

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/152

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J3-0124	
<b>Naslov projekta</b>	VPLIV REKOMBINANTNEGA HUMANEGA ERITROPOETINA NA IZRAŽANJE GENOV IN PRENOS SIGNALA PRI RAKU NA DOJKAH	
<b>Vodja projekta</b>	18622	Nataša Debeljak
<b>Tip projekta</b>	J	Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	2.082	
<b>Cenovni razred</b>	D	
<b>Trajanje projekta</b>	02.2008 - 01.2011	
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	381	Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	302 312	ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA Univerzitetni klinični center Ljubljana
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13.	Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

#### 1.1. Družbeno-ekonomski cilj<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	13.03
<b>Naziv</b>	Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

#### 2. Sofinancerji<sup>2</sup>

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

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta<sup>3</sup>

#### **Hipoteza**

Podporna terapija z rekombinantnim človeškim eritropoetinom (rHuEpo) med kemoterapijo zaščitno vpliva na lastnosti rakastih celic. rHuEpo aktivira EpoR signalne poti in regulira izražanje genov vključenih v signalizacijo, apoptozo, proliferacijo in celični cikel. Izražanje endogenega Epo je med zdravljenjem z rHuEpo in kemoterapijo spremenjeno.

#### **Namen projekta**

Namen študije je bil raziskati vpliv podporne terapije z rekombinantnim humanim eritropoetinom (rHuEpo) na lastnosti rakastega tkiva dojke, ob sočasnem zdravljenju s kemoterapijo. V predstavljeni študiji smo želeli:

1. ugotoviti, kako kemoterapija vpliva na izražanje genov Epo sistema in ostalih;
2. ugotoviti, kako zdravljenje anemije z rHuEpo vpliva na lastnosti rakastega tkiva;
3. ugotoviti, kako zdravljenje s kemoterapijo povzročene anemije z rHuEpo vpliva na nihanje nivoja endogenega Epo (eEpo);
4. z uporabo mikromrež oceniti učinek zdravljenja z rHuEpo na celostno izražanje genov rakastega tkiva;
5. postaviti model molekularnega mehanizma delovanja rHuEpo na prenos signala pri raku in uravnavanje izražanja genov.

Študija je bila prvotno načrtovana le na vzorcih bolnic z metastatskim rakom dojke, ki med zdravljenem s kemoterapijo prejemajo podporno terapijo z rHuEpo (*in vivo*). V sklopu analize endogenega Epo z metodo IEF smo v študijo vključili tudi bolnike z drugimi oblikami raka (rak mehurja), zaradi zagotovitve zadostnega števila vzorcev. Poleg tega je bila študija razširjena tudi na analizo vpliva rHuEpo na celične linije raka dojke in živčnega izvora (*in vitro*), z namenom zagotovitve statistično reprezentivnega števila vzorcev in možnosti poglobljene analize mehanizmov delovanja rHuEpo.

#### **Opis raziskovanja**

V sodelovanju z Onkološkim inštitutom smo v raziskavo vključili trinajst bolnikov z metastatskim rakom dojke ali mehurja. Trem bolnicam smo pri vsakem odvzemu bioloških vzorcev odvzeli biopsijo, kri za izolacijo RNA, proteinov in DNA ter urin in kri za analizo IEF. Desetim bolnikom smo odvzeli urin in kri za analizo IEF. Metoda zbiranja vzorcev, ki je bila postavljena v sklopu post-doktorskega projekta dr. Sabine Berne, je bila nadgrajena. Iz biopsij in krvi smo izolirali RNA ter jo shranili na -80°C. Plazmo za izolacijo proteinov smo alikvotirali z ali brez inhibitorjev fosfataz ter zmrznili -80°C. Vzorce urina in krvi za analizo IEF smo shranili na -80°C do IEF analize. Zbiranje vzorcev biopsij je bilo omejeno zaradi sprejetja novih ESMO (The European Society for Medical Oncology) in ASCO (The American Society of Clinical Oncology) smernic uporabe rHuEpo v onkologiji po začetku izvajanja projekta.

