

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/225

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-9612
Naslov projekta	Uporaba humane matične celice za zdravljenje
Vodja projekta	12336 Primož Rožman
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	2.838
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	07.2007 - 06.2010
Nosilna raziskovalna organizacija	311 Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	7421 EDUCCELL podjetje za celično biologijo d.o.o. Ljubljana
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	13.03
Naziv	Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Terapija z uporabo matičnih celic (MC) je logično nadaljevanje današnjega transfuzijskega zdravljenja s krvjo, ki ga bodo v veliki meri nadomestile celične terapije. Raziskave različnih primitivnih matičnih celic v kostnem mozgu, t.j. krvotvorne matične celice (KMC), mezenhimske matične celice (MMC) in različnih drugih MC so pokazale, da jih lahko razvijemo v različne somatske celice ekto-, endo- in mezodermalnega porekla in načeloma uporabimo za avtologno ali alogensko zdravljenje.

Že okrog 30 let je jasno, da se KMC nahaja v kostnem mozgu odrasle osebe. Pri tem ni popolnoma jasno, kdaj in kako nastane iz primitivne predniške oblike matične celice. Znano je, da s pomočjo svojega proliferacijskega in samoobnovitvenega potenciala proliferira v vse krvne celične linije, poleg tega pa s pomočjo plastičnosti tudi dediferencira in se spremeni v druge oblike matičnih celic in progenitorjev, kot so endotelna matična celica, mezenhimska MC in druge. Končni učinek teh pojavov je naselitev različnih organov in razvoj v različne somatske celice (srčna, živčna, itd.) (Martin-Rendon in Watt, 2003).

V zadnjem času je jasno, da bo potrebno spremeniti določene poglede na diferenciacijo matičnih celic, pri čemer je ključnega pomena poznavanje embrionalne matične celice (EMC). Ker je pridobivanje EMC zaradi socioloških in drugih vzrokov oteženo, lahko v ta namen uporabljamo tudi drugi vrste celic, ki imajo podoben potencial kot EMC (Hochedlinger in Jaenisch, 2006).

V okviru projekta J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje je bil glavni namen razviti metode za osamitev in karakterizacijo primitivnih MC iz popkovnice in nadalje ugotoviti, ali to celično vrsto diferenciramo in namnožimo v ključni list endoderma (npr. v prednike pankreatične celice) in v ključni list mezoderma (koža, kost, krvne celice megakarioblastne in eritroblastne linije).

Na začetku smo iz sveže popkovnične krvi izolirali MC, ki so po morfologiji zelo podobne že poznanim primitivnim MC iz popkovnice (prej imenovane MLPC), ter iz njih ustvarili stabilno celično linijo. To smo nato okarakterizirali s pretočnim citometrom določili površinske antigene (CD29, CD44, CD105) ter s fluorescenčnim barvanjem in konfokalno mikroskopijo določili znotrajcelična označevalca oct4 in sox2, ki sta značilna embrionalna ekspresijska faktorja. Z barvanjem po Gurr/Giemsi smo preverili tudi stabilnost kromosomov. Dobljena domača linija je imela kljub tri- in tetra-ploidiji nekaterih kromosomov sposobnost diferenciacije v živčne in jetrne celice, kar smo dokazali z usmerjenim gojenjem na 2D kulturi v specializiranih medijih ter določitvijo specifičnih markerjev (alfa fetoprotein, albumin, citokeratin7,18,19 za jetrne celice in NF200, GFAP in doublecortin za živčne celice) z metodo konfokalne mikroskopije. Jetrne celice so predstavnice endoderma, živčne celice pa predstavnice ektoderma.

V nadaljevanju smo se usmerili v poglobljene načine izolacije in razvoja različnih tipov matičnih celic iz popkovnične krvi. Te poskuse smo izvedli na inštituciji "International Centre for Life", oddelek North East England Stem Cell Institute (laboratorij za matične celice) in Univerzi Newcastle upon Tyne, UK, v sodelovanju s skupino prof. Colina McGuckina. Izolacije so potekale s pomočjo imunomagnetnih partiklov. Pozitivno selekcijo smo izvedli s komercialnima kitoma proti antigenu CD133 (Miltenyi Biotech) in CD34 (Dyna-Invitrogen), negativna selekcija celic pa s kokejzom protiteles proti antigenom CD7, CD33, CD45 in CD235a. Celice smo gojili v enoslojni celični kulturi, poskusili pa smo tudi gojenje v biorektorskem sistemu (Synthecon). Končno smo osamili celično linijo primitivnih MC, ki jih raziskovalci v zdajšnjem času imenujejo celice CBE (angl. cord blood derived embryonic like stem cells) (McGuckin in sod. 2005). Te celice smo uspešno okarakterizirali in diferencirali v ektodermale živčne progenitorje. Delo, pri katerem je sodeloval naš MR Marko Strbad, je bilo tudi objavljeno v Nature Protocols (McGuckin in sod. 2008).

