

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2016/30



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z4-4063
Naslov projekta	Uporaba matičnih celic iz maščobnega tkiva za pripravo ožiljenih tkivnih nadomestkov
Vodja projekta	25484 Mirjam Fröhlich
Tip projekta	Zg Podoktorski projekt za gospodarstvo
Obseg raziskovalnih ur	3400
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	05.2015 - 07.2015
Nosilna raziskovalna organizacija	7421 EDUCCELL podjetje za celično biologijo d.o.o. Ljubljana
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija 4.06.02 Bioinženirstvo
Družbeno-ekonomski cilj	
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.04 Medicinska biotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Nadomeščanje tkiva, ki je lahko posledica bolezni ali poškodb, predstavlja enega pomembnih kliničnih problemov, ki se bo v prihodnjih letih, zaradi staranje človeške populacije, še povečeval. Obetavno možnost za avtologno nadomeščanje tkiva predstavlja tkivno-inženirski pristop, pri katerem bolniku z minimalno invazivnim posegom odvzamemo lastne celice, jih in vitro namnožimo, nasadimo na ustrezen

nosilec in tako pripravljen tkivni implant implantiramo na mesto poškodbe. Nekaj kliničnih primerov že poroča o uspešnem TE pristopu zdravljenja. Kljub dobrim obetom, pa bo za pripravo klinično uspešnejših, funkcionalnih tkivnih implantov, potrebno odgovoriti še na mnoga vprašanja, med katerimi je eno pomembnejših – ožiljenje tkivnih implantov. Implantacija in vitro pripravljenih nadomestkov mnogokrat ni uspešna, ker se implant ne integrira z okoljnim tkivom in posledično propade. Glavni vzrok za to je odsotnost ožiljenja. Ožiljenje namreč omogoča izmenjavo hranil in plinov ter je zato ključnega pomena za preživetje tkivnega nadomestka po implantaciji. Ožiljenje ima poleg prehranjevalne vloge tudi ključen vpliv na pravilen razvoj drugih celičnih tipov v obnavljajočem se tkivu. Primeri tkiv, ki morajo biti za svoje normalno delovanje nujno ožiljeni so kostno, kožno, maščobno in mišično tkivo. Količina celic je za pripravo tkivno-inženirske aplikacije velikokrat kritičnega pomena, zato smo kot vir celic uporabili maščobno tkivo, saj je le-to lahko dostopno v večjih količinah.

V raziskavi smo proučili žilni potencial celic pridobljenih iz maščobnega tkiva (endotelijske celice, matične celice, pericitne celice) in s tem pomembno prispevali k izboljšanju pomanjkljivosti dosedanjih pristopov priprave tkivnih implantov, kot sta neprimerna ožiljenost in manj primerni celični viri. Dosegli smo sledeče zastavljene cilje: (i) določili smo najoptimalnejše mesto odvzema maščobnega tkiva in protokol, ki zagotavlja pridobitev največjega števila funkcionalnih endotelijskih celic, (ii) določiti smo ustrezne in vitro protokole za namnoževanje endotelijskih celic pridobljenih iz maščobnega tkiva, (iii) ugotoviti kolikšen delež endotelijskih celic se najhaja v začetni populaciji stromalno-žilne frakcije (SVF) ter kolikšen delež endotelijskih celic se tekom in vitro gojenja diferencira iz matičnih celic (ASC), (iv) proučili vplive hipoksije na proliferacijske in diferenciacijske sposobnosti endotelijskih celic, (v) proučili interakcije endotelijskih celic z ostalimi tkivno specifičnimi celicami - kostnimi, gladkomišičnimi in maščobnimi ter, (vi) razvili novo celično tehnologijo in v sodelovanju s klinikami, inovativen pristop ožiljenja temelječ na celični komponenti pridobljeni iz maščobnega tkiva, vpeljali v klinično prakso.

ANG

Numerous tissue defects, which arise due to diseases or injuries, represent one of the major clinical problems. The need for tissues will be in coming years even increasing, due to the aging of human population. Tissue engineering (TE) approach could provide autologous tissue implants for the transplantation, thus alleviating the shortage of tissues. In TE approach, cells are harvested from a small biopsy of the patient, are subsequently expanded in vitro, combined with a suitable biomaterial (scaffold) and are finally implanted back to the patient, to the site of the injury. Some clinical cases are already reporting good results using TE to treat various tissue defects, yet, many issues still need to be addressed. One of most important problems to be solved if TE approach is to be used in clinical practice is the vascularization. Several studies prove that implantation of tissue implant fail, because the implant doesn't integrate with the surrounding tissue. The main reason for this is the lack of the vascular network within the implant. The vasculature assures the exchange of nutrients and gases and is therefore of crucial importance for the survival of the tissue implants after they have been implanted. Some examples of the tissues which require extensive vascular network for their functioning are bone, adipose, and muscle tissue. Quantity of cells is often a critical parameter, therefore our source of endothelial cells was adipose tissue, which is abundant and easy to harvest. In the study we evaluated the vascular potential of cells from adipose tissue (endothelial cells, stem cells, pericytes) as a cell source for the purposes of vascularization, and overcame disadvantages of current TE approaches, such as lack of vasculature and less suitable cell sources. The following specific goals were achieved: (i) protocols enabling harvesting of clinically relevant quantities of functional endothelial cells were established, (ii) in vitro protocols for adipose derived endothelial cell proliferation were defined, (iii) the portion of endothelial cells in SVF and the portion of endothelial cells which differentiate from stem cells (ASC) were defined, (iv) the effects of hypoxia on proliferation and differentiation capabilities of endothelial cells were assessed, (v) interactions of endothelial cells with other tissue specific cell types (bone -, smooth muscle -, adipose cells) were evaluated, and finally (vi) a new cell technology has been developed, and has been used in the clinics as an innovative approach for vascularization.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

RAZISKOVALNE HIPOTEZE IN OPIS RAZISKOVANJA:

Ovrednotiti smo želeli potencial stromalno-žilne frakcije (SVF) maščobnega tkiva, kot vira endotelijskih celic za pripravo ožiljenih TE implantov in s tem postaviti temelje za vpeljavo novih metod v klinično prakso. Raziskovalne hipoteze so bile sledeče:

Iz lipoaspiratov maščobnega tkiva lahko pridobimo endotelijske celice, ki imajo in vitro sposobnost proliferacije in ohranjanja endotelijskega fenotipa.

Endotelijske celice lahko iz maščobnega tkiva pridobimo iz dveh virov/na dva načina: (i) že diferencirane endotelijske celice se nahajajo v populaciji stromalno-žilne frakcije (SVF) in (ii) endotelijske celice lahko z ustreznimi in vitro pogoji diferenciramo iz matičnih celic (ASC).