Sinteza endogenega Epo je spodbujena zaradi hipoksije in anemije, ter zavrnjena zaradi zdravljenja s kemoterapijo in rHuEpo ter stanja bolnika. Nasprotno vpliv anemije, zdravljenja s kemoterapijo in rHuEpo na končno

količino endogenega Epo (eEpo) pri bolnikih z rakom še ni pojasnjen. V ta namen smo uporabili metodo analize Epo z izoelektričnim fokusiranjem (IEF), saj analiza z ELISA ne omogoča ločeno analizo količine eEpo in rHuEpo. IEF namreč omogoča ločevanje izoform Epo molekul endogenega in rekombinantnega izvora s pomočjo električnega toka na gelu s pH gradientom ter semikvantitativno analizo posamezne izoforme. Izoforme Epo so podrazred molekule Epo, ki imajo različen nivo glikolizacije (število sialičnih kislin) in s tem različen naboj in pI. Metoda izoelektričnega fokusiranja, ki jo je razvila dr. Lasne, je bila prvič uporabljena leta 2000 v namen protidopinške kontrole na olimpijskih igrah v Sydneyu. Metoda temelji na 5 glavnih korakih: priprava urina/k krvi, ločevanje na gelu s pH gradientom, izpostavitvev protitelesom in dvojni prenos, detekcija s kemoiluminiscenco in računalniška analiza slike.

Za pridobitev znanja in tehnike namenjene postavitvi metode izoelektričnega fokusiranja za detekcijo eritropoetina se je mladi raziskovalec K. Španinger leta 2008 en mesec šolal v WADA (World Anti Doping Agency) laboratoriju, Francija pod mentorstvom dr. Françoise Lasne. Tekom šolanja je analiziral več kliničnih vzorcev bolnikov z rakom in kontrolnih vzorcev ter potrdil, da metoda IEF služi tudi kot diagnostično sredstvo detekcije količine endogenega Epo in delovanja ledvic pri rakavih bolnikih, ki prejemajo cisplatinsko kemoterapijo in rHuEpo. V letu 2009 je metodo postavil v domačem laboratoriju in analiziral novo skupino IEF vzorcev bolnic z rakom dojke, ki so zdravljene s kemoterapijo in rHuEpo, ki so jih zbrali tekom leta 2009 in 2010.

Med analiziranimi vzorci je izstopal vzorec bolnice 1161, pri kateri nismo opazili zamika med eEpo izoliranim iz urina in plazme. Navadno je zamik prisoten pri zdravih ljudeh. Vzrok temu je bil vpliv cisplatinskega kemoterapevtskega zdravljenja, ki dokazano lahko vpliva na funkcijo ledvic, ki so glavno mesto sinteze endogenega eritropoetina. Potrdili smo vpliv zdravljenja s cisplatinom, rHuEpo in stanja bolnika (nefroza) na količino endogenega Epo. Rezultati študije na bolnici 1161 so bili objavljeni tudi v mednarodni reviji s faktorjem citiranja (Španinger et al, *Acta chim. slov.* 2011) in predstavljeni v obliki predavanja na dveh mednarodnih znanstvenih srečanjih (Epo srečanje, Luebeck, Nemčija ter Kongres SBD, Otočec) in strokovnem srečanju (OI, Ljubljana).

V namene ugotovitve ali pri bolnikih z rakom sinteza eEpo poteka tudi v rakavih celicah, smo vzorce bolnice 1161 analizirali tudi z metodo MAIIA v sodelovanju z dr. Maria Lönnberg, MAIIA Diagnostics, Švedska. Metoda MAIIA je kombinacija kromatografije in imunodetekcije, ki poleg detekcije rHuEpo omogoča tudi ločevanje eEpo glede na njihov izvor (ledvice, jetra). Ugotovili so, da ni nikakršnega odstopanja od normalnih vrednosti. Kar kaže na to, da metoda ne omogoča ločevanja eEpo rakastega izvora ali da le-ta v vzorcih ni prisotna (v zadostni količini).