Nato smo nadaljevali z diferenciacijami MC iz popkovnične krvi v insulin producirajoče celice. Protokole, dostopne iz literature, smo optimizirali do te mere, da smo skrajšali čas diferenciacije, pri tem pa nismo zasledili zmanjšane števila celic (skupkov), katerim smo določili produkcijo c-peptida, prekursorja, ki določa produkcijo inzulina. Popkovnično kri, ki smo jo uporabili v raziskavi, smo pridobili iz javne banke popkovnične krvi – enote ESPOK Zavoda RS za transfuzijsko medicino, in sicer kot vzorce, ki niso ustrezali kriterijem za shranjevanje v javni banki. Za pridobljene vzorce smo pridobili soglasje staršev, ter dovoljenje Komisije za medicinsko etiko R Slovenije. Kri je bila zbrana v sterilno vrečko proizvajalca MacoPharma, kateri je že dodana ohranitvena raztopina CPD (21 ml). Vzorce smo nato v aseptičnih pogojih prenesli v sterilne centrifugirke (50 ml) (TPP, Švica), zmešali z izotonično raztopino PBS (Sigma, USA), ter prenesli na raztopino Ficoll-a z gostoto 1,077 g/L. Gradientnemu centrifugiranju je sledilo žetje in izolacija celic, ter nasaditev v gojilne posodice z 12 oz 24 luknjicami (TPP, Švica). Celice smo najprej gojili v serumskem mediju s citokini (trombopoetin, SCF, in FLT-3) in proteini ekstracelularnega matriksa (kolagen). Ta medij omogoča ohranjanje in regeneracijo matičnih celic po izolaciji. Inkubacijski dobi 1-3 dni je sledilo namnoževanje celic (medij s serumom in rastnimi dejavniki EGF, SCF, bFGF ter kolagenom). Medij omogoča namnožitev matičnih celic brez spontane diferenciacije. Po 6 do 9-dnevni ekspanziji smo celicam dodali medij, ki spodbuja diferenciacijo celic v smer pankreatičnih celic (serumski medij z Activinom A, retinojsko kislino, bFGF, heparinom in kolagenom), kateremu je sledilo zorenje celic v insulin producirajoče celice (serumski medij z N2, B27, nikotinamidom, bFGF, heparinom, lamininom in kolagenom). Začetne stopnje izolacije celic in stopnje diferenciacije smo sproti analizirali s pretočno citometrijo in/ali s imunocitokemičnimi barvanji. Ugotovili smo, da velik delež izoliranih celic izraža transkripcijske faktorje SOX-2 in Oct-4, ter Nanog, označevalce značilne za pluripotentne matične celice. Na stopnji diferenciacije smo preverili produkcijo c-peptida in inzulina. Produkcijo omenjenih peptidov smo preverili tudi na končni populaciji celic. Terminalno diferenciarne celice in skupke smo označili tudi s protitelesi proti glukagonu, s čimer smo preverili izločanje peptida iz skupkov. V vseh primerih smo dobili pozitiven rezultat. Kljub temu, da nam je uspelo usmerjeno gojiti matične celice v pankreatične celice, je izplen le teh še vedno majhen (2-5%), ter tako še neprimeren za translacijo v klinično študijo.

Poleg glavne smeri raziskave J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje, ki je bila usmerjena v

raziskovanje uporabnosti MC iz popkovnične krvi, pa so raziskave hkrati vodile tudi v nekatere nepričakovane in nenačrtovane smeri, oz. so imele stranske učinke. V kontekstu raziskav MC smo v okviru sodelovalne raziskovalne organizacije Educell d.o.o. izdelali postopke izolacije in shranjevanja matičnih celic iz kostnega mozga in adipoznega tkiva. Gre za matične celice iz odraslih tkiv, katerih uporaba ni etično sporna. V prvi fazi smo postavili in optimizirali postopke za izolacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva (ASC) in kostnega mozga (BMSC) in njihovo uspešno razmnoževanje v enoslojnih celičnih kulturah. Naslednja faza je bila postavitvev metod za diferenciacijo in karakterizacijo celic. Z diferenciacijo celic v smeri mezodermalnih tkiv kot so kost, maščobno tkivo in hrustanec smo bili uspešni tako v primeru ASC kot BMSC. Pri obeh virih celic smo potrdili ključne parametre, ki so kriterij za opredelitev celične populacije kot populacije mezenhimskih matičnih celic:

- celice so adherentne in se pritrjujejo na podlago ter so sposobne pomnoževanja
- celice izražajo membranske označevalce CD105, CD90 in CD73, ne pa CD45 in CD34
- celice so sposobne diferenciacije v različne vrste mezenhimskih celic.

Adipogeno diferenciacijo smo vrednotili s formiranjem maščobnih kapljic ter na nivoju genske ekspresije. Gensko ekspresijo smo merili z ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System in programom 2.3 SDS (Applied Biosystems, ZDA) s pomočjo TaqMan® Gene Expression Assays po navodilih proizvajalca. Merili smo izražanje genov ADIPOQ (Hs00605917_m1), LPL (Hs00173425_m1), PPAR γ (Hs01115513_m1), VEGFA (Hs00173626_m1). Osteogeno diferenciacijo smo vrednotili z barvanjem VonKossa in izražanjem genov za osteokacin, osteopontin in alkalno fosfatazo; hondrogeno diferenciacijo smo vrednotili z izražanjem genov colIII in agrekan.

Opravili smo tudi študijo izplena mezenhimskih matičnih celic iz odvzetega biološkega materiala. Preizkusili smo kostni mozeg in maščobno ali adipozno tkivo. V študiji smo proučili tudi stopnjo pomnoževanja mezenhimskih matičnih celic in vitro (v celičnih kulturah) ter njihovo sposobnost za diferenciacijo. Zaključili smo, da je potrebno posamezniku odvzeti povprečno 100 ml lipoaspirata (maščobnega tkiva) oziroma 30 ml kostnega mozga. Ta količina naj bi zadostovala za pripravo večine tkivno inženirskih pripravkov.

Opravili smo tudi študijo vpliva zamrzovanja celic v tekočem dušiku na njihovo stopnjo preživetja, sposobnost pomnoževanja in diferenciacije po odmrzovanju. Postopka zamrzovanja in odmrzovanja, ki smo ju optimizirali, sta ustrezna, saj je izplen viabilnih celic velik. Njihova regeneracija po odmrzovanju je hitra. Če gojimo celice do tretje ali četrte pasaže je njihovo število dovolj visoko za pripravo tkivno inženirskega pripravka. Prav tako se po odmrzovanju ohrani njihov diferencijski potencial.

