

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/211



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J2-2249
Naslov projekta	Analiza funkcionalizacije ter mobilnosti magnetnih nanodelcev in vitro za uporabo v biomedicinskih aplikacijah
Vodja projekta	19411 Vladimir B. Bregar
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4172
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	2431 NANOTESLA INSTITUT - Razvojni center nanotehnologij na področju magnetnih materialov in kompozitov
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	2 TEHNIKA 2.21 Tehnološko usmerjena fizika
Družbeno-ekonomski cilj	13.02 Tehnološke vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	2.10
- Veda	2 Tehniške in tehnološke vede
- Področje	2.10 Nanotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Nanodelci (ND) v kombinaciji s terapevtskimi molekulami predstavljajo eno izmed najpomembnejših novih metod za ciljan vnos učinkovin, izmed teh pa magnetni nanodelci MND predstavljajo poseben nosilni sistem, ki ga je mogoče usmerjati z magnetnim poljem. Za uspešno uporabo tovrstnih v biomedicinskih in biotehnoloških

aplikacijah pa je ključno: razvoj ustreznih ND za določeno aplikacijo, kvantitativno ovrednotenje učinkovitosti funkcionalizacije ND z makromolekulami (biopolimeri, DNA, ligandi,...), karakterizacija v bioloških medijih, ovrednotenje mobilnosti različno funkcionaliziranih MND v in vitro modelu tkiva ter interakcija ND z biološkimi sistemi. Kvalitetna karakterizacija ter analiza v relevantnih bioloških medijih z visoko vsebnostjo proteinov in ionov je ključna tako za razvoj aplikacij kot tudi za vedno bolj aktualno področje nanotoksikologije. Zato smo razvili metodo analize funkcionalizacije ND z meritvami AC magnetne susceptibilnosti; določitev hidrodinamskega radija ter časovno dinamiko suspenzije magnetnih ND. Nadalje smo izvedli obširno raziskavo vpliva sestave biološko relevantnih medijev na stabilnost oziroma agregacijo širšega nabora pozitivno in negativno nabitih ND na osnovi kobalt-ferita in maghemita. Pojasnili smo mehanizem agregacije zaradi divalentnih ionov in vezave proteinov na površino. Pokazali smo, da razumevanje mehanizmov interakcije ND s komponentami medija omogoča vnaprejšnje načrtovanje funkcionalizacije ND za dano aplikacijo, ki omogoča stabilnost ter s tem optimalen privzem v celice. Na podlagi pridobljenega znanja sinteze in karakterizacije smo že izvedli tudi študijo dinamike vnosa kobalt-feritnih ND in njihove znotrajcelične usode na CHO celicah, ter določili poti vnosa.

Vzporedno smo razvili 3D numerični model ki omogoča izračun magnetne sile, ki deluje na magnetne ND zaradi zunanega magnetnega polja. Model omogoča sklopitev magnetostatskih izračunov z izračuni magnetoforeze. Z uporabo magnetoforeze na gelskem sistemu smo določili mobilnosti različnih ND, vzporedno smo razvili tudi 3D in vitro model celic vgrajenih v kolagenski matriks, ki nam bo omogočal izračun tipičnega dosega MND pri realnih jakostih in trajanju magnetne sile.

Na osnovi pridobljenega znanja sinteze, funkcionalizacije ter karakterizacije ND smo v nadaljevanju zasnovali razvoj ustrezno funkcionaliziranih magnetnih ND ciljno načrtovanih za multimodalnost (vizualizacija, vnos učinkovin, specifično ciljanje), skupaj z ustrezno karakterizacijo pa nam omogočajo razvoj novih biomedicinskih aplikacij. Osredotočili smo se na razvoj biokompatibilnih ND za vizualizacijo ter razvoj ND za magnetofekcijo – vnos genov z magnetnimi ND. Magnetofekcija na osnovi naših ND je že uspešno prenesena na in vivo imunogeno terapijo [Prijič et al., 2012], in vitro pa smo tudi potrdili potencial druge vrste ND za vizualizacijo (early cancer diagnostics) in sledenje celic (labeling) [Bregar et al., 2013], v pripravi je tudi mednarodni patent.

ANG

Nanoparticles (NP) in combination with therapeutic molecules represent one of the most promising new methods for targeted drug delivery, with magnetic NPs offering also the possibility of manipulation of NP with the external magnetic field. Successful applications of magnetic NPs in biotechnological and biomedical fields require accurate design of NPs for the specific purpose, validation of functionalization efficiency with different macromolecules (biopolymers, DNA, ligands etc.), characterization of NPs in physiologically relevant media, evaluation of NP mobility in in vitro tissue models and determination of interactions between NPs and biological systems.

The quality of characterization and analysis in biologically relevant media with high protein and ion content is essential for proper development of the application as well as for the increasingly important nanotoxicological assessments. We thus developed a method for analysis of functionalization based on the measurements of AC magnetic susceptibility: determination of the hydrodynamic radius and time dynamics of NPs in suspension. We also assessed the importance of the composition of biologically relevant media for stability and aggregation of several positively and negatively charged cobalt-ferrite or maghemite NPs. We explained the mechanisms of aggregation as a result of binding of divalent ions and proteins on the surface of NPs. We show that understanding of the mechanisms of interactions between NPs and medium components helps predesign NP properties for the chosen application: their stability and desired interactions with the cells. Based on this knowledge, we designed and fluorescently labeled highly stable cobalt-ferrite NPs and characterized their interactions with CHO cells.

Moreover, we developed a 3D numerical model, which enables to calculate the

magnetic forces applied on the NPs due to external magnetic field. The model enables coupling magnetostatic and magnetoforetic calculations. We determined the mobility of different NPs in gels using magnetoforesis and developed a 3D in vitro model of cells, grown on a collagen matrix, which will enable us to determine the mobility of NPs exposed to chosen strengths and durations of applied magnetic force.

Based on acquired knowledge on synthesis, functionalization and characterization we developed functionalized multimodal magnetic NP, suitable for visualization, drug delivery and targeted delivery, which will enable us to develop new biomedical applications. We focused on biocompatible NP for imaging and magnetofection (transfection using magnetic NP). Our NPs for magnetofection were already successfully introduced in vivo immunogenic therapy [Prijič et al., 2012], moreover, based on in vitro experiments another type of our NPs proved suitable for early cancer diagnostics and cell tracking [Bregar et al., 2013], for which we are also preparing an international patent.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Izhodišče/hipoteza: Kvalitetna karakterizacija nanodelcev ter predvsem analiza v relevantnih bioloških medijih je ključna tako za nanotoksikologijo kot tudi za razvoj nanobiotehnoloških in biomedicinskih aplikacij. Pomemben izziv pri karakterizaciji ND predstavlja izvajanje meritev pri fizioloških pogojih, ki oponašajo ali so podobni stanjem v in vivo pogojih. Ob tem je pomembna tudi karakterizacija vezave in funkcionalizacije makro in bio-molekul na MND ter razumevanje obnašanja funkcionaliziranih in nefunkcionaliziranih MND v realističnih in vitro ter in vivo sistemih. Ključni namen projekta je bilo razviti metode za karakterizacijo MND v bioloških sistemih, razumeti mehanizme agregacije ND v biološko relevantnih medijih ter analizirati interakcijo ND z biološkimi sistemi.

Na osnovi pridobljenega znanja sinteze, funkcionalizacije ter karakterizacije nanodelcev smo v nadaljevanju i) razvili funkcionaliziranih MND ciljno načrtovanih za multimodalnost (vizualizacija, vnos učinkovin, specifično ciljanje), ii) izvedli analizo stabilnosti MND v biološko relevantnih medij ter razlago mehanizmov destabilizacije, iii) razvili eksperimentalne in numerične modele za analizo mobilnosti MND v 3D in vitro modelih tkiv za analizo interakcij in načrtovanje magnetnih sistemov za in vivo aplikacije, iv) izvedli študijo dinamike in vizualizacije vnosa MND in njihove znotrajcelične usode na CHO celicah, ter določili poti vnosa.

Ključni rezultati/znanstvena spoznanja:

SKLOP 1- Razvoj in analiza metode magnetne susceptibilnosti za merjenje hidrodinamskega radija nanodelcev: V okviru Sklopa 1 smo zasnovali in postavili sistem za merjenje hidrodinamskega radija (h-radija) na osnovi magnetne AC susceptibilnosti (AC suscept.). Za evaluacijo tega in komercialnega optičnega merilnega sistema na osnovi dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) smo izdelali več testnih suspenzij magnetnih nanodelcev (MND) (kobalt ferit- CoFe_2O_4 ali magnetit- Fe_3O_4) z različnimi velikostmi primarnih aglomeratov, ki smo jih nadalje površinsko funkcionalizirali. Nanodelce smo karakterizirali z rentgensko spektroskopijo, s presevnim elektronskim mikroskopom, določitev specifične površine, in z meritvijo magnetizacije materiala. Pokazali smo, da je za magnetne meritve pomembnejša velikost osnovnih delcev kot primarnih aglomeratov, kar je potencialno pomembno tudi za magnetno hipertermijo. Rezultati obeh sistemov se kvalitativno ujemajo za MND na osnovi CoFe_2O_4 , medtem ko Fe_3O_4 MND ne dajo uporabnega magnetnega signala in smo jih lahko merili le z DLS sistemom. Enako velja tudi za heterogene površinsko funkcionalizirane ND, zato smo uporabljali obe metodi v nadaljnjem delu.