V okviru raziskovalnega dela na celičnih linijah raka dojke je mlada raziskovalka Nina Trošt proučevala mehanizme prenosa Epo signala v normalnih in rakavih celičnih linijah, analizirala vpliv rHuEpo na celično proliferacijo, celični cikl in zaščitno vlogo rHuEpo pred z cisplatinom (cDDP) posredovano apoptozo. Uporabljala je celične linije Hs578T, Hs578Bst, MCF-7, MCF-10A, T-47D, SKBR3, MDA-MB-231 in MDA-MB-361.

Celične linije raka dojke Hs578T, Hs578Bst, SKBR3, MDA-MB-231 in MCF-7 so bile akutno (do 2 dni) in kronično (8 tednov – 6 mesecev) izpostavljene rHuEpo z namenom analize vpliva na rast celic (GCA, MTT, Wst

in test kolonigenosti), izražanja genov (RT-qPCR) in analize aktivacije signalnih poti (WB). Za določanje vpliva rHuEpo na rast posamezne celične linije smo uporabili eno od sledečih metod. Narejena je bila optimizacija metode GCA (Growth Characterization Assay), štetje celic je bilo izvedeno z avtomatskim števcem ADAM. Kalorimetrično določanje proliferativnega potenciala z metodo WST-1 in MTT omogoča posredno določitev števila celic preko njihove metabolne aktivnosti. Pri testu kolonigenosti z analizo velikost celičnih kolonij določimo nivo njihove proliferacije (večje kolonije pomenijo hitrejšo proliferacijo).

Pri dveh celičnih linijah je analiza z MTT nakazala povečan proliferativen potencial rakastih celic, ki so bile kronično izpostavljene rHuEpo vendar tega rezultata nismo uspeli ponoviti. Tudi WST-1 analiza ni pokazala povečanega proliferativnega potenciala pri celicah, ki so bile kronično tretirane z rHuEpo (5 U/mL) v primerjavi z netretiranimi celicami. Test kolonigenosti kaže na vpliv kronične izpostavitve celic rHuEpo pri MCF-7 celični liniji, ne pa tudi pri MDA-MB-231 celični liniji. Po 8-ih tednih izpostavitve rHuEpo je proliferativni potencial MCF-7 celic statistično signifikantno večji od tistega pri netretiranih celicah ( $p < 0.05$ ) in se kaže v večjem številu velikih kolonij.

Kvantitativna PCR analiza v realnem času (RT-qPCR) genov, udeleženih v celičnem ciklu, celični proliferaciji, apoptozi in medceličnih stikih, je pokazala da so pri akutnem tretiranju diferencno izraženi geni vključeni v Epo signalizacijo in apoptozo. Določen je bil tudi nivo ekspresije EpoR pri različni konfluentnosti celic in na vzorcih po akutnem tretiranju z rHuEpo. EpoR je izražen le v celicah, ki kažejo odzivnost na rHuEpo. Nivo izražanja EpoR se med akutno izpostavitvijo rHuEpo ne spremeni, kot se tudi ne spremeni nivo izražanja EpoR in Epo pri kronično tretiranih MCF-7 in MDA-MB-231.

S skupino prof. dr. T. Lanišnik Rižner smo sodelovali pri analizi nivoja izražanja estrogenskega (ER) in progesteronskega receptorja (PR) ter 18 encimov vključenih v metabolizem estrogena na osmih celičnih linijah raka dojke. Podaljšana izpostavitvev estrogenom je pomemben faktor tveganja za razvoj raka dojke. Rezultati študije so bili objavljeni tudi v mednarodni reviji s faktorjem citiranja (Hevir et al, *Chem.-biol. interact.* 2011). Na vseh celičnih linijah smo določili tudi nivo izražanja Epo in EpoR. Sodelovanje bomo nadaljevali z namenom razjasnitve vloge soizražanja ER, EpoR in  $\beta$ CR na lastnosti raka dojke ter njihovo odzivnost na tamoksifen.