Nenazadnje smo v okviru teh študij vzpostavili tudi sistem kakovosti pridobivanja, vzdrževanja in procesiranja celičnih kultur. Z učinkovitim nadzorom procesov poleg varnosti hkrati zagotavljamo tudi učinkovitost (z nadzorovanjem parametrov preprečujemo propad tkiv in celic ter zagotavljamo njihovo integriteto ter funkcionalnost) ter kakovost (mikrobiološka neoporečnost, dokazana živost ter metabolna aktivnost, istovetnost).

Naslednji in zadnji vzporedni del raziskave J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje - je bila tudi izjemno pomembna pilotska študija, ki je nakazala, da se določena vrsta pritivnih MC nahaja tudi pri odraslih osebah. Nakazala je, da se v kostnem mozgu odraslega človeka nahaja subpopulacija malih matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki jih je sicer zelo težko osamiti. V tej študiji smo poskusili dokazati njihove embrionalne lastnosti in preveriti, ali so se sposobne diferencirati v zgodnje progenitorje spolnih celic. Po pridobivanju vzorcev kostnega mozga zdravih preiskovancev smo najprej izolirali mononuklearne celice z gradientnim centrifugiranjem, pri čemer smo dobili različne plasti, ki so presenetljivo vsebovale enak ekspresijski profil za embrionalne označevalce (pozitivne za Oct-4A, Oct-4B, Sox2, Nanog in c-kit). Nato smo različne plasti izoliranih mononuklearnih celic gojili v različnih gojiščih ob dodatkih rastnih dejavnikov bFGF in TGF β ter folikularne tekočine. Po dvajsetdnevem gojenju, med katerim smo pozorno spremljali morfologijo celic, smo iz kultur izolirali skupno RNA in z metodo RT-PCR preverili ekspresijo germinalnih označevalcev (c-kit, SCP3, VASA, ZP2 in ZP3). V kulturi, kjer smo celice gojili v mediju z dodatkom folikularne tekočine, so se razvile velike okrogle celice (premer 80 μ m), z metodo RT-PCR smo nato preiskovali ali so celice izražale c-kit, VASA in SCP3. Dobljeni rezultati so z določeno verjetnostjo pokazali, da se v kostnem mozgu odraslih oseb nahaja populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki je sposobna nadaljne diferenciacije in ki bo v prihodnosti lahko izvor celic za regenerativno medicino. Vse te ugotovitve pa smo se odločili potrditi v bolj dokazljivi raziskavi ob uporabi novih metod molekularne biologije, ki bi izključile lažno določanje označevalcev iz področja psevdogenov, ter ob uporabi protokolov za in vitro diferenciacijo v tri klične liste ter z uporabo laboratorijskih živali za dokaz in vivo diferenciacije v teratomske klične liste. Kot posledica skupne aktivnosti raziskovalcev smo v l. 2009 uspeli s prijavo prvega nacionalnega znanstvenega programa P3-0371 Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami, ki še poteka.

Kot zaključek lahko ugotovimo, da je projekt J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje, katerega glavni namen je bil razviti metode za osamitev in karakterizacijo primitivnih MC iz popkovnice, uspešno zaključen.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Glavni cilj raziskave oz. projekta J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje je bil osvojiti ustrezno metodologijo za proliferacijo in diferenciacijo EMC in MC iz popkovnične krvi, kar naj nam bi dalo pregled in razumevanje biologije primitivnih MC iz popkovnične krvi in s čimer bi omogočili možnost izkoriščanja teh celic v klinični medicini namesto etično sporne uporabe EMC. Pričakovali smo določena odkritja in izboljšave pri novih načinih izolacije MC iz popkovnične krvi, pa tudi iz kostnega mozga in periferne krvi, razširitev metodološkega instrumentarija za karakterizacijo matičnih celic in usmerjenih celic prednic, nadaljni razvoj metod za diferenciacijo

humane matične celice predvsem v krvne celične linije ter osvojitve tehnologij za pridobivanje in prečiščevanje različnih vrst matičnih celic.

V projektu je prišlo do kakovostnega preskoka na višji nivo, ker smo bili primorani osvojiti lastno tehnologijo razvoja matičnih celic iz popkovnične krvi. Glede na predvidene mejnike za obdobje 2008-2010 menim, da smo dosegli zastavljene cilje. V tem obdobju smo izpopolnili tehnike izolacije gojenja in karakterizacije matičnih celic iz popkovnične krvi, postavili metode imunofluorescenčnega barvanja in osvojili osnove konfokalne mikroskopije. Razvili smo tudi ustrezne analitične metode - pretočno citometrijo, imunocitokemično barvanje ter molekularne metode RT-PCR. Eden izmed raziskovalcev je osvojil tudi tehniko analize kromosomv (standardno g-binding metodo) in razvoj celic v endodermalno celično linijo. S tem smo posredno posegli še v eno, izjemno pomembno klinično področje uporabe matičnih celic - t.j. v zdravljenje diabetesa. Poleg ostalega smo posegli tudi na področje razvoja embrionalnih matičnih celic in razvili tehnologije za določanje izražanja pluripotentih genov v matičnih celicah. Osvojili smo vso ostalo potrebno tehnologijo za diferenciacijo v pankreatične celice, ki so del endoderma. Kljub temu, da nam je uspelo usmerjeno gojiti matične celice v pankreatične celice, je izplen le teh še vedno majhen (2-5%), ter tako še neprimeren za translacijo v klinično študijo. Po drugi strani smo v pilotski študiji nakazali, da se v KM odraslega človeka nahaja subpopulacija malih matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki jih je sicer zelo težko osamiti in poskusili dokazati njihove embrionalne lastnosti. Vse te ugotovitve je potrebno potrditi z novimi metodami molekularne biologije, ki izključijo lažno določanje označevalcev iz področja psevdogenov, ter z in vitro diferenciacijo v tri klične liste ter in vivo diferenciacije v teratomske klične liste, zato smo vse izsledke prenesli v nacionalni raziskovalni program P3—0371-Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami, trajanje 1.1.2009—31.12.2011, kjer z omenjenimi raziskavami nadaljujemo v klinično uporabno smer. Lahko torej zaključimo, da smo raziskovalne hipoteze pravilno postavili in tudi uspešno realizirali.

