plastičnih polimerov. Problematika vse večje onesnaženosti okolja in izpostavljenosti ljudi bisfenolom postaja vse bolj pereča. Prvi iz te skupine spojin, ki se je začel uporabljati v komercialne namene, je bisfenol A, zato je tudi najbolj razširjen, njegovi učinki pa najbolj raziskani. Odkritjem o njegovem škodljivem delovanju na okolje in organizme so sledile omejitve njegove proizvodnje in uporabe v določene namene. Omenjeni ukrepi so tlakovali pot vstopu na tržišče spojinam, ki so po strukturi in fizikalno-kemijskih lastnostih zelo podobne bisfenolu A. Le-te v zadnjih letih vztrajno nadomeščajo uporabo bisfenola A, zato je nujno, da damo ustrezno oceno tveganja njihove uporabe za okolje in ljudi. Gre za kompleksen proces, saj je treba njihove mehanizme delovanja proučiti z različnih vidikov. Namen našega dela je bil proučiti citotoksičen in genotoksičen potencial bisfenola A in njegovih treh najpogostejših nadomestnih strukturnih analogov bisfenolov S, F in AF na celicah humanega hepatoma (HepG2) ter rezultate umestiti v širši kontekst z drugimi študijami. Rezultati naše raziskave so pokazali, da sta bisfenol F in AF bolj genotoksična aktivna kot bisfenol A, kar vzbuja skrb, vprašanje o varnosti njihove uporabe pa ostaja odprto. V delu smo opozorili na problematiko možnosti izpostavitve ljudi več bisfenolom hkrati. Proučili smo genotoksičen potencial mešanic bisfenolov A, S, F in AF s sestavo in koncentracijami, značilnimi za človekovo izpostavitev. V naših poskusih niso izkazale genotoksične aktivnosti.

Cytotoxic and Genotoxic Activity of Bisphenols A, S, F, AF and Their Mixtures in HepG2 Cell Line

LIDIJA KAČ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

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

Co-supervisor: Bojana Žegura, National Institute of Biology

The widespread use of bisphenols in the plastic industry has led to their extensive distribution in the environment and practically unavoidable exposure to the human population. Bisphenol A is one of the most widespread chemicals in the world and many studies revealed its toxic effects on environment and living organisms. The publication of studies demonstrating its toxic effects was followed by regulations of its production or complete prohibition of its use in various applications. These regulations paved the way for the gradual market entry of structurally similar chemicals, with similar physicochemical properties, called bisphenol analogues. Despite their widespread occurrence there is a knowledge gap in their toxicological profile. In our research we examined cytotoxic and genotoxic potential of bisphenol A and its three most widely used analogues bisphenols S, F and AF on human hepatoma cell line (HepG2). Our results showed that bisphenols F and AF exhibited greater genotoxic activity than bisphenol A, indicating they are not safer alternatives to bisphenol A. Therefore more studies should be conducted to fully understand the mechanisms of their toxicity and prepare risk assessment. Since the production and application of these analogues is increasing, co-exposure to multiple bisphenol analogues should also be researched. In our research we studied the genotoxic potential of various mixtures of bisphenols A, S, F and AF at concentrations relevant for human exposure. In our experiments they did not induce DNA damage.

Sinteza in vrednotenje potencialnih zaviralcev N-acetilglukozaminil transferaze

MAŠA STERLE, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Marko Anderluh, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Matjaž Weiss, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

O- β -N-acetilglukozaminil transferaza (OGT) je encim, ki je odgovoren za posttranslacijsko modifikacijo, tj. glikozilacijo številnih citosolnih in jedrnih proteinov, ki so udeleženi v patologiji raka, metabolnih, nevrodegenerativnih in avtoimunskih bolezni. Na podlagi struktурno podprtga rešetanja smo načrtovali in nato sintetizirali sedem novih potencialnih zaviralcev OGT, ki se predvidoma vežejo v vezavni žep za uridindifosfat kofaktorja GlcNAcUDP. Vse spojine so imele osnovno ogrodje kinolon-4-karboksamidnega tipa, s katerim v vezavnem mestu tvorijo vodikove vezi z Ala 896, Thr 922 in Thr 921. Pokazalo se je, da encim v največjem odstotku zavrejo tiste spojine, ki v vezavnem mestu omogočajo tvorbo dodatnih vodikovih vezi z Gln 839 in Lys 842 ter interakcij π - π s His 920. Spojine smo sintetizirali in preverili njihovo biološko aktivnost v sodelovanju z Univerzo v Utrechtu, kjer so bile ovrednotene na testnih sistemih zaviranja OGT *in vitro*, zdaj pa so v fazi nadaljnega testiranja.

Synthesis and Evaluation of Potential N-Acetylglucosaminy Transferase Inhibitors

MAŠA STERLE, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Marko Anderluh, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Matjaž Weiss, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) is an enzyme responsible for posttranslational modification – glycosylation of cytosolic and nuclear proteins, which are involved in pathology of cancer, metabolic and neurodegenerative diseases as well as in pathology of autoimmune diseases. On the basis of structure-based screening, we designed and synthesized seven novel potential inhibitors that target the donor uridinediphosphate OGT binding site. All the compounds are composed of quinolone-4-carboxamide scaffold that enables hydrogen bonds formation with Ala 896, Thr 921 and Thr 922. Final compounds were tested for their inhibitory activity against OGT. The most potent inhibitors revealed to be the compounds that enabled the formation of new hydrogen bonds with Gln 839 and Lys 842 as well as π - π interactions with His 920 in the binding site. The compounds were synthesized and assayed in cooperation with the University of Utrecht where two different *in vitro* test systems were used for evaluation of their inhibitory activity. Currently, the compounds are undergoing further testing.

Razvoj in izdelava polimernih nanodelcev za uporabo v ustni votlini

LEA BENČINA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorka: Mirjana Gašperlin, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentorka: Marianne Hiorth, Univerza v Oslo

Občutek suhih ust oziroma kserostomija je pogosta bolezen z zmanjšanim pretokom sline. Nadomestki sline, ki so na voljo na trgu, se na ustni sluznici zadržujejo kratek čas in zagotavljajo le začasno lajšanje simptomov. Namen raziskovalne loge je bil razviti in pripraviti stabilne polimerne nanodelce za zdravljenje simptomov kserostomije. Zaradi interakcije z mucinom se pri nanodelcih čas zadrževanja na ustni sluznici podaljša. Nanodelci smo pripravili iz alginata, LM-pektina in hitosana z metodo ionskega premreževanja ter vrednotili velikost, polidisperzni indeks, zeta potencial in motnost. Najbolj obetavni so bili nanodelci iz alginata (0,05 % w/w) z razmerjem ZnCl₂ : alginat = 35 : 65 in nanodelci iz hitosana (0,05 % w/w) z razmerjem tripolifosfat : hitosan = 15 : 85 ali 20 : 80. Razvili smo reološko metodo in jo uporabili za proučevanje interakcije med polimeri in mucinom ter nanodelci in mucinom. Dokazali smo interakcijo (negativni reološki sinergizem) med hitosanom in mucinom, nanodelci iz hitosana in mucinom ter alginatnimi nanodelci in mucinom. Da bi bila viskoznost končne formulacije nanodelcev podobna človeški slini, smo disperzijam nanodelcev dodali nevtralni polimer hidroksietilcelulozo (HEC). Končna viskoznost disperzij nanodelcev iz hitosana in alginata je bila po dodatku HEC (1 % w/w ali 1,5 % w/w) v območju med 2 mPas in 5 mPas, kar je v skladu z viskoznostjo človeške sline.

Development and Production of Polymer-Based Nanoparticles for Use in the Oral Cavity

LEA BENČINA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Mirjana Gašperlin, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Marianne Hiorth, University of Oslo

Xerostomia or "dry mouth" is a common disease with reduced salivary flow. Saliva substitutes available on the market have a short residence time in the oral cavity and therefore their effect is only temporary. The overall aim of this thesis was to develop and produce polymer-based nanoparticles (NPs) for use in the treatment of xerostomia. NPs have prolonged residence time in the oral cavity due to their interaction with mucin. NPs composed of alginate, low-methoxylated pectin and chitosan were prepared by ionic crosslinking and characterized according to their size, polydispersity index, zeta potential and turbidity. The most promising formulations were 0.05% w/w alginate NPs with the ZnCl₂:alginate ratio = 35:65 and 0.05% chitosan NPs with the tripolyphosphate : chitosan ratio = 15:85 or 20:80. A rheological method was successfully set up and used for investigating the interaction between the polymers and mucin or the NPs and mucin. The interaction (negative rheological synergism) was shown between chitosan and mucin, chitosan NPs and mucin and alginate NPs and mucin. In order to modify the viscosity of the final nanoparticle formulations to behave similar to human saliva, the neutral polymer hydroxethylcellulose (HEC) was added to the NP dispersions. Final viscosity of the alginate and chitosan NPs mixed with HEC (1% w/w or 1.5% w/w) ranged from 2 mPas to 5 mPas, which was in accordance with the reported viscosity value of the whole human saliva.

