

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/64



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-4109
Naslov projekta	Interakcije med nanodelci z različno površino in modelnimi biološkimi sistemi
Vodja projekta	11155 Damjana Drobne
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	10854
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	105 Nacionalni inštitut za biologijo 381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 382 Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta 792 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo 1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.03 Biologija 1.03.01 Zoologija in zoofiziologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	1 Naravoslovne vede 1.06 Biologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V primerjavi z večjimi materiali iste kemijske sestave imajo nanodelci nekatere lastnosti, zaradi katerih so zelo zanimivi za širok spekter uporab. Z razširitvijo nanotehnologije na področja kot je biomedicine, farmacija in prehranska industrija pa hkrati neizogibno prihaja do raznih

pomislov. V takšnih aplikacijah namreč hote ali nehoti nastopi neposredni stik med biološkimi celicami in nanomateriali.

V projektu smo testirali široko množico nanodelcev z različno kemijsko sestavo in površino, velikostjo in stopnjo kristalinnosti. Delci so bili proizvedeni in karakterizirani v različnih evropskih laboratorijih.

V prvem delu projekta smo se bomo osredotočili na morfološke in strukturne spremembe lipidnega dvosloja, nastale kot posledica delovanja nanodelcev. Ključne metode pri tem delu raziskave so: mikroskopske in spektroskopske tehnike, računalniško podprta mikroskopija ter metoda, ki temelji na sipanje svetlobe pod majhnim kotom (SAXS). V prvem delu smo uspeli prepoznati temeljne fizikalne interakcije med nanodelci in lipidi ter intenziteto teh interakcij v odvisnosti od lastnosti nanodelcev in lastnosti nanodelcev v suspenziji. Cilj prvega dela projekta je bil pojasniti interakcije med nanodelci in lipidnimi membranami z uporabo različnih lipidnih membranskih modelov. Predpostavili smo, da je pri teh interakcijah ključnega pomena velikost delcev. Ugotovili pa smo, da je najverjetneje bolj pomembna njihova hidrofobnost in ukrivljenost površine.

V drugem delu projekta smo s študijami interakcije med umetnimi lipidnimi membranami in delci. Študirali smo vpliv CoFe₂O₄ nanodelcev z dvema različnima površinama ter rezultate študij na preverili v sistemu *in vivo*. **Nadaljevali** smo s študijami z modelnimi nevretenčarskimi organizem kjer smo ugotovili, da delci ne vstopajo v intaktne celice. V celice pa prosto vstopajo ioni, ki nastanejo z raztapljanjem delcev. V celoti smo realizirali zastavljen program na treh sistemih. Vzporedno pa smo razvijali tudi dodatne biomarkerje za ugotavljanje interakcij med nanodelci in organizmom.

Celična internalizacija je ključnega pomena tako pri uporabi nanodelcev za medicinske, farmacevtske in prehranske namen kot tudi pri razumevanju kvarnih učinkov delcev na celice. Šele razumevanje mehanizmov privzema delcev z različnimi primarnimi in sekundarnimi lastnosti lahko omogoči uspešno in varno uporabo proizvodov nanotehnologij.

V tretjem delu projekta smo podrobneje proučevali privzemi delcev v celice modelnega tkiva. To so prebavne žleze rakov enakonožcev. V prebavnih žlezah zaužiti delci pridejo v neposreden kontakt s celicami. Hkrati pa je mogoče tudi izračunati na podlagi zaužite hrani, koliko delcev so živali dejansko pojedle (odmerek nanodelcev). Vstop delcev v celico smo študirali s kombinacijo mikroskopskih in spektroskopskih metod, ki temelji na x-žarkih. Uporabili smo SR XRF, PIXE in EDX-SEM analizo. Temu naboru pa smo dodali še Ramansko spektroskopijo in FIB/SEM analizo tkivo.

ANG

The objective of the proposed project was to study nanoparticle-lipid membrane systems *in vitro* and *in vivo*. Project was divided into three parts. The goal of Parts 1 and 2 of this project was an understanding of the fate of nanoparticles when coming in contact with lipid membranes. The aim of Part 3 was to provide experimental evidence on cellular internalisation of nanoparticles. Cellular internalisation of nanoparticles is of great importance for their successful use in biomedical and pharmaceutical applications.

In **Part 1** of the Project, the lipid vesicles were incubated in a suspension with nanoparticles. After the incubation, the morphological and structural disturbances caused by nanoparticles in the lipid bilayer were examined. The microscopic, spectroscopic and fluorometric techniques were employed. Phospholipid vesicles, the most frequently used models for membranes, can be viewed as a convenient system with which to understand the function of cellular membranes. Lipid vesicles are attracting great attention, due to their high degree of resemblance to biological membranous objects. Vesicles enable studies of biological membrane structure, self-assembly properties, phase behaviour, transport and elasticity properties, as well as their interaction with other macromolecules.

In **Part 2**, the results obtained on lipid vesicles were validated *in vivo*. Here, the invertebrate model organisms was exposed to selected nanoparticles and primary integrity of cell membrane was assessed along with other cytotoxicity and organism level toxicity biomarkers.

The *in vivo* biological systems we have analysed whether particles which affected lipid

membranes also have the potential to affect cell membranes. In addition, the aim of our work was to elucidate whether cell membranes are affected directly by nanoparticles or the nanoparticles first exert oxidative stress which subsequently leads to cell membrane destabilisation

To elucidate interactions between nanoparticles and digestive gland cells, we have selected different types of biomarkers, digestive gland cell membrane stability, mitochondrial function (metabolic activity) and oxidative stress *via* lipid peroxidation. These relate to different cellular compartments and reflect different functions. At the same time, responses at the level of the organism was followed to assess the health of the animals.