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

Večjih sprememb projekta ni bilo. Tudi v sestavi projektne skupine ni prišlo do odstopanj. Zaradi relativno slabega uspeha pri uporabi komercialnih matičnih celic, vzgojenih iz popkovnične krvi (hMLPC) smo se osredotočili na lastno izolacijo takih celic iz svežih vzorcev popkovnične krvi in uporabo lastnih celičnih linij iz popkovnične krvi, ter na izolacijo embrionalnim podobnih celic iz kostnega mozga bolnikov. Izvedli smo tudi dodatne diferenciacije v celice ektoderma. Dokončali smo tudi ekspanzijo v endodermalno celično linijo (celice beta pankreasa). Dodano vrednost dajejo rezultati na področju biologije MC iz maščobe in odkritje celic ESC-A, kar ni bilo v prvotnem načrtu projekta J3-9612-0311 - Uporaba humane matične celice za zdravljenje.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

	Znanstveni rezultat		
1.	Naslov	SLO	Opis rastnih faktorjev matičnih celic, ki jih dobimo iz trombocitov
		ANG	Description of growth factors derived from platelets
	Opis	SLO	Trombociti vsebujejo več kot 14 različnih rastnih dejavnikov, ki se vpleteni v biologijo in razvoj MC. Avtorja obširno opisujeta vse aspekte njihove biološke funkcije, pridobivanje in klinično uporabnost.
		ANG	Platelets contain over 14 different growth factors implied in the SC development and differentiation. Authors extensively describe all aspects of their biological functions, their preparation and their clinical implications.
	Objavljeno v		ROŽMAN, Primož, BOLTA, Zoran. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. Acta dermatovenerolog. Alp. Panon. Adriat., 2007, vol. 16, no. 4, str. 156-165.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		23866329
2.	Naslov	SLO	Embrionalnim podobne celice se nahajajo tudi v tkivih odraslega človeka – v ovariju
		ANG	Embryonic-like stem cells were confirmed in adult human tissues i.e. in ovary
	Opis	SLO	Iz ovarijskega epitelijskega odraslih žensk smo osamili MC velike 2-4 um in ki so izražale zgodnje embrionalne transkripcijske markerje SSEA4, Oct-4, Nanog, Sox-2, in c-kit. V kulturi so iz njih nastale oocitom podobne celice s premerom do 95um, ki so izražale transkripcijske markerje Oct-4A, Oct-4B, c-kit, VASA in ZP2. Zanje predlagamo nov izraz ESC-A (embryonic-like stem cells of the adult). Verjetno je, da naseljujejo tkiva in organe odrasle osebe. Ta odkritja se lahko uporabijo za avtologno zdravljenje ovarijske neplodnosti in za namene regenerativne medicine.
			Ovarian stem cells (OSCs) were isolated from the OSE layer in women. Their diameters is 2-4 um. They expressed early embryonic developmental

		ANG	markers SSEA4, Oct-4, Nanog, Sox-2, and c-kit. When grown in vitro, oocyte-like cells developed, with diameter 95 um and expressed Oct-4A, Oct-4B, c-kit, VASA, and ZP2 transcription markers. A new term "embryonic-like stem cells of the adult" (ESC-A) was proposed for these cells that might persist in various tissues and organs of adults. These findings could be used for autologous treatment of ovarian infertility and degenerative diseases.
	Objavljeno v		VIRANT-KLUN, Irma, ZECH, Nicolas H., ROŽMAN, Primož, VOGLER, Andrej, CVJETIČANIN, Branko, KLEMENC, Polona, MALIČEV, Elvira, MEDEN-VRTOVEC, Helena. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. Differentiation (Lond.), 2008. Oct;76(8):843-56.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		24354265
3.	Naslov	SLO	Razvoj mezenhimskih MC v hrustanec in kost in vitro
		ANG	Development of MSCs into cartilage and bone in vitro
	Opis	SLO	Človeške MMC smo gojili in vitro in usmerili v hrustanec in kost, kar smo spremljali z magnetno resonanco, kompjutersko mikrotomografijo, biokemičnimi, histološkimi in mehanskimi metodami. Kost je nastajala bolje kot hrustanec, kar dokazuje možnost tega načina uporabe, hkrati pa dokazuje da je kapaciteta MMC za razvoj v kost večja, in da so pri tem razvoju ključni hondrocitni rastni dejavniki.
		ANG	Human hMSCs from bone marrow were cultured. Cartilage and bone formation were assessed by magnetic resonance imaging and micro-computerized tomography imaging and by biochemical, histological and mechanical assays. Bone-like tissue formation progressed more than cartilage-like one, suggesting that tissue composites with well-mineralized regions can be generated in vitro, that hMSCs have markedly higher capacity for producing engineered bone than cartilage, and that chondrogenic factors play major roles at early stages of bone formation by hMSCs.
	Objavljeno v		AUGST, Alexander, MAROLT, Darja, FREED, Lisa E., VEPARI, Charu, MEINEL, L, FARLEY, Michelle, FAJARDO, Robert, PATEL, Nipun, GRAY, Martha, KAPLAN, David L., VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana. Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. Journal of the Royal Society interface, 2008, letn. 5, št. 25, str. 929-939, doi: 10.1098/rsif.2007.1302.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		24142041
4.	Naslov	SLO	Razvoj mezenhimskih MC v hrustanec in kost in vitro
		ANG	Development of MSCs into cartilage and bone in vitro
	Opis	SLO	Človeške MMC smo gojili in vitro in usmerili v hrustanec in kost, kar smo spremljali z magnetno resonanco, kompjutersko mikrotomografijo, biokemičnimi, histološkimi in mehanskimi metodami. Kost je nastajala bolje kot hrustanec, kar dokazuje možnost tega načina uporabe, hkrati pa dokazuje da je kapaciteta MMC za razvoj v kost večja, in da so pri tem razvoju ključni hondrocitni rastni dejavniki.
		ANG	Human hMSCs from bone marrow were cultured. Cartilage and bone formation were assessed by magnetic resonance imaging and micro-computerized tomography imaging and by biochemical, histological and mechanical assays. Bone-like tissue formation progressed more than cartilage-like one, suggesting that tissue composites with well-mineralized regions can be generated in vitro, that hMSCs have markedly higher capacity for producing engineered bone than cartilage, and that chondrogenic factors play major roles at early stages of bone formation by hMSCs.
	Objavljeno v		AUGST, Alexander, MAROLT, Darja, FREED, Lisa E., VEPARI, Charu, MEINEL, L, FARLEY, Michelle, FAJARDO, Robert, PATEL, Nipun, GRAY, Martha, KAPLAN, David L., VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana. Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. Journal of the Royal Society interface, 2008, letn. 5, št. 25, str. 929-939, doi: 10.1098/rsif.2007.1302.