Formuliranje farmacevtskih učinkovin v polimere s plini visoke gostote

BARBARA LJUBEC, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Mentorica: **Maša Knez Hrnčič**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru
Somentorja: **Zoran Novak, Darija Cör**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

Topnost farmacevtske učinkovine je kritična fizikalno-kemijska lastnost, na katero lahko vplivamo z velikostjo delcev farmacevtske učinkovine. Z zmanjšanjem velikosti delcev lahko izboljšamo topnost in posledično raven absorpcije ter biološko uporabnost farmacevtske učinkovine. Visokotlačni postopki s plini visoke gostote predstavljajo alternativno metodo za pridobivanje nekontaminiranih majhnih delcev z možnostjo regulacije njihove velikosti in oblike ter želene kvalitete produkta na okolju neškodljiv način. V raziskavi smo proučevali termodynamične lastnosti slabo vodotopne farmacevtske učinkovine fenofibrat in biorazgradljivega polimernega nosilca polioksietilen stearil eter v različnih plinih. Na osnovi teh podatkov smo izvedli formulacijo farmacevtske učinkovine v polimeri nosilec z visokotlačnim postopkom PGSSTM pri optimalnih pogojih. Izračunali smo izkoristek in učinkovitost procesa ter pri dobljenem produktu izmerili termične lastnosti (DSC/TGA), velikost in velikostno porazdelitev delcev (CILAS), morfologijo delcev (ESEM), vsebnost (LC/MS) in profil raztopljanja farmacevtske učinkovine. Formulacijo smo izvedli uspešno, saj smo zmanjšali velikost delcev in s tem izboljšali topnost farmacevtske učinkovine v vodnem mediju.

Formulation of Pharmaceutical Compounds into Polymers with Gases of High Density

BARBARA LJUBEC, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor
Supervisor: **Maša Knez Hrnčič**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor
Co-supervisors: **Zoran Novak, Darija Cör**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

The solubility of a pharmaceutical compound is a critical physico-chemical property, which can be influenced by the particle size of the pharmaceutical compound. The solubility and consequently the rate of absorption and bioavailability of the pharmaceutical compound can be improved by particle size reduction of the pharmaceutical compound. High-pressure processes with dense gases represent an alternative method for obtaining uncontaminated small particles with the possibility to control their size and shape and the desired quality of the product in an environmentally friendly manner. In this study, the thermodynamic properties of a poorly water-soluble pharmaceutical compound fenofibrate and a biodegradable polymeric carrier polyoxyethylene stearyl ether in various gases were investigated, and on the basis of these data the formulation of the pharmaceutical compound was performed in the polymeric carrier with a high-pressure process PGSSTM under optimal conditions. Furthermore, the efficiency and effectiveness of the process were calculated and also thermal properties (DSC / TGA), the particle size and particle size distribution (CILAS), the particle morphology (ESEM), the content (LC / MS) and the dissolution profile of the pharmaceutical compound for obtained products were measured. The formulation process was carried out successfully due to particle size reduction and thus improved solubility of the pharmaceutical compound in aqueous medium was observed.

Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela za ustekinumab pri pacientih s Crohnovo bolezni

ELEONORA MARINI, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: **Iztok Grabnar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Beatrice Perissutti**, Univerza v Trstu

Naš cilj je razviti prvi populacijski farmakokinetični model, validiran za ustekinumab pri Crohnovi bolezni, ki bi bil lahko osnova za prihodnje študije. Za določitev koncentracij ustekinumaba v serumskih vzorcih bolnikov smo uporabili encimsko-imunski absorpcijski test (ELISA), bolnike pa smo genotipizirali za dva enonukleotidna polimorfizma (SNP) v genu IL12B (rs3212227 in rs6887695). Podatke smo analizirali z modeliranjem nelinearnih mešanih učinkov. Za našo populacijo smo uspešno razvili dva modela POPPK: model 1-CMT z mehanizmom Michaelis-Menten in model 2-CMT z linearnim očistkom. Validacija je pokazala, da se oba modela dobro obneseta pri drugi skupini bolnikov in da vrednosti parametrov obeh modelov odražajo ocene parametrov, že opisane v literaturi o monoklonskih protitelesih. Poleg tega je to prvi model POPPK, razvit za ustekinumab pri bolnikih s Crohnovo bolezni, uvajanje nelinearnosti z mehanizmom Michaelis-Menten ter vključenost dveh oddelčnih modelov pa sta med raziskavami modeliranja POPPK, ki jih najdemo v literaturi, nova. Naša raziskava je zajemala zelo majhno populacijo (20 bolnikov), vendar lahko glede na izide predvidevamo, da bi bil model 2-CMT z mehanizmom Michaelis-Menten lahko ustrezen tudi pri večji skupini, kar nakazuje optimizacijo in individualizacijo zdravljenja.

Development of Population Pharmacokinetic Model for Ustekinumab in Patients with Crohn's Disease

ELEONORA MARINI, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: **Iztok Grabnar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Beatrice Perissutti**, University of Trieste

The aim was to develop and provide for the first population pharmacokinetic model validated for ustekinumab in Crohn's disease that could serve as a base for future studies. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentrations of ustekinumab in serum samples from patients, and patients were genotyped for two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene IL12B (rs3212227 and rs6887695). The analysis of data was made by a nonlinear mixed effects modelling approach. We successfully developed two population pharmacokinetic models for our population: the first compartment model with the Michaelis-Menten mechanism, and the second compartment model with linear clearance. The validation showed that both models behave well on another group of patients with Crohn's disease, stranger from our cohort, and the parameter values of both models reflect the parameter estimates already outlined in literature of monoclonal antibodies. Moreover, this is the first population pharmacokinetic model developed for ustekinumab in patients with Crohn's disease, and the introduction of non-linearity with the Michaelis-Menten mechanism and the inclusion of the two compartment models are new among the population pharmacokinetic modelling studies found in literature for ustekinumab. Our study included a very small population (20 patients), but from the outcomes it is plausible that a bigger cohort could evidence the suitability of a two-compartment model with the Michaelis-Menten mechanism, suggesting an optimisation and individualisation of the treatment.

Sinteza magnetnih nanoverig za dostavo zdravilnih učinkovin

TAMARA JARM, DEJA JURIŠEVIČ, Gimnazija Vič

Mentor: Slavko Kralj, Institut Jožef Stefan

Somentor: Gašper Pernek, Gimnazija Vič

Somentor: Črt Dragar, Institut Jožef Stefan

Cilj najine raziskovalne naloge je bil razviti postopek za sintezo magnetnih nanoverig, ki bi bile bolj učinkovite in varne za uporabo, poleg tega bi imele zadostno koloidno stabilnost in bi bile magnetno vodljive, hkrati pa bi lahko prenašale zadostno količino zdravilne učinkovine. V laboratoriju na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za sintezo materialov K8, sva nanodelce najprej združili v nanoskupke, nato pa jih s pomočjo homogenega magnetnega polja uredili v nanoverige. Nanoverige sva nato delno izpraznili, in sicer z delnim raztavljanjem nanodelcev v nanoverigi, ter jih napolnili z zdravilno učinkovino (ibuprofen). Sintetizirane nanoverige sva ovrednotili s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in tudi z drugimi analitičnimi metodami (porozimeter, magnetometer, termogravimetrična analiza), s katerimi sva dokazali uspešno napoljenost nanoverig z zdravilno učinkovino.

Synthesis of Magnetic Nanochains for Controlled Drug Delivery

TAMARA JARM, DEJA JURIŠEVIČ, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: Slavko Kralj, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: Gašper Pernek, Gimnazija Vič Grammar School

Co-supervisor: Črt Dragar, Jožef Stefan Institute

The goal of our research work was to develop procedures for the synthesis of magnetic nanochains suitable for magnetically controlled drug delivery, which would be more effective and safer for use. They would also be colloidally stable enough, could be magnetically manipulated and would have enough space for the drug. In a laboratory at the Jožef Stefan Institute, we combined nanoparticles into nanoclusters, which we then aligned into nanochains with the use of a homogeneous magnetic field. After that, we prepared partially hollow nanochains with dissolution of nanoparticles in the middle of the nanochains. Synthesised nanochains were then evaluated with a transmitted electron microscope (TEM) and other analytical methods – Brauner-Emmet-Teller (BET) analysis, magnetometer and thermogravimetric analysis, which confirmed that the nanochains were successfully loaded with an active ingredient.

Aspartam in njegovi razpadni produkti

VANESA CVELBAR, NIKA GODEC, ANA ŠENICA, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto

Odkar so aspartam kot aditiv odobrili za uporabo v prehranski industriji, so med potrošniki in proizvajalci prisotne številne polemike o njegovi kontroverznosti. Sladki ubijalec – takšno ime se ga je prijelo med njegovimi nasprotniki – naj bi bil telesu škodljiv predvsem zaradi razpadnih produktov, med katerimi so znani fenilalanin, asparaginska kislina, diketopiperazin in metanol. Zadnja dva imata v večjih količinah negativne učinke na telo, medtem ko je fenilalanin izredno nevaren za ljudi s fenilketonurijo. V letih burnih razprav je nastalo veliko raziskav, ki večjih negativnih učinkov aspartama niso potrdile. Uporabo aspartama sta odobrili FDA in EFSA. Najpogosteje se uporablja v žvečilnih gumijih in dietnih izdelkih ozziroma izdelkih brez sladkorja, ki so zaradi nekaloričnosti primerji tudi za diabetike. Zaradi številnih razprav in različnih trditev o njegovi (ne)škodljivosti smo o aspartamu že zeleli izvedeti čim več. Proučile smo zajeten kup literature, pravilnikov in drugih uradnih dokumentov, strokovnih in poljudnoznanstvenih člankov ter se seznanile s številnimi dejstvi, a tudi nejasnostmi in nasprotuječimi si informacijami. Proučile smo tudi metode za določanje vsebnosti aspartama in njegovih treh razpadnih produktov (asparaginske kisline, fenilalanina in diketopiperazina) in izbrano metodo s šolskim visokotlačnim tekočinskim kromatografom (HPLC) deloma potrdile. Z njo smo nato določale količino aspartama v izbranih pihačah in žvečilnih gumijih ter spremljale njegovo stabilnost pri sobni in povišani temperaturi (40 °C) ter njegovo kislo in bazično hidrolizo. Slednjo smo deloma spremljale tudi s tankoplastno kromatografijo (TLC).