Znižani odstotki kisika na fenotip ASC in endotelijskih celic vplivajo tako, da bodo pospešili tvorbo angiogenih faktorjev in povzročili intenzivnejšo diferenciacijo in obstojnost endotelijskih celic.

Sočasno gojenje (ko-kultura) endotelijskih celic in drugega tkivno-specifičnega tipa celic (kostne, gladkomišične ali maščobne celice) vpliva na proliferacijske in diferenciacijske lastnosti obeh tipov celic.

Lipoaspirate smo pridobili iz UKC Ljubljana (6 bioloških vzorcev) in iz klinike PKLP Ästhetic, Klagfurt (5 bioloških vzorcev). Za določitev najustreznejše anatomske pozicije smo lipoaspirate pridobili iz različnih delov telesa – zgornji del roke, stegno in trebuh, s pomočjo treh različnih tehnik (ročna siringa, peristaltična in vakuumška črpalka). Lipoaspirat smo inkubirali v prisotnosti encima in pridobili stromalno žilno frakcijo (SVF). Celice smo gojili do prve pasaže in jih shranili v tekočem dušiku za kasnejšo uporabo.

Za gojenje smo uporabljali medije za celične kulture, pri čemer smo testirali vpliv različnih komponent medija (VEGF, bFGF,) na ohranjanje endotelijskega fenotipa. Endotelijski fenotip celic smo dokazovali z metodo imunocitokemijskega barvanja proti endotelijskemu markerju CD31, pri čemer smo ugotavljali tudi vpliv zmanjšanih odstotkov kisika. Ekspresijo gena *vegf* smo ugotavljali z metodo qPCR. Dejanski vpliv VEGFa, ki so ga izločile celice, smo preverili tako, da smo z ASC inkubiran medij uporabili za gojenje endotelijskih celic in proučevali njihov odziv. Proučevali smo tudi, ali endotelijske celice lahko pridobimo z diferenciacijo ASC ter kakšen je delež takih celic. V kulturah ASC smo z metodo imunocitokemijskega barvanja proti gladko-mišičnemu markerju α Smooth Muscle Actin (α SMA), določali prisotnost gladkomišičnih celic, ter njihov fenotip preverili s kontrakcijskim testom.

Za proučevanje odziva endotelijskih celic na različne okoljske faktorje (npr. hipoksija, osmolarnost, toksini-npr. anestetiki pri implantaciji) smo vzpostavili t.i. test formiranja tubularnih struktur, za katerega smo uporabili komercialno dostopne endotelijske celice. Omenjen test nam je služil za validacijo našega in vitro sistema ASC.

Za proučevanje interakcij endotelijskih celic z ostalimi tkivno specifičnimi celicami, smo kot vir ASC uporabili tiste celice, pri katerih smo že ob postopku izolacije SVF dokazali spontano prisotne žilne celice. Celice ASC smo izpostavili medijem za podporo (i) osteogenega, (ii) maščobnega in (iii) gladkomišičnega fenotipa ter po enem, dveh, oz. treh tednih preverjali prisotnost specifičnih markerjev (za osteogen fenotip: kvantitativno določanja kalcija, von Kossa, Alkalna fosfataza; za gladkomišični fenotip: α SMA; za maščobni fenotip: maščobne vakuole). Za namene sledenja ASC v ko-kulturah, smo celice transficirali s fluorescenčnim proteinom TomatoRed.

UGOTOVLJENI REZULTATI:

Volumni lipoaspiratov so variirali od 54 ml – 100 ml ($0,674 - 2,3 \cdot 10^6$ celic). Glede na anatomske pozicije in način odvzema maščobnega tkiva nismo ugotovili razlike v številu in viabilnosti celic. Polovica pridobljenih vzorcev je vsebovala že prisotno endotelijsko CD 31+ subpopulacijo, pri čemer število žilnih struktur ni bilo odvisno od prisotnosti žilnega faktorja VEGF. Žilni elementi so se tekom gojenja v kulturi tvorili spontano. Diferenciacija iz ASC v endotelijski fenotip *in vitro* ni potekla: v kulturah, pri katerih ob postopku izolacije SVF nismo dokazali že spontano prisotnih endotelijskih celic, po gojenju v endotelijskem mediju nismo dokazali CD31+ celic.

Zmanjšani odstotki kisika so povzročili povišano ekspresijo *vegf* pri celicah pridobljenih iz žilno stromalne frakcije. Dejansko prisotnost in učinkovitost proteina, smo preverili na kulturah endotelijskih celic, ki so se odzvale s povišano proliferacijo. Število CD31+ struktur v kulturah ASC se je ob prisotnosti hipoksije zmanjšalo.

V vseh pridobljenih vzorcih smo dokazali subpopulacijo s pericitnim oz. gladkomišičnim fenotipom (α SMA+). Na enem vzorcu smo s pomočjo t.i. kontrakcijskega testa dokazali tudi funkcionalnost gladkomišičnih celic.

Pri preučevanju interakcij endotelijskih celic z ostalimi tkivno specifičnimi celicami smo v primeru

gojenja ASC celic v osteogenem gojišču dokazali uspešno diferenciacijo ASC v kostne celice, pri čemer je bilo število endotelijskih tubularnih struktur manjše v primerjavi s kontrolnim gojiščem. V primeru gojenja ASC v mediju za adipogeno in gladkomišično diferenciacijo, smo dokazali uspešno diferenciacijo ASC v maščobne oz. gladkomišične celice, pri čemer je bilo število endotelijskih tubularnih struktur enako v primerjavi s kontrolnim gojiščem. Za namene natančnejšega proučevanja interakcij in razlikovanja med dvema tipoma celic v kulturi, smo ASC transficirali s fluorescenčnim proteinom TomatoRed. Pri validaciji odziva transficiranih celic, smo v primeru ostogenega medija (diferenciacija ASC v kostne celice), ugotovili, da so bili označevalci kostnega fenotipa izraženi močneje, kot pri netransficiranih ASC. V primeru adipogenega medija (diferenciacija ASC v maščobne celice), transfekcija ni vplivala na izražanje adipogenih označevalcev.

UPORABA REZULTATOV:

Pridobivanje celic iz tkiva je ključnega pomena za razvoj celičnega produkta, saj nam mora ta korak zagotoviti zadostno število živih celic. Pridobljeni rezultati kažejo, da s tremi trenutno pogosto uporabljenimi metodami odvzema lipoaspiratov, lahko pridobimo zadostno število živih celic, pri čemer anatomsko pozicija odvzema nima odločujoče vloge.