In **Part 3**, the cellular internalisation of some selected nanoparticles was investigated. Our focus was on the biological interfaces that nanoparticles may encounter following their interaction with cells when suspended in a tissue culture or biological medium. We determined how these interactions perturb the fundamental forces that govern the interactions of nanoparticles with biological systems and discuss the development of methods for probing the nano-bio interface.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Prvi del projekta

Lastnosti nanodelcev materialov z velikostjo od 1 do 100 nm se dokazano razlikujejo od materialov enake kemijske sestave, a z večjo maso. V primerjavi z večjim materialom pridejo do izraza nove lastnosti. S proizvodnjo nanodelcev in z njihovo naraščajočo uporabo se je pojavilo tudi vprašanje o njihovi varnosti. Naredili smo pregled objav o in vivo učinkih TiO₂ nanodelcev (MENARD, Anja, DROBNE, Damjana, JEMEC, Anita. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. Environmental pollution, 2011, vol. 159, 3, str. 677-684.) in prišli do presenetljivih ugotovitev. Kljub številnim objavam pa rezultate le-teh med sabo ni mogoče primerjati in pripraviti osnutek ocene tveganja. Razlogov za to je več. Med pomembnejšimi je ta, da delci drugače reagirajo z biološkimi sistemi, kot je to značilno za druge topne kemikalije. Zardi tega dejstva je potrebno razumeti tako temeljne, molekularne mehanizme interakcij, kot tudi pripraviti nove biomarkerje učinkov, ki bodo razkrivali način delovanja, ki ga obstoječi testi ne morejo. Testene sistem pa je potrebno poenotiti. Pripravili smo nekaj predlogov, kako poenotiti testiranja učinkov delcev, da bi povečali stopnjopripravljenosti rezultatov (VALANT, Janez, IAVICOLI, Ivo, DROBNE, Damjana. The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO₂. Protoplasma, ISSN 0033-183X, 2012, vol. 249, 3, str. 493-502.)

OPIS RAZISKOVANJA IN REZULTATOV: V prvem delu raziskave smo se ukvarjali s temeljnimi interakcijami med nanodelci in biološkimi membranami. Dejstvo je, da prve interakcije nanodelcev z biološkim sistemom nastopijo na celičnih membranah, kar zahteva preučevanje strukturnih in funkcionalnih lastnosti membrane. Fosfolipidni vezikli so najpogostejše uporabljen membranski model za študije funkcij celičnih membran. Fosfolipidni dvosloj je široko uporabljen membranski model v obliki veziklov, t.j. liposomov, ali kot ravninska plast lipidov. Lipidne vezikle so za študije značilnosti bioloških membran uporabljali že leta 1970. Zaradi visoke stopnje podobnosti z biološkimi membranami pritegnili veliko pozornosti med raziskovalci. Vezikli nam kot modelni sistem omogočajo študije strukture bioloških membrane, njihovih lastnosti samosestavljanja, elastičnosti, obnašanja v območjih faznih prehodov, transporta, kot tudi interakcije z makromolekulami. Poskusi narejeni z lipidnimi vezikli so nam pojasnili, da nanomateriali spremenijo ukrivljenost lipidnih membrana. Učinek je odvisen od velikosti agregatov in njihove hidrofobnosti. Te izsledke smo objavili v večjih člankih:

- ZUPANC, Jernej, DOBNIKAR, Andrej, DROBNE, Damjana, VALANT, Janez, ERDOGMUS, Deniz, BAS, Erhan. Biological reactivity of nanoparticles: mosaics from optical microscopy videos of giant lipid vesicles. Journal of biomedical optics, ISSN 1083-3668, 2011, vol. 16, no. 2, str. 026003.
- ZUPANC, Jernej, DROBNE, Damjana, ŠTER, Branko. Markov random field model for segmenting large populations of lipid vesicles from micrographs. Journal of liposome research, ISSN 0898-2104, 2011, vol. 21, no. 4, str. 315-323.
- ZUPANC, Jernej, DROBNE, Damjana, DRAŠLER, Barbara, VALANT, Janez, IGLIČ, Aleš, KRALJ-IGLIČ, Veronika, MAKOVEC, Darko, RAPPOLT, Michael, SARTORI, Barbara, KOGEJ, Ksenija. Experimental evidence for the interaction of C-60 fullerene with lipid vesicle membranes. Carbon, ISSN 0008-6223. [Print ed.], 2012, vol. 50, no. 3, str. 1170-1178
- DRAŠLER, Barbara, DROBNE, Damjana, NOVAK, Sara, VALANT, Janez, BOLJTE, Sabina,

OTRIN, Lado, RAPPOLT, Michael, SARTORI, Barbara, IGLIČ, Aleš, KRALJ-IGLIČ, Veronika, ŠUŠTAR, Vid, MAKOVEC, Darko, GYERGYEK, Sašo, HOČEVAR, Matej, GODEC, Matjaž, ZUPANC, Jernej. Effects of magnetic cobalt ferrite nanoparticles on biological and artificial lipid membranes. International journal of nanomedicine, ISSN 1178-2013. [Online ed.], 2014, vol. 9, no. 1, str. 1559-1581.

- ZUPANC, Jernej, DRAŠLER, Barbara, BOLJTE, Sabina, KRALJ-IGLIČ, Veronika, IGLIČ, Aleš, ERDOGMUS, Deniz, DROBNE, Damjana. Lipid vesicle shape analysis from populations using light video microscopy and computer vision. PloS one, ISSN 1932-6203, Nov. 2014.

POTRDITEV HIPOTEZE: Proti koncu temeljitih študij in ob pregledu literature pas mo ugotovili, da je lipidna komponenta bioloških membran vendarle manj odzivna na nanodelce, kot smo pričakovali. Glede na to, da smo ugotovili, da je hidrofobnost ena od ključnih lastnosti nanodelcev, ki vpliva na njihovo reaktivnost, je naslednje logično vprašane, kakšna je reaktivnost nanodelcev napram beljakovinam. Razvili smo sitem spremljana učinkov nanomaterialov na beljakovine in potrdili, da so beljakovine najverjetneje bolj na udaru ob interakcijah nanomaterialov z biološkimi sistemi, kot pa lipidne membrane. Izsledke smo tudi objavili v ugledni znanstveni reviji (MESARIČ, Tina, BAWEJA, Lokesh, DRAŠLER, Barbara, DROBNE, Damjana, MAKOVEC, Darko, DUŠAK, Peter, DHAWAN, Alok, SEPČIČ, Kristina. Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. Carbon, ISSN 0008-6223. [Print ed.], 2013, vol. 62, str. 222-232.)