Za analizo aktivacije Epo signalnih poti z metodo western blot (WB) smo uporabili protitelesa proti sledečim proteinom: ERK, P-ERK, AKT, P-AKT, STAT5, P-STAT5. Preliminarna WB analiza kronično tretiranih in kontrolnih celičnih linij MCF-7 in MDA-MB-231 ni pokazala aktivacije STAT5 in AKT signala po tretiranju z rHuEpo. To nakazuje na odstotnost navedenih signalnih poti, znano je da obe celični liniji ne izražata STAT5. Pri MDA-MB-231 celični liniji je P-ERK prisoten v tretiranih in kontrolnih vzorcih, kar kaže na aktivacijo Epo signalne poti preko ERK.

Za razumevanje sprememenjene signalizacije v rakastem tkivu je ključno razumevanje signalizacije v normalnem tkivu (kostni mozeg), ki poteka v sodelovanju z prof. Petrom Černelč, Kliničnim oddelkom za hematologijo, Univerzitetni Klinični center Ljubljana.

Vlogo rHuEpo pri zaščiti rakastih celic dojke pred citotoksičnimi vplivi cisplatina (cDDP) smo v sodelovanju s prof. Gregorjem Seršo, Onkološki inštitut Ljubljana določili na vzorcih celičnih linij MCF-7 in MDA-MB-231, ki so bile kronično (9 tednov) in akutno (24h) izpostavljene z rHuEpo. Določili smo proliferacijski potencial celic (WST-1) in analizirala gene (RT-qPCR) udeležene v procesih celičnega cikla in apoptoze (*BCL2*, *CASP3*, *CASP9*, *PMAIP1*, *BBC3*,

*BAD, TP53, FOS, JUN, BAX*). Zmanjšan proliferativni potencial celic, ki so bile kronično tretirane z rHuEpo nakazuje, da ima zaščitno vlogo le akutna izpostavitve rHuEpo. RT-qPCR analiza je pokazala, da so pri celični liniji MCF-7 diferencno izraženi sledeči geni: v sklopu izpostavitve cDDP (povečano izražanje *CASP9, PMAIP1, BBC3, TP53, BAX, BCL2* in znižano izražanje *FOSc*), v sklopu izpostavitve Epo (povečano izražanje *CASP9, PMAIP1, BBC3, TP53, FOSc, BAX, BAD*).

V sklopu analize vloge rHuEpo na celicah raka živčnega izvora je mlad raziskovalec K. Španinger analiziral vpliv rHuEpo na rast celic in izražanje genov (specifično in globalno) ter zaščitno vlogo Epo-R103A pred s staurosporinom spodbujeno apoptozo. Uporabil je celične linije U78MG, SH-SY5Y, Y79 in PC12.

Tekom štiri mesečnega usposabljanja leta 2008 na Harvard Medical School, Boston, ZDA je pod mentorstvom prof. A. J. Sytkowskega osvojil rokovanje s celičnimi linijami, test citotoksičnosti, analizo rasti ter test metabolne aktivnosti celic. V laboratorij je uvedel aparaturo za avtomatično štetje celic imenovano ADAM (Automatic Cell Counting System) ter jo z namenom analize rasti GCA (Growth Characterization Assay) vpeljal tudi v domačem laboratoriju. Z analizo vpliva kronične izpostavitve rHuEpo, njegove zaščitne vloge in analizo genov ter signalnih poti vključenih v nevroprotekcijo je nadaljeval v letu 2009 in 2010.

Rezultati na celični liniji SH-SY5Y in PC-12 kažejo, da rHuEpo deluje nevroprotektivno pri nižjih koncentracijah (pod 25 U), kot dosedaj navaja strokovna literatura. Kronična izpostavitve celičnih linij rHuEpo (pod 4 tedne) privede do spremembe morfoloških značilnosti celičnih linij, poleg tega celice postanejo nedovzetne za akutno izpostavitve rHuEpo.