Potrdili smo, da so endotelijske celice že prisotne v SVF, medtem ko diferenciacije ASC v endotelijski fenotip nismo dokazali. Rezultat je pomemben z vidika priprave ustreznih protokolov in medijev za pridobivanje endotelijskih celic: na osnovi naših rezultatov zaključujemo, da dodatek faktorjev kot so VEGF, ni nujno potreben za vzdrževanje endotelijskih celic v kulturi, kar pomembno zniža stroške proizvodnje, zagotavlja večjo varnost pacienta in obenem ne vpliva na kakovost produkta. Omejen potencial ASC za neposredno diferenciacijo v endotelijski fenotip predstavlja pomembno spoznanje na področju biologije ASC.

Za funkcionalni žilni element so poleg endotelijske celic potrebne tudi pericitne oziroma gladkomišične celice. Običajno za potrebe priprave žilnih elementov v kulturah oba tipa celic izvirata iz različnih tkiv, kar pa ne zagotavlja popolne medsebojne kompatibilnosti. V naši raziskavi smo iz enega tkiva (podkožnega tkiva) pridobili oba tipa celic in tako zagotovili najboljšo možno biološko kompatibilnost med obema celičnima tipoma.

Poznavanje odziva celic na dejavnike, ki so prisotni na mestu implantacije, niso pa značilni za nativno tkivo od koder izvirajo implantirane celice, je ključnega pomena za napoved, kako uspešno se bo implantat integriral z okoljnim tkivom, oziroma kako uspešna bo terapija. Mesto poškodbe je pogosto slabo prekravljeno in hipoksično. Rezultati kažejo, da ASC v hipoksičnih pogojih izločijo večje količine VEGF, kar ima lahko velik pomen za uspešnost klinične terapije, saj bi implantacija celic in povišanje produkcije VEGF, lahko prispevala k pospešenemu ožiljenju in regeneraciji tkiva. Glede na vrsto tkiva se lahko pojavijo še drugi specifični dejavniki, ki niso značilni za naravno okolje ASC. V primeru, da bi želeli ožiliti tkiva kot npr. mehur ali ledvice, bi bile transplantirane celice izpostavljene višjim osmolarnostim kot v naravnem okolju. Povišane osmolarnosti niso imele negativnega vpliva na tvorbo endotelijskih struktur v kulturi. Poznavanje odziva žilnih celic na dejavnike značilne na mestu implantacije pomembno je ključnega pomena za izbiro ustreznih kliničnih indikacij ter posledično večji uspešnosti celičnih terapij.

Vzpostavljen in vitro sistem endotelijskih celic pridobljenih iz lipoaspiratov predstavlja tudi osnovo in potencialno možnost razvoja personaliziranih predkliničnih testov za vrednotenje pro- oz. anti-angiogenih učinkov zdravil.

Za uspešno ožiljenje implanta je potreben uspešen so-obstoj endotelijskih celic s celicami tkiva, katerega želimo nadomestiti. Dokazali smo soobstoj endotelijskih celic s kostnimi, maščobnimi in gladkomišičnimi celicami. Za namene natančnejšega proučevanja interakcij in razlikovanja med dvema tipoma celic v kulturi, smo ASC transficirali s fluorescenčnim proteinom, kar predstavlja tudi običajno prakso v literaturi. Predpostavlja se, da postopek transfekcije, razen izražanja fluorescenčnega protein, ne spremeni drugih lastnosti celice. Nasprotno, pa smo v našem primeru ugotovili, da transfekcija povzroči fenotipsko spremembo pri osteogeno induciranih ASC, kar je pomembna (in do sedaj še ne objavljena) ugotovitev za mnoga področja znanstvenih raziskav. Pridobljeni rezultati imajo tako znanstveno kot tudi veliko aplikativno vrednost, saj smo na osnovi rezultatov projekta v Educellu razvili novo celično tehnologijo in produkt (set za osamitev celic z regeneracijskim potencialom iz maščobnega tkiva), predstavljajo pa tudi osnovo za razvoj nove metode preverjanja kakovosti. Nova celična tehnologija AdipoArt temelji na celični komponenti z žilnim potencialom (pridobljena iz maščobnega tkiva) in je trenutno v eksperimentalni klinični fazi za dve indikaciji: i) regeneracijo parodontalne kosti, kjer je bilo obravnavanih 5 pacientov in ii) pomlajevanje obraznih mehkih tkiv, kjer je bilo obravnavanih 7 pacientov. Dosedanji klinični rezultati kažejo spodbudne rezultate. Celična tehnologija AdipoArt ima velik potencial tudi za druge

indikacije kot npr. za regeneracijo mišičnega tkiva. Metoda za preverjanje kakovosti celične komponente, bo temeljila na določanju in vitro žilnega potenciala ASC in bo uporabljena za napovedovanje uspešnosti implantacije ASC ter bo tako lahko še dodatno zagotovila večjo uspešnost novege tehnologije.

Na osnovi pridobljenih rezultatov trenutno z ameriški partnerji poteka tudi razvoj kompleksnih, biomimetičnih *in vitro* testnih sistemov za proučevanje so-obstoja med različnimi tipi celic in testiranja zdravilnih učinkovin (predviden produkt je patent).

SODELOVANJE S TUJIMI PARTNERJI:

Sodelave s tujimi partnerji so omogočile večjo kakovost raziskav, kot tudi umestitev slovenskih raziskovalcev in raziskav v mednarodnem prostoru.

-dr. Peter Lisborg, kozmetični kirurg (Klinike PKLP Ästhetic, Klagenfurt, Austria): vir kliničnih vzorcev, kot tudi usmeritev o dejanskih zahtevah za končni produkt. Klinike PKLP Ästhetic predstavlja tudi potencialnega uporabnika celičnega produkta.

-prof. Jeffrey Gimble (Pennington Biomedical Research Center, Louisiana, USA): S skupino sodelujemo na področju vzpostavitve in vitro žilnih sistemov, pri čemer so vir vaskularnih celic vzorci lipoaspiratov, pridobljeni v njihovih laboratorijih.

-prof. Bruno Cammue in prof. Jan Michiels (KU LUEVEN, Belgija): Vir malih molekul-toksinov, s pomočjo katerih smo validirali in vitro celični sistem za proučevanje odziva endotelijskih celic na okoljske dejavnike (kot hipoksija, osmolarnost, toksini-npr. anestetiki pri implantaciji). Rezultat sodelave so skupne publikacije in prijave skupnih projektov.