DOPRINOS: Študije z uporabo lipidnih veziklov se široko uporabljajo v različnih znanstvenih disciplinah, med drugim v matematični in teoretični fiziki (topologija dvodimenzionalnih površin, premičnih v tridimenzionalnem prostoru), biofiziki (lastnosti celičnih membran in membranskih kanalov), kemiji (kataliza, energijske pretvorbe, fotosinteza), v koloidni znanosti (stabilnost, termodinamika zaprtih sistemov), biokemiji (funkcija membranskih proteinov) in v biologiji (izločevanje, celično delovanje, preusmerjanje in obveščanje dostave genov in funkcije teh).

V predlaganem projektu smo izboljšali eksperimentalni pristop uporabe lipidnih veziklov in računalniške obdelave podatkov za študije fizikalnih interakcij med nanodelci v suspenziji in lipidnimi vezikli ali med nanodelci, enkapsuliranimi v vezikle. Cilj naše študije, ki smo ga dosegli, je bil priskrbeti eksperimentalne podatke o interakcijah med nanodelci z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in lipidnimi membranami.

Drugi del projekta

OPIS RAZISKOVANJA IN REZULTATOV: V drugem delu raziskave smo študirali vpliv delcev na biološke membrane na modelnem organizmu. Študirali smo vpliv zaužitih delcev na integriteto membran prebavnih žlez. Ugotovili smo, da nanodelci v povišanih koncentracijah destabilizirajo membrano celic prebavnih žlez, kar pa je reverzibilen proces.

- VALANT, Janez, DROBNE, Damjana, NOVAK, Sara. Effect of ingested titanium dioxide nanoparticles on the digestive gland cell membrane of terrestrial isopods. Chemosphere, ISSN 0045-6535. [Print ed.], 2012, vol. 87, issue 1, str. 19-25.

- NOVAK, Sara, DROBNE, Damjana, VALANT, Janez, PIPAN TKALEC, Živa, PELICON, Primož, VAVPETIČ, Primož, GRLJ, Nataša, FALNOGA, Ingrid, MAZEJ, Darja, REMŠKAR, Maja. Cell membrane integrity and internalization of ingested TiO₂ nanoparticles by digestive gland cells of a terrestrial isopod. Environmental toxicology and chemistry, ISSN 0730-7268, 2012, vol. 31, issue 5, str. 1083-1090.

- VALANT, Janez, DROBNE, Damjana. Biological reactivity of TiO₂ nanoparticles assessed by ex vivo testing. Protoplasma, ISSN 0033-183X, 2012, vol. 249, issue 3, str. 835-842.

POTRDITEV HIPOTEZE: Ugotovili smo, da se učinkov delcev razlikujejo od učinkov drugih topnih kemikalij, da je potrebno prirediti testene sisteme in uvesti nove biomarkerje.

- RAJAPAKSE, Katarina, DROBNE, Damjana, KASTELEC, Damijana, MARINŠEK-LOGAR, Romana. Experimental evidence of false positive Comet test results due to TiO₂ particle - assay interactions. Nanotoxicology, ISSN 1743-5390, 2013, vol. 7, no. 5, str. 1043-1051.

- NOVAK, Sara, DROBNE, Damjana, MENARD, Anja. Prolonged feeding of terrestrial isopod (Porcellio scaber, Isopoda, Crustacea) on TiO₂ nanoparticles : absence of toxic effect. V: ŠTRUS, Jasna (ur.), TAITI, Stefano (ur.), SFENTHOURAKIS, Spyros (ur.). Advances in Terrestrial Isopod Biology, (Zookeys, Vol. 176, special issue). Sofia: Pensoft Publishers, 2012, vol. 176, special issue, str. 261-273.

- DROBNE, Damjana, DROBNE, Samo. Reference values for feeding parameters of isopods (Porcellio scaber, Isopoda, Crustacea). ZooKeys, ISSN 1313-2989, 2014, vol. 457, str. 312-322.

DOPRINOS: Najpomembnejša ugotovitev je da, da nanodelci sicer imajo učinek, ki pa ga ni mogoče ovrednotiti s klasičnimi biomarkerhi za strupenost. Nanodelci torej strupeni niso, na organizem pa vplivajo tako, da ga ob daljši izpostavljenosti energetsko izčrpajo. MENARD, Anja, DROBNE, Damjana, NOVAK, Sara. Altered physiological conditions of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* as a measure of subchronic TiO₂ effects. *Protoplasma*, ISSN 0033-183X, 2014, vol. , iss. , 8 str.

Tretji del projekta

OPIS RAZISKOVANJA IN REZULTATOV: Tretji del raziskav pa smo v celoti posvetili študiju vstopa nanodelcev v celice. Za ta namen smo razvili tudi nekaj metod. VAVPETIČ, Primož, VOGEL-MIKUŠ, Katarina, JEROMEL, Luka, OGRINC POTOČNIK, Nina, PONGRAC, Paula, DROBNE, Damjana, PIPAN TKALEC, Živa, NOVAK, Sara, KOS, Monika, KOREN, Špela, REGVAR, Marjana, PELICON, Primož. Elemental distribution and sample integrity comparison of freeze-dried and frozen-hydrated biological tissue samples with nuclear microprobe. *Nuclear instruments & methods in physics research. Section B, Beam interactions with materials and atoms*, ISSN 0168-583X. [Print ed.], 2015, 5; MILLAKU, Agron, DROBNE, Damjana, TORKAR, Matjaž, NOVAK, Sara, REMŠKAR, Maja, PIPAN TKALEC, Živa. Use of scanning electron microscopy to monitor nanofibre/cell interaction in digestive epithelial cells. *Journal of hazardous materials*, ISSN 0304-3894. [Print ed.], 15. Sep. 2013, vol. 260, str. 47-52.