	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		24142041
5.	Naslov	SLO	Matične celice lahko osamimo tudi iz telesne maščobe, nagojimo v bioreaktorju in jih uporabimo za regenerativno medicino kosti
		ANG	Stem cells can be isolated from the adipose tissues, expanded in bioreactors and further used for the regeneration of human bones
	Opis	SLO	Izdelali smo kostne konstrukte velikosti pol centimetra iz MC , osamljenih iz človeškega maščevja odraslih dajalcev. Z gojenjem in vitro na nosilcu iz naravne kosti, ki je dajal ustrezno okolje za osteogeno diferenciacijo in s pomočjo perfuzijskega bioreaktorja smo gojili konstrukte 5 tednov. Dodatek rastnih dejavnikov je povečal število celic kot tudi količino sestavin matriksa (kolagena, sialoproteina in osteopontina), kar je vodilo v tvorbo kompaktnega in živega kostnega tkiva. To se lahko uporabi za avtologno transplantacijo.
		ANG	We constructed half-centimeter-sized bone constructs in vitro by using human adipose-derived stem cells (hASCs) from adult donors. hASCs were seeded on native bone scaffolds, providing the environment for osteogenic differentiation, and cultured in perfusion bioreactors for 5 weeks. Addition of osteogenic factors significantly increased the cellularity and the amounts of bone matrix components (collagen, bone sialoprotein, and bone osteopontin), resulting in the formation of compact and viable bone tissue constructs that can be used for autologous transplantation.
	Objavljeno v		FRÖHLICH, Mirjam, GRAYSON, WL, MAROLT, Darja, GIMBLE, JM, KREGAR-VELIKONJA, Nevenka, VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. Tissue Eng. part A, 2010, letn. 16, št. 1, str. 179-189.
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID		25944537	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Identifikacija embrionalnim podobnih celic v kostnem mozgu odraslega človeka
		ANG	Identification of embryonic like stem cells in the adult human bone marrow
	Opis	SLO	V svoji raziskovalni smo se posvetili subpopulaciji malih celic z embrionalnimi lastnostmi in dokazali, da obstajajo tudi v kostnem mozgu odraslega človeka in da izražajo embrionalne označevalce. Nato smo te celice z gojenjem z dodatkom rastnih dejavnikov razvili v velike, jajčnim celicam podobne celice. Analiza izražanja genov je pokazala, da se v njih prepisujejo geni, ki so sicer značilni za oogenezo. Dobljeni rezultati potrjujejo, da se v kostnem mozgu odraslih oseb nahaja populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi.
		ANG	We have focused at the small embryonic like stem cells in adult human bone marrow and proved their existence. They were shown to express embryonic stem cell markers. Further she differentiated the cells in the presence of growth factors into large oocyte like cells and with the gene expression analysis she has shown that oogenesis-specific genes are expressed. The results have confirmed the existence of stem cells with embryonic character in the adult human bone marrow.
	Šifra		D.10 Pedagoško delo
	Objavljeno v		JEŽ, Mojca. Identifikacija celic z embrionalnimi lastnostmi v kostnem mozgu odraslega človeka : diplomsko delo = Identification of stem cells with embryonic character in the adult human bone marrow : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 2). Ljubljana: [M. Jež], 2008. XIV, 60 f., [2] f. pril., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_jez_mojca.pdf .
Tipologija		2.11 Diplomsko delo	
COBISS.SI-ID		5695609	
2.	Naslov	SLO	Vpliv 3-D gojenja na rast in diferenciacijo humanih matičnih celic
		ANG	The effect of 3-D culture on growth and differentiation of hSCs