Aspartame and Its Degradation Products

VANESA CVELBAR, NIKA GODEC, ANA ŠENICA, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Janja Pust, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Ever since aspartame was approved as an additive for use in the food industry, there have been many differences of opinion among consumers and producers concerning its controversial nature. Referred to as a sweet killer by those who oppose it, it is considered harmful to the organism, mainly because of its degradation products that occur in the body. These products include phenylalanine, aspartic acid, diketopiperazine and methanol. The latter two have negative effects on the body in large quantities, and phenylalanine is extremely dangerous for people suffering from phenylketonuria. In the years of vigorous debates, a great many studies were published that failed to confirm major negative effects of aspartame. Aspartame is still strongly approved by the FDA and EFSA. It is mostly found in chewing gums and dietary or sugar-free products, which are also suitable for diabetics due to their low caloric content. Due to its controversy and so many different assertions about its (un)harmfulness, we wanted to learn more about it. We studied a vast amount of literature, regulations, and other official documents, professional and popular articles, and became familiar with a number of facts, as well as uncertainties and controversies. We searched for the right method to determine the content of aspartame and its three degradation products (aspartic acid, phenylalanine and diketopiperazine), and partially confirmed the selected method with the school's high pressure liquid chromatograph (HPLC). We then used the same method to determine the amount of aspartame in selected drinks and chewing gums, monitored the stability of aspartame at both room and increased temperatures (40°C), and observed the acid and basic hydrolysis of aspartame, which was also partially monitored by thin-layer chromatography (TLC).

Vpliv uporabe različnih topil na ekstrakcijo kurkuminoidov in njihovo antimikrobnو delovanje na bakterijo *Staphylococcus aureus*

AJDA BRKOPEC, LARA REDEK ŽNIDARŠIČ, ŠPELA GRMOVŠEK, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma,
Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija
Mentorica: **Vojka Zupančič**, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija

Kurkuma je tradicionalna indijska rastlina, ki vsebuje številne zdravilne učinkovine, med drugim tudi kurkuminoide. Najbolj poznan in proučen kurkuminoid je kurkumin, aktivna komponenta kurkume, ki jo zaradi protivnetnih in drugih zdravju blagodejnih učinkov že več kot 2000 let uporabljajo v alternativnem zdravstvu, kot začimbo in kot prehransko dopolnilo. Namen našega dela je bil identificirati kurkuminoide kurkume s poudarkom na kurkuminu in preveriti njihovo antimikrobnо učinkovitost na po Gramu pozitivno bakterijo *Staphylococcus aureus*. Ugotoviti smo želeli, ali uporaba različnih topil vpliva na učinkovitost ekstrakcije in sestavo ekstraktov, ki smo jih pridobili iz sveže in suhe kurkume, ter dokazati bakteriocidno delovanje kurkumina oz. kurkuminoidov na bakterijo *S. aureus*. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da uporaba različnih topil vpliva na učinkovitost ekstrakcije in sestavo ekstraktov, ter dokazali, da imajo kurkumin in ostali kurkuminoidi v kurkumi protimikrobne lastnosti. Najboljši izkoristek in najboljša sestava ekstrakta kurkume sta bila pri ekstrakciji s topilom diklorometanom. Pri delu smo uporabili metode konvencionalne ekstrakcije, tankoplastno kromatografijo, filtracijo in mikrodilucijo.

Influence of Different Solvents on Extraction of Curcuminoids and Their Antimicrobial Activity on *Staphylococcus aureus*

AJDA BRKOPEC, LARA REDEK ŽNIDARŠIČ, ŠPELA GRMOVŠEK, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Grm Agricultural School and Biotechnical Grammar School
Supervisor: **Vojka Zupančič**, Grm Novo mesto – Centre of Biotechnics and Tourism, Grm Agricultural School and Biotechnical Grammar School

Turmeric is a traditional Indian plant containing many active substances, particularly curcuminoids. Curcumin, the most known curcuminoid, is an active ingredient of turmeric and has been investigated for more than 2000 years due to its anti-inflammatory and other health beneficial effects, which have contributed to its use in alternative medicine as a spice and nutritional supplement. The purpose of our project work was to identify curcuminoids in turmeric with an emphasis on curcumin and to test their antimicrobial efficiency on Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. We wanted to establish whether the use of various solvents affects the efficiency of extraction and composition of extracts that we obtained from fresh and dry turmeric, and to prove the bactericidal activity of curcumin and other curcuminoids on *Staphylococcus aureus*. Based on the obtained results, we found that the use of various solvents influences the efficiency of extraction and composition of extracts and proved that curcumin and other curcuminoids of turmeric have antimicrobial characteristics. The best utilisation rate and composition of turmeric extract were with extraction by a solvent dichloromethane. We used methods of conventional extraction, thin layer chromatography, filtration and microdilution.

Prisotnost pesticidov in zdravilnih učinkovin v reki Ledavi

ANDREJ PLANINŠEK, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana
Mentor: **Robert Roškar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: **Darja Silan**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

Poleg embalaže, izpušnih plinov iz vozil in ogrevalnih naprav človek v okolje negativno posega z uporabo fitofarmacevtskih izdelkov, predvsem v poljedelstvu, in z uporabo zdravil. Veliko teh spojin se lahko kopči v okolju in imajo škodljive učinke na živali, lahko pa prehajajo tudi v prehranjevalno verigo ljudi. Razvoj analiznih metod, kakršna je masna spektroskopija, in njihova dostopnost omogočata spremljanje prisotnosti fitofarmacevtskih sredstev in zdravilnih učinkovin v različnih vodnih vzorcih. V vzorcih vode iz reke Ledave smo med oktobrom 2016 in aprilom 2019 zaznali sedem določenih pesticidov v majhnih koncentracijah. Za primerjavo smo analizirali vodo iz treh jezer v Prekmurju in v njih prav tako zaznali prepovedane in dovoljene pesticide. Analizirali smo tudi pitno vodo v Murski Soboti. V začetku leta 2019 smo v reki Ledavi na šestih odvzemnih mestih vzdolž njenega toka od avstrijske do hrvaške meje merili prisotnost 50 zdravilnih učinkovin. Na vseh odvzemnih mestih smo jih zaznali 47. Nadaljnje spremljanje prisotnosti zdravilnih učinkovin in pesticidov v površinskih vodah bo v prihodnosti omogočalo proučevanje vplivov na okolje in načrtovanje aktivnosti za zmanjševanje koncentracij.

Presence of Pesticides and Active Pharmaceutical Substances in the Ledava River

ANDREJ PLANINŠEK, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana Grammar School
Supervisor: **Robert Roškar**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: **Darja Silan**, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana Grammar School

In addition to packaging, exhaust gases from vehicles and heating devices, the human environment is negatively affected by use of plant protection products, mainly in agriculture, and the use of medicines. Many of these compounds can accumulate in the environment and have harmful effects on animals, but they can also pass into the food chain of humans. The development of analytical methods, such as mass spectroscopy, and their accessibility enable the monitoring of the presence of plant protection products and active pharmaceutical substances in various water samples. Between October 2016 and April 2019, we detected seven identified pesticides in water samples from the Ledava River in low concentrations. For comparison, we analysed water from three lakes in Prekmurje and detected prohibited and allowed pesticides in them. We also analysed drinking water in Murska Sobota. At the beginning of 2019, the presence of 50 active pharmaceutical substances in the Ledava River was measured at six extraction sites along its current from the Austrian to the Croatian border. Forty-seven were detected at all extraction sites. Further monitoring of the presence of active pharmaceutical substances and pesticides in surface waters will enable the study of environmental impacts and the planning of activities to reduce their concentrations in the future.

Vpliv genetske variabilnosti glutation S-transferaz na tveganje za pojav malignega mezotelioma

MAJ BAVEC, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija

Mentorica: **Katja Goričar**, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: **Marjeta Prašnikar**, Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija

Maligni mezoteliom (MM) je agresiven tumor, povezan z izpostavljenostjo azbestu. Genetska variabilnost proteinov, ki sodelujejo pri odstranjevanju kisikovih reaktivnih spojin (ROS), bi lahko vplivala na tveganje za nastanek MM. Glutation S-transferaze (GST) so proteini, ki iz celice odstranjujejo lipidne perokside. V genih za GST so prisotni polimorfizmi, ki lahko vplivajo na učinkovitost odstranjevanja ROS in s tem na tveganje za nastanek MM. Namen raziskave je bil ugotoviti, ali polimorfizmi v genih *GSTM1*, *GSTT1* in *GSTP1* vplivajo na tveganje za nastanek MM in metastaz pri MM. Izvedli smo raziskavo primerov s kontrolami. Primerov je bilo 230, kontrol pa 212. Primeri so bili bolniki z MM, kontrole pa preiskovanci, ki so bili poklicno izpostavljeni azbestu in niso zboleli za nobeno azbestno boleznijo. Za določanje polimorfizmov v genih *GSTM1*, *GSTT1* in *GSTP1* smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo in agarozno gelsko elektroforezo. Vpliv polimorfizmov na tveganje za pojav MM ali metastaz smo določali z logistično regresijo. Pri bolnikih z delečijo gena *GSTM1* je bila verjetnost za pojav metastaz (razmerje obetov = 0,38; 95%-interval zaupanja = 0,17–0,83; p = 0,016) 2,6-krat manjša. Ostali polimorfizmi v naši raziskavi niso vplivali na pojav metastaz, prav tako noben proučevani polimorfizem v genih za GST ni vplival na tveganje za pojav MM.