POTRDITEV HIPOTEZE: Potrdili smo, da nanodelci ne vstopijo v celice, če ima ta nepoškodovano membrano.

- NOVAK, Sara, DROBNE, Damjana, GOLOBIČ, Miha, ZUPANC, Jernej, ROMIH, Tea, GIANONCELLI, Alessandra, KISKINOVA, Maya Petrova, KAULICH, Burkhard, PELICON, Primož, VAVPETIČ, Primož, JEROMEL, Luka, OGRINC POTOČNIK, Nina, MAKOVEC, Darko. Cellular internalisation of dissolved cobalt ions from ingested CoFe₂O₄ nanoparticles : in vivo experimental evidence. *Environmental science & technology*, ISSN 0013-936X. [Print ed.], 2013, vol. 47, no. 10, str. 5400-5408.

-NOVAK, Sara, DROBNE, Damjana, VACCARI, Lisa, KISKINOVA, Maya Petrova, FERRARIS, Paolo, BIRARDA, Giovanni, REMŠKAR, Maja, HOČEVAR, Matej. Effect of ingested tungsten oxide (WOX) nanofibers on digestive gland tissue of *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) : fourier transform infrared (FTIR) imaging. *Environmental science & technology*, ISSN 0013-936X. [Print ed.], 2013, vol. 47, no. 19, str. 11284-11292.

Zelo pomembna pa je ugotovitev, da v celico vstopijo ioni iz raztopljenih nanodelcev. ROMIH, Tea, DRAŠLER, Barbara, JEMEC, Anita, DROBNE, Damjana, NOVAK, Sara, GOLOBIČ, Miha, MAKOVEC, Darko, SUSIČ, Robert, KOGEJ, Ksenija. Bioavailability of cobalt and iron from citric-acid-adsorbed CoFe₂O₄ nanoparticles in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Science of the total environment*, ISSN 0048-9697, 2015, vol. 508, no. 1, str. 76-84.

DOPRINOS: Najpomembnejši doprinos projekta je ugotovitev:

- a) Delci vstopijo v celice prebavnih žlez le v primeru, ko je membran destabilizirana
- b) V celice vstopajo ioni iz raztopljenih nanodelcev

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

Projekt je bil sestavljen iz teh delov. V vsakem delu smo si zastavili cilje in raziskovalne hipoteze. Vse zastavljene cilje smo dosegli. Večino hipotez smo potrdili v celoti ali pa delavno. Vodilna ideja raziskave je bila ta, da nanodelci najprej pridejo v stik z biološkimi membranami. Iz tega je izhajala predpostavka za naše delo, da nanodelci vplivajo na lipidno komponento bioloških membran. Da bi potrdili ali zavrgli to predpostavko, smo projekt razdeli v tri dele.

Hipoteze:

V prvem delu smo proučevali interakcije med različnimi delci in umetnimi biološkimi membranami. Med zelo pomembne sile, ki odločajo o interakcijah med delci in medijem ter med delci samimi, so Van der Waalove (VDW) in odbojne elektrostatične dvoslojne interakcije. Na krajše razdalje delujejo tudi sile, ki izhajajo iz naboja in steričnih , interakcij, ki določajo stike nanodelcev z okoliškimi molekulami.

Ugotovitve iz prvega dela, smo testirali **v drugem delu** na celicah modelnega nevretenčarskega organizma. Predpostavili smo, da tisti delci, ki močnejše reagirajo z umetnimi biološkimi membranami, intenzivneje intereagirajo tudi s celicami.

V tretjem delu pa smo predpostavili, da delci, ko pride do interakcije z membrano, v celice tudi vstopijo.

Potrditev/zavrnitev hipotez:

V prvem delu smo potrdili hipotezo, da delci reagirajo z umetnimi lipidnimi membranami tako, da spremenijo njihovo obliko, se pod določenimi pogoji vrinejo med lipidne dvosloje ali pa povzročijo, da lipidni vezikli počijo. Ugotovili smo, da je za te reakcije pomembna velikost aglomeratov in površinski naboj delcev. Najverjetneje pa sta ta dva parametra med sabo povezana, saj nabiti delci tvorijo manjše aglomerate. Manjši aglomerati pa bolj intenzivno reagirajo z umetnimi membranami.

V drugem delu smo ugotovili, da delci poškodujejo membrane v primeru zelo visokih, nerealnih izpostavitvenih koncentracij, s katerimi organizem ne pride v stik. Pričakovali pa smo, da bodo vplivi na membrane že pri nižjih izpostavitvenih koncentracijah.

V tretjem delu pa smo študirali privzem zaužitih delcev v celice prebavnih žlez. Tudi tukaj, enako kot v drugem delu, smo prišli do nepričakovanih ugotovitev. Delci pridejo v celice le pri primeru, ko je organizem izpostavljen izjemno visokim izpostavitvenim koncentracijam in je membrana poškodovani. V primeru izpostavitve nižjim koncentracijam, ki so verjetne tudi v okolju, pa delci v celice ne vstopijo. Pomembna pa je tudi ugotovitev, da v primeru, ko se delci raztapljajo, v celice vstopijo ioni. To smo dokazali na primeru kovinskih nanodelcev. Med najpomembnejšimi in najbolj presenetljivimi ugotovitvami pa je brez dvoma ta, da se delci raztapljajo v prebavilu testnega organizma. To pomeni, da kemijske analitske metode, s katerimi karakteriziramo lastnosti suspenzij delcev pred stikom z organizmom ne morejo podati odgovora o tem, koliko ionov bo organizmu dejansko dostopnih. S temi raziskavami intenzivno nadaljujemo v okviru drugih projektov.