Opis	SLO	3-D okolje bistveno vpliva na rast MC. Primerjali smo rast EMC in h AMC (adipozne MC) v 3-D okolju hidrogelov na podlagi ocenitve živosti, metabolne aktivnosti in izražanja genov. hAMC so najbolj rasle v kolagenskem gelu. Hidrogeli ponujajo nove možnosti za ekspanzijo MC.
	ANG	3-D environment influences the growth of SCs. We compared the ESC and ASC growth on different 3-D hydrogels by means of live/dead assay, metabolic activity and gene expression analysis. Human ASCs grew optimally in collagen. Hydrogels offer new possibilities for SC expansion.
Šifra		D.10 Pedagoško delo
Objavljeno v		ZUPANČIČ, Klemen. Vpliv gojenja v tridimenzionalnem okolju na rast in diferenciacijo humanih matičnih celic : diplomsko delo = The effect of culture in three dimensional environment on growth and differentiation of human stem cells : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomsko dela, 8). Ljubljana: [K. Zupančič], 2009. XII, 56 f., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_zupancic_klemen.pdf .
Tipologija		2.11 Diplomsko delo
COBISS.SI-ID		6036601
3. Naslov	SLO	AMC iz maščobnega tkiva kot gojilna plast pri gojenju EMC
	ANG	ASC as feeder layer for the ESC cultivation
Opis	SLO	EMC je težko gojiti, ker se hitro diferencirajo. Če za gojilno plast uporabimo AMC, ki so podobne MMC, EMC dobro ohranijo pluripotentnost po daljši kultivaciji, kar dokazuje ohranitev ekspresije Oct-4 in Sox-2 ter Nanog transkripcijskih faktorjev.
	ANG	The cultivation of ESCs is hindered by their differentiation. If they are grown on feeder layer composed of ASCs, they retain their embryonic character as proven by expression analysis of Oct-4, Sox-2 and Nanog.
Šifra		D.10 Pedagoško delo
Objavljeno v		TAJNŠEK, Urška. Uporaba matičnih celic iz maščobnega tkiva kot hranilne plasti za gojenje embrionalnih matičnih celic : diplomsko delo = Adipose derived stem cells as a feeder layer for embryonic stem cells : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomsko dela, 6). Ljubljana: [U. Tajnšek], 2009. XVIII, 68 f., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_tajnsek_urska.pdf .
Tipologija		2.11 Diplomsko delo
COBISS.SI-ID		6037625
4. Naslov	SLO	Obstoj ESC-A celic v periferni krvi človeka
	ANG	The existence of ESC-A cells in peripheral human blood
Opis	SLO	V periferni krvi je malo MC. Embrionalnih celic tam ne pričakujemo. Z določanjem ekspresije pluripotentnih markerjev Oct-4 in Nanog smo dokazali obstoj takih celic, kar kaže verjetnost, da take redke celice občasno pridejo iz kostnega mozga.
	ANG	There is very little evidence that ESC could be normally found in the adult blood. With the expression analysis of pluripotent markers Oct-4 and Nanog we proved their feeble presence, indicating their eventual release from the bone marrow into the blood.
Šifra		D.10 Pedagoško delo
Objavljeno v		KONEČNIK, Petra. Določanje izražanja označevalcev embrionalnih matičnih celic v periferni krvi človeka z metodo PCR v realnem času : diplomsko delo = Determination of the embryonic stem cell markers expression in the peripheral human blood using real-time PCR method : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomsko dela, 4). Ljubljana: [P. Konečnik], 2009. XIII, 67 f., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_konecnik_petra.pdf .
Tipologija		2.11 Diplomsko delo
COBISS.SI-ID		6037881
5. Naslov	SLO	Dokaz ESC-A v popkovnični krvi s pretočno citometrijo
	ANG	A proof of ESC-A existence in UCB with flow cytometry

Opis	SLO	V popkovnični krvi se nahajajo celice, ki izražajo označevalce EMC, to so Oct-4, Nanog in SSEA-4. Te celice smo uspeli analizirati tudi na pretočnem citometru in njihovo vsebnost dodatno povečati z imunomagnetno selekcijo. Z uporabo ločevalnika fluorescenčno označenih celic smo končno izolirali populacijo celic pozitivnih za CD133 in negativnih za CD45 ter za označevalce linijsko usmerjenih celic. Za morebitno uporabo teh celic v regenerativni medicini je potrebno postopke za njihovo izolacijo še dodatno optimizirati.
	ANG	In the UCB there are some ESC-like cells expressing the typical markers Oct-4, Nanog and SSEA-4. We managed to analyse them by flow cytometry and to increase their numbers by immunomagnetic sorting. With the cell sorter we finally isolated a population expressing CD133, but lacking CD45 and other markers of lineage differentiation. Additional tests need to be performed in order to explore the possible use of these cells in regenerative medicine.
Šifra	D.10 Pedagoško delo	
Objavljeno v	VEBER, Matija. Identifikacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi v humani popkovnični krvi s pretočno citometrijo : diplomsko delo = Identification of stem cells with embryonic character in the human cord blood using flow cytometry : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 45). Ljubljana: [M. Veber], 2010. XIV, 57 f., [2] f. pril., ilustr., preglednice.	
Tipologija	2.11 Diplomsko delo	
COBISS.SI-ID	6421113	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

FRÖHLICH, M et al. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. Current stem cell research and therapy, 2008, letn. 3, št. 4, str. 254-264. [COBISS.SI-ID 25676761]

DOMANOVIČ, D et al. Preparation of autologous CD34+ cells for intracoronary infusion to patients with end-stage dilated cardiomyopathy. Bilt. transfuziol., 2009, letn. 55, št. 1/2, str. 79-83. [COBISS.SI-ID 27355097]