Influence of Genetic Variability in Glutathione S-Transferases on Malignant Mesothelioma Risk

MAJ BAVEC, St. Stanislav's Institution, Diocesan Classical Gymnasium

Supervisor: **Katja Goričar**, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Marjeta Prašnikar**, St. Stanislav's Institution, Diocesan Classical Gymnasium

Malignant mesothelioma (MM) is an aggressive tumour associated with asbestos exposure. Genetic variability of proteins involved in removal of reactive oxygen species (ROS) could influence the risk for developing MM. Glutathione S-transferases (GSTs) are proteins that help remove dangerous lipid peroxides from the cells. Common polymorphisms are present in genes coding for GSTs and they might affect the efficacy of ROS removal and therefore influence the MM risk. The aim of our study was to determine if genetic variability of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes influences the risk for developing MM or metastases. We performed a case-control study. We included 230 cases and 212 controls. The cases included MM patients, while controls were subjects that were occupationally exposed to asbestos but did not develop any asbestos-related disease. For the analysis of polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes, we used polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis. We used logistic regression to assess the association of investigated polymorphisms with MM risk or development of metastases. MM patients with *GSTM1* gene deletion had a 2.6-lower odds of developing metastases (odds ratio = 0.38; 95% confidence interval = 0.17–0.83; p = 0.016). Other investigated polymorphisms were not associated with development of metastases in MM patients. None of the investigated polymorphisms in GST genes was associated with MM risk in our study.

Biološka aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu na humane celice

JULIJA KOLETNIK, II. gimnazija Maribor

Mentor: **Uroš Maver**, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Somentorica: **Petra Kotnik**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

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

V naši primerjamo biološko aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu na humane črevesne epitelne celice (HUIEC). Surov rastlinski material je obdelan s superkritičnim CO₂ in nato ekstrahiran z ekstrakcijo po Soxhletu ali z ultrazvočno ekstrakcijo. Po določitvi antioksidacijske učinkovitosti ekstraktov in vsebnosti izbranih spojin v njih smo vodne raztopine ekstraktov nanesli na celice HUIEC ter preverili njihovo obnašanje ob prisotnosti raztopin. Najvišje vrednosti antioksidacijske učinkovitosti so izkazali ekstrakti, ekstrahirani z uporabo topila 50-odstotnega etanola. Ob nanosu na črevesne celice pri razredčini 1 : 32 je ekstrakt, ekstrahiran z uporabo ultrazvočne kopeli s 50-odstotnim etanolom, izkazal najpozitivnejši učinek na povečano viabilnost celične kulture (126,26%). Ugotavljamo, da so ekstrakti sladkega pelina z visokimi vrednostmi antioksidacijske učinkovitosti ob nanosu na humane črevesne celice HUIEC najbolj vzpodbujali celično rast.

Bioactivity of *Artemisia annua* L. Extracts Applied to Human Intestinal Cell Line

JULIJA KOLETNIK, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Uroš Maver**, Faculty of Medicine, University of Maribor

Co-supervisor: **Petra Kotnik**, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Maribor

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

The purpose of the research was to compare the safety and efficiency, in other words, bioactivity of *Artemisia annua* L. extracts when applied to human epithelium intestine cells, also known as HUIEC. The crude plant material was processed with supercritical CO₂, followed by Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extraction. After determining the antioxidative efficiency of the extracts and their quantitative content of the selected compounds using the DPPH method and liquid chromatography/mass spectrometry, the aqueous solution of the extracts was applied to the HUIEC cells and the cell viability was determined using the MTT method. The highest antioxidant efficiency was shown by the extracts obtained using a solvent of 50% ethanol. When applied to the intestinal cells at a dilution of 1:32, the extract prepared using an ultraviolet bath with 50% ethanol showed the most significant effect on the increased cell culture viability (126.26%). We found that the extracts of sweet pepper stimulated the cell growth the most and presented high values of antioxidant efficacy when applied to human intestinal cells (HUIEC).

Optimizacija in primerjava cenovno dostopnih metod za ekstrakcijo klorofila iz raztopine kiefa

TJAŠA LUZAR, MATEVŽ TURK, LANA JEGLIČ, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Tanja Gačnik, Gimnazija Novo mesto

Somentor: Uroš Ocepek, Gimnazija Novo mesto

Somentorica: Eva Tavčar Benković, Patron, d. o. o.

Številni pozitivni učinki konopljinih kanabinoidov in terpenov na človekovo zdravje so ključni dejavnik za njihovo vse večjo uporabo. Najpogostejši obliki, v kateri se nahajajo, sta koncentrirana smola in kapljice. Priprava kapljic je dokaj enostavna: rastlino za nekaj minut namočimo v nepolarno topilo in kanabinoidi ter terpeni bodo skoraj v celoti difundirali iz rastline v tako raztopino. Toda tu se pojavi problem. Zaradi delno nepolarne strukture iz rastline deloma preidejo tudi molekule klorofila, ki takim kapljicam ali olju drastično znižajo tržno vrednost, saj je končni produkt neprijetnega okusa in hitreje pokvarljiv. Klorofil lahko iz raztopine odstranimo z metodo ekstrakcije s superkritičnim CO₂, ki selektivno ekstrahira le zelo nepolarne molekule, toda naprave za ta način ločbe so za manjše predelovalce konoplje prevelika naložba. Našo raziskovalno nalogu smo zato posvetili iskanju optimalnega in cenovno dostopnejšega načina ekstrakcije klorofila iz raztopine kanabinoidov in terpenov. Najučinkovitejši postopek za pripravo razredčenega olja je ekstrakcija s H₃PO₄, za pripravo koncentrirane kanabinoidne smole pa ekstrakcija z aktivnim ogljem.

Optimisation and Comparison of Affordable Methods of Chlorophyll Extraction from Kief Solutions

TJAŠA LUZAR, MATEVŽ TURK, LANA JEGLIČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Tanja Gačnik, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Co-supervisor: Uroš Ocepek, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Co-supervisor: Eva Tavčar Benković, Patron d.o.o.

Numerous benefits of cannabinoids and terpenes of cannabis on human health are the main reason for their increased use and production every year. They are most commonly available in concentrated resin or drops. The preparation of drops is simple: the plant is soaked in a non-polar solvent for a couple of minutes to let cannabinoids and terpenes diffuse almost entirely from the plant into the solution. However, here is where the problem arises – due to its partly non-polar structure, the molecules of chlorophyll also pass over from the plant. These molecules of chlorophyll drastically lower the market value of drops or oil and not only give the final product a bitter and unpleasant taste but also make it highly perishable. Chlorophyll can be removed from the solution with different methods. One of them is the super fluid CO₂ method, which selectively extracts only very non-polar molecules; however, equipment for such separation methods is too big of an investment for small cannabis processors. Therefore, we dedicated our research project to the quest for an optimum and affordable method of separating chlorophyll from the solution of cannabinoids and terpenes. The most effective procedure for preparing impure oil is the extraction with H₃PO₄, followed by the extraction with active charcoal which is recommended for the preparation of concentrated resin.

Ugotavljanje vsebnosti artemisinina v različnih pripravkih sladkega pelina

MAŠA CAPELLO, EVA JERAN, I. gimnazija v Celju

Mentorica: Mojca Plevnik Žnidarec, I. gimnazija v Celju

Somentorica: Katarina Vogel Mikuš, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Vraziskovalni nalogi smo določali vsebnost artemisinina v različnih pripravkih iz sladkega pelina (*Artemisia annua* L.). Ta naj bi poleg učinkovitega zdravljenja malarije, v ta namen se namreč danes uporablja po celem svetu, povečevanja imunske odpornosti, blaženja bolečin, zdravljenja herpesov in glivic imel velik potencial tudi za zdravljenje rakavih obolenj. Zanimalo nas je, ali lahko rastlino vzgojimo sami in iz nje pripravimo različne pripravke. Ko nam je to uspelo, smo želeli raziskati in ugotoviti, koliko artemisinina vsebujejo tako pripravljeni vzorci v primerjavi z nam bolj znanim navadnim pelinom. Za ugotavljanje vsebnosti artemisinina smo uporabili spektroskopsko metodo UV-VIS in dobljene rezultate ovrednotili glede na zastavljena raziskovalna vprašanja oziroma hipoteze. Ugotovili smo, da je vzgoja sladkega pelina zelo preprosta, pridelek pa obilen. Iz svežih oziroma posušenih delov rastline smo brez večjih težav pripravili čaj, hidrolat in tinkture, ki so bili naši vzorci za nadaljnjo analizo. Rezultati spektroskopske analizne metode so pokazali, da je največ artemisinina v tinkuri, pridobljeni iz cvetoče rastline sladki pelin. Iz ugotovitev sklepamo, da je vsebnost artemisinina odvisna od vrste pelina in okolja, v katerem je vzgojen.

Content of Artemisinin in Different Preparations of Sweet Wormwood

MAŠA CAPELLO, EVA JERAN, I. Gimnazija Celje Grammar School

Supervisor: Mojca Plevnik Žnidarec, I. Gimnazija Celje Grammar School

Co-supervisor: Katarina Vogel Mikuš, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

This research deals with the content of artemisinin in different preparations of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.). Artemisinin is used all over the world for the treatment of malaria and is effective in improving the immune system, alleviating the pain, and treating herpes and fungal skin infections; moreover, it should also have the potential for treating cancer. We were interested in finding out whether we could grow the plant and make different preparations out of it. We succeeded and wanted to determine the content of artemisinin in our samples in comparison to common wormwood. We used UV-VIS spectroscopy method and interpreted the results according to hypotheses. We found that the cultivation of sweet wormwood is simple and abundant. We easily made tea, hydrolat and tincture out of its fresh leaves and used them for further analysis. The results showed the highest artemisinin content in the tincture made out of fresh leaves of sweet wormwood. Based on the results we conclude that the artemisinin content depends on the type of wormwood and on its cultivation environment.