Celice SH-SY5Y, PC12 in Y79 so bile kronično (do 6 tednov) izpostavljene rHuEpo z namenom analize vpliva na rast celic (GCA) in izražanja genov (RT-qPCR). Rezultati GCA z avtomatskim števcem ADAM kažejo, da ima rHuEpo dvojni učinek na rast celic; v prvih tednih tretiranja deluje anti-proliferativno, v daljšem obdobju pa proliferativno. Z metodo PCR v realnem času (RT-qPCR) smo analizirali izražanje genov vpletenih v uravnavanje in signalizacijo Epo v celičnih linijah SH-SY5Y in PC12. Prva stopnja v RT-qPCR analizi je izbor genov primernih za normalizacijo nivoja izražanja. Ugotovljeno je bilo namreč, da izbira napačnih normalizacijskih faktorjev lahko spremeni interpretacijo rezultatov izražanja genov interesa. Na združenih vzorcih celične linije SH-SY5Y smo s ploščicami TaqMan (Express Human plate) analizirali stabilnost 32 referenčnih genov. Ekspresija enega nastabilnejših genov iz TaqMan analize (*Rplp*) je bila nato z RT-qPCR potrjena na posameznih vzorcih SH-SY5Y, skupaj z dvema po literaturi najpogosteje uporabljenima referenčnima gena (*GAPDH, Actb*). V celični liniji PC12 smo preverili stabilnost izražanja treh po literaturi najpogosteje uporabljenih referenčnih genov (*GAPDH, CycA* in *Ywhaz*). V obeh celičnih linijah smo analizirali tudi nivo izražanja šest genov vključenih v Epo signalno pot (*EpoR, Epo, STAT5b, STAT5a, Jun, Akt, Fos*). Stabilnost izražanja je bila analizirana s programi geNorm, NormFinder and BestKeeper. Vsi trije programi so pokazali, da je najbolj stabilen in za normalizacijo celične linije SH-SY5Y ustrezen gen *Rplp*, za PC12 pa *CycA* in *Ywhaz*. Genoi Epo signalnih poti so nizko diferencno izraženi. Pokazali smo, da je interpretacija rezultatov ob normalizaciji na *GAPDH* napačna. Rezultati so v procesu objave v mednarodni reviji s faktorjem citiranja (K. Španinger et al., *Gene*, submitted).

S pomočjo genskih mikro mrež smo pogledali vpliv izpostavitve rHuEpo na globalni nivo izražanja genov v celični liniji SH-SY5Y. Celice smo akutno izpostavili 5IU/ml Epo, izolirali RNA 0, 3, 12 in 48 h po izpostavljenosti celic ter analizirali z genskimi mikromrežami Affymetrix (Human Gene 1.0 ST Array). Ugotovili smo, da ima funkcija časa večji vpliv na diferencialno izražanje genov kot funkcija Epo tretmaja v specifični časovni točki. Pokazali smo diferencialno izražanje genov vpletenih v signalne poti Jak/Stat, MAPK in PI3K, ki so vključene v eritropoezo. Vlogo teh poti v procesu nevroprotekcije celic živčnega izvora SH-SY5Y bo treba dodatno raziskati.