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

Projekt je bil sestavljen iz teh delov. V vsakem delu smo si zastavili cilje in raziskovalne hipoteze. Vse zastavljene cilje smo dosegli. Večino hipotez smo potrdili v celoti ali pa delno. V takih primerih smo si zastavili nove hipoteze in jih pričeli preverjati. Vodilna ideja raziskave je bila ta, da nanodelci najprej pridejo v stik z biološkimi membranami. Iz tega je izhajala predpostavka za naše delo, da nanodelci vplivajo na lipidno komponento bioloških membran. Da bi potrdili ali zavrgli to predpostavko, smo projekt razdeli v tri dele.

Hipoteze:

V prvem delu smo proučevali interakcije med različnimi delci in umetnimi biološkimi membranami. Med zelo pomembne sile, ki odločajo o interakcijah med delci in medijem ter med delci samimi, so Van der Waalove (VDW) in odbojne elektrostatične dvoslojne interakcije. Na krajše razdalje delujejo tudi sile, ki izhajajo iz naboja in steričnih, interakcij, ki določajo stike nanodelcev z okoliškimi molekulami. Ugotovitve iz prvega dela, smo testirali v drugem delu na celicah modelnega nevretenčarskega organizma. Predpostavili smo, da tisti delci, ki močnejše reagirajo z umetnimi biološkimi membranami, intenzivneje intereagirajo tudi s

celicami.

V tretjem delu pa smo predpostavili, da delci, ko pride do interakcije z membrano, v celice tudi vstopijo.

Potrditev/zavrnitev hipotez:

V prvem delu smo potrdili hipotezo, da delci reagirajo z umetnimi lipidnimi membranami tako, da spremenijo njihovo obliko, se pod določenimi pogoji vrinejo med lipidne dvosloje ali pa povzročijo, da lipidni vezikli počijo. Ugotovili smo, da je za te reakcije pomembna velikost aglomeratov in površinski naboj delcev. Najverjetneje pa sta ta dva parametra med sabo povezana, saj nabiti delci tvorijo manjše aglomerate. Manjši aglomerati pa bolj intenzivno reagirajo z umetnimi membranami.

V drugem delu smo ugotovili, da delci poškodujejo membrane v primeru zelo visokih, nerealnih izpostavitvenih koncentracij, s katerimi organizem ne pride v stik. Pričakovali pa smo, da bodo vplivi na membrane že pri nižjih izpostavitvenih koncentracijah.

V tretjem delu pa smo študirali privzem zaužitih delcev v celice prebavnih žlez. Tudi tukaj, enako kot v drugem delu, smo prišli do nepričakovanih ugotovitev. Delci pridejo v celice le pri primeru, ko je organizem izpostavljen izjemno visokim izpostavitvenim koncentracijam in je membrana poškodovani. V primeru izpostavitve nižjim koncentracijam, ki so verjetne tudi v okolju, pa delci v celice ne vstopijo. Pomembna pa je tudi ugotovitev, da v primeru, ko se delci raztapljajo, v celice vstopijo ioni. To smo dokazali na primeru kovinskih nanodelcev.

Med najpomembnejšimi in najbolj presenetljivimi ugotovitvami pa je brez dvoma ta, da se delci raztapljajo v prebavilu testnega organizma. To pomeni, da kemijske analitske metode, s katerimi karakteriziramo lastnosti suspenzij delcev pred stikom z organizmom, ne morejo podati odgovora o tem, koliko ionov bo organizmu dejansko dostopnih. S temi raziskavami intenzivno nadaljujemo v okviru drugih projektov.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

	Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID		2451279	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Eksperimentalni dokaz interakcij med C60 in lipidnimi vezikli	
		ANG	Experimental evidence for the interaction of C-60 fullerene with lipid vesicle membranes	
	Opis	SLO	Avtorji so proučeval interakcije med C60 in umetnimi lipidnimi membranami. Predpostavili so, da C60 reagirajo z lipidnimi membranami in vpliva na njihovo ukrivljenost ali pa celo povzročijo poškodbe membrane do take mere, da membrana počí. Domneve so uspešno potrdili z večimi metodami. Pokazali so na potencial delcev, da poškodujejo membrane tudi in vivo.	
		ANG	The aim of this study is to assess the potential for disruption of the lipid bilayer by C-60 suspended in water. We selected a C-60 suspension that has previously been shown to provoke cell membrane destabilisation in vivo. Phase contrast microscopy and computer aided image analysis results show that C-60 causes shape transformations and rupture of unilamellar phospholipid vesicles, indicative of changes in their average mean curvature. Small-angle X-ray scattering reveals that C-60 provokes disruptions of external membranes of multilamellar vesicles only after freeze and thaw cycles. Here, the liposomes undergo breakage and annealing steps which increase the probability for fullerenes to insert into the MLVs. Our experimental findings confirm the potential of C-60 to reconstruct lipids in biological membranes.	
	Objavljeno v		Pergamon Press.; Carbon; 2012; Vol. 50, no. 3; str. 1170-1178; Impact Factor: 5.868;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.402; A': 1; WoS: EI, PM; Avtorji / Authors: Zupanc Jernej, Drobne Damjana, Drašler Barbara, Valant Janez, Iglič Aleš, Kralj-Iglič Veronika, Makovec Darko, Rappolt Michael, Sartori Barbara, Kogej Ksenija	
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek		