Nov način priprave vzorcev in stabilizacije papirja z nanosom pigmenta verdigris

MITJA DENAC, BOR KOLAR BAČNIK, Gimnazija Vič

Mentorica: ALENKA MOZER, Gimnazija Vič

Somentorica: JANA KOLAR, CERIC-ERIC

Somentorica: JASNA MALEŠIČ, Narodna in univerzitetna knjižnica

Pigment verdigris razgraje papir, na katerega je nanesen, zato je veliko zgodovinsko pomembnih dokumentov in zemljevidov ogroženih. V nalogi smo opisali kako, poteka razgradnja, ter na podlagi tega razvili metodo stabilizacije papirja, ki razgradnjo in njene negativne posledice, ki se kažejo v temnjenju in krhkosti papirja, zmanjša. To nam je uspelo z uporabo antioksidanta. Prav tako smo pokazali, da pigment verdigris, ki je iz bakrovega acetata, med staranjem razpada v strupen bakrov oksid, kar je pomembna informacija za vse zaposlene na tem področju.

New Techniques of Sample Preparation and Stabilisation of Papers with Pigment Verdigris

MITJA DENAC, BOR KOLAR BAČNIK, Gimnazija Vič Grammar School

Supervisor: ALENKA MOZER, Gimnazija Vič Grammar School

Co-supervisor: JANA KOLAR, CERIC-ERIC

Co-supervisor: JASNA MALEŠIČ, National and University Library

The pigment Verdigris degrades the paper onto which it is applied. Therefore, many important historic documents and maps are in danger. In the research, we described the mechanism of this degradation and, as a result, developed a successful paper stabilisation technique. This technique minimises the negative effects of the degradation, which include a decrease in fibre strength and darkening of the paper. We managed to achieve this with the use of an antioxidant. We also found that verdigris, which mostly consists of copper acetate, degrades into poisonous copper oxide. This is very useful information for everyone working in this field.

Arzen v rižu na slovenskem trgu

ANA GROBLER, LEON GORŠE, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: ZDENKA ŠLEJKOVEC, Institut Jožef Stefan

Somentorica: MARINKA KOVAČ, Gimnazija Novo mesto

Riž je osnovno živilo in pomemben prehranski vir anorganskega arzena. Bolje kot večina rastlin absorbira arzen iz prsti, zaradi česar vsebuje veliko več anorganskega arzena kot ostala žita. Arzen je dobro znan toksin, ki se v povečanih koncentracijah pojavlja v številnih regijah po svetu. Akumulacija arzena v poljščinah lahko predstavlja tveganje za različna obolenja pri človeku. Anorganske arzenove spojine (arzenit in arzenat) so zelo toksične, organske arzenove spojine (monometilarzenova kislina – MMA, dimetilarzenova kislina – DMA) pa so manj nevarne. Dolgotrajna izpostavljenost anorganskemu arzenu povzroča kožnega raka, raka mehurja, pljučnega raka. V zadnjih desetletjih se je prek kontaminirane vode in hrane zastrupilo na milijone ljudi. Pomembno se je zavedati negativnih učinkov, ki jih ima prisotnost arzena v rižu, saj se uživanje riža povečuje za 1,1 % na leto. Pri raziskovanju smo ugotovljali vsebnost skupnega arzena in posameznih arzenovih spojin (arzenit, arzenat, MMA, DMA) v 24 vzorcih riža na slovenskem tržišču. Skupna koncentracija arzena v vzorcih je variirala od 51,8–265 ng/g. V večini vzorcev je močno prevladoval arzenit, prav vsi so vsebovali tudi DMA, medtem ko sta bila arzenat in MMA le v nekaterih vzorcih in še to običajno v manjših koncentracijah. Z raziskovanjem smo dokazali, da neoluščen ozioroma delno oluščen riž vsebuje več skupnega arzena, kar je posledica njegovega kopiranja v lupini riževega zrna. V večini vzorcev je bila koncentracija anorganskega arzena (arzenit + arzenat) bistveno večja od koncentracije organskega arzena (MMA + DMA), noben vzorec pa ni presegel predpisane mejne vrednosti za koncentracijo anorganskega arzena v rižu, ki znaša 200 ng/g za beli (brušeni) riž in 250 ng/g za rjavi (integralni, nebrušen) riž. Kljub temu da prav vsi vzorci riža, ki smo jih analizirali, vsebujejo anorganski arzen, je riž primeren za uživanje, saj koncentracije anorganskega arzena ne presegajo mejnih vrednosti. Znanstvene raziskave in odkritja na področju kemije prispevajo k večji ozaveščenosti ljudi in hkrati pomagajo zmanjševati negativne učinke arzena v rižu.

Arsenic in Rice on the Slovenian Market

ANA GROBLER, LEON GORŠE, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: ZDENKA ŠLEJKOVEC, Jožef Stefan Institute

Co-supervisor: MARINKA KOVAČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Rice is a staple food and a significant dietary source of inorganic arsenic. Rice absorbs arsenic from soil more easily than other plants, which is why it contains higher concentrations of arsenic than other cereals. Arsenic is a well-known toxin, which occurs naturally in many world regions. The accumulation of arsenic in food crops may pose a health risk to humans. Inorganic arsenic compounds (arsenate and arsenite) are very toxic, while organic arsenic compounds (monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid) are less. Long-term exposure may cause skin cancer, bladder or lung cancer. In recent decades, millions of people have suffered from arsenic poisoning as a result of arsenic-contaminated water or arsenic-contaminated foods. As rice consumption around the world continues to grow steadily at around 1.1 per cent per annum, it is important to be aware of drawbacks that arsenic has in rice. In our research, we determined the content of total arsenic and individual arsenic compounds (arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid) in twenty-four samples of rice on the Slovenian market. The concentrations of total arsenic ranged from 51.8 ng/g to 265 ng/g. We also determined that samples of brown rice contain higher total concentrations of arsenic as a result of arsenic accumulation in the rice bran. In most rice samples, the concentration of inorganic arsenic (arsenate + arsenite) was seemingly higher in comparison with organoarsenic (MMA + DMA). Inorganic arsenic levels in all samples were lower than the regulatory limits defined as 200 ng/g for white (polished) rice and 250 ng/g for brown (unpolished, integral) rice. Furthermore, all samples were within the regulations set by EFSA (European Food Safety Authority). We can conclude that findings and advancements in chemistry help to minimise the health risks associated with rice consumption.

Imobilizacija lipaze na GMA poliHIPE monolit in uporaba za hidrolizo 4-nitrofenil butirata

KAJA ZUPANČIČ, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorja: **Peter Krajnc, Muzafera Paljevac**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza Maribor

Somentorica: **Nina Žuman**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

S pomočjo literature sem se seznanila s polimeri, poliHIPE materiali, z njihovimi lastnostmi, morfologijo, uporabo in z imobilizacijo encima. Z eksperimentalnim delom pa sem uspešno sintetizirala porozni polimerni material na osnovi funkcionalnega monomera GMAja, kar sem nato okarakterizirala s FTIR-spektroskopijo, vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), elementnim analizatorjem in adsorpcijo/desorpcijo dušika. Ugotovila sem, da je bila imobilizacija lipaze na poliHIPE materialu uspešna, kar mi je potrdil rumeno obarvani kompleks, ki nastane pri taki reakciji. Potek dela in vsi rezultati so predstavljeni v nalogi.

Immobilisation of Lipase onto GMA PolyHIPE Monolith and Use for Hydrolysis on 4-Nitrophenyl Butyrate

KAJA ZUPANČIČ, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

Supervisors: **Peter Krajnc, Muzafera Paljevac**, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor

Co-supervisor: **Nina Žuman**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

I got familiar with polymers, polyHIPE materials, their characteristics, morphology, use, and enzyme immobilisation by studying scientific writings. With the experimental work, I successfully synthesised porous polymeric material on the basis of functional monomer GMA, which I then characterised with FTIR spectroscopy, SEM, elemental analyser and with absorption/desorption of nitrogen. I concluded that the immobilisation of lipase on polyHIPE material was successful; this was confirmed by the yellow coloured complex. The course of the work and all the results are presented in the paper.

Posledice delovanja brioporina in hidralizina 2 na različne celice

LAN VUKOLIČ, Gimnazija Vič

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

Somentorica: **Maja Čemažar**, Onkološki inštitut Ljubljana

Somentorici: **Sonja Artač, Maja Gerden**, Gimnazija Vič

Porotvorni proteini (PFP) tvorijo pore v celičnih membranah. Raziskovali smo možnosti uporabe dveh strukturno različnih PFP-jev, brioporina in hidralizina 2, pri zdravljenju raka. Določili smo njune citotoksične učinke ter možnost permeabilizacije membran različnih celičnih linij. Temperatura faznega prehoda pri obeh proteinih je približno 55 °C, hitrost hemolize je pri obeh večja v okolju z nižjim pH-jem, zato bi bila oba proteina stabilna in *in vivo* aktivna, saj je medceličnina rakavih tkiv bolj kisla od zdravih tkiv. S povečanjem prepustnosti membran tumorskih celic bi lahko dosegli boljšo dostavo zdravil v tarčne celice.