Za oba merilna sistema smo določili nabor ključnih parametrov testiranih vzorcev. Trenutni AC suscept. sistem ima koncentracijsko ločljivost dosti manjšo kot pri optičnem sistemu, vendar je možno z nadgradnjo to ločljivost precej izboljšati. S primerjavo meritev golih in oplaščenih MND smo potrdili detekcijo spremembe h-radija zaradi plašča, vendar zaradi polidisperznosti suspenzij le za povprečne vrednosti radija.

Pri analizi časovne dinamike smo razvili hitri merilni protokol za AC suscept., ki omogoča meritve dinamike v sekundnem območju. Krajšanje časovne resolucije pri DLS postopku je pomembno

poslabšalo natančnost že pri precej daljših časih meritev. Za analizo ločljivosti po tipu ND smo karakterizirali mešanice dveh ali treh različnih stabilnih sistemov MND, kjer izstopa AC suscept. z zmožnostjo specifične detekcije endodemenskih ND v mešanicah drugih ND.

Na podlagi teh analiz je bila izvedena interna ocena patentabilnosti nekaterih vidikov AC suscept. sistema, v pripravi je izvirni znanstveni članek. Poleg samega razvoja/izboljšave metode AC suscept smo na podlagi protokolov in znanja pridobljenih tekom sklopa 1 lahko izvedli karakterizacijo v fiziološko relevantnih medijih ter načrtovali ustrezne MND za biomedicinske aplikacije.

SKLOP 2: Karakterizacija funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev – določanje hidrodinamskega radija, kinetična analiza vezave/sproščanja, in študija konformacij makromolekul

V okviru Sklopa 2 smo razvili in optimizirali postopke priprave stabiliziranih in funkcionaliziranih ND na osnovi magnetnih jeder in biopolimernih plasti, ki so relativno stabilni v fizioloških pogojih in primerni za biomedicinske aplikacije.

Funkcionalizacijsko plast smo izvedli z uporabo različnih organskih makromolekul, ki je lahko sestavljena iz več plasti različnih materialov. Tako pripravljene ND smo poleg meritve h-radija karakterizirali z diferenčno kalorimetrijo, meritvijo zeta potenciala, masno magnetizacijo, difraktometrijo z rentgenskimi žarki, ter ovrednotili stabilnost teh suspenzij v različnih medijih. Parametri funkcionalizacije vplivajo na debelino in kakovost plasti, zato smo lahko z meritvijo h-radija identificirali stopnjo funkcionalizacije MND.

Karakterizacija je potrdila možnost ponovljive priprave stabilnih večplastnih nanodelcev, ki so biokompatibilni ter s fleksibilno sestavo za različno nadaljnjo funkcionalizacijo, z meritvami pri različnih pogojih pa smo tudi pokazali, da je stabilizacija dosežena tako elektrostatsko kot tudi delno sterično.

Z nadaljnim razvojem na AC suscept. merilnem sistemu smo prilagodili sistem za sprotno merjenje v reakcijski posodi ter prvi analizirali in pokazali neobčutljivost sistema na mehansko ali magnetno mešanje merilnega vzorca, karo mogoča uporabo takšnega sistema za sprotno spremljanje sinteznih reakcij tudi na industrijski skali.

S takšnim sistemom smo nadaljevali delo na meritvi kinetike reakcij in suspenzij in ugotovili, da je kljub hitrim meritvam večina procesov površinske funkcionalizacije hitrejša kot je časovna resolucija sistemov. Z analizo tarčnih točk smo določili časovno dinamiko procesa pri inducirani aglomeraciji drugače stabilnih disperzij.

Nadaljevali smo delo na površinski funkcionalizaciji, kjer smo razvijali različne postopke elektrostatske in kovalentne vezave makromolekul ali funkcionalnih molekul, npr. fluorescentnih barvil. Razvili smo protokol fluorescentnega barvanje negativno nabitih ND ter kovalentno vezavo na pozitivno nabite ND preko aktivne skupine NH₂. Fluorescentno obarvani ND omogočajo sprotno spremljanje internalizacije nanodelcev v celice in vitro in njihovo znotrajcelično usodo. To nam je omogočilo tudi spremljanje dinamike celične internalizacije, kvantifikacijo privzema ND ter korelacijo z toksičnostjo, kar nam je odprlo tudi nove smeri raziskovanja na področju nanotoksikologije, prejeli pa smo tudi nagrado na mednarodni konferenci s 400 udeleženci za najboljši poster iz področja Nanotoksikologije na 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN12).

Razviti protokol kovalentne vezave pa nam omogoča tudi vezavo ligandov in protiteles zanimivih za biomedicinske aplikacije. Trenutno razvijamo protokol vezave citostatika na novo vrsto nanodelcev za terapijo raka urotelija v sodelovanju z Medicinsko fakulteto UL.

Za uporabo ND v biomedicinskih aplikacijah je ključno poznavanje velikosti, površinskega naboja ter agregacije v biološko relevantnih pogojih. Ker se je do sedaj pokazalo v vrsti študij, da se velikokrat sicer stabilni ND agregirajo v fizioloških razmerah, smo se osredotočili na analizo agregacije in optimalne funkcionalizacije z ustreznimi biopolimeri ter na analizo mehanizma stabilizacije/agregacije v fiziološko relevantnih medijih.

Pokazali smo, da so ustrezno funkcionalizirani MND lahko relativno stabilni tudi v različnih biološko relevantnih medijih, stopnja agregacije pa je močno odvisna od sestave medija. Specifično smo analizirali vpliv dvovalentnih ionov ter prisotnost seruma in sam mehanizem destabilizacije. Pokazali smo, da je stabilnost elektrostatsko stabiliziranih ND odvisna od molarne koncentracije in valence prisotnih ionov. Ugotovili smo, da prisotnost in vezava proteinov ter predvsem divalentni ioni lahko ključno vplivajo na destabilizacijo preko mehanizma ionskega mosta. To kaže na to, da je za uporabo ND v biomedicini nujna karakterizacija v fiziološko relevantnih pogojih, da lahko razumemo interakcije ND z biološkimi sistemi ter ocenimo potencialne možnosti vnosa in toksičnosti. Nadalje lahko z razumevanjem mehanizmov destabilizacije predvidevamo efekte v različni medijih ter s tem ustrezno prilagodimo protokole oziroma načrtovanje ND.

SKLOP 3: Analiza mobilnosti in interakcij funkcionaliziranih nanodelcev v gelih in in vitro modelih tkiva z gelsko elektroforezo/magnetoforezo

Ena od glavnih omejitev za magnetni vnos učinkovin je doseganje učinkovitih koncentracij MND in učinkovine v ciljnem tkivu, saj je mobilnost ND v tkivnih strukturah omejena in odvisna od njihove velikosti/agregacije. Zato je pomembno poznavanje mobilnosti ND v in vitro 3D modelih. Uporabili dva pristopa, dejanske meritve na gelih kot prvih približkih tkiva, ter numerično modeliranje mobilnosti. Vzporedno smo tudi razvili 3D model celic vgrajenih v kolagenski matriks, ki vodi k 3D in vitro modelu tkiva.

Za gelsko magnetoforezo smo uporabili agarozne gele, v katerih smo določili gibljivosti različnih MND

Z magnetoforezo za dve različni geometriji. Nadalje smo razvili 3D numerični model na osnovi metode končnih elementov, ki sklaplja izračun porazdelitev magnetnega polja za realno geometrijo z analitičnim izračunom sile na MND ter sklopitev z difuzijsko-konvekcijsko enačbo, kar upošteva hkrati magnetoforezo in difuzijo. Analizirali smo magnetno silo za različne postavitve, ter izračunali časovno dinamiko in koncentracijsko distribucijo ($c(z,t)$). Pokazali smo, da je eden ključnih parametrov, ki določa mobilnost v tkivu, tvorba večjih aglomeratov nanodelcev pri fizioloških pogojih ter interakcija nanodelcev z okoliškim matriksom. Numerični model in eksperimentalne meritve so pokazale da pri preveliki agregaciji delci ne morejo prodirati skozi agarozni del, pri funkcionaliziranih stabilnih MND pa je mobilnost bistveno večja. Ti eksperimentalni in numerični modeli služijo kot dodatna karakterizacija razvitih nanodelcev, v pripravi pa je tudi širša študija na 3D in vitro sistemu.

Nadalje smo razširili študijo interakcije na analizo interakcije med nanodelci in biološkimi celicami. Izvedli smo in vitro študijo interakcije med celicami CHO in MND oblečenimi s poliakrilno kislino (PAA). S pomočjo fluorescenčne mikroskopije ter presevalne in vrstične elektronske mikroskopije smo določili mehanizem endocitotne poti vnosa in njihovo znotrajcelično usodo, ter stopnjo agregacije. Kot prvi smo s SEM slikanjem opazili prvo fazo vnosa, kjer so nanodelci ujeti v del uvihane membrane. Celice so hitro privzele nanodelce kot majhne agregate, preko makropinocitoze in od klatrina odvisne endocitoze. Glede na rezultate je v pripravi tudi mednarodna patentna prijava.