-prof. David Kaplan (Tufts University, MA, USA): V sodelovanju z laboratorijem prof. Kaplana, smo izpeljali transdukcijo ASC za namene sledenja celic v kulturi. Rezultat sodelave je skupna objava.

-prof. Tanja Dominko (Worcester Polytechnic Institute USA): Pri dr. Tanji Dominko je bil na gostovanju Matija Veber, doktorski kandidat, kateremu delovna mentorica je Dr. Mirjam Frohlich, in katerega področje raziskav je uporaba alternativnih celičnih virov za namene ožiljenja.

4.Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

S predlaganim projektom smo želeli ovrednotiti potencial stromalno-žilne frakcije (SVF) maščobnega tkiva, kot vira endotelijskih celic za pripravo ožiljenih TE implantov. Raziskovalno delo je bilo razdeljeno v 4 delovne sklope (DS). Aktivnosti treh DS (DS1 – DS3) so predstavljale znanstvene raziskave, aktivnosti DS4 pa so namenjene promociji rezultatov, tako v obliki znanstvenih publikacij, kot prenosa znanja v industrijo in kliniko (razvoj novega produkta). Program dela je bil v celoti realiziran, pravtako so bili doseženi vsi zastavljeni raziskovalni cilji:

- Določili smo najoptimalnejše mesto odvzema maščobnega tkiva (trebuh, stegna, zadnjica), ki bo zagotavljalo pridobitev največjega števila funkcionalnih endotelijskih celic (Cilj DS1).
- Določili smo ustrezne in vitro protokole za namnoževanje endotelijskih celic pridobljenih iz maščobnega tkiva (Cilj DS1).
- Ugotovili smo, kolikšen delež endotelijskih celic se najhaja v začetni populaciji SVF ter kolikšen delež endotelijskih celic se tekom in vitro gojenja diferencira iz matičnih celic (ASC) (Cilj DS1).
- Proučili smo vplive hipoksije na proliferacijske in diferenciacijske sposobnosti endotelijskih celic (Cilj DS2).
- Proučili smo interakcije endotelijskih celic z ostalimi tkivno specifičnimi celicami - kostnimi, gladkomišičnimi, maščobnimi (Cilj DS3).
- Rezultate pridobljene tekom raziskav smo predstavili kot znanstvene prispevke, v sodelovanju s klinikami pa pristop ožiljenja vpeljali v klinično prakso. (Cilj DS4).

Na osnovi rezultatov smo potrdili ali ovrgli sledeče hipoteze:

- Potrdili smo hipotezo, da iz lipoaspiratov maščobnega tkiva lahko pridobimo endotelijske celice, ki imajo in vitro sposobnost proliferacije in ohranjanja endotelijskega fenotipa.
- Potrdili smo hipotezo, da endotelijske celice lahko iz maščobnega tkiva pridobimo kot že diferencirane endotelijske celice, ki se nahajajo v populaciji stromalno-žilne frakcije (SVF) lipoaspiratov. Ovrgli smo hipotezo, da lahko endotelijske celice z ustreznimi pogoji *in vitro* diferenciramo iz matičnih celic (ASC).
- Potrdili smo hipotezo, da znižani odstotki kisika na fenotip ASC in endotelijskih celic vplivajo tako, da povzročijo večjo tvorbo angiogenih faktorjev (VEGF), in ovrgli hipotezo, da znižani odstotki

kisika povzročijo intenzivnejšo diferenciacijo in obstojnost endotelijskih celic.

-Pri proučevanju medsebojnih vplivov endotelijskih celic in ostalih tkivnospecifičnih celic, smo v primeru kostnih celic potrdili, v primeru gladkomišičnih in maščobnih celic pa ovrgli hipotezo, da sočasno gojenje (ko-kultura) endotelijskih celic in drugega tkivno-specifičnega tipa celic (kostne, gladkomišične ali maščobne celice) vpliva na proliferacijske in diferenciacijske lastnosti endotelijskih celic.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Izvajanje večine aktivnosti se je v letu 2013 iz podjetja Educell preneslo na Institut Jožef Stefan, na oddelk Biokemija, molekularna in strukturna biologija, kjer je bila zagotovljena vsa potrebna infrastruktura za izvajanje raziskovalnega dela. Kot posledica prenosa aktivnosti projekta na drugo institucijo, so bile vsebinske in finančne aktivnosti projekta v letu 2013 za tri mesece zaustavljene. Aktivnosti so v letu 2013 kljub temu potekale v skladu s predlogom projekta, vendar s tromesečnim zamikom. Zaradi nastopa porodniškega dopusta, so bile aktivnosti na projektu od aprila 2014 do maja 2015 zaustavljene. Omenjene časovne in prostorske spremembe niso vplivale na vsebino in rezultate projekta.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	29696217	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Avtologne celične terapije za regeneracijo kostnega tkiva
		ANG	Autologous cell therapies for bone tissue regeneration
	Opis	SLO	Je vodilna avtorica poglavja z naslovom 'Autologous cell therapies for bone tissue regeneration' (sl.: Avtologne celične terapije za regeneracijo kostnega tkiva', v katerem so predstavljeni pristopi, postopki in klinična uporaba celičnih produktov za regeneracijo kostnega tkiva. Predstavljena je problematika ožiljenja tkivnih nadomestkov in potencialna uporabnost endotelijskih celic iz maščobnega tkiva za namene ožiljenja.
		ANG	Mirjam Frohlich is a leading author of a chapter, entitled: 'Autologous cell therapies for bone tissue regeneration', in which the approaches, procedures, and clinical use of cell products for bone tissue regeneration are presented. The importance of vascularization of tissue implants is emphasized, as well as the potential of endothelial cells derived from adipose tissue for vascularization purposes.
	Objavljeno v	V: TAL, Haim (ur.). Bone regeneration. Rijeka: InTech, 2012, str. 25-50. [COBISS.SI-ID 29696217] kategorija: 3B (Z1); tipologijo je verificiral OSICM točke: 3, št. avtorjev: 10	
Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji	
2.	COBISS ID	27526439	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Uporaba celic in biomaterialov za regeneracijo obolelih in poškodovanih tkiv
		ANG	Using Cells and Biomaterials for Regeneration of Diseased and Damaged Tissues
	Opis	SLO	Kot vabljenega predavateljica je na mednarodnem kongresu pripravila prispevek 'Using Cells and Biomaterials for Regeneration of Diseased and Damaged Tissues', v katerem je predstavila uporabo matičnih celic iz maščobnega tkiva za regenerativno medicino, kot za predklinično testiranje biomaterialov/substanc.
		ANG	In the Regional Biophysics Conference 2012, she had an invited lecture 'Using Cells and Biomaterials for Regeneration of Diseased and Damaged