Effects of Bryoporfirin and Hydralysin 2 on Different Cell Types

LAN VUKOLIČ, Gimnazija Vič Grammar School

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

Co-supervisor: **Maja Čemažar**, Institute of Oncology Ljubljana

Co-supervisors: **Sonja Artač, Maja Gerden**, Gimnazija Vič Grammar School

Pore-forming proteins (PFPs) form pores in cell membranes. We decided to study two new PFPs, bryoporfirin and hydralysin 2, in cancer treatment. We tested their cytotoxic effects and the ability to permeabilise the cell membrane on different cell types. The temperature of half phase aggregation of both proteins was around 55°C and the test of hemolytic activity of both proteins showed that hemolysis is even better at lower pH values. According to our results, both proteins satisfy the needs for *in vivo* use. The extracellular matrix of cancer cells is more acidic than in normal cells. Consequently, pore formation is more effective on cancer cells than on non-cancer cells, which may improve the target-cell drug delivery.

Primerjava antimikrobne učinkovitosti evgenola, indol-3-karbinola in karvona s triklosanom

ANA BRENCE, II. gimnazija Maribor

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

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

Bolnišnične okužbe (BO) predstavljajo največji delež okužb, povezanih z zdravstvom, in so eden od večjih javnozdravstvenih problemov v svetu, Evropi in Sloveniji. Proti BO se borimo predvsem z večjo higieno rok in uporabo biocidov, ki lahko imajo nevarne učinke tako za bolnike kot tudi za zdravstvene delavce. V raziskovalni nalogi smo iskali manj nevarno alternativo, ki so jo predstavljale tri naravne učinkovine, in sicer evgenol, indol-3-karbinol in karvon. Njihovo antimikrobno in antioksidativno učinkovitost smo primerjali s trenutno v zdravstvu zelo razširjenim biocidom triklosanom. Ugotovili smo, da je antimikrobna učinkovitost evgenola primerljiva z antimikrobno učinkovitostjo triklosana, poleg tega je evgenol izjemno močan antioksidant. V nalogi smo proučevali učinek dveh koncentracij evgenola, in sicer 0,5% in 5,0% (posamično in v mešanici s karvonom in I3C), ter ugotovili, da že 0,5% koncentracija evgenola lahko predstavlja učinkovito antimikrobno zaščito na nerjavnih površinah jekla, prav tako pa poveča antimikrobni učinek bakra. Zaradi intenzivnega vonja evgenola in njegove zmožnosti inhibicije encimov predlagamo, da se kot antimikrobno sredstvo prouči v obliki ustreznega polimernega nanosa, ki bo preprečil neposreden stik z bolnikom/zdravstvenim delavcem, obenem pa onemogočil rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

Comparison of Antimicrobial Efficiency of Eugenol, Indole-3-Carbinol and Carvone with Triclosan

ANA BRENCE, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Supervisor: **Zdenka Keuc**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Co-supervisor: **Tamara Šiško**, II. Gimnazija Maribor Grammar School

Hospital-acquired infections (HAI) are the largest proportion of healthcare-associated infections (HAI or HCAI) and one of the major public health problems in the world, Europe and Slovenia. We currently fight HAI with increased hand hygiene and with the use of biocides, which can have dangerous side effects for both, patients and health professionals. In the research, our objective was to find a less dangerous alternative with three natural substances: eugenol, indole-3-carbinol and carvone. We compared their antimicrobial and antioxidant efficiency with a currently widely used biocide in healthcare, triclosan. We found that eugenol has a comparable antimicrobial efficiency to triclosan, while it is also an extremely potent antioxidant. We studied the efficiency of two concentrations of eugenol, namely 0.5% and 5% (individually and in a mixture with carvone and indole-3-carbinol). It was found that eugenol has an effective antimicrobial protection on stainless steel surfaces with a concentration of 0.5% and that it increases the antimicrobial effect of copper. Due to the intense smell of eugenol and its enzyme inhibition capabilities, we suggest that it be considered as an antimicrobial agent in the form of an appropriate polymer application, which will prevent a direct contact with a patient/healthcare professional and at the same time disable the growth and reproduction of microorganisms.

Ozkolistni trpotec

NIK VIDMAR, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: **Branka Klemenčič**, Gimnazija Novo mesto

V raziskovalni nalogi smo proučevali ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*). Z metodo HPLC smo določali vsebnost katalpola, avkubina in akteozida v vzorcih čaja ozkolistnega trpotca, nabranega v različnih časovnih obdobjih, in jo primerjali z vsebnostjo omenjenih zdravilnih učinkovin v kupljenih čajih in v različnih pripravkih, ki vsebujejo ozkolistni trpotec. Proučevali smo tudi vpliv temperature in svetlobe na vsebnost katalpola, avkubina in akteozida ter določili najustreznejše pogoje za shranjevanje vzorcev. Pripravili smo predloge za nadaljnje raziskovalno delo, predvsem možnost določanja antimikrobnega delovanja pripravkov iz ozkolistnega trpotca.

Plantago lanceolata

NIK VIDMAR, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: **Branka Klemenčič**, Gimnazija Novo mesto Grammar School

In the research project, we studied *Plantago lanceolata*. Using the HPLC method, we determined and compared the content of catalpol, aucubin and acteoside in the samples of tea of *Plantago lanceolata* collected over different periods of time with the content of the mentioned active substances in purchased teas and in various preparations containing *Plantago lanceolata*. We also studied the effects of temperature and light on the content of catalpol, aucubin, and acteoside, and determined the most appropriate conditions for the storage of samples. We brought forward some proposals for further research work, especially as the possibility of determining the antimicrobial activity of preparations from *Plantago lanceolata*.

Odstranjevanje Cu²⁺ iz modelnih vodnih raztopin z magnetnim nanoadsorbentom na osnovi razvejanega aminopolimera polietilenimina

NEŽA ZANJKOVIČ, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorica: Mateja Godec, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Somentorica: Olivija Ploh, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

Odpadne vode, onesnažene s presežnimi mejnimi vrednostmi težkih kovin, danes predstavljajo vedno večji problem, saj so težke kovine lahko toksične za žive organizme. Čiščenje vode s primerno modificiranimi magnetnimi nanodelci je ena od najbolj obetajočih metod. V svoji raziskovalni nalogi sem želela ugotoviti, kateri so najprimernejši parametri za uspešno adsorpcijo Cu²⁺ iz modelnih vodnih raztopin z uporabo magnetnih nanodelcev, prevlečenih s tanko plastjo porozne silikatne prevleke (SiO₂), in funkcionaliziranih z derivatom na osnovi aminopolimera polietilenimina. V raziskavah sem spremenjala pogoje adsorpcije, kot so koncentracija adsorbenta, koncentracija ionov Cu²⁺ in pH-vrednost, da bi ugotovila, kateri so najprimernejši pogoji za čim učinkovitejši proces adsorpcije. Ugotovila sem, da so magnetni nanodelci MND@SiO₂@bPEI zelo učinkoviti pri odstranjevanju bakra. Na učinkovitost vplivata tako količina adsorbenta kot količina Cu²⁺.

Removing Cu²⁺ from Aqueous Model Solutions with Magnetic Nanoadsorbent Functionalised with Amino-Polymer Polyethyleneimine

NEŽA ZANJKOVIČ, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

Supervisor: Mateja Godec, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School

Co-supervisor: Olivija Ploh, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor

Wastewater contaminated with heavy metals in higher amounts than allowed is an increasing problem nowadays, as heavy metals can be toxic to living organisms. Water treatment with properly modified magnetic nanoparticles has been proven to be one of the most promising methods. In my research, I wanted to determine the most suitable parameters for successful Cu²⁺-adsorption from aqueous model solutions by using magnetic nanoparticles coated with a thin amorphous silica (SiO₂) layer and further functionalised with an amino-polymer polyethyleneimine derivative. I studied the influence of the concentration of the adsorbent, the concentration of Cu²⁺ ions, and the pH value in order to find the most suitable conditions for an efficient adsorption process. I have found that magnetic nanoparticles MND@SiO₂@bPEI are very effective in removing copper. The effectiveness is influenced by the amount of adsorbent as well as the amount of Cu²⁺.

Vpliv mil z dodatkom ricinusovega olja na barierno funkcijo kože

IMAM HUSSEIN, TEJA ŠUŠTARŠIČ, TEA PIRC, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

Pravilna skrb za kožo in njena nega sta zelo pomembni za zdravje in dobro počutje posameznika. Pri tem je najpomembnejša izbira izdelka, ki je prilagojen vsakodnevni uporabi in obvaruje barierno funkcijo kože. Pri kozmetičnih izdelkih, ki jih kupimo v trgovinah, to ni vedno zagotovljeno, zato v zadnjem času vse bolj narašča priprava lastnih mil in izdelkov za osebno higieno iz preverjenih in za kožo primernih sestavin. Naš cilj je bil pripraviti gele za tuširanje, jih preizkusiti in spremljati njihov vpliv na različne kožne parametre. Za potrebe raziskovalne naloge smo proučili literaturo in pregledali sestavine najpogosteje uporabljenih izdelkov za vsakodnevno nego. Pripravili smo štiri gele z različno sestavo in posledično tudi različnim pH-jem. Za izdelavo smo uporabili že pripravljene milne osnove in poiskali ustrezno razmerje med dodatki, da bi dobili obstojno homogeno zmes. Gele je preizkusilo 10 testirancev, pri petih smo spremljali tudi vpliv dveh gelov z različnim pH-jem in dodatkom ricinusovega olja na barierno funkcijo kože.