Učinki rezultatov projekta in njihova uporaba

Pridobljeno znanja sinteze, funkcionalizacije, karakterizacije in analize interakcij s celicami nam je skupaj s sodelujočimi in drugimi raziskovalnimi skupinami omogočilo razvoj biomedicinskih aplikacij na osnovi nanodelcev. Razviti nanodelci so platforma na kateri sedaj razvijamo tri specifične biomedicinske aplikacije. Že tekom projekta smo se osredotočili na razvoj biokompatibilnih netoksičnih ND za vizualizacijo ter razvoj nanodelcev za magnetofekcijo (vnos genov z MND). V okviru projekta smo sodelovali z raziskovalno skupino iz Onkološkega Inštituta Ljubljana tudi pri razvoju in izboljšavi metode magnetofekcije za vnos DNK v celice. Posebno za to metodo smo funkcionalizirali večplastne MND ter sodelovali pri določitvi protokola izvajanja magnetofekcije, kjer funkcionalizirani MND tvorijo komplekse s plazmidi za ustrezne gene in s pomočjo zunanjega magnetnega sistema uspešno prenašajo ta plazmid v celično citoplazmo. Magnetofekcija na osnovi naših nanodelcev je že uspešno prenesena na in vivo imuno-gensko terapijo, in vitro pa smo tudi potrdili potencial druge vrste delcev za vizualizacijo in sledenje celic).

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

V okviru projekta smo predvideli realizacijo rezultatov:

- D1: postavitev sistema na osnovi magnetne susceptibilnosti za karakterizacijo MND
- D2: določitev ključnih parametrov za optični in magnetni merilni sistem
- D3: Hidrodinamski radiji za različno funkcionalizirane ND
- D4: Analiza interakcij med DNK in ND pri različnih testnih pogojih
- D5: Parametri za karakterizacijo hidrodinamskega radija v časovni domeni – analiza kinetike
- D6: Zasnova in implementacija gelske elektroforeze in magnetoforeze za meritve na MND
- D7: Teoretična in eksperimentalna analiza mobilnosti ND ter interakcij v in vitro modelu tkiva

Vsi predvideni glavni rezultati so bili realizirani, kar je razvidno iz podrobnejšega opisa rezultatov ter objavljenih dosežkov. V okviru tega smo izvedli vse predvidene specifične naloge, vendar pa so nekateri rezultati odstopali od pričakovanih in smo aktivnosti prilagodili z namenom najuspešnejše realizacije pridobljenih znanj.

Poleg prilagoditve merilnih protokolov na polidisperzne suspenzije zaradi težav pri pripravi monodisperznih suspenzij, smo se zaradi omejenih možnosti kovalentne vezave makromolekul na površino ND osredotočili na fizisorpcijsko funkcionalizirane ND. Prav tako smo načrtovali širšo

analizo konformacij makromolekul, vendar smo se zaradi ugotovljenega potenciala razvitih postopkov osredotočili na razvoj funkcionalizacije za magnetofekcijo ter za označevanja celic. Zaradi uspešno razvitih MND ter protokolov vezave fluorescentnih barvil, smo se odločili za vzporedno delo tako na analizi mobilnosti MND v 3D gelih kot modelu tkiva, kot tudi že na prvi študiji interakcije MND s celicami in vitro.

Glavni rezultati projekta:

- 6 SCI člankov, od katerih je eden v najvišji kategoriji, ter 15 prispevkov na mednarodnih konferencah
- Razvoj metod in protokolov za karakterizacijo v fizioloških pogojih
- Razvoj serije funkcionaliziranih MND za biomedicinske aplikacije, razumevanje mehanizmov stabilizacije ter elektrostatike je omogočilo nadaljnjo funkcionalizacije s plazmidno DNK ali fluorescentnimi barvili
- Postavitev sistema meritve mobilnosti z magnetoforezo, razvoj 3D numeričnega modela difuzije in magnetoforeze
- Že implementirana in vivo biomedicinska aplikacija na osnovi MND za imuno-gensko terapijo raka v sodelovanju z Onkološkim Inštitutom (vodja projekta je bil tudi vodja razvoja MND za to delo), v teku je razvoj dveh novih metod za terapijo raka ter za označevanje celic in vivo
- Analiza interakcije in znotrajcelične usode na bioloških celicah in vitro, kar omogoča nadaljnji razvoj MND za biomedicinsko uporabo
- Projekt je povezal različne raziskovalne skupine na Nanotesla Inštitutu, Onkološkem Inštitutu, FE UL ter MF UL, ter omogočil prehod od sinteze, karakterizacije ter funkcionalizacije ND do in vitro poskusov ter končnih aplikacij

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

V letu 2011 je bila vključena v projektno skupino dodatna sodelujoča raziskovalna organizacija Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani. Razloga za vključitev dodatne sodelujoče raziskovalne organizacije je dejstvo, da na Nanotesla Inštitutu Ljubljana ni na razpolago ustrezne raziskovalne infrastrukture za izvedbo tretjega delovnega sklopa ter tako zadovoljivo dokončanje projekta. Dodatna sodelujoča raziskovalna organizacija (Fakulteta za elektrotehniko, UL) ima na voljo ustrezno infrastrukturo tako za izvedbo numeričnega modeliranja kot tudi za izvedbo eksperimentalnega dela na mobilnosti v gelskih sistemih, ki sta ključna dela tretjega delovnega sklopa predlaganega načrta izvedbe projekta. Na nosilni raziskovalni organizaciji (Nanotesla Inštitut Ljubljana) ostaja za izvedbo projekta na voljo obstoječa raziskovalna infrastruktura za sintezo in karakterizacijo nanomaterialov, tako da smo s to vključitvijo zagotovili vso potrebno infrastrukturo ter ekspertizo za dokončanje izvedbe predvidenega programa dela. Vključitev FE UL je omogočila tudi karakterizacijo in analizo interakcije nanodelcev in vitro na bioloških celicah, kar je odprlo možnost novih sodelovanj s tujino in drugimi skupinami v Sloveniji.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	9593172	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Stabilnost suspenzij nanodelcev v različnih biološko relevantnih medijih
		<i>ANG</i>	Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media
			Za uporabo ND v biomedicinskih aplikacijah je ključno poznavanje velikosti, površinskega naboja ter agregacije v biološko relevantnih pogojih. Osredotočili smo se na karakterizacijo maghemitnih in kobalt feritnih nanodelcev z različnimi prevlakami v različnih mediji (gojišča za celice, fiziološka raztopina), merili smo hidrodinamski radij in zeta potencial. Pokazali smo, da so naši PAA delci relativno zelo stabilni tudi v različnih biološko relevantnih medijih, kjer je stopnja agregacija močno odvisna od sestave medija. Specifično smo analizirali vpliv dvovalentnih ionov ter prisotnost seruma in mehanizem destabilizacije. Pokažemo, da je stabilnost elektrostatsko stabiliziranih delcev odvisna od molarne koncentracije in

Opis	SLO	valence prisotnih ionov kot npr. Na ⁺ or Mg ²⁺ kjer je učinkoviti površinski naboj ter s tem odbojna sila (ključna za stabilizacijo) zmanjšana zaradi prisotnosti protiionov (counterions). Ugotovili smo, da pristonost in vezava proteinov (formiranje proteinske korone) ter predvsem divalentni ioni lahko ključno vplivajo na destabilizacijo. To kaže na to, da je za uporabo ND v biomedicine potreba nujna karakterizacija v fiziološko relevantnih pogojih ali v primeru biotehnoških aplikacij v ustreznem celičnem gojišču. Le tako lahko razumemo interakcijo ND z biološkimi sistemi ter ocenimo potencialne možnosti vnosa in toksičnosti. Nadalje lahko z razumevanjem mehanizmov destabilizacije predvidevamo efekte v različni medijih ter s tem ustrezno prilagodimo protokole oziroma načrtovanje nanodelcev.	
	ANG	For application of nanoparticles (NPs) as delivery vectors for biomedical applications the size, charge, surface chemistry and aggregation of the particles are one of key parameters. We focused on characterization of maghemite and cobalt ferrite magnetic NPs by measuring size distribution and zeta potential in different culture media and PBS. We show that our NPs functionalized with PAA are relatively very stable also in different culture media, where level of aggregation depends on medium composition. Effect of divalent ions and serum presence on stability is specifically analysed and we present possible destabilization mechanisms. We show that stability of electrostatically stabilized suspensions is affected by the molar concentration and valence of destabilizing counterions like Na ⁺ or Mg ²⁺ where effective surface charge of nanoparticles and thus repulsion force is screened by these counterions. In agreement with other papers we demonstrate significant effect of media composition (divalent ions, serum) and thus show the importance of NPs characterization under conditions that are representative of cell culture media or physiological conditions for understanding of NPs interaction with biological systems and for assessments of nanoparticle cytotoxicity. Further, by understanding the destabilization mechanisms one can anticipate effect in different media and to some degree predict behaviour of nanoparticle suspensions.	
	Objavljeno v	Institute of Materials Physics.; Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures; 2012; Vol. 7, no. 4; str. 1389-1400; Impact Factor: 1.200; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.27; WoS: NS, PM; Avtorji / Authors: Pavlin Mojca, Bregar Vladimir Boštjan	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	30476761	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Vizualizacija internalizacije funkcionaliziranih kobalt-feritnih nanodelcev in njihova celična usoda	
	ANG	Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate	
Opis	SLO	Dosedaj je bila izvedena že vrsta analiz interakcije nanodelcev z celicami, vendar pa še vedno veliko odprtih vprašanj glede same interakcije z membrano, poti vnosa in citotoksičnosti. Izvedli smo in vitro študijo interakcije med celicami CHO (Chinese Hamster Ovary) in magnetnimi nanodelci oblečenimi v poliakrilno kislino (PAA). S pomočjo fluorescenčne mikroskopije ter presevalne in vrstične elektronske mikroskopije smo določili mehanizem endocitotne poti vnosa in njihovo znotrajcelično usodo. Kot prvi smo s SEM slikanjem opazili prvo fazo vnosa, kjer so nanodelci ujeti v del uvihane membrane. Celice so hitro privzele nanodelce kot majhne aggregate, preko makropinocitoze in od klatrina odvisne endocitoze. Že eno uro po izpostavitvi so se nanodelci v celicah nahajali v različnih veziklih, od zgodnjih do poznih endosomov in lizosomov, ki so se večinoma nakopičili v perinuklearni regiji, kjer so ostali vsaj še 24 ur po izpostavitvi. Po 24-urni izpostavitvi smo v celicah opazili velike količine nanodelcev, ki niso imeli toksičnih vplivov. Rezultati kažejo, da so PAA oplaščeni delci primerni za biotehnoške aplikacije (označevanje), v pripravi je tudi mednarodni	