Pri analizi zaščitne vloge rHuEpo na celičnih linijah živčnega izvora (nevroprotekcije) smo apoptozo izvali a staurosporinom. V ta namen je bila določena umeritvena krivulja določitve optimalne koncentracije pri SH-SY5Y in PC12 celicah, ki ustreza literaturnim podatkom. Za nadaljne poskuse je bilo potrebno sintetizirati in očistiti zadostno količino mutante Epo-R103A in nespremenjenega (Epo-wt) eritropoetina. Mutanta Epo-R103A ni sposobna vezave na homodimerni EpoR receptor in zato ne sproži proliferacije celic hematopoetskega izvora. Vendar naj bi Epo-R103A ohranila sposobnost vezave na heterodimerni EpoR (EpoR- $\beta\epsilon\tau\alpha$ CR ali drugi), preko katerega omogoča zaščito pred apoptozo (nevroprotekcija). V ta namen smo transfeciral celice CHO z plazmidoma, ki nosita zapis za Epo-R103A in Epo-wt, oba označena s histidinskim repom. Celice so pod selekcijo z antibiotikom sintetizirale Epo in ga izločale v medij, iz katerega smo protein očistili s pomočjo afinitetnih NiNTA kolon. Uspešnost transfekcije in nivo izražanja je bila ocenjena s pomočjo prenosa po Westernu. V namene dokazati, da Epo-R103A deluje le protektivno in ne spodbuja proliferacije celic, je izvedel poskus na UT7/Epo celicah, ki rastejo le ob prisotnosti eritropoetina. Rezultati so pokazali, da Epo-R103A nima proliferativnega vpliva, za razliko od Epo-wt, ki ima ohranjen proliferativen vpliv. Sledil je poskus nevroprotekcije na celicah SH-SY5Y. Celice smo izpostavili Epo-R103A in Epo-wt za 24h, ter nato medij zamenjali in celice izpostavili staurosporinu. Z metodo štetja celic (GCA) smo potrdili, da pretretiranje celic z Epo-R103A deluje zaščitno. Poleg tega smo pokazali, da ni razlike v aktivnosti med Epo-R103A in Epo-wt. To nakazuje, da je za zaščitno vlogo celic zadostna vezava Epo na EpoR monomer.

Analizirali smo tudi vpliv sočasne izpostavljenosti SH-SY5Y celic staurosporinu in Epo na nivo genskega izražanja genov udeleženih v apoptozi (*Bcl2l*, *Bax*, *Akt*). V ta namen smo dokazali stabilnost genov *GAPDH*, *Actb* in *Rplp*, ki so bili uporabljeni v postopku normalizacije. Rezultati so pokazali, da tretiranje celic s staurosporinom ob pretretiranju z Epo nima vpliva na nivo izražanja genov.

### **Ključne ugotovitve in znanstvena spoznanja ter rezultati in učinki**

V okviru projekta smo na nivoju celičnih linij rakastega izvora potrdili vpliv rHuEpo na rast celic in izražanje genov. Na vzorcih bolnikov pa smo potrdili vpliv zdravljenja (z rHuEpo in kemoterapijo) in stanja bolnika na nivo eEpo.

V okviru študije smo dosegli sledeče rezultate in učinke:

1. z izražanjem v celični liniji CHO smo pridobili dve Epo modelni molekuli, primerni za analizo zaščitne vloge: nespremenjeno (Epo-wt) in mutirano obliko (Epo-R103A);
2. vzpostavili smo analizo Epo v vzorcih krvi in urina z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) v raziskovalne namene, trenutno smo edini laboratorij v Sloveniji;

3. vzpostavili smo več novih metod: test kolonigenost, GCA, test citotoksičnosti,...;
4. predstavitev raziskav na več mednarodnih in domačih znanstvenih in strokovnih srečanjih;
5. objavo treh SCI citiranih izvirnih znanstvenih člankov in enega preglednega znanstvenega članka;
6. iz rezultatov pridobljenih v letu 2010 pripravljamo štiri izvirne znanstvene članke (qPCR, mikromreže, Epo-ER, Epo-cisplatin) in en pregledni znanstveni članek.

#### 4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>4</sup>

V okviru študije smo uspešno realizirali vse zastavljene raziskovalne cilje. Realizacija namena dela je bila omogočena z uporabo dveh sistemov; vzorcev bolnikov (*in vivo*) ter celičnih linij raka dojke in živčnega izvora (*in vitro*).