2.	COBISS ID		2573903	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Dokaz lažnega pozitivnega rezultata testa komet v primeru testiranja TiO ₂ delcev	
		ANG	Experimental evidence of false positive Comet test results due to TiO ₂ particle - assay interactions	
	Opis	SLO	Z evkariontskim mikroorganizmom <i>Tetrahymena thermophila</i> smo proučevali interakcije med pogosto uporabljanimi nanodelci TiO ₂ in celico. Interakcije nanodelcev z živim sistemom smo spremljali z različnimi biološkimi testi (lipidna peroksidacija, koncentracija ATP, koncentracija ROS, profili dolgoverižnih maščobnih kislin, spremembe citosolnega proteoma, polnjenje prebavnih vakuol, pokanje celic, prelomi DNA). Predvideli smo, da bodo različne velikosti delcev TiO ₂ različno vplivale na modelni organizem. V primeru kometnega testa smo eksperimentalno dokazali možnost lažnih pozitivnih rezultatov. Ugotovili smo tudi, da se v celicah <i>T. thermophila</i> kopičijo nanodelci TiO ₂ v prebavnih vakuolah, kar je odvisno od njihove velikosti, koncentracije in dolžine izpostavitve. Ugotovili smo, da ob izpostavitvi nanodelcem TiO ₂ pride do pokanja pri 5% celic v populaciji ni pa drugih izrazitejših poškodb.	
		ANG	We have studied the genotoxicity of TiO ₂ particles with a Comet assay on a unicellular organism, <i>Tetrahymena thermophila</i> . Exposure to bulk or nano-TiO ₂ of free cells, cells embedded in gel or nuclei embedded in gel, all resulted in a positive Comet assay result but this outcome could not be confirmed by cytotoxicity measures such as lipid peroxidation, elevated reactive oxygen species or cell membrane composition. Published reports state that in the absence of cytotoxicity, nano- and bulk TiO ₂ genotoxicity do not occur directly and a possible explanation of our Comet assay results is that they are false positives resulting from post-festum exposure interactions between particles and DNA. We suggest that before Comet assay is used for nanoparticle genotoxicity testing, evidence for the possibility of post-festum exposure interactions should be considered. The acellular Comet test described in this report can be used for this purpose.	
	Objavljeno v		Taylor & Francis; Nanotoxicology; 2013; Vol. 7, no. 5; str. 1043-1051; Impact Factor: 7.336; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.771; A'': 1; A': 1; WoS: NS, YO; Avtorji / Authors: Rajapakse Katarina, Drobne Damjana, Kastelec Damijana, Marinšek-Logar Romana	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID		3220104	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Učinek nanodelcev na celično strukturo in rast kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		ANG	The effects of engineered nanoparticles on the cellular structure and growth of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	Opis	SLO	Namen študije je bil proučiti vpliv različnih nanodelcev na strukturo in funkcijo kvasovke (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>). Proučevali smo naslednje delce: TiO ₂ -NPs (1–3 nm), ZnO-NPs (<100 nm), CuO-NPs (<50 nm), bulk, Ag-NPs (10 nm) in ogljikove delce (SWCNTs). Rezultati so pokazali, da so najbolj reaktivni tisti delci, pri katerih se ioni odtapljajo v medij. V študiji smo tudi dokazali neprimernost klasičnih testov genotoksičnosti zaradi možnosti lažnih pozitivnih rezultatov.	
			In order to study the effects of nanoparticles (NPs) with different physicochemical properties on cellular viability and structure, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> were exposed to different concentrations of TiO ₂ -NPs (1–3 nm), ZnO-NPs (<100 nm), CuO-NPs (<50 nm), their bulk forms, Ag-NPs (10 nm) and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs). CuO-NPs were highly cytotoxic, reducing the cell density by 80% at 9	

		ANG	cm ² /ml, and inducing lipid droplet formation. Cells exposed to Ag-NPs (19 cm ² /ml) and TiO ₂ -NPs (147 cm ² /ml) contained dark deposits in intracellular vacuoles, the cell wall and vesicles, and reduced cell density (40 and 30%, respectively). ZnO-NPs (8 cm ² /ml) caused an increase in the size of intracellular vacuoles, despite not being cytotoxic. SWCNTs did not cause cytotoxicity or significant alterations in ultrastructure, despite high oxidative potential. Two genotoxicity assays, GreenScreen and the comet assay, produced different results and the authors discuss the reasons for this discrepancy. Classical assays of toxicity may not be the most suitable for studying the effects of NPs in cellular systems, and the simultaneous assessment of other measures of the state of cells, such as TEM are highly recommended.
	Objavljeno v		Taylor & Francis; Nanotoxicology; 2014; Vol. 8, no. 4; str. 363-373; Impact Factor: 7.336; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.771; A'': 1; A': 1; WoS: NS, YO; Avtorji / Authors: Bayat Narges, Rajapakse Katarina, Marinšek-Logar Romana, Drobne Damjana, Cristobal Susana
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	2768975	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vstop ionov kobalta odtopljenih iz zaužitih nanodelcev CoFe ₂ O ₄
		ANG	Cellular internalisation of dissolved cobalt ions from ingested CoFe ₂ O ₄ nanoparticles
	Opis	SLO	V študiji smo želeli ugotoviti ali pride do raztapljanja zaužitih delcev CoFe ₂ O ₄ v prebavnih sokovih modelnega organizma. Za ta namen smo uporabili različnih slikovnih tehnik. Potrdili smo, da v prebavilu pride do raztapljanja delcev in da v celice vstopi le Co in ne tudi Fe. Toksikološke analize pa so pokazale, da je za varno delovanje kriv Co ion in ne delec. V članku smo diskutirali primernost izbranega biološkega modelnega organizma za študije raztapljanja delcev v prebavnem sistemu in morebitno sproščanje ionov.
		ANG	The aim of this study was to provide experimental evidence on the formation of Co ²⁺ , Fe ²⁺ and Fe ³⁺ ions from CoFe ₂ O ₄ nanoparticles in the digestive juices of a model organism. Standard toxicological parameters were assessed. Cell membrane stability was tested with a modified method for measurement of cell membrane stability. Proton induced x-ray emission and low energy synchrotron radiation X-ray fluorescence were used to study internalisation and distribution of Co and Fe. Co ²⁺ ions were found to be more toxic than nanoparticles. The authors confirmed that Co ²⁺ ions accumulate in the hepatopancreas but Fe ⁺ ions or CoFe ₂ O ₄ nanoparticles are not retained in vivo. A model biological system with a terrestrial isopod is suited to studies of the potential dissolution of ions and other products from metal-containing nanoparticles in biologically complex media.
	Objavljeno v		American Chemical Society; Environmental science & technology; 2013; Vol. 47, no. 10; str. 5400-5408; Impact Factor: 5.481; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.116; A'': 1; A': 1; WoS: IH, JA; Avtorji / Authors: Novak Sara, Drobne Damjana, Golobič Miha, Zupanc Jernej, Romih Tea, Gianoncelli Alessandra, Kiskinova Maya Petrova, Kaulich Burkhard, Pelicon Primož, Vaupetič Primož, Jeromel Luka, Ogrinc Potočnik Nina, Makovec Darko
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	2658127	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Akumulacija bakra po izpostavitvi bakrovim nanodelcem pri modelnem organizmu Porcellio scaber je povezana z odatplajanjem bakra iz nanodelcev
			Upon exposure to Cu nanoparticles, the accumulation of copper in the