		patent.
	ANG	Several internalization and cytotoxicity studies have been performed, but there are still many unanswered questions concerning the interactions of nanoparticles and cells. We prepared functionalized magnetic NPs, coated with polyacrylic acid (PAA), which are stable also in physiological conditions and short-term non-toxic. Using scanning and transmission electron microscopy, we were able to observe and determine the internalization pathways in Chinese hamster ovary (CHO) cells. We could observe that NP were internalized as small aggregates via macropinocytosis and clathrin mediated endocytosis, resulting in rapid uptake in a time-dependent manner. Inside the cytoplasm, aggregated NPs were found enclosed in acidified vesicles accumulated in the perinuclear region 1 h after exposure, where they stayed for at least up to 24 h. Moreover, using scanning electron microscopy we also captured what might be the first step of NPs internalization - an endocytic vesicle in the process of formation enclosing NPs bound to the membrane. Since no cytotoxic effects were observed, the NDs are potentially suitable for biomedical applications (e.g. labeling). In preparation is international patent application.
Objavljeno v		Dove Medical Press; International journal of nanomedicine; 2013; Vol. 8; str. 919-931; Impact Factor: 3.130; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.705; WoS: NS, TU; Avtorji / Authors: Bregar Vladimir Boštjan, Lojk Jasna, Šuštar Vid, Veranič Peter, Pavlin Mojca
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	7803220 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Razvoj 3D in vitro modela celic vključenih v kolagenski gel
		ANG Use of collagen gel as a three-dimensional in vitro model to study electropermeabilization and gene electrotransfer
	Opis	SLO Razvili smo 3D in vitro model tkiva celic vključenih v 3D kolagenske gele, ki predstavljajo kompleksen sistem podoben realnemu okolju v tkivih. Celice so v gelu viabilne ter omogočajo analize elektrotrafektije ali magnetofektije. 3D kolagenski modeli so izjemno pomembni, saj je mobilnost nanodelcev ali makromolekul podobna mobilnosti v tkivih, kar omogoča tudi načrtovanje in optimizacijo različnih protokolov za vnos genov z magnetofektijo v realnem modelu tkiva, hkrati pa se tudi zmanjša število žrtvovanih živali.
		ANG We have developed a 3D in vitro model of cells embedded in collagen gels, which represent a complex system similar to realistic environment in tissues. Cells in 3D gel are viable and enable analysis of electrotransfection or magnetofection. 3D collagen models are very important since the mobility of nanoparticles or macromolecules is similar to mobility in tissues, which enables design and optimization of protocols for magnetofection in a more realistic in vitro model. Gel models represent important step toward clinical trials, since they reduce the number of sacrificed animals.
	Objavljeno v	Springer; The journal of membrane biology; 2010; Vol. 236, no. 1; str. 87-95; Impact Factor: 1.630; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.078; WoS: CQ, DR, UM; Avtorji / Authors: Haberl Saša, Pavlin Mojca
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	967035 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Razvoj površinsko funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev za vnos v celice
		ANG Development of surface functionalized magnetic nanoparticles for uptake in cells
		V okviru raziskav smo razvili in karakterizirali biokompatibilne magnetne

Opis	SLO	nanodelce, ki so ustrezno površinsko funkcionalizirani in omogočajo nadaljno kompleksiranje z plazmidno DNA. Ti nanodelci so prilagojeni za vnos v celice v in vitro pogojih z uporabo zunanjih magnetnih polj in izkazujejo povečan vnos v celice ob relativno nizki citotoksičnosti. V kombinaciji s tem smo načrtovali in razvili ustrezne magnetne sisteme za magnetofekcijo (vnos genov s pomočjo magnetnega polja) v celice in vitro. Rezultati so uporabljeni v sodelovanju z Onkološkim Inštitutom Ljubljana za razvoj magnetofekcije v in vitro sistemih. Z našimi delci smo pokazali večjo učinkovitost in vitro magnetofekcije kot s sorodnimi delci, ki so na voljo na trgu.	
	ANG	We developed and characterized a new type of magnetic nanoparticle delivery system for gene transfer, with option of further functionalization for imaging or drug delivery. In combination, appropriate magnetic system for magnetofection (gene transfer with help of magnetic field) were designed and developed. These nanoparticles are optimized for intake in cell in in vitro conditions with application of external magnetic fields and exhibit increased uptake in cells with relatively low cytotoxicity. Such nanoparticles are very appropriate vector system for uptake of active components in cells and can be applied in biotechnological and biomedical applications like magnetofection. The results are used in collaboration with Institute of Oncology for development of in vitro magnetofection and further translation of the method to in vivo systems. Magnetofection of cells with plasmid DNA encoding reportergene using our magnetic NDs was superior in transfection efficiency to commercially available nanoparticles.	
	Objavljeno v	Springer; The journal of membrane biology; 2010; Vol. 236, no. 1; str. 167-179; Impact Factor: 1.630; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.078; WoS: CQ, DR, UM; Avtorji / Authors: Prijič Sara, Ščančar Janez, Romih Rok, Čemažar Maja, Bregar Vladimir Boštjan, Žnidaršič Andrej, Serša Gregor	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	1237883	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Površinsko modificirani magnetni nanodelci za imuno-gensko terapijo živalskega modela adenokarcinoma	
	ANG	Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma	
Opis	SLO	Magnetni nanodelci razviti tekom projekta (razvoj je vodil vodja projekta) za magnetofekcijo - za vnos genov v celice smo nadalje razvijali tudi za uporabo in vivo z namenom končne uporabe za terapijo raka. Razvili smo tudi ustrezne magnetne sisteme za magnetofekcijo (vnos genov s pomočjo magnetnega polja). V sodelovanju z Onkološkim Inštitutom Ljubljana smo dosegli uspešen vnos nanodelcev na katere je bila vezana DNA z zapisom za interleukin IL -12, ter dosegli signifikanten protitumorski učinek na adenokarcinomu in vivo na morskih prašičkih, kar je zelo obetavno za razvoj imuno-genske terapije raka.	
	ANG	The the type of magnetic nanoparticles developed for magnetofections in course of the project lead by PI have been further developed as delivery system for gene transfer in vivo for cancer therapy. Appropriate magnetic system for magnetofection (gene transfer with help of magnetic field) were designed and developed. In collaboration with Institute of Oncology we have sucesfully achieved significant antitumor effect in vivo of murine adenocarcinoma using our magnetic nanoparticles functionalized with DNA encoding interleukin IL - 12, which can be futher used for immuno-gene therapy.	
		Butterworth Scientific Limited; Biomaterials; 2012; Vol. 33, iss. 17; str. 4379-4391; Impact Factor: 7.404; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.017; A": 1; A': 1; WoS: IG, QE; Avtorji /	

Objavljeno v	Authors: Prijič Sara, Prosen Lara, Čemažar Maja, Ščančar Janez, Romih Rok, Lavrenčak Jaka, Bregar Vladimir Boštjan, Cör Andrej, Kržan Mojca, Žnidaršič Andrej, Serša Gregor
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