##### **Realizacija glede na točke namena projekta**

Ad 1. Potrdilo smo, da kemoterapija vpliva na izražanje genov Epo sistema in ostalih:

- z RT-qPCR smo potrdili, da cisplatin in izpostavitve rHuEpo spremenita izražanje genov vključenih v celični cikel in apoptozo pri celičnih linijah raka dojke;

Ad 2. Potrdili smo, da zdravljenje anemije z rHuEpo vpliva na lastnosti rakastega tkiva:

- s testom kolonigenosti smo potrdili vpliv rHuEpo na sposobnost tvorbe kolonij pri celičnih linijah raka dojke;
- z GCA smo potrdili, da kronična izpostavitve rHuEpo vpliva na rast celic (dva načina delovanja glede na čas izpostavitve) pri celičnih linijah raka živčnega izvora;
- z WST-1 smo potrdili, da ima le akutna izpostavitve rHuEpo zaščitno vlogo pri celičnih linijah raka dojke, ki so izpostavljene cisplatinu;
- z GCA smo potrdili, da imata tako Epo-R-103A kot tudi Epo-wt nevroprotektivno vlogo v celičnih linijah raka živčnega izvora, ki so izpostavljene stauroporinu;
- z citotoksičnim testom smo nakazali, da je vezava Epo na monomeren EpoR receptor zadostno za posredovanje zaščitne vloge pri linijah raka živčnega izvora, ki so izpostavljene stauroporinu;

Ad 3. Analizirali smo, kako zdravljenje s kemoterapijo povzročene anemije z rHuEpo vpliva na nihanje nivoja endogenega Epo (eEpo):

- potrdili smo primernost uporabe analize IEF na bolnikih z rakom;
- z metodo IEF smo potrdili sovpliv zdravljenja z rHuEpo, kemoterapije in tudi stanje bolnika na nivo endogenega Epo;

Ad 4. Z uporabo mikromrež smo ocenili učinek zdravljenja z rHuEpo na celostno izražanje genov rakastega tkiva:

- z metodo RT-qPCR in mikromrežami smo potrdili, da rHuEpo spremeni izražanje genov vključenih v Epo signalno poti pri celičnih linijah raka dojke in živčnega izvora;

Ad 5. Postavitev modela molekularnega mehanizma delovanja rHuEpo

na prenos signala pri raku in uravnavanje izražanja genov:

- glede na izvedene raziskave predlagamo sledeč model molekularnega mehanizma delovanja kronične izpostavitve rHuEpo pri raku: 1. vezava rHuEpo na monomeren EpoR receptor; 2. aktivacija Epo signalnih poti (fosforilacija npr. Erk); 3. regulacija izražanja genov vključenih v Epo signalne poti (Jak-STAT, MAPK in PI3K); 4. počasnejša rast zaradi prenasičenosti signala ali delovanja negativne povratne zanke; 5. reorganizacija sistema na nivoju signalizacije, izražanja genov ali postranslacijske modifikacije in posledično hitrejša rast celic;
- model bomo preverili ter potrdili ali ovrgli v nadaljnjih raziskavah.

## 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>5</sup>

Zaradi nerazjasnjene vpliva rHuEpo na rakaste celice so se ESMO (The European Society for Medical Oncology) in ASCO (The American Society of Clinical Oncology) smernice uporabe rHuEpo v onkologiji v letu 2008, 2009 in 2010 spremenile. Z vsakim letom so se kriteriji uporabe rHuEpo v onkologiji zaostri, zadnje smernice omejujejo uporabo na bolnike z metastatsko obliko bolezni brez možnosti za ozdravitev z nivojem Hb pod 10 g/dl (Rizzo JD et al, 2010, Schrijvers D et al, 2010). Smernice uporabe rHuEpo v onkologiji v Sloveniji sledijo svetovnim trendom. Število rakastih bolnikov, ki prejemajo rHuEpo, je v prvem letu izvajanja projekta zelo upadlo in s tem se je zmanjšalo število bolnikov, primernih za vključitev v študijo. Tako je bila onemogočena pridobitev statistično reprezentativnega števila vzorcev, potrebnega za ustrezno interpretacijo rezultatov.