	ANG	isopod Porcellio scaber is due to the dissolved Cu ions inside the digestive tract
Opis	SLO	Analizirali smo količino zaužitega bakra v prebavnih žlezah modelnega organizma v primeru, ko smo živali hranili z dostopnim bakrom iz bakrove soli in z bakrom v obliki nanodelcev. Ugotovili smo, da se večina bakra nakopiči v žlezah in da gre za bistvene razlike v kopičenju, če so živali zaužile bakrovo sol ali bakrove nanodelce. Ugotovili smo tudi, da do odtaplaja dejansko pride v prebavilu in ne pred zaužitjem.
	ANG	In the current work, we used a test system with terrestrial isopods (Porcellio scaber) fed with food spiked with Cu NPs or soluble Cu salt for 14 days. Cu content was analyzed in the digestive glands, gut, and the 'rest' of the body. Similar patterns of (i) assimilated and depurated amounts of Cu, (ii) Cu body distribution, and (iii) effect on isopods feeding behavior were observed regardless of whether the animals were fed with Cu NPs or soluble Cu salt spiked food. Thus, Cu ions and not Cu NPs were assimilated by the digestive gland cells. The comparison of the in vitro data on solubilization of Cu NPs and in vivo data on Cu accumulation in the animal tissues showed that about 99% of accumulated copper ions was dissolved from ingested Cu NPs in the digestive system of isopods.
Objavljeno v		American Chemical Society; Environmental science & technology; 2012; Vol. 46, issue 21; str. 12112-12119; Impact Factor: 5.257; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.014; A'': 1; A': 1; WoS: IH, JA; Avtorji / Authors: Golobič Miha, Jemec Anita, Drobne Damjana, Romih Tea, Kasemets Kaja, Kahru Anne
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Seyens podjetje
		ANG	Seyens company
	Opis	SLO	Na osnovi sodelovanja v ARRS proejeku je bilo ustanovljeno podjetje Seyens, ki ga je ustanovil eden od članov projektne skupine, dr. Jernej Zupanc. Namen podjetja je pomoč uporabnikom na področju računalniškega vida, strojnega učenja in analize slik (www.seyens.com).
		ANG	On the basis of the cooperation in the research project, one of the members of the project team, Jernej Zupanc PhD, established a private company Seyens (www.seyens.com). The company solves problems in the field of image analysis, computer vision, and machine learning.
	Šifra	F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")
	Objavljeno v	www.seyens.com	
	Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo	
2.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Partnerstvo v velikem EU projektu it 7.OP NanoMile (310451)
		ANG	Partnership in Large-scale integrating EU FP7 project NanoMile (310451)
	Opis	SLO	Raziskovalna skupina za nanobiologijo in nanotoksikologijo je kot partnerica v velikem projektu FP7 NanoMile tudi članica konzorcija NanoSafety. Preko tega je aktivno vključena v pretok svetovnega znanja na področju nano-varnosti. Konzorcij ima redna srečanja in oblikuje priporočila na področju

			nano-varnosti na podlagi najnovejših dognanj.
		ANG	The reseach group for nanobiology and nanotoxicology is a member of Nanosafety cluster through to its acive involvement in two interantionallarge scale projects, NanoMile and NanoValid. The EU NanoSafety Cluster is addressing all aspects of nanosafety including toxicology, ecotoxicology, exposure assessment, mechanisms of interaction, risk assessment and standardisation.
	Šifra	D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov	
	Objavljeno v	http://nanomile.eu-vri.eu/	
	Tipologija	2.14 Projektna dokumentacija (idejni projekt, izvedbeni projekt)	
3.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Partnerstvo v velikem EU projektu it 7.OP NanoValid (263147)
		ANG	Partnership in Large-scale integrating EU FP7 project NanoValid (263147)
	Opis	SLO	Raziskovalna skupina za nanobiologijo in nanotoksikologijo je kot partnerica v velikem projektu FP7 NanoValid tudi članica konzorcija NanoSafety. Preko tega je aktivno vključena v pretok svetovnega znanja na področju nano-varnosti. Konzorcij ima redna srečanja in oblikuje priporočila na področju nano-varnosti na podlagi najnovejših dognanj.
		ANG	The reseach group for nanobiology and nanotoxicology is a member of Nanosafety cluster through to its acive involvement in two interantionallarge scale projects, NanoMile and NanoValid. The EU NanoSafety Cluster is addressing all aspects of nanosafety including toxicology, ecotoxicology, exposure assessment, mechanisms of interaction, risk assessment and standardisation.
	Šifra	D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov	
	Objavljeno v	http://www.nanovalid.eu/index.php/project	
	Tipologija	2.14 Projektna dokumentacija (idejni projekt, izvedbeni projekt)	
4.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Metoda ugotavljanja interakcije nano-vlaken z epitelnimi celicami prebavnega sistema enakonožca Porcellio scaber
		ANG	Method for assessing interactions between nano-fibres and cells of the digestive system of terrestrial isopod Porcellio scaber
	Opis	SLO	Predstavljena je metoda vrstične elektronske mikroskopije in analize z rentgenskimi žarki, s katero je mogoče ugotavljati fizične interakcije med zaužitimi nano-vlakni in epitelom prebavnih žlez v modelnem organizmu. Metoda omogoča natančen pregled površine in analizo na izbranem mestu. Ta metoda je primerna, ko gre za ugotovljane interakcij med katerimi koli celicami in nano-vlakni kovinskega izvora.
		ANG	The combination of scanning electron microscopy and x-ray analyses allow to investigate interactions between physical interactions between nano-fibres and epithelial cells. The scanning electron microscopy allows careful investigation of the surface, while x-ray analysis is appropriate for elemental analyses of any selected structure on the surface. This method is well suited for analyses of interactions of any epithelia and nano-fibres containing metals.
	Šifra	F.33 Patent v Sloveniji	
	Objavljeno v	Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino; 2012; 4 f, [2] f.; Avtorji / Authors: Torkar Matjaž, Millaku Agron, Drobne Damjana	
	Tipologija	2.24 Patent	
5.	COBISS ID	2569039	Vir: COBISS.SI