Družbeno-ekonomski dosežek																						
1.	<table border="1"> <tr> <td>COBISS ID</td> <td>1185403</td> <td>Vir: COBISS.SI</td> </tr> <tr> <td>Naslov</td> <td><i>SLO</i> Magnetofekcija reporterskega in terapevtskega gena v različne celične linije</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>ANG</i> Magnetofection of reporter and therapeutic genes into different cell lines</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Opis</td> <td colspan="2"> <p>Prispevek predstavlja del rezultatov na področju magnetofekcijskega vnosa genov v celičnih kulturah. Postopek temelji na uporabi stabilnih površinsko funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev, ki tvorijo komplekse s plazmidi za terapevtske ali reporterske gene in s pomočjo zunanega magnetnega sistema uspešno prenašajo ta plazmid v celično citoplazmo. V okviru projekta so bile izvajane aktivnosti na načrtovanju in pripravi ustrezno funkcionaliziranih nanodelcev ter magnetnih sistemov, medtem ko je bilo izven projekta dodatno potrebno vzpostaviti ustrezne magnetofekcijske protokole za uporabo in vitro ter in vivo.</p> <p>V okviru tega dosežka so bili objavljeni tudi drugi prispevki: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p> <p>The conference presentation represents a part of results on the field of magnetofection - transfection of genes with magnetic nanoparticles- in cell cultures. The procedure is based on application of stable surface functionalized magnetic nanoparticles, which form complexes with plasmids of therapeutic and reporter genes, and with use of external magnetic system successfully transfer this plasmid into cell cytoplasm. Within this project activities on design and preparation of appropriate functionalized nanoparticles and magnetic systems were done, whereas further work was necessary for development of appropriate magnetofection protocols for use in in vitro and in vivo systems.</p> <p>Other contributions were presented as: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p> </td> </tr> <tr> <td>Šifra</td> <td>F.02</td> <td>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</td> </tr> <tr> <td>Objavljeno v</td> <td colspan="2">s. n.; FEBS Advanced Lecture Course on Translational Cancer Research, September 27 to October 4, 2011, Olhos de Água, Albufeira - Algarve, Portugal; 2011; Str. [1]; Avtorji / Authors: Prijič Sara, Prosen Lara, Čemažar Maja, Žnidaršič Andrej, Serša Gregor</td> </tr> <tr> <td>Tipologija</td> <td>1.12</td> <td>Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci</td> </tr> </table>	COBISS ID	1185403	Vir: COBISS.SI	Naslov	<i>SLO</i> Magnetofekcija reporterskega in terapevtskega gena v različne celične linije			<i>ANG</i> Magnetofection of reporter and therapeutic genes into different cell lines		Opis	<p>Prispevek predstavlja del rezultatov na področju magnetofekcijskega vnosa genov v celičnih kulturah. Postopek temelji na uporabi stabilnih površinsko funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev, ki tvorijo komplekse s plazmidi za terapevtske ali reporterske gene in s pomočjo zunanega magnetnega sistema uspešno prenašajo ta plazmid v celično citoplazmo. V okviru projekta so bile izvajane aktivnosti na načrtovanju in pripravi ustrezno funkcionaliziranih nanodelcev ter magnetnih sistemov, medtem ko je bilo izven projekta dodatno potrebno vzpostaviti ustrezne magnetofekcijske protokole za uporabo in vitro ter in vivo.</p> <p>V okviru tega dosežka so bili objavljeni tudi drugi prispevki: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p> <p>The conference presentation represents a part of results on the field of magnetofection - transfection of genes with magnetic nanoparticles- in cell cultures. The procedure is based on application of stable surface functionalized magnetic nanoparticles, which form complexes with plasmids of therapeutic and reporter genes, and with use of external magnetic system successfully transfer this plasmid into cell cytoplasm. Within this project activities on design and preparation of appropriate functionalized nanoparticles and magnetic systems were done, whereas further work was necessary for development of appropriate magnetofection protocols for use in in vitro and in vivo systems.</p> <p>Other contributions were presented as: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p>		Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	Objavljeno v	s. n.; FEBS Advanced Lecture Course on Translational Cancer Research, September 27 to October 4, 2011, Olhos de Água, Albufeira - Algarve, Portugal; 2011; Str. [1]; Avtorji / Authors: Prijič Sara, Prosen Lara, Čemažar Maja, Žnidaršič Andrej, Serša Gregor		Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
COBISS ID	1185403	Vir: COBISS.SI																				
Naslov	<i>SLO</i> Magnetofekcija reporterskega in terapevtskega gena v različne celične linije																					
	<i>ANG</i> Magnetofection of reporter and therapeutic genes into different cell lines																					
Opis	<p>Prispevek predstavlja del rezultatov na področju magnetofekcijskega vnosa genov v celičnih kulturah. Postopek temelji na uporabi stabilnih površinsko funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev, ki tvorijo komplekse s plazmidi za terapevtske ali reporterske gene in s pomočjo zunanega magnetnega sistema uspešno prenašajo ta plazmid v celično citoplazmo. V okviru projekta so bile izvajane aktivnosti na načrtovanju in pripravi ustrezno funkcionaliziranih nanodelcev ter magnetnih sistemov, medtem ko je bilo izven projekta dodatno potrebno vzpostaviti ustrezne magnetofekcijske protokole za uporabo in vitro ter in vivo.</p> <p>V okviru tega dosežka so bili objavljeni tudi drugi prispevki: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p> <p>The conference presentation represents a part of results on the field of magnetofection - transfection of genes with magnetic nanoparticles- in cell cultures. The procedure is based on application of stable surface functionalized magnetic nanoparticles, which form complexes with plasmids of therapeutic and reporter genes, and with use of external magnetic system successfully transfer this plasmid into cell cytoplasm. Within this project activities on design and preparation of appropriate functionalized nanoparticles and magnetic systems were done, whereas further work was necessary for development of appropriate magnetofection protocols for use in in vitro and in vivo systems.</p> <p>Other contributions were presented as: Magnetofection of B16F1 cells with therapeutic gene for interleukin-12, Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 216; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1157243) Magnetic nanoparticles-mediated in vitro gene delivery, SLONANO 2011 Book of abstracts; 2011; Str. 80; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Žnidaršič Andrej, Čemažar Maja, Serša Gregor (Cobiss ID 1173627)</p>																					
Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj																				
Objavljeno v	s. n.; FEBS Advanced Lecture Course on Translational Cancer Research, September 27 to October 4, 2011, Olhos de Água, Albufeira - Algarve, Portugal; 2011; Str. [1]; Avtorji / Authors: Prijič Sara, Prosen Lara, Čemažar Maja, Žnidaršič Andrej, Serša Gregor																					
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci																				
2.	<table border="1"> <tr> <td>COBISS ID</td> <td>8747860</td> <td>Vir: COBISS.SI</td> </tr> </table>	COBISS ID	8747860	Vir: COBISS.SI																		
COBISS ID	8747860	Vir: COBISS.SI																				

Naslov	SLO	Analiza magnetoforetske mobilnosti magnetnih nanodelcev v magnetnem polju
	ANG	Analysis of magnetophoretic mobility of magnetic nanoparticles in magnetic field
Opis	SLO	Ena od ključnih omejitev za magnetni vnos učinkovin je doseganje učinkovitih koncentracij magnetnih nosilcev in učinkovine v ciljnem tkivu, saj je mobilnost nanodelcev v tkivnih strukturah majhna. Zato je pomembno poznavanje mobilnosti nanodelcev v različnih okoljih. Za ovrednotenje te mobilnosti smo uporabili dva pristopa, dejanske meritve na gelih kot prvih približkih tkiva, ter numerično modeliranje za podrobnejšo analizo ključnih parametrov in geometrije. Uporabili smo gelsko magnetoforezo za merjenje gibljivosti različnih magnetnih nanodelcev v agaroznem gelu, kar predstavlja prvi približek mobilnosti v tkivu. Vzporedno smo vzpostavili model na osnovi metode končnih elementov, s katerim smo analizirali različne postavitve trajnih magnetov za doseganje učinkovitih magnetnih gradientov. Na podlagi tega smo analizirali dejansko magnetno silo za različne postavitve. Iz obeh delov smo pokazali, da je eden ključnih parametrov, ki določa mobilnost v tkivu, tvorba večjih aglomeratov nanodelcev pri fizioloških pogojih ter interakcija nanodelcev z okoliškim matriksom. Te ugotovite in izdelani eksperimentalni in numerični modeli naj bi služili kot izhodišče za širšo študijo biološko relevantnih sistemov.
	ANG	One of major current limitations of magnetic drug targeting is to achieve efficient concentration of magnetic carrier-drug complexes at the targeted sites due to poor mobility of nanoparticles in tissue structures, therefore it is essential to know particle mobility in a given environment. We addressed this problem with combination of experimental measurements and numerical modeling. We used gel magnetophoresis in order to measure motilities of different magnetic NPs (Co-ferrite, c-Fe ₂ O ₃) in agarose gel. Numerical modeling using FEM method was used to determine appropriate settings of magnets, which generate sufficient magnetic field gradient. Further, we used the numerical modeling to evaluate the magnetic force on the NPs for different geometries. We obtained that one of crucial factors which determines final mobility in tissue is formation of larger aggregates of nanoparticles under physiological conditions and interaction of nanoparticles with surrounding matrix. These findings and experimental and numerical models will be applied for further study of biologically relevant systems.
Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
Objavljeno v	Springer; Abstracts; European biophysics journal; 2011; Str. S231; Impact Factor: 2.139; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.24; WoS: DA; Avtorji / Authors: Pavlin Mojca, Drmota Ana, Žnidaršič Andrej, Bregar Vladimir Boštjan	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3. COBISS ID	8312660	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Analiza magnetizacijskega stanja aglomeratov magnetnih nanodelcev z vidika funkcionalnosti v biotehnologiji
	ANG	Analysis of magnetization state of agglomerates of magnetic nanoparticles with respect to functionality in biotechnology
Opis	SLO	Izvedli smo podrobno analizo magnetnega stanja aglomeratov ter preučili posledice na uporabnost za biotehnoške in biomedicinske aplikacije. Kot ključno ugotovitev smo pokazali, da je za magnetno stanje aglomeratov pomembno praktično samo stanje osnovnih kristalitov/nanodelcev. Tako je mogoče doseči velike aglomerate, ki izkazujejo superparamagnetno magnetizacijo tako kot izhodiščni nanodelci, medtem ko je odziv na zunanje