			Tissues', in which she presented the potential of the use of adipose-derived stem cells for the purposes of regenerative medicine and in vitro testing systems for drugs and biomaterials.
	Objavljeno v	Regional Biophysics Conference 2012. Kladovo, Serbia. September 3rd – 7th 2012.	
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanja)	
3.	COBISS ID	27520295	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Peptid OSIP108 inhibira biofilm Candide albicans brez vpliva na viabilnost celic
		ANG	The plant-derived decapeptide OSIP108 inhibits Candida albicans biofilm formation without affecting cell viability
	Opis	SLO	Mirjam Fröhlich je so-avtorica znanstvenega prispevka z naslovom 'The plant-derived decapeptide OSIP108 inhibits Candida albicans biofilm formation without affecting cell viability', v katerem je s pomočjo endotelijskih monoslojnih kultur, kot tudi t.i. 'tube formation' testa (obe metodi predstavljata osnovni orodji za študije endotelijskega fenotipa razvitih znotraj projekta), ovrednotila citotoksičen vpliv testne molekule na proliferacijo endotelijskih celic ter njihovo sposobnost tvorjenja tubularnih struktur.
		ANG	Mirjam Fröhlich is a co-author of a scientific paper 'The plant-derived decapeptide OSIP108 inhibits Candida albicans biofilm formation without affecting cell viability', where she employed monolayer endothelial cultures as well as tube formation test (both methods represent fundamental approaches to study endothelial function in the project) to assess the influence of the tested molecule on proliferation and tube forming potential of endothelial cells.
	Objavljeno v	Antimicrob Agents Chemother (2014): 58(5): 2647-56.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	28601639	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Identifikacija in karakterizacija diklorokarbazola s protimikrobno aktivnostjo
		ANG	Identification and characterization of an anti-pseudomonal dichlorocarbazol derivative displaying anti-biofilm activity
	Opis	SLO	Mirjam Fröhlich je so-avtorica znanstvenega prispevka z naslovom 'Identification and characterization of an anti-pseudomonal dichlorocarbazol derivative displaying anti-biofilm activity', v katerem je s pomočjo endotelijskih kultur, s t.i. 'tube formation' testom (metoda predstavljata eno od osnovnih orodij za študije endotelijskega fenotipa razvitih znotraj projekta), ovrednotila citotoksičen vpliv testne molekule na sposobnost endotelijskih celic za tvorjenje tubularnih struktur.
		ANG	Mirjam Fröhlich is a co-author of a scientific paper 'Identification and characterization of an anti-pseudomonal dichlorocarbazol derivative displaying anti-biofilm activity', where she employed tube formation test (a method representing a fundamental approach to study endothelial function in the project) to assess the influence of the tested molecule on tube forming potential of endothelial cells.
	Objavljeno v	Bioorg Med Chem Lett. (2014): 24(23): 5404-8.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	101	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Vpliv transdukcije na diferenciacijski potencial matičnih celic maščobnega tkiva

		ANG	Effects of lentivirus transduction with Tomato Red protein on differentiation potential of human adipose derived stem cells
Opis	SLO		Mirjam Fröhlich je prva avtorica znanstvenega prispevka z naslovom 'Effects of lentivirus transduction with Tomato Red protein on differentiation potential of human adipose derived stem cells', Fröhlich M, Choi JH, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D, v katerem je ovrednotila vpliv transdukcije na osteogeno in adipogeno diferenciranje ASC. Za namene natančnejšega proučevanja interakcij in razlikovanja med dvema tipoma celic v kulturi, smo ASC transducirali s fluorescenčnim označevalcem (protein Tomato Red), kar predstavlja tudi običajno prakso v literaturi. Zaenkrat še ni bilo pokazano, da bi transdukcija, poleg izražanja omenjenega proteina, bistveno vpliva na ostale lastnosti celice. Nasprotno, pa smo v naših poskusih dokazali, da so bili pri transduciranih celicah, v primeru ostrogenega medija (diferenciacija ASC v kostne celice), markerji kostnega fenotipa izraženi močnejše, kot pri netransduciranih ASC. V primeru adipogenega medija (diferenciacija ASC v maščobne celice), transdukcija ni vplivala na izražanje adipogenih markerjev. Omenjeni rezultati so močno relevantni za mnoga področja znanstvenih raziskav.
		ANG	Mirjam Fröhlich is a first co-author of the paper 'Effects of lentivirus transduction with Tomato Red protein on differentiation potential of human adipose derived stem cells' Fröhlich M, Choi JH, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D, in which she studied the effect of lentiviral transduction on ASC phenotype. Transduction enhanced the expression of osteogenic markers, but had no effect on adipogenic differentiation.
	Objavljeno v	Cell biology international; v procesu objave	
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	27527463	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Uporaba matičnih celic maščobnega tkiva za namen regeneracije tkiva
		ANG	Adipose-derived stem cells for tissue regeneration
	Opis	SLO	Na kongresu WAOCS, katerega se udeležujejo kozmetični kirurgi, je predstavila uporabo celic pridobljenih iz maščobnega tkiva za namene rekonstrukcije mehkih tkiv. Na predavanju je med drugim predstavila tudi rezultate pridobljene tekom postdoktorskega projekta, pri čemer je poudarila pomen endotelijskih celic in žilnega potenciala za uspešnost klinične aplikacije. Na omenjeni konferenci je pridobila potencialne partnerje za razvoj kliničnega produkta – regenerativne celice iz maščobnega tkiva z močnim žilnim potencialom. S priznanim kozmetičnim kirurgom dr. Petrom Lisborgom (Klinike PKLP Ästhetic, Klagenfurt, Austria) poteka aktivno sodelovanje na razvojno-raziskovalnem področju.
		ANG	Mirjam Frohlich gave an invited lecture at the 3rd Annual Meeting of World Academy of Cosmetic Surgery (WAOCS) in Vienna, Austria. She presented the potential of the use of cells derived from adipose tissue for the purposes of soft tissue regeneration. Among other things, she presented results from her studies, focusing on endothelial cells derived from adipose tissue for the vascularization purposes. At the conference she made contacts and initiated collaborations with partners for the development of new clinical product – cells from adipose tissue with a strong vascular potential. The active R&D collaboration with the well known cosmetic surgeon dr. Peter Lisborg (Klinike PKLP Ästhetic, Klagenfurt, Austria) is