Effect of Castor Oil Soap on Skin Barrier Function

IMAM HUSSEIN, TEA PIRC, TEJA ŠUŠTARŠIČ, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Supervisor: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto Grammar School

Proper skin care is essential for the health and well-being of every individual. One of the most important factors in maintaining healthy skin is choosing skin care products for daily use that do not impair the skin barrier function. However, not all skin products on the market are safe. Recently we have noticed a rise in home-made soaps and personal hygiene products containing safe and skin friendly ingredients. Therefore, the main purpose of our research was to make shower gels, test them and observe their effect on the skin surface parameters. For this purpose we studied available literature and the most commonly used ingredients in skin care products for daily use. We prepared four shower gels with different ingredients and consequently different pH levels. We used pre-established soap bases for the production of gels and focused on finding appropriate ratios between the added ingredients in order to create a homogeneous substance. The gels were tested on 10 participants, five of whom used two gels with different pH levels and castor oil additives so that we could monitor their effects on the skin barrier function.

Funkcionalizacija PE/PP folij s koloidno formulacijo hitozan/naravni ekstrakt in določitev njihove protimikrobne učinkovitosti

URŠKA SEVER, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Mentorica: **Mateja Godec**, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Somentorica: **Sanja Potrč**, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

V okviru raziskovalne naloge sem uspešno sintetizirala hitozanske nanodelce z ujetimi ekstrakti timijana in rožmarina, nanesla nanodisperzije na PE- in PP-folije in na koncu določila, kako premazi hitozana in nanodelcev vplivajo na protimikrobnost folij. Cilj naloge je bil dokazati, da hitozanski nanodelci z ujetimi ekstrakti timijana oziroma rožmarina povečajo protimikrobnost folij, kar pri embalažnem pakiranju vpliva na kakovost in varnost živil. Nanodelce sem sintetizirala z metodo ionotropnega geliranja, tako da sem k raztopini hitozana sočasno dodajala raztopino TPP-ja in ekstrakt. Hitozan in nanodelce sem na folije nanesla z metodo sitotiska (tiskanje z magnetom). Folje sem poslala na Biotehniško fakulteto v Ljubljani, kjer so opravili mikrobiološka testiranja in določili protimikrobnoučinkovitost pripravljenih folij na dve bakteriji (*S. aureus*, *E. coli*) in dve plesni (*A. flavus*, *P. verrucosum*).

Functionalisation of PE/PP Foils with Colloidal Formulation Chitosan/Natural Extract and Determination of Their Antimicrobial Efficiency

URŠKA SEVER, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School
Supervisor: **Mateja Godec**, Gimnazija Franc Miklošič Ljutomer Grammar School
Co-supervisor: **Sanja Potrč**, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor

As part of the research project, I successfully synthesised chitosan nanoparticles with encapsulated thyme and rosemary extracts, applied a nanodispersion to PE and PP foils and ultimately determined how chitosan and nanoparticles affect the antimicrobial properties of foils. The purpose of the research was to demonstrate that chitosan nanoparticles with encapsulated thyme or rosemary extracts increase antimicrobial activity of foils, which affects the quality and safety of packaged food. I synthesised the nanoparticles with the ionotropic gelation method, by simultaneously adding a TPP solution and an extract to chitosan solution. I applied chitosan and nanoparticles to the foil using the screen printing method (magnet printing). I sent the foils to the Biotechnical Faculty in Ljubljana, where they performed microbiological tests and determined the antimicrobial efficiency of the prepared foils on two bacteria (*S. aureus*, *E. coli*) and two examples of mould (*A. flavus*, *P. verrucosum*).

Koloidno srebro v dentalnih produktih

ULA DRAGMAN, LAURA DRAŠLER, Gimnazija Vič
Mentorica: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič
Somentorica: **Anja Drame**, Institut Jožef Stefan

V raziskovalni nalogi smo objektivno predstavili pozitivne in negativne lastnosti koloidnega srebra oziroma nanosrebra, ki se vse pogosteje uporablja v različnih izdelkih. Osredotočili smo se na dentalne produkte, saj z njihovo uporabo delno zaužijemo tudi prisotne nanodelce. Analizirali smo tri izdelke. S kolorimetrično detekcijo smo žeeli zaznati vsebnost nanosrebra v dentalnih produktih in ugotoviti, ali je ta metoda primerna za vse tri type izdelkov. Rezultate kolorimetrične detekcije smo preverili z rezultati, ki smo jih dobili z uporabo drugih metod karakterizacije (SEM, DLS). Poleg tega smo za preverjanje metode izvedli biosintezo in dobili približno 100 nm velike srebove nanodelce, ki smo jih uporabili kot referenčni vzorec. S karakterizacijo dentalnih produktov smo ugotovili, da je vsebnost nanodelcev zelo majhna oziroma je nismo zaznali. Ker je bila kolorimetrična detekcija referenčnega vzorca uspešna, lahko potrdimo, da s to metodo zaznamo prisotnost nanosrebra, vendar ni primerna za vzorce, ki imajo lastno obarvanost. Tudi analiza SEM se je pokazala za učinkovito pri zaznavanju nanosrebra v referenčnem vzorcu, a ni primerna za analizo kompleksnih vzorcev, ki vsebujejo organske snovi.

Colloidal Silver in Dental Products

ULA DRAGMAN, LAURA DRAŠLER, Gimnazija Vič Grammar School
Supervisor: **Alenka Mozer**, Gimnazija Vič Grammar School
Co-supervisor: **Anja Drame**, Jožef Stefan Institute

In the presented research assignment, we objectively presented the positive and negative properties of the colloidal/nanosilver, which is increasingly used in different consumer products. We focused on dental products where the nanoparticles are partially consumed. We used colorimetric detection to identify the content of nanosilver in three different products and assessed the suitability of this method for the analysis. The results of colorimetric detection were compared with the results obtained using other characterisation methods (e.g. SEM, DLS). In addition, we used biosynthesis to create approximately 100 nm large silver nanoparticles, which we used as a reference sample. Using the characterisation, we discovered that the content of nanoparticles in dental products is very low or undetectable. As the colorimetric detection of the reference sample proved successful, we can confirm that this method can be used to assess the presence of nanosilver. However, it is not suitable for samples with their own coloration. The SEM analysis proved to be effective in detecting nanosilver in the reference sample, but it is not suitable for analysing complex samples containing organic substances.

Primerjava laserja in vodne kopeli pri odmrzovanju krvi

TAJDA KBLAR, Gimnazija Poljane

Mentor: Rok Rudež, Gimnazija Poljane

Somentorica: Nina Kostevšek, Institut Jožef Stefan

V raziskovanju in medicini se uporabljajo velike količine krvi. S pomočjo fizikalnih metod (centrifugiranje, filtriranje ipd.) odvzeto enoto polne krvi ločijo na posamezne sestavine. To naredijo zato, da bi izolirali želeno komponento, ki jo potrebujejo pri raziskavah ali zdravljenju. Sestavine je treba shraniti pod optimalnimi pogoji, saj vsako odstopanje vpliva na viabilnost celic in kakovost komponent krvi. V nalogi sem raziskovala krioprezervacijo rdečih krvnih celic ter primerjala učinkovitost laserja in vodne kopeli pri odmrzovanju krvi. Pri delu sem uporabljala molekulo, ki jo imenujemo IR-820. To je barvilo, ki sem ga izbrala zaradi fototermičnega efekta, pri katerem se absorbirana svetloba pretvorí v toploto. Določala sem hemokompatibilnost barvila in primerjala zamrzovanje celic z barvilm in brez barvila ter ocenila stopnjo hemolize po odtajanju. Vzorci krvi so bili zamrznjeni s tekočim dušikom (-196°C) in shranjeni v skrinji na -80°C . Med odtajevanjem sem s termovizijsko kamero spremembno temperature. Ugotovila sem, da je delež preživelih celic največji pri uporabi laserja z močjo 5 W pri vzorcih brez dodanega barvila. V hitrosti segrevanja vzorcev ni bilo bistvene razlike, če je bilo barvilo uporabljeni ali ne. Iz tega lahko sklepamo, da izkorisčanje njegovega fototermičnega efekta ni najboljši način, ker celice že same absorbirajo dovolj energije in se tako odtajajo. Ugotovila sem tudi, da je IR-820 v vzorcih povzročil celično smrt in da je bolje, da ga sploh ne uporabljam. Uporaba laserja pri odtajevanju krvi je primerljiva z vodno kopeljo, celo boljša je kot vodna kopel. Hkrati pa je še veliko prostora za optimizacijo tega postopka, ki bi vodila do občutnega izboljšanja preživetja celic.

Comparison of Laser- and Water Bath-Based Thawing Process of Frozen Red Blood Cells

TAJDA KBLAR, Gimnazija Poljane Grammar School

Supervisor: Rok Rudež, Gimnazija Poljane Grammar School

Co-supervisor: Nina Kostevšek, Jožef Stefan Institute

A large amount of blood is used for research and medical purposes every day. By using physical methods such as filtration and centrifugation, particular components can be separated from the whole blood. These components must be stored under optimal conditions because every inconsistency affects the cell viability and the quality of the blood components. In the scope of this research project, I investigated the cryopreservation of red blood cells. Moreover, the efficiency of laser- and water bath-based thawing of frozen red blood cells was compared, and the temperature was monitored in real time using a thermal imaging infrared camera. In the research, a dye molecule, called IR-820, was used due to its high photothermal effect. That means that the dye efficiently converts the absorbed light into thermal energy, i.e. heat. The hemocompatibility of IR-820 dye was determined. Then, the red blood cells were instantly frozen with or without the addition of the dye using liquid nitrogen (-196°C) and kept in a freezer at -80°C . After thawing, the degree of hemolysis was evaluated. The best results in terms of cell viability were in the samples that contained no IR-820 dye and were thawed using a 5W laser. There was no significant difference in the speed of thawing between the samples with and without IR-820 dye. In conclusion, the addition of highly-absorbing IR-820 dye is not needed because it does not accelerate the thawing process and it even showed significant hemotoxicity after the thawing process. Therefore, laser-assisted thawing alone was shown to be sufficient to obtain a comparable degree of hemolysis to that of water bath, which is usually used for such applications. Importantly, laser-assisted thawing approach gave comparable or even slightly better results than the water bath, but there is still a lot of potential for the optimisation of this procedure that would lead to a significant improvement of cell survival.