		magnetne sile bistveno večji. Dodatno smo pokazali tudi stabilnost funkcionaliziranih enodomenskih nanodelcev in aglomeratov ter uporabnost za biotehnoške aplikacije.
	ANG	We analyzed magnetic states of agglomerates and evaluated the effect on applicability for biomedical and biotechnological applications. As key finding we showed that magnetic state of agglomerates is determined almost exclusively by state of primary nanoparticles. Hence large agglomerates that exhibit superparamagnetic state like primary nanoparticles are possible whereas response to the external magnetic fields is greatly enhanced. Further, we showed stability of functionalized single-domain nanoparticles and agglomerates and possibility of use for biotechnological applications.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	American Institute of Physics; 8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers; 2010; str. 59-64; Avtorji / Authors: Bregar Vladimir Boštjan, Pavlin Mojca, Žnidaršič Andrej
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
4.	COBISS ID	34792709 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Razvoj in karakterizacija novih funkcionaliziranih nanodelcev za aplikacije v biotehniko in biomedicini ter razvoj metode magnetofekcije za vnos DNK v celice s pomočjo zunanega magnetnega polja
		ANG Development and characterization of novel functionalized nanoparticles for application in bioengineering and biomedicine and development of magnetofection method for uptake of DNA in cells with application of external magnetic field
	Opis	SLO V okviru projekta smo sodelovali z raziskovalno skupino iz Onkološkega Inštituta Ljubljana tudi pri razvoju in izboljšavi metode magnetofekcije za vnos DNK v celice s pomočjo zunanega magnetnega polja. V okviru projekta smo razvili postopke priprave ter karakterizirali nove nanodelce z magnetnim jedrom, ki imajo večplastno funkcionalizacijo ter so biokompatibilni. Izhodišni postopki omogočajo nadgradnjo večplastne strukture z različnimi makromolekulami, kot je DNK, disperzije takšnih večplastnih nanodelcev pa so stabilne pri fizioloških pogojih. Magnetno jedro je iz aglomerata ustreznih nanodelcev, zato je odziv na magnetno polje relativno velik. Zaradi fleksibilnosti sestave in s tem lastnosti ter stabilnosti so takšni delci zelo primerni za zelo različne biotehnoške aplikacije. Posebno za magnetofekcijo smo funkcionalizirali večplastne magnetne nanodelce ter sodelovali pri določitvi protokola izvajanja magnetofekcije. Analizirali smo tudi različne variante za dodatno optimizacijo na strani zunanega magnetnega sistema.
		ANG Within the project we collaborated with research group from Institute of Oncology Ljubljana on development and optimization of magnetofection method for uptake of DNA in cells with external magnetic field. We developed synthesis procedures and characterized nanoparticles with magnetic core that have multilayer functionalization and are biocompatible. Synthesis procedures allow upgrade of multilayer structure with different macromolecules like DNA; dispersions of such multilayer nanoparticles are stable at physiological conditions. As the magnetic core is agglomerate of nanoparticles, also the response to the external magnetic field is relatively large. Due to flexibility of composition and properties such particles are very appropriate for diverse bioengineering applications. Specifically for the magnetofection we functionalized multilayer magnetic nanoparticles and collaborated on design of magnetofection protocol. We also analyzed different options for optimization of external magnetic system.
	Šifra	F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije
		PRIJIČ, Sara, SERŠA, Gregor, ČEMAŽAR, Maja, BREGAR, Vladimir Boštjan,

	Objavljeno v	RAJNAR, Nevenka, ŽNIDARŠIČ, Andrej. Magnetofekcija plazmidne DNA s poročevalskim genom v celice melanoma B16F1, gojene in vitro, s superparamagnetnimi nanodelci v prisotnosti zunanega magnetnega polja : patent SI 23577 (A), 2012-06-29. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2012. 12 str., ilustr. [COBISS.SI-ID 34792709]	
	Tipologija	2.24 Patent	
5.	COBISS ID	9319252	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vizualizacija prvih korakov internalizacije nanodelcev ter njihova znotrajcelična pot
		ANG	Visualization of internalization pathways of polyacrylic acid functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate
	Opis	SLO	Kljub široki uporabi nanodelcev je še vedno veliko neznanega o njihovi interakciji s celicami in le malo raziskav je vizualiziralo celoten proces prehoda v celico. Uporabili smo kombinacijo elektronske transmisijske in vrstične mikroskopije ter fluorescenčne mikroskopije ter določili časovno dinamiko internalizacije, po 1h smo lahko že opazili nanodelce v veziklih v bližini jedra. Kot prvi smo z uporabo presevalne elektronske mikroskopije opazili proces formacije vesikla obkroženimi nanodelci. S transmisijsko elektronsko mikroskopijo smo določili celotno pot od prvih vdolbin/izvihkov, multivesikularnih teles do lizosomov z nanodelci.
		ANG	Despite considerable utilization of nanoparticles (NPs), there are still many unanswered questions concerning their interactions with cells and only few studies visualized the whole process of internalization. Using SEM, we are first to observe the first step of NPs internalization-endocytotic vesicles with NPs in process of formation. Combining fluorescence microscopy, transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) we determined time dynamics of internalization via endocytosis, in approx. 1h aggregated NPs were found enclosed in vesicles accumulated in the perinuclear region. TEM showed NPs along the whole endocytotic pathway from coated pits, over multivesicular bodies to lysosomal structures.
	Šifra	E.02 Mednarodne nagrade	
	Objavljeno v	s. n.]; Abstract book; 2012; Str. 301; Avtorji / Authors: Lojk Jasna, Stražišar Maruša, Bregar Vladimir Boštjan, Šuštar Vid, Veranič Peter, Pavlin Mojca	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

--

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

<p>Kvalitetna karakterizacija nanodelcev ter analiza v relevantnih bioloških medijih je ključna tako za razvoj nanobioteknoloških in biomedicinskih aplikacij kot tudi za področje nanotoksikologije. Osnovni namen projekta je bilo razviti metode za karakterizacijo v bioloških pogojih, razumeti</p>
--

mehanizme agregacije ND v biološko relevantnih medijih, ter analizirati interakcijo z biološkimi sistemi. Na osnovi pridobljenega znanja sinteze, funkcionalizacije in karakterizacije ND ter osvojenih metod v okviru projekta smo v nadaljevanju izvedli razvoj ustrezno funkcionaliziranih multimodalnih MND (vizualizacija, vnos učinkovin, ciljna dostava). To nam skupaj z ustrezno karakterizacijo in boljšim razumevanjem interakcij med ND in biološkimi sistemi omogočilo razvoj biomedicinskih aplikacij na osnovi ND.

Kot izhodišče smo vzpostavili postopke priprave različnih MND v stabilnih suspenzijah, ki so bili uporabljeni za nadaljnjo funkcionalizacijo z različnimi biokompatibilnimi makromolekulami ter z dodatnimi funkcionalnimi učinkovinami (DNK, barvila...). Z lastnim magnetnim merilnim sistemom smo potrdili pomen mikrostrukture ND in primarnih aglomeratov na magnetno stanje sistema, kar je pomembno za uporabo takšnih ND na področju magnetne hipertermije. V prihodnosti bomo v sodelovanju s skupinami iz tujine preverili tudi potencial naših nanodelcev za metodo hipertermije.

S postavitvijo merilnega sistema za karakterizacijo MND smo poglobili razumevanje interakcij med MND in organskimi makromolekulami ter vpliv različnih parametrov (ionska koncentracija, pH) na stabilnost in uporabnost v biološko relevantnih medijih. Ugotovili smo, da prisotnost proteinov ter divalentnih ionov lahko ključno vpliva na destabilizacijo, zato je za uporabo MND v biomedicinske namene nujna karakterizacija v fiziološko relevantnih pogojih. Z razumevanjem mehanizmov destabilizacije lahko predvidimo efekte v različni medijih ter ustrezno prilagodimo protokole, zato so objavljeni rezultati širše zanimivi, saj predstavimo splošne mehanizme destabilizacije nanodelcev v biološko relevantnih medijih.

Postavili smo 3D in vitro model, ki v kombinaciji z numeričnim modelom omogoča analizo mobilnosti različnih MND v gelih pri različnih postavitvah zunanjih magnetov. Ta sistem je osnova za nadaljnje raziskave mobilnosti in usmerjanju MND v in vitro in in vivo sistemih, ki so v načrtu.