			ongoing.
	Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	3rd Annual Meeting of World Academy of Cosmetic Surgery. WAOCS. Vienna, Austria. August, 31st 2012.	
	Tipologija	3.16	Vabljen predavanje na konferenci brez natisa
2.	COBISS ID	27583783	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Alternativni viri človeških gladko-mišičnih celic
		ANG	Alternative Sources Of Human Smooth Muscle Cells
	Opis	SLO	Kot soavtorica je na kongresu Meeting of the Society for In Vitro Biology 2013 objavila prispevek o alternativnih virih človeških gladko-mišičnih celic kot pomembne komponente za pripravo funkcionalnih žilnih struktur.
		ANG	At the Meeting of the Society for In Vitro Biology 2013, she had a paper on alternative sources of human smooth muscle cells, which present an important component for engineering of functional vascular structures.
	Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	2013 in vitro Biology Meeting; 2013 Meeting of the Society for In Vitro Biology. June 15 – 19, Providence, Rhode Island	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID	16799510	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	n-POSSCOG
		ANG	n-POSSCOG
	Opis	SLO	Kot soavtorica je na kongresu '4th International Congress Nanotechnologym Medicine, and Biology' predstavila uporabo primarnih celic, vključujoč endotelijske celice za namene testiranja materialov, ki jih razvijajo v namene biomedicinske uporabe. Pri testiranjih materialov je pomembno izbrati ustrezni celični vir – v večini primerov je za uspešno implantacijo potrebna dobra ožiljenost okoljnega tkiva, za kar je potrebno zagotoviti, da dotičen material nima negativnih vplivov na žilne celice.
		ANG	At the 4th International Congress Nanotechnologym Medicine, and Biology, she had a paper on the use of primary cells, including ASC, for purposes of safety testing of materials which are being developed for biomedical purposes. When testing biomaterials it is of crucial importance to choose the most relevant cell type – in most cases, well established vasculature of the tissue is a prerequisite for succesfull integration of a biomaterial, therefore it is important that the biomaterial doesn't cause negative effects on vascular cells.
	Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	BioNanoMed2013. 4th International Congress Nanotechnologym Medicine, and Biology. 13 – 15 March 2013, Krems, Austria.	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
4.	COBISS ID	27056423	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Učinki sintranja na citotoksičnost aktivnih biostekel testirani s pomočjo človeških primarnih celic
		ANG	The effect of sintering on active bioglass cytotoxicity evaluated by human primary cells
	Opis	SLO	Kot soavtorica je na kongresu '25th European Conference on Biomaterials, ESB 2013' predstavila uporabo primarnih celic za namene testiranja materialov, ki jih razvijajo v namene regeneracije kostnega tkiva. Za uspešno inplantacijo in regeneracijo kostnega tkiva je dobra ožiljenost

			ključnega pomena, zato je potrebno zagotoviti, da dotičen material nima negativnih vplivov na žilne celice.
		ANG	At the 25th European Conference on Biomaterials, ESB 2013 she had a paper on the use of primary cells for the purposes of safety testing of materials being developed for the purposes of bone tissue regeneration. Well established vasculature is a prerequisite for successful integration and regeneration of bone tissue, therefore the implanted material should support the survival and growth of vascular cells.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	V: 25th European Conference on Biomaterials, ESB 2013, XXV Symposium of the European Society for Biomaterials, 8-12 September 2013, Madrid (Spain).	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
5.	COBISS ID		Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Razvoj nove tehnologije
		ANG	Development of new technology platform
	Opis	SLO	Pridobljeni rezultati imajo tudi veliko aplikativno vrednost, saj smo na njihovi osnovi v Educellu razvili novo celično tehnološko platformo in produkt (set za osamitev celic z regeneracijskim potencialom iz maščobnega tkiva), predstavljajo pa tudi osnovo za razvoj nove metode preverjanja kakovosti. Nova celična tehnologija temelji na celični komponenti z žilnim potencialom (pridobljena iz maščobnega tkiva) in je trenutno v eksperimentalni klinični fazi za dve indikaciji: i) regeneracijo čeljustnega kostnega tkiva, kjer je bilo obravnavanih 5 pacientov in ii) pomlajevanje obraznih mehkih tkiv, kjer je bilo obravnavanih 7 pacientov. Dosedanji klinični rezultati kažejo spodbudne rezultate. Nova celična tehnologija ima velik potencial tudi za druge indikacije kot npr. za regeneracijo mišičnega tkiva. Metoda za preverjanje kakovosti celične komponente, bo temeljila na določanju in vitro žilnega potenciala ASC in bo uporabljena za napovedovanje uspešnosti implantacije ASC ter bo tako lahko še dodatno zagotovila večjo uspešnost nove tehnologije.
		ANG	Results of the project have a great applicative value as they served as a basis for new cell technology platform and a product (set for isolation of regenerative cells from the adipose tissue). New cell technology platform is based on a cellular component with high vascular potential and is currently being used for two clinical indications: i) regeneration of maxilar bone tissue (5 patients so far), and ii) rejuvenation of facial tissues (7 patients so far). The results are encouraging. The new technology platform has a great potential also for other clinical indications, e.g. regeneration of muscle tissue. Based on the project results, a new Quality Control method can be developed, which would – on the prediction of vascular potential – further increase the success of new cell therapies.
	Šifra	F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Objavljeno v	N/A	
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^Z

F.06 Razvoj novega izdelka

Vzpostavili in validirali smo t.i. test formiranja tubularnih struktur, za katerega smo zaenkrat uporabili komercialno dostopne endotelijske celice in nam omogoča spremljanje odziva endotelijskih celic na različne okoljske faktorje. Razvoj omenjenega testa predstavlja osnovo za

nov tržni produkt v podjetju Educell. Ob uspešni nadgradnji, bi lahko v vzpostavljenem sistemu uporabili tudi endotelijske celice pridobljene iz lipoaspiratov, kar bi pomenilo dodaten sistem vrednotenja in potencialno možnosti razvoja personaliziranih predkliničnih testov.

Strokovno predavanje:

Na strokovnem srečanju Zdravstvenih domov Ljubljana, je M Frohlich predstavila zahteve, ki so ključnega pomena za razvoj uspešnega produkta: opredelitev klinične aplikacije, prepoznati potrebo po učinkovitejših pristopih zdravljenja, oceniti pogostost bolezni, določiti zahteve za produkt (vloga ožiljenja), kontrola kakovosti, upoštevati zakonske regulative. (Fröhlich M. Technology and development aspects of introducing cell therapies into clinical practice. Expert Meeting held by Community Health Centre Ljubljana. Ljubljana, Slovenia. June 19th 2012.)