MA, Teng, et al. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. Biotechnol. prog. (Print). [Print ed.], 2009, letn. 25, št. 1, str. 32-42, doi: 10.1002/btpr.128. [COBISS.SI-ID 25660377]

VOGRIN, M et al. Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: A prospective, randomized, double-blind, clinical trial = Elektronski vir. European Surgical Research, 2010, vol. 45, no. 2, str. 77-85, doi: 10.1159/000318597. [COBISS.SI-ID 3697215] 1.01

MAROLT, D et al. Bone tissue engineering with human stem cells. Stem cell research & therapy, 2010, letn. 1, str. 1-10. <http://stemcellres.com/content/pdf/scrt10.pdf>, doi: 10.1186/scrt10. [COBISS.SI-ID 27069657]

BARLIČ, A et al. Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba = Stem cells from adipose tissue and their use. Farm. vestn., 2010, letn. 61, št. 1, str. 42-45. [COBISS.SI-ID 27477209] 1.01 Izvirni znanstveni članek

FRÖHLICH, M et al. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. Tissue eng. part A, 2010, letn. 16, št. 1, str. 179-189, doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0164. [COBISS.SI-ID 25944537] 1.01 Izvirni znanstveni članek

KRAŠNA, M et al. Analysis of cord blood units donated to the Slovenian cord blood bank = Analiza popkovnične krvi, darovane v slovensko banko popkovnične krvi. Zdrav Vestn (Tisk. izd.). [Tiskana izd.], 2009, letn. 78, št. 9, str. 451-455. [COBISS.SI-ID 26095833]

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Celične terapije, študije diferenciacije celic in raziskave MC so ena temeljnih razvojno-raziskovalnih usmeritev biomedicine v zadnjem desetletju. Potencial, ki ga nudijo različne MC je ogromen in z uporabo novih postgenomskih tehnologij in sitemske biologije dajejo tudi odgovore na nekatera temeljna vprašanja biomedicine, kot je zdravljenje raka, genskih bolezni, itd. Osrednja vprašanja se danes dotikajo tudi uporabe EMC, ki pa je etično nezaželena. Zaradi

tega so zelo pomembni alternativni pristopi, ki uporabljajo embrionalnim celicam podobne MC, ki jih lahko dobimo iz porodnih tkiv, npr. iz popkovnične krvi. Uspešen razvoj teh celic bi nam omogočil razumevanje in nadzor razvoja MC, s katerimi bi lahko nadomestili uporabo EMC, kar bi bil velik korak v svetovnem merilu.

Osrednje probleme izolacije in karakterizacije primitivnih MC iz popkovnične krvi in nadaljno diferenciacijo v živčne celice smo najprej dokumentirali v objavi v Nature Protocols (McGuckin in sod. Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. Nat Protoc 2008; 3(6): 1046-1055). Te celice smo nato razvili tudi v endodermalno celično linjo (jetra in beta-celice pankreasa (Strbad M, Doktorska disertacija, v pripravi). Vzporedno smo prišli do nepričakovanih spoznanj, da so podobne celice prisotne tudi pri odraslih osebah, na začetku v ovariju (objava Virant-Klun in sod. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. Differentiation (Lond.), 2008. Oct;76(8):843-56). Te celice smo uspeli razviti v spolne celice in celo partenogenetsko blastocisti podobno obliko, kar potrjuje našo domnevo da gre za celice z visokim pluripotentnim značajem (objava Virant-Klun in sod. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. Stem cells dev., 2009, vol. 18, no. 1, str. 137-149). Nato smo preverjali, ali se take celice nahajajo tudi v kostnem mozgu in uspelo nam je priti do pozitivnih rezultatov (objava JEŽ, Mojca. Identifikacija celic z embrionalnimi lastnostmi v kostnem mozgu odraslega človeka : diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, 2008). Vzporedno smo matične celice osamili tudi iz maščobnega tkiva in nakazali njihovo potencialno uporabnost za regeneracijo kosti (objava Fröhlich Mirjam in sod.. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. Tissue eng. part A, 2010, letn. 16, št. 1, str. 179-189).

Potek raziskave je pokazal, da smo uspeli zastaviti relevantna vprašanja in da smo rešili večino tehnoloških ovir. Osvojili smo potrebno znanje za kultiviranje, izolacijo in karakterizacijo matičnih celic iz popkovnične krvi in drugih tkiv ter z temi dosežki relevantno nastopili v mednarodnem okolju, kar dokazujejo tudi naše objave. Od naših rezultatov pričakujemo določena nova odkritja in izboljšave pri novih načinih izolacije matične celice iz kostnega mozga in periferne krvi, razširitev metodološkega instrumentarija za karakterizacijo matičnih celic in usmerjenih celic prednic, nadaljni razvoj metod za diferenciacijo humane MC v krvne celične linije ter osvojitve tehnologij za pridobivanje in prečiščevanje različnih vrst matičnih celic za klinično uporabo.

ANG

Cell therapies, differentiation studies and SC research are one of basic research/developmental directions in the biomedicine in last decade. Potential of different SCs is enormous and it gives, along with the use of new post-genomic technologies and system biology, answers to some key questions in biomedicine, such as treatment of cancer, genetic diseases, etc. The central issues consider the use of ESCs, which is highly ethically questionable. Therefore alternative approaches are essential, using the embryonic-like SCs from partial tissues such as umbilical cord blood (UCB). A successful development of these cells will enable understanding and control of SC development, which will substitute the use of ESCs. This would represent a major scientific improvement in a global aspect.