Postopki večstopenjske funkcionalizacije MND so omogočili izdelavo različnih namenskih nanosistemov, ki so optimirani in v sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami že v uporabi za vnos učinkovin, označevanje, vizualizacijo ter podobne biotehnoške aplikacije. S pomočjo fluorescenčne mikroskopije ter presevalne in vrstične elektronske mikroskopije smo določili mehanizem endocitotne poti vnosa in njihovo znotrajcelično usodo, ter stopnjo agregacije. Kot prvi smo s SEM slikanjem opazili prvo fazo vnosa, kjer so ND ujeti v del uvihane membrane in je predstopnja internalizacije z endocitozo. To nam je omogočilo tudi spremljanje dinamike celične internalizacije, kvantifikacijo privzema ND ter analizo toksičnosti, kar odpira nove smeri raziskovanja na področju nanotoksikologije.

Razviti magnetni ND so platforma na osnovi katere lahko razvijamo vrsto aplikacij, saj omogočajo multimodalnost - vizualizacijo z NMR/fluorescenco ter vnos učinkovin. Omogočajo tudi nadaljnjo funkcionalizacijo s katero lahko dosežemo sproščanje vezanih učinkovin ali DNA znotraj celice - npr. v lizosomu. Z raziskovalno skupino iz Onkološkega Inštituta Ljubljana smo sodelovali tudi pri razvoju in izboljšavi metode magnetofekcije za vnos DNK v celice in vitro ter za in vivo imuno-gensko terapijo. Posebno za to metodo smo funkcionalizirali večplastne magnetne ND ter sodelovali pri določitvi protokola izvajanja magnetofekcije, kjer stabilni površinsko funkcionalizirani MND tvorijo komplekse s plazmidi za terapevtske ali reporterske gene in se ti kompleksi s pomočjo zunanjega magnetnega polja prenašajo v celično citoplazmo.

ANG

Characterization of NPs in biologically relevant media is crucial for nanotoxicology as well as for development of nanobiotechnological and biomedical applications. The main scopes of this project were the development of a method for characterization of NPs in biological conditions, understanding mechanisms of NP aggregation in biologically relevant media and analysis of interactions of NPs with biological systems. Base on the knowledge on synthesis, functionalization and characterization of NPs acquired during this project we designed functionalized multimodal MNP suitable for visualization, drug delivery and specific targeting. Proper characterization and better understanding NP interactions with biological systems enables the development of NP based biomedical applications.

First we established protocols for preparation of stable suspensions of different MNP cores, which were than functionalized with different biocompatible macromolecules and other substances (DNA, fluorescent dies ...). Using our magnetic measuring systems we showed the importance of NP microstructures and primary aggregates on the magnetic state of the system, which is important when using such NP for magnetic hyperthermia.

By using measurement systems for MNP characterization we extended our understanding of interactions between MNP and organic macromolecules and determined how different parameters (ion concentrations, pH) affect their stability in biologically relevant media. We showed that the presence of proteins and divalent ions in the media can cause destabilization. This stresses the importance of characterization in biologically relevant media for NP used for biomedical purposes. By understanding the mechanisms of destabilization we can also predict the effects of certain media on NP stability and behaviour, therefore our publication of mechanisms of destabilization in biologically relevant media should be interesting for wider nanobiomedical field.

We also developed a 3D in vitro model, which in combination with a numerical model enables to assess the mobility of different MNP in gels when exposed to different external magnetic fields. This system will be also used for experiment involving magnetic guiding of MNPs in in vitro and in vivo systems.

The developed protocols for multilayer functionalization of MNPs enabled us to design nanosystems, optimized for different for applications like drug delivery, labelling and visualization, some of which were already used in collaboration with other research groups. Using fluorescence microscopy, scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) we determined the degree of aggregation, mechanisms of internalization and intracellular fate of our MNPs. Using SEM we also showed the first steps of internalization: MNPs associated with different membrane protrusions typical for macropinocytosis and clathrin mediated endocytosis. This enabled us to determine the dynamics of internalization, quantification and cytotoxicity, which opens new research possibilities in field of nanotoxicology.

Developed magnetic nanoparticles and protocols are a platform for various specific applications as they allow multimodal behaviour, e.g. visualization with NMR or fluorescence and drug intake. In addition, further functionalization for release of bound active drugs or macromolecules within the cells, e.g. in the lysosome.

We also developed special multilayer MNP, suitable for delivery of nucleic acids into the cells, with which we improved the magnetofection protocols with the collaboration of the research group from Institute of Oncology Ljubljana. These stable functionalized MNPs form complexes with plasmids carrying therapeutic or reporter genes and in this way enable their delivery in the cytoplasm using external magnetic fields.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Projekt je interdisciplinaren in pokriva področje nanotehnologije, tehnike, biomedicine in biotehnologije. Uporaba nanodelcev za biotehnoške in biomedicinske aplikacije je trenutno en najbolj obetavnih smeri raziskovanja novih metod ciljanega vnosa učinkovin. Interdisciplinarna struktura projektne skupine in ekspertiza projektne skupine iz področji razvoja magnetnih materialov, kompozitov, numeričnega modeliranja, eksperimentalnih metod karakterizacije nanodelcev, ter in vitro eksperimentov na bioloških celicah je omogočala, da smo na vseh korakih eksperimentalno delo integrirali s teoretično analizo ter uporabili tudi napredno numerično modeliranje z metodo končnih elementov.

Razvoj novih biomedicinskih aplikacij - prenos novih tehnologij v klinično testiranje:

V sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami na področju prenosa nanotehnologije v biomedicinske aplikacije smo razvili in še naprej razvijamo nove vrste ustrezno funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev ter zagotavljamo strokovno podporo na področju magnetizma in magnetnih materialov ter tudi priprave in karakterizacije površinsko funkcionaliziranih materialov. S tem prispevamo k prenosu in uveljavitvi najnovejših biomedicinskih tehnik tudi v Sloveniji.

Na podlagi pridobljenega znanja smo vzpostavili sodelovanje s Inštitutom za biologijo celice Medicinske Fakultete UL ter Fakulteto za elektrotehniko UL, ter uspešno sodelovali z Onkološkim Inštitutom pri razvoju imuno-genske terapije raka na osnovi magnetofekcije (objavljen je članek v A" kategoriji ter slovenski patent)

Prenos in razvoj novih tehnologij:

V okviru projekta smo razvili in vzpostavili nove tehnologije karakterizacije magnetnih nanodelcev v slovenskem okolju in razvili vrsto protokolov funkcionalizacije. Nadalje smo v

sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami razvili protokole vizualizacije vnosa nanodelcev v celice s fluorescenčno in elektronsko mikroskopijo, kvantifikacije toksičnosti, razvijamo pa tudi metodo za kvantifikacijo vnosa.

Mednarodna nagrada na področju nanotoksikologije pa nam je odprla tudi možnost širšega povezovanja s partnerji znotraj EU na področju nanotoksikologije in nanobiotehnologije.

Razvoj novih produktov in prenos v industrijo:

Uspešno gradimo nova znanja na področju nanomaterialov za biotehnoške in biomedicinske aplikacije z namenom povezovanja raziskovalnih skupin in končnega prenosa v industrijo oziroma v klinično rabo. Znanje sinteze in funkcionalizacije bomo uporabili za razvoj specifičnih vrst nanodelcev za konkretne aplikacije (patenti), s tem pa se nam je odprla možnost povezovanja z industrijo, preučujemo možnost prijave mednarodnega patenta skupaj z zainteresiranim podjetjem za uporabo naših nanodelcev kot podporne metode vizualizacije celic.

Prenos naprednih numeričnih metod v nanobiotehnologijo:

Uspešno smo razvili 3D numerične modele za modeliranje mobilnosti magnetnih nanodelcev v 3D gelskih sistemih in v tkivu. To nam omogoča optimizacijo funkcionalizacije novih vrst nanodelcev ter načrtovanja zunanjih magnetnih sistemov za biomedicinske aplikacije in vivo.

Povezava visokotehnološkega znanja z izobraževalnim sistemom:

Vodja projekta ter vodji sodelujočih skupin imajo izkušnje z delom v interdisciplinarnih skupinah in so bili mentorji več diplomskih in doktorskim študentom na različnih področjih od elektrotehnike do biologije in medicine, prenos znanja do študentov pa poteka preko podiplomskega predmeta na interdisciplinarnem študiju Nanoznanosti na UL. Pri vseh korakih od razvoja nanodelcev do karakterizacije in eksperimentalnega dela in vitro ter in vivo smo vključevali podiplomske študente, znotraj projektne skupine je sodelovalo 5 mladih raziskovalcev.

Vključenost diplomskih, doktorskih študentov ter podoktorskih raziskovalcev v projekt jim je omogočila neposreden stik z vrhunskimi nanotehnološkimi in biomedicinskimi metodami.