B.01 Organizator znanstvenega srečanja

M. Frohlich je bila (v okviru Društva za celično in tkivno inženirstvo Slovenije) oranzatorica in predsednica mednarodnega simpozija z naslovom: "Regenerative Medicine: Achievements and Perspectives", (17.4.2015, Ljubljana), na katerem so se predstavili trenutni trendi na področju regenerativne medicine.

D.09 Mentorstvo doktorandom

M Frohlich je mentorica doktorandki Urški Potočar (področje raziskav: matične celice maščobnega tkiva) in delovna mentorica Matiji Vebru (področje raziskav: alternativni viri žilnih celic).

9.Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1.Pomen za razvoj znanosti²

SLO

Poškodbe tkiv, katerih število se s staranjem prebivalstva še povečuje, predstavljajo veliko potrebo po tkivnih implantih. Uspešnost in vitro pripravljenih tkivnih implantov je v veliki meri odvisna od njihove ožiljenosti oz. potenciala za ožiljenost, vendar ta problem še vedno ostaja nerazrešen. V naših raziskavah smo vse potrebne celične tipe za tkivni implant (tkivnospecifične celice in žilne celice) pridobili iz enega samega, klinično relevantnega vira – maščobnega tkiva, katerega odvzem je enostaven in za pacienta netvegan. Osredotočili smo se predvsem na endotelijske celice stromalne žilne frakcije maščobnega tkiva (ang. Stromal Vascular Fraction, SVF), pri čemer smo proučevali njihove lastnosti (količina, izvor, zmožnost samo-urejanja v žilne elemente), odzive na pogoje značilne za mesto implantacije, oz. postopke priprave celičnega produkta (kot npr. znižani odstotki kisika in prisotnost oz. odstotnost žilnih rastnih faktorjev, osmolarnost) in medcelične interakcije z ostalimi tkivno-specifičnimi celicami. Pridobljena znanja predstavljajo znanstveni doprinos na področju biologije endotelijskih celic, matičnih celic, celičnih interakcij, ter tudi mnogo širše in sicer na področju pristopov in vitro ožiljenja, ki je relevantno za mnoga področja tkivnega inženirstva in regenerativne medicine kot npr. regeneracija kostnega tkiva, kože in mišic. Znanstvene rezultate smo uporabili za razvoj nove celične tehnologije, ki je v eksperimentalni fazi preizkušanja za dve klinični indikaciji in sicer za regeneracijo čeljustne kosti in kože.

ANG

Due to numerous tissue defects, which will even increase further in coming years due to the aging of the population, there is a great need for tissue substitutes. Bone defects, and soft tissue defects present two big areas for the use of in vitro engineered tissue implants. The success of implantation of the in vitro engineered tissue greatly depends on the vascularization of the implant. The problem of vascularization, however, hasn't been adequately solved yet. In our studies, all cell types needed for engineering a tissue implant can be obtained from a single, clinically relevant cell source – adipose tissue, which is easy to harvest and is safe for the patient. The focus of our research were the endothelial cells derived from stromal vascular fraction, namely, their characteristics (quantity, origin, self-assembly potential to form vascular structures), their response to specific environments characteristic for the implantation site or the process of preparation of cell product (such as hypoxia, presence or absence of VEGF,

osmolarity), and their integrations with other tissue specific cells. The obtained results contribute to the development of scientific field of stem cells, endothelial cells, and cell interactions, as well as to the area of in vitro vascularization approaches, which are applicable to the broad field of cell therapy and tissue engineering aiming at regeneration of bone, soft (skin) tissues, heart and skeletal muscle, vessels, wounds, etc. Results of this study also served as a base for the development of new cell technology platform aiming for regeneration of bone and augmentation of soft tissue.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Zaključki raziskave predstavljajo temelje za razvoj in vpeljavo inovativnih pristopov za regeneracijo in rekonstrukcijo tkiv v klinično prakso. Z rezultati smo prispevali k reševanju enega najbolj perečih problemov na področju tkivnega inženirstva – ožiljenju. Pridobljena znanja o žilni komponenti lipoaspiratov so potencialno uporabna na širokem področju zdravljenja s celičnimi terapijami, kjer je ožiljenje ključnega pomena, kot npr.: tkivni implantati za kostne poškodbe, poškodbe mehkih (kožnih) tkiv, poškodbe srčne in skeletne mišice, zdravljenje bolezni žilja, težko celeče rane, ipd. Osnovna dejavnost podjetja Educell je razvoj celičnih terapij za namene zdravljenja in regeneracije humanih tkiv. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo v podjetju že tekom projekta razvili novo celično tehnologijo, ki omogoča regeneracijo kostnega in mehkega tkiva in predstavlja primer neposredne uporabe znanstvenih rezultatov za razvoj celične terapije in njene uporabe v kliniki. Pridobljeni rezultati predstavljajo tudi možnosti za razvoj novih celičnih produktov ter metod kontrole kakovosti in zato omogočajo neposreden napredek podjetja kot tudi celotne gospodarske panoge - biotehnologije. Vpeljava pridobljenih znanj v klinično prakso ima tudi velik socialno-ekonomski pomen, saj učinkovitejši pristopi zdravljenja zmanjšajo stroške obravnave bolezni. Zaradi učinkovitejše terapije se število ponovnih obravnav zmanjša, kar posledično pomeni tudi manjše stroške in višjo kakovost življenja pacientov. Tekom projekta so se vzpostavila in ohranjala številna sodelovanja tako z domačimi kot s tujimi partnerji, vključujoč industrijo in akademijo, kar predstavlja veliko dodano vrednost rezultatom ter večjo konkurenčnost slovenske znanosti in podjetij. Vpeljava inovativnih pristopov zdravljenja v klinično prakso pomeni promocijo podjetja, raziskovalnih organizacij, slovenskih znanstvenikov in države v mednarodnem prostoru, saj so primeri uspešne uporabe celičnih terapij v klinični praksi še vedno razmeroma redki. Vpeljava novih pristopov zdravljenja bo pripomogla k razvoju biotehnologije, oz. natančnejše tkivnega inženirstva, ki je v Sloveniji, primerjalno z Zahodnim svetom še precej nerazvito. Razvoj omenjenega področja bo nudil tudi večjo možnost kakovostnejšega izobraževanja in zaposlitev za mlade v slovenskem prostoru. Pridobljeno znanje se bo ohranjalo in prenašalo tudi na študente in sicer preko programov biotehnologije Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