The central problems of isolation and characterisation of primitive SCs from UCB and further differentiation into nerve cells was documented by our group in the article in Nature protocols (McGuckin et al. Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. Nat Protoc 2008; 3(6): 1046-1055). These cells we further developed into the endodermis line (liver and beta-cells of pancreas), as documented in doctoral thesis of Strbad M. (in preparation). During this work some unexpected discoveries appeared in our group, such as the existence of similar SCs in adult human ovary (see Virant-Klun in sod. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. Differentiation (Lond.), 2008. Oct;76(8):843-56). These ESC-A like cells were later developed in vitro into parthenogenetic like blastocysts, confirming that the cells in question are highly pluripotent (see Virant-Klun in sod. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. Stem cells dev., 2009, vol. 18, no. 1, str. 137-149). We have checked if similar SCs existed in adult bone marrow, which was positively confirmed by a BSc research work (Jež, Mojca. Identifikacija celic z embrionalnimi lastnostmi v kostnem mozgu odraslega človeka : diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, 2008). In parallel, SCs were isolated from the adipose tissues and they were shown to be useful for regeneration of bones (see Fröhlich Mirjam et al. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion

bioreactor culture. Tissue eng. part A, 2010, letn. 16, št. 1, str. 179-189).

Our research has shown that relevant scientific questions were addressed and majority of technical questions were solved. The cultivation, isolation and characterisation techniques for UCB SCs cultivation were mastered and the results were relevantly conveyed into the international scientific community. Our result will contribute to further discoveries and improvements in the SC isolation from the bone marrow and blood, expansion of methodologies for the characterisation of SCs and their progenitors, development of protocols for differentiation into blood cells as well as provision of techniques for the acquiring and purifying various SCs for clinical use.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Dobri rezultati raziskave so omogočili možnost izkoriščanja linij matičnih celic v klinični medicini, izboljšavo izolacij matične celice iz kostnega mozga in periferne krvi, razširitev metodološkega instrumentarija za karakterizacijo matičnih celic in usmerjenih celic prednic, nadaljni razvoj metod za diferenciacijo humane matične celice ter osvojitve tehnologij za pridobivanje in prečiščevanje različnih vrst matičnih celic. Rezultati naše raziskave bodo služili predvsem razvoju transfuzijske medicine, dolgoročno pa še bolj raziskovalnim skupinam v drugih kliničnih vejah medicine, ki bodo lahko našo razvito metodologijo uporabile za praktično terapijo določenih bolezni. V našem primeru se kaže najhitrejša aplikacija razvoj matičnih celic iz popkovnice v beta celice pankreasa ter potencialni razvoj v umetno kri. Pri tem so naše ciljne skupine klinični oddelki za hematologijo in transplantacijo kostnega mozga, oddelki za kirurgijo jeter in pankreasa, oddelki za kardiologijo, urologijo, plastično kirurgijo, kirurgijo lokomotoričnega aparata, ortopedski oddelki ter stomatološka klinika; po drugi strani pa lahko rezultate uporabijo tudi mala oz. nastajajoča medicinska biotehnoška podjetja ter večje farmacevtske korporacije.

Naše delo bo omogočilo vrhunske storitve v medicini, ki bodo omogočale državljanom zdravljenje, ki jim zagotavlja visok nivo kvalitete življenja. Nadomeščanje okvarjenih ali obolelih tkiv že danes veliko pripomore k uspešnemu zdravljenju in hitri rehabilitaciji. Tako lahko dosežemo odlične direktne in posredne učinke za bolnike in celotno družbo. V zadnjih 10 letih smo prijavitelji uspeli ustvariti solidno infrastrukturo, kadre in dosežke na področju medicinske biotehnologije. Sistematično delo naše skupine na tem področju je že pomagalo že več stotim bolnikom, ki jih pred desetletji sploh ne bi mogli zdraviti. Področje celičnih terapij lahko v Sloveniji postane eno od prepoznavnih dejavnosti. Ta panoga medicine bo zelo propulzivna tudi kot proizvodna panoga, ki je okolju prijazna in omogoča trajen razvoj tako gospodarstva, medicine kot tudi zdravstvenega turizma ter sistema Univerze – visokega šolstva in seveda znanosti v našem okolju.

ANG

Good results of our project enabled the possibility of clinical use of SC lines, improvement of SC isolation from the bone marrow and peripheral blood, broadening of methodologies and instruments for characterization of SCs and progenitor cells, further development of directed differentiation of hSC and mastering technologies for the isolation and purification of different SCs. Our results will serve to the development of transfusion medicine and in long term, to other clinical medicine oriented research groups, which will need these methodologies for therapeutic purposes of certain disease. In our case, we demonstrated a conversion of UCB SCs into pancreatic beta cells and development into blood cells. Our target user groups are clinical wards for haematology and bone marrow transplantation, surgery of liver and pancreas, cardiology, urology, plastic surgery, trauma, orthopedics, and dental surgery. On the other hand, results could be used in SMEs and pharmaceutical industry.

This work will contribute the top medical services that will enable treatments and consequent high level of health. Supplementing the diseased tissues is already contributing to the current treatment and rehabilitation. In last 10 years we have succeeded to form a solid infrastructure, personnel and achievements on the field of medical biotech. Our systematic work has already helped to several hundred previously non-healable patients. Cellular therapies in Slovenia could become a representative activity. This medical field is also a propulsive industry, that is ecology-friendly, enabling further development of economy, including medicine, health tourism, educational system, and finally, scientific development of our society.

10. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem 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	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
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	
	Uporaba rezultatov	
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	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
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!**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega 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	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni 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 sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer		
	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			
2.	Sofinancer		
	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			
3.	Sofinancer		
	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			

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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> 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:

Primož Rožman	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

4.5.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/225

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti 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 (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMŽL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (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/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](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

62-AC-C8-B8-AD-CC-CD-C1-70-33-15-6B-33-BC-3C-3A-86-EA-65-E8