ANG

This is an interdisciplinary project and covers the fields of nanotechnology, technics, biomedicine and biotechnology. Nanoparticles currently represent one of the most perspective methods in biotechnological and biomedical applications, especially for targeted drug delivery. Interdisciplinarity of the group, covering the fields of magnetic materials, composites, numerical modeling, experimental methods for characterization of NP and in vitro experiments enables us to integrate our experimental work with theoretical analysis through all steps of NP development, including the numerical modeling using the finite element method.

Development of new biomedical applications – transfer of the new technologies into clinical testing:

In collaboration with research groups specializing in transfer of nanotechnological products into biomedical applications we have developed new types of specially functionalized MNP and provide professional support in the fields of magnetism and magnetic materials and characterization of surface functionalized materials, in this was contributing to introduction of these new biomedical techniques also in Slovenia. Based on our acquired knowledge, we established collaborations with Institute for Cell Biology (Faculty of Medicine, UL) and Faculty of Electrical Engineering (UL) and a successful collaboration with Institute of Oncology Ljubljana for the development of NPs for cancer immuno-gene therapy based on magnetofection (paper published in A" category, Slovenian patent).

Development and transfer of new technologies:

During this project we developed and established new technologies for characterization of MNP in Slovenia and developed several functionalization protocols. In collaboration with other research groups we developed new protocols for visualization of internalization of NPs in cells using fluorescent and electron microscopy. We also determined NP toxicity and are developing a method for quantification of NP internalization. International award in nanotoxicology opened up possibility of wider integration with partners within the EU in the field of nanotoxicology and nanobiotechnology.

Development of new products and transfer to industry:

We successfully build new knowledge in the field of nanomaterials for biotechnical and biomedical applications for the purpose of connecting research groups and the final transfer of developed NPs to the industry or in the clinical use. With acquired knowledge on characterization and development of NPs we will develop NPs for specific applications (patents) and possibly also connect with the industry (international patent application for NPs as a method of cell visualization).

Transfer of advanced numerical models in biotechnology:

We successfully developed a 3D numerical model for evaluating mobility of NP in gels and in tissues. This enables us to optimize functionalization of new NPs and develop external magnetic systems for biomedical applications in vivo.

Connecting high-tech knowledge with education system:

The project leader and the collaborating partners have experience with work in interdisciplinary groups and were mentors to several graduate and doctoral students in various fields, from electrical engineering to biology and medicine, the acquired knowledge is also transmitted to students through lectures at the interdisciplinary doctoral program Biosciences, field of Nanosciences (UL). Five doctoral students were involved with the project in various steps of development and experimentation. Involvement with the project enabled them to try and learn new high-tech nanotechnological and biomedical methods.

**11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni**

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

12.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička					

		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

13. Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja		EUR

		projekta je znašala:	
		Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:	%
		Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³

14.1. Izjemni znanstveni dosežek

--

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Projekt je povezal različne raziskovalne skupine ter omogočil prehod od sinteze, karakterizacije in funkcionalizacije ND do analize mehanizmov stabilizacije, razumevanja interakcije s celicami ter končnih aplikacij. Ciljno smo razvili novo serijo funkcionaliziranih magnetnih ND, ki predstavljajo platformo za uporabo v biomedicini. Razvili smo ND za vezavo plazmidne DNK, na osnovi tega pa smo sodelovali z Onkološkim Inštitutom pri demonstraciji uporabe ND in vivo za imuno-gensko terapijo raka (objavljen je članek v A" kategoriji ter slovenski patent). Nadalje smo izvedli in vitro analizo interakcije ND s celicami od vizualizacije do analize znotrajcelične usode v sodelovanje z Medicinsko Fakulteto UL ter Fakulteto za elektrotehniko UL (nagrada za najboljši poster iz nanotoksikologije na konferenci 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies), v teku pa je tudi razvoj dveh novih aplikacij na osnovi ND - za terapijo raka ter za označevanje celic in vivo.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

NANOTESLA INSTITUT - Razvojni
center nanotehnologij na področju
magnetnih materialov in kompozitov

Vladimir B. Bregar

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	15.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/211

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priložitev/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00

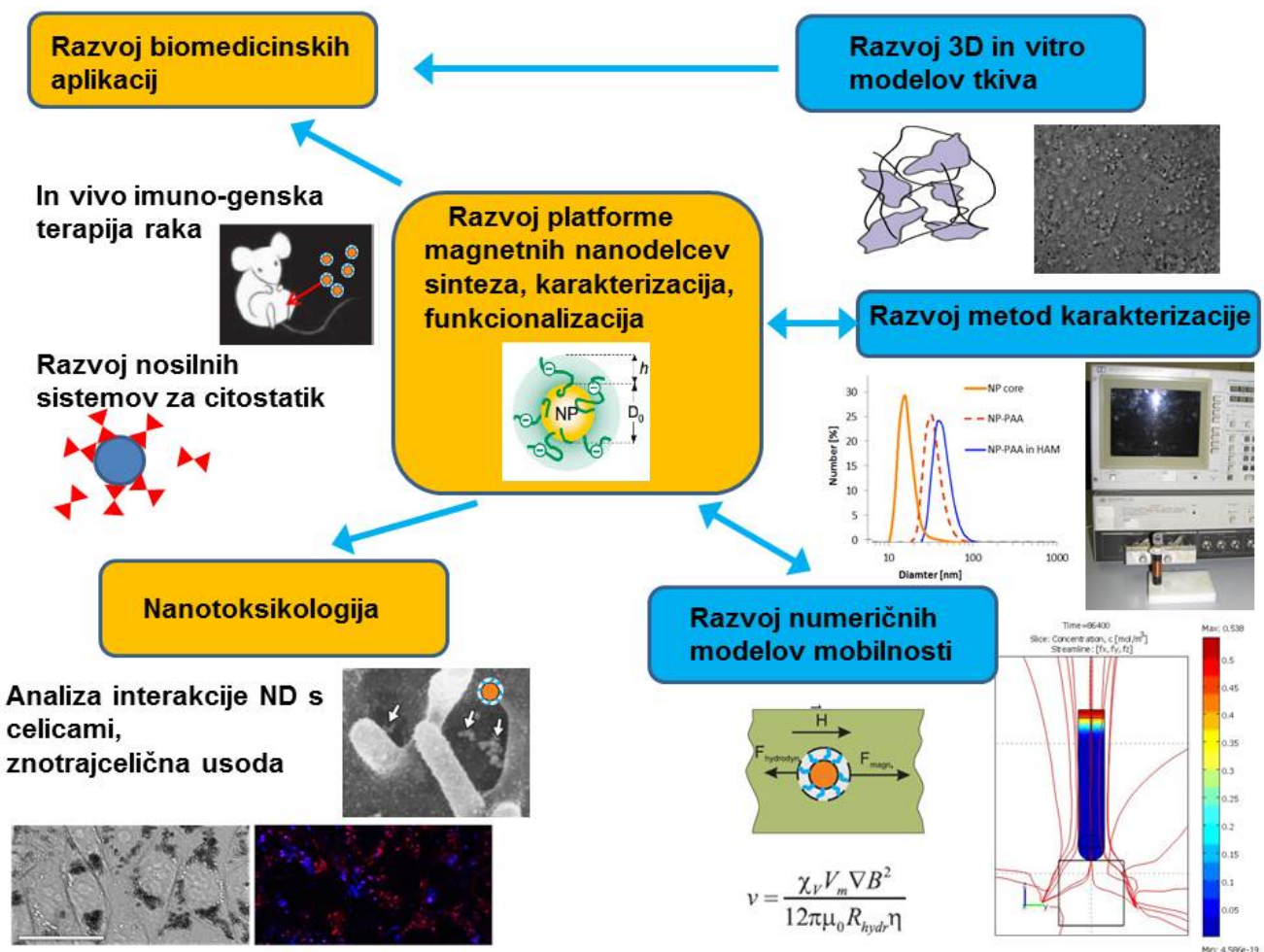
56-6A-FC-CC-CC-BF-57-25-FD-45-E5-7B-17-73-45-34-04-98-CE-1E

TEHNIKA

Področje: 2.21 Tehnološko usmerjena fizika

Dosežek 1: *Razvoj magnetnih nanodelcev za biomedicinske aplikacije*

Vir: Cobiss-ID 1237883, Prijic *et al*, Biomaterials (2012) Vol. 33, str. 4379-4391



karakterizacije in funkcionalizacije ND do analize mehanizmov stabilizacije, razumevanja interakcije s celicami ter končnih aplikacij. Ciljno smo razvili novo serijo funkcionaliziranih magnetnih ND, ki predstavljajo platformo za uporabo v biomedicini. Razvili smo ND za vezavo plazmidne DNK, na osnovi tega pa smo sodelovali z Onkološkim Inštitutom pri demonstraciji uporabe ND in vivo za imuno-gensko terapijo raka (objavljen je članek v A" kategoriji ter slovenski patent). Nadalje smo izvedli in vitro analizo interakcije ND s celicami od vizualizacije do analize znotrajcelične usode v sodelovanje z Medicinsko Fakulteto UL ter Fakulteto za elektrotehniko UL (nagrada za najboljši poster iz nanotoksikologije na konferenci 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies), v teku pa je tudi razvoj dveh novih aplikacij na osnovi ND - za terapijo raka ter za označevanje celic in vivo.