ANG

The results of the study serve as a basis for the development and introduction of new innovative approaches for the regeneration of tissues into the clinical practice. The novel approach will contribute to solving one of the most difficult problems in the field of cell and tissue engineering – vascularization. The results and knowledge gained through the project are applicable to the broad field of cell therapy and tissue engineering aiming at regeneration of bone, soft (skin) tissues, heart and skeletal muscle, vessels, wounds, etc. The main Educell's activity is development of cell therapies for regeneration of tissues in humans. In this context, based on the project results, a new cell technology platform aiming at regeneration of bone and soft tissue has been developed by the company and was successfully introduced into the clinics already in the course of the project. Furthermore, results present the possibility of development of additional cell products, as well as quality control tests and therefore contribute to direct professional and economical benefits of the company, as well as growth and promotion of whole economy branch – biotechnology, more specifically tissue engineering. Introduction of more efficient methods to the clinical practice also has a beneficial socio-economical impact as they result in fewer secondary interventions needed, which is consequently leading to money savings, as well as to improving the life quality of the patients. In the course of the project, numerous collaborations were initiated or maintained, including world-wide acknowledged research laboratories and industry, which contributed to the increased quality of results and increase of the competitiveness of Slovenian science as well as the business sector. Successful

implementation of the project and introduction of new methods to the clinical practice importantly promotes the company, research entities, the country and its scientists internationally, as examples of successful implementation of cell therapies in the clinics are still fairly rare. New knowledge and development of tissue engineering approaches contributes to the development of tissue engineering – currently, a rather undeveloped field in Slovenia - which might provide additional chances for the education and employment of younger people. The knowledge will also be transferred through lectures to the students of biotechnology at the Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana.

10. 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	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	▼
	Uporaba rezultatov	▼
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

11. 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	☒	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☒	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☒	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☒	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☒	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☒	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☒	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☒	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☒	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☒	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☒	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☒	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☒	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☒	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☒	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☒	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☒	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☒	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☒	☐	☐	☐	
	Varovanje okolja in trajnostni					

G.06.	razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra	
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

13.Izjemni dosežek v letu 2015¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Za namene natančnejšega proučevanja interakcij žilnih celic z ostalimi tkivno-specifičnimi celicami v ko-kulturi, smo ASC transducirali s fluorescenčnim označevalcem Tomato Red, kar predstavlja tudi običajno prakso v literaturi. Zaenkrat še ni bilo pokazano, da bi transdukcija, poleg izražanja omenjenega proteina, bistveno vpliva na ostale lastnosti celice. Nasprotno, pa smo v naših poskusih dokazali, da so bile pri transduciranih celicah, nekatere lastnosti celic spremenjene: ugotovili smo znižano proliferacijo, v primeru ostogene diferenciacije pa so bili markerji kostnega fenotipa izraženi močneje, kot pri netransduciranih ASC. V primeru adipogene diferenciacije ASC, transdukcija ni vplivala na izražanje adipogenih markerjev. Omenjeni rezultati so pomembni za mnoga področja bioloških in medicinskih raziskav, saj je pomembno razlikovati med spremembami, ki jih povzroči proučevan dejavnik in spremembami, ki so posledica metode/orodja za vizualizacijo celice.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

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:

EDUCELL podjetje za celično biologijo
d.o.o. Ljubljana

Mirjam Fröhlich

ŽIG

Datum:

21.3.2016

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2016/30

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² 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](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ 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](#)

⁵ 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](#)

⁶ 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](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ 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](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

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

¹¹ Rubrike izpolnite / prepišite 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](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2015 (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 priponko/-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/2016 v1.00

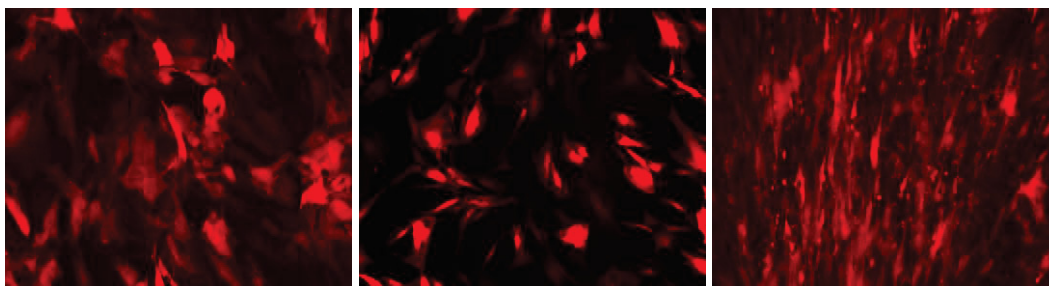
90-57-8C-7C-C0-E6-B5-6B-28-C5-E7-9E-2E-C6-14-1D-4E-C8-37-EE

Priloga 1

MEDICINSKE VEDE

Področje: 3.04 Medicinska biotehnologija

Dosežek 1: Uporaba žilnih celic maščobnega tkiva za ožiljenje tkivnih implantov – diseminacija področja in rezultatov



Izražanje proteina Tomato Red v (A) nediferenciranih matičnih celicah maščobnega tkiva (ASC), (B) adipogeno diferenciranih ASC in (C) osteogeno diferenciranih ASC.

Ovrednotenje vpliva transdukcije na osteogeno in adipogeno diferencirane matične celice maščobnega tkiva (ASC). Za namene natančnejšega proučevanja interakcij žilnih celic z ostalimi tkivno-specifičnimi celicami (kot npr. osteoblastne in maščobne) v ko-kulturi, smo ASC transducirali s fluorescenčnim označevalcem 'Tomato Red', kar predstavlja tudi običajno prakso v literaturi. Zaenkrat še ni bilo pokazano, da bi transdukcija, poleg izražanja omenjenega proteina, bistveno vpliva na ostale lastnosti celice. Nasprotno, pa smo v naših poskusih dokazali, da so bile pri transduciranih celicah, nekatere lastnosti celic spremenjene: ugotovili smo znižano proliferacijo, v primeru ostrogenega medija pa so bili markerji kostnega fenotipa izraženi močnejše, kot pri netransduciranih ASC. V primeru adipogenega medija (diferenciacija ASC v maščobne celice), transdukcija ni vplivala na izražanje adipogenih markerjev. Omenjeni rezultati so pomembni za mnoga področja bioloških in medicinskih raziskav, saj je pomembno razlikovati med spremembami, ki jih povzroči proučevan dejavnik in spremembami, ki so posledica metode/orodja za vizualizacijo celice. Omenjeni rezultati so zbrani v znanstvenem prispevku z naslovom 'Effects of lentivirus transduction with Tomato Red protein on differentiation potential of human adipose derived stem cells', ki je v postopku oddaje.