Priprava ekstraktov navadne smreke (*Picea abies*), bogatih z aktivnim borneolom, ter njihova aktivnost in delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*)

MAJA GRIL, JAKOB ŠIVAVEC, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

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

Mentorja: Robert Susič, Irena Kralj Cigic, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehologijo, Univerza v Ljubljani

Borneol je organska spojina, ki se nahaja v več kot 260 rastlinah, predvsem v iglavcih. Je sestavina številnih eteričnih olj, ki so v smoli iglavcev. Pogosto se uporablja kot dišava v izdelkih za čiščenje in kot ojačevalec okusa. Dokazane so njegove antimikrobne in insekticidne lastnosti, zato je večkrat tudi v repelentih. Zelo je priljubljen tudi v tradicionalni kitajski medicini, kjer ga zaradi antikoagulantnih lastnosti uporablja za zdravljenje in preprečevanje bolezni srca in ožilja. V projektnem delu je opisana ekstrakcija borneola iz lesa in iglic navadne smreke (*Picea abies*) s topiloma n-heksan in diklorometan. Kvantitativno vsebnost diklorometana smo v vzorcih določili s pomočjo plinske kromatografije s plamensko ionizacijskim detektorjem. V zadnjem delu projekta smo raziskovali tudi učinek delovanja maceratov in borneola na modelni organizem kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Živost modelnega organizma smo določali z indirektnim štetjem kolonij na trdih gojiščih (CFU), in s spektrofotometričnim določanjem optične gostote v tekočih gojiščih. Rezultati projektnega dela so pokazali, da borneol in preostale učinkovine, ki so prisotne v ekstraktih iz lesa in smrekovih iglic, učinkujejo na modelni organizem. S poskusi izolacije v splošnem pokažemo, da je diklorometan kot ekstrakcijsko topilo učinkovitejši kot n-heksan. Iz rezultatov analiz s plinsko kromatografijo je razvidno, da je v iglicah večja koncentracija borneola kot v lesu.

Preparation of Norway Spruce Extracts (*Picea abies*) Rich with Active Borneol and Its Effect on Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

MAJA GRIL, JAKOB ŠIVAVEC, Biotechnical Education Centre Ljubljana, General Upper Secondary School and Veterinary Technician School

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

Supervisors: Robert Susič, Irena Kralj Cigic, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Borneol is an organic compound, which is found in more than 260 plants, mainly in deciduous trees. It is present in etheric oils that may be found in resin of trees with needles. It is often used as a fragrance in cleaning products and as a food additive. Owing to its proven antimicrobial and insecticidal properties, it is also a common ingredient of many repellents. Furthermore, borneol is very popular in traditional Chinese medicine, where it is used as anticoagulant for the treatment and prevention of cardiovascular diseases. The present project describes the extraction of borneol from wood and needles of Norway Spruce (*Picea abies*) with hexane and dichloromethane as solvents. Biological activity of borneol and its effect on yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) are described along with the results of gas chromatography with a flame ionisation detector. We tracked the vivacity of the model organism with indirect counting, meaning that we were counting the number of colonies on solid agar in petri dishes (CFU), and spectrophotometric measurements, giving us the amount of unabsorbed light. The research has shown that borneol and other compounds in extracts from wood and pine needles have an effect on the model organism. We discovered that the amount of borneol is greater in the needles, as opposed to the wood. The results of gas chromatographic analyses have shown that dichloromethane is a more efficient solvent than hexane.

KAZALO AVTORJEV

65	Tina Barborič	99	Imam Hussein	80	Lara Redek Žnidaršič
82	Maj Bavec	78	Tamara Jarm	58	Blaž Regina
75	Lea Benčina	84	Lana Jeglič	64	Ula Savšek
54	Davide Benedetto Tiz	85	Eva Jeran	100	Urška Sever
57	Maruša Bizjak	78	Deja Juriševič	88	Maša Starman
60	Tina Brec	73	Lidija Kač	74	Maša Sterle
96	Ana Brence	67	Tjaž Kobal	68	Nika Strašek
80	Ajda Brkopeč	102	Tajda Koblar	79	Ana Šenica
85	Maša Capello	56	Hristina Kocić	103	Jakob Šivavec
79	Vanesa Cvelbar	86	Bor Kolar Bačnik	32	Katja Škrlec
91	Žiga Česen	83	Julija Koletnik	61	Jan Štos
86	Mitja Denac	20	Klemen Korasa	89	Timotej Šuman
101	Ula Dragman	93	Nuša Kos Thaler	99	Teja Šuštaršič
101	Laura Drašler	59	Matic Kovačič	84	Matevž Turk
92	Niko Farič	93	Lana Krmelj	55	Dunja Urbančič
79	Nika Godec	26	Nika Kruljec	63	Danijel Videc
87	Leon Gorše	53	Urša Lamprecht Tratar	97	Nik Vidmar
38	Darja Gramec Skledar	69	Kaja Lenarčič	88	Tadeja Vidmar
103	Maja Gril	76	Barbara Ljubec	90	Aleksandra Vujanović
80	Špela Grmovšek	84	Tjaša Luzar	95	Lan Vukolić
62	Andrej Grobin	77	Eleonora Marini	98	Neža Zanjkovič
87	Ana Grobler	91	Ana Mestinšek Mubi	94	Kaja Zupančič
92	Blaž Gubič	44	Rok Narobe		
72	Ema Guštin	99	Tea Pirc		
70	Žan Hribar	81	Andrej Planinšek		
66	Sara Hrovat	71	Nina Podjed		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

92	Urban Ajdnik	93	Sandra Janežič	84	Uroš Ocepek	67	Urška Šebenik
74	Marko Anderluh	103	Marko Jeran	94	Muzafara Paljevac	96	Tamara Šiško
61	Samo Andrenšek	91	Marjetka Kastelic Švab	57	Mojca Pavlin	87	Zdenka Šlejkovec
95	Sonja Artač	89, 96	Zdenka Keuc	72	Miha Pavšič	84	Eva Tavčar Benković
34	Aleš Berlec	54	Danijel Kikelj	77	Beatrice Perissutti	53	Nataša Tozon
28	Tomaž Bratkovič	97, 99	Branka Klemenčič	78	Gašper Pernek	71	Iztok Turel
76	Darija Cör	76	Maša Knez Hrnčič	72	Toni Petan	85	Katarina Vogel Mikuš
95	Maja Čemažar	86	Jana Kolar	40	Lucija Peterlin Mašič	22, 60	Franc Vrečer
90	Irena Dogša	46	Burkhard König	57	Sergej Pirkmajer	74	Matjaž Weiss
78	Črt Dragar	102	Nina Kostevšek	63	Odon Planinšek	54	Nace Zidar
101	Anja Drame	70	Janez Košmrlj	59	Janez Plavec	80	Vojka Zupančič
60	Aleša Dular Vovko	83	Petra Kotnik	85	Mojca Plevnik Žnidarec	73	Bojana Žegura
61	Matjaž Finšgar	87	Marinka Kovač	98	Olivija Plohl	58	Polona Žnidaršič Plazl
64	Wolfgang Frieß	94	Peter Krajnc	95	Marjetka Podobnik	94	Nina Žuman
84	Tanja Gačnik	78	Slavko Kralj	100	Sanja Potrč		
75	Mirjana Gašperlin	103	Irena Kralj Cigić	66	Franc Požgan		
95	Maja Gerden	90	Darja Kravanja	82	Marjeta Prašnikar		
92, 98, 100	Mateja Godec	64	Julijana Kristl	79	Janja Pust		
56	Aleksandar Godić	56	Tomaž Langerholc	62, 81	Robert Roškar		
82	Katja Goričar	63	Dejan Lamešič	102	Rok Rudež		
77	Iztok Grabnar	86	Jasna Malešič	81	Darja Silan		
69	Ester Heath	83	Uroš Maver	88	Gašper Jan Simon		
75	Marianne Hiorth	55	Irena Mlinarič Raščan	69, 73	Marija Sollner Dolenc		
83, 93	Katja Holnhaner Zorec	86, 101	Alenka Mozer	88	Katja Strašek Smrdel		
22	Grega Hudovornik	65	Janez Mravljak	103	Robert Susič		
46	Jernej Iskra	28, 76	Zoran Novak	68	Jurij Svete		

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Maja Oberstar Falkner, Tanja Sluga Kobe

Jezikovni pregled (slovenski jezik) Marta Anžlovar, Ksenija Kosem

Prevod in jezikovni pregled (angleški jezik) Mojca Ceferin, Meta Hauptman, Katarina Tomc, Karmen Ulčnik, Simona Žgeč

Produkcija Tanja Balantič, Klaudija Sečen, Elizabeta Vrhovec-Krevelj

Fotografije Andrej Križ

Tisk Tiskarna VEK

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

www.krkinenagrade.si