	Naslov	SLO	(Ne)varnost nanodelcev
		ANG	Safety and non-safety of nanoparticles
	Opis	SLO	Poljudna oddaja o nanodelcih predstavlja čaroben svet majhnega in na uporabo nanodelcev v našem vsakdanjem življenju. Avtorice predstavljajo različne pristope v znanstveno raziskovanem delu in uporabo in varnost nanodelcev, ki se jim ni mogoče več izogniti. http://www.rtv slo.si/odprtikop/ugriznimo-v-znanost/nevarnost-nanodelcev/
		ANG	Scientists manipulate matter at the atomic level, but relatively little is known about the potential health and environmental effects of the tiny particles -- just atoms wide and small enough to easily penetrate cells in lungs, brains and other organs. Or not? Four scientists explain their scientific approaches in the nanoparticle research and their views on the safety issue of nanomatter. http://www.rtv slo.si/odprtikop/ugriznimo-v-znanost/nevarnost-nanodelcev/ RTV Slovenija 1; 2012; Avtorji / Authors: Drobne Damjana, Remškar Maja, Iskra Ivan, Kristl Julijana
	Šifra	F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
	Objavljeno v	RTV Slovenija 1; 2012; Avtorji / Authors: Drobne Damjana, Remškar Maja, Iskra Ivan, Kristl Julijana	
	Tipologija	2.19	Radijska ali televizijska oddaja

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Vabilo v vključitev v mednarodni konzorcij pri pripravi EU projekta Horizont 2020 (EU project 646002 – NanoFASE). Prijava je bila uspešna in projekt je trenutno v fazi priprave projektne dokumentacije. ARRS projekt je omogočil raziskave na področju internalizacije nanodelcev v različne organizme. S tem postala skupina za Nanobiologijo in nanotoksikologijo konkurenčna in vabljen partner v EU projektu. Brez ARRS projekt to najbrž ne bi bilo mogoče.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

V projektu smo študirali vpliv nanodelcev na umetne lipidne membrane z namenom ugotoviti ali nanodelci delujejo neposredno na lipidno komponento bioloških membran. Dobljene rezultate smo preverili in vivo sistemu. Ključne znanstvene ugotovitve, ki je prispeval ta projekt so:

- nanodelci ne vstopijo v nepoškodovane celice
- nanodelci, če so v dovolj visokih koncentracijah najprej poškodujejo celično membrano in šele nato vstopijo
- nanodelci sicer vplivajo na lipidne komponente bioloških membran, vendar je ta učinek manj izrazit, kot smo pričakovali

ANG

In this project we have provide experimental data on the effects of nanoparticles on lipid membranes. Since lipid membranes are major constituents of biological membranes we have focused on the effect of nanoparticles on the lipid component of the biological membrane. This was validated also in in vivo system. The key findings of the project are:

- Nanoparticles are not internalised by intact cells
- Nanoparticles enter the cells only when cell membrane is damaged
- the effect of nanoparticles on lipid membranes is less pronounced as expected at the beginning of the project.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Nanotehnologije proizvajajo vedno nove proizvode, ki pridejo namerno ali slučajno v stik z organizmi. Te tehnologije so v razcvetu in v naslednjih letih nas bodo brez dvoma njeni proizvodi preplavili. Zaradi tega dejstva je vedno bolj pomembno, da proizvajalci in uporabniki proizvodov nanotehnologij razumemo in smo seznanjeni s morebitnim kvarnim delovanjem nano-proizvodov. V primeru, ko gre za uporabo nanoproduktov v biomedicine, farmaciji ali prehranski industriji, je poznavanje bio-nano interakcij ključnega pomena tudi za zagotavljanje njihove uspešne uporabe. Rezultati, dobjeni v projektu so nam omogočili, da svoje znanje koristno prenašamo v dve slovenski podjetji: Cinakrna in Zlatarna Celje.

ANG

With the rapid rise of the field of nanotechnology and the design and production of increasingly complex nanoscale materials, it has become ever more important to understand how the physical form and chemical composition of these materials interact synergistically to determine bio-nano interactions. During the development of any nanotechnological product for biomedical application, application in pharmacy food industry and similar, controlled interactions with biological systems have to be studied in order to reach the desired application. However, when a product is to be put on the market its potential side effects have to be known as well. The knowledge obtained in this project is already disseminated to two sloveian companies: Zlatara and Cinkarna Celje.

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	
	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 upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih 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	☐	☐	☐	☐	
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 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 2014¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

/

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:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Damjana Drobne

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/64

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 2014 (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/2015 v1.00a

2E-33-B6-53-2E-58-54-11-9A-24-EA-57-93-4D-41-AF-9D-05-0C-4E