V namen pridobitve zadostnega števila vzorcev za analizo endogenega Epo pri bolnikih z rakom, smo poleg bolnic z rakom dojke v študijo vključili tudi bolnike z drugimi tipi raka (rak mehurja).

Študijo na bolnicah (*in vivo*) smo nadgradili z analizo molekularnega delovanja rHuEpo na več celičnih linijah (*in vitro*). Uporabili smo več celičnih linij raka dojke (Hs578T, Hs578Bst, MCF-7, MCF-10A, T-47D, SKBR3, MDA-MB-231 in MDA-MB-361) in raka živčnega izvora (SH-SY5Y, PC12 in Y79). Uporaba celičnih linij omogoča pridobitev statistično reprezentativnega števila vzorcev in možnost uporabe večjega števila raziskovalnih metod. S tem je omogočena uporaba več primerljivih metod za analizo vpliva rHuEpo na proliferativen potencial celic, kot je štetje celic (Growth Characterization Assay, GCA), merjenje metabolne aktivnosti (MTT, Wst) in test kolonigenosti. Na celičnih linijah lahko poleg tega analiziramo tkivno-zaščitno vlogo rHuEpo ob akutni kot tudi kronični izpostavitvi rHuEpo med zdravljenjem z ali brez uporabe citostatikov. Omogočena je tudi analiza s spremenjenimi oblikami Epo, kot Epo-R103A, s katerim smo testirali hipotezo o posredovanju nevroprotektivne vloge rHuEpo preko EpoR homo ali heteroreceptorja.

## 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Eritropoetin: novi pristopi pri razvoju molekul z izboljšanimi lastnostmi ter alternativnim učinkom
		ANG	Erythropoietin : new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives
	Opis	SLO	Podporno zdravljenje z rHuEpo se uporablja pri bolnikih z anemijo, ki nastane kot posledica okvare ledvic, raka in drugih bolezni. Z namenom izboljšanja njegovega <i>in vivo</i> učinka so v razvoju nove oblike Epo-u podobnih substanc; kot so Epo-posnemajoče molekule in molekule, ki povečajo sintezo endogenega Epo. Epo zaščitno vlogo tudi izven hematopoetskega sistema. V razvoju so molekule brez hematopoetske sposobnosti, vendar z ohranjeno



		zaščitno aktivnostjo v ostalih tkivih. Zaskrbljujoč je podatek, da je Epo sposoben sproži signalizacijo v nekaterih oblikah raka.
	ANG	rHuEpo is pharmaceutical used to correct anemias associated with renal insufficiency, cancer and other diseases. Efforts to increase its efficacy in vivo by manipulating the protein's structure resulted in novel Epo like agents. Epo mimetic agents and agents to increase endogenous production are underway. As Epo has tissue protective actions outside of erythropoiesis, designs try producing erythro-inactive molecules that still retain extra-hematopoietic activity. Data that Epo can trigger signaling in some cancer cells has raised attention of medical community and regulatory authorities.
	Objavljeno v	DEBELJAK, Nataša, SYTKOWSKI, Arthur J. Erythropoietin : new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. Curr. pharm. des., 2008, letn. 14, št. 13, str. 1302-1310. JCR IF (2008): 4.399
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	24260313
2.	Naslov	SLO Izražanje estrogenskega in progesteronskega receptorja ter encimov, ki metabolizirajo estrogen, v različnih celičnih linijah raka dojke
		ANG Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines
	Opis	SLO Podaljšana izpostavitve estrogenom je pomemben faktor tveganja za razvoj raka dojke. Le ta se pojavi zaradi povečane proliferacije celic in oksidativnega metabolizma. Z namenom razumevanja vloge metabolizma estrogena pri raku dojke smo v osmih celičnih linijah raka dojke analizirali nivo izražanja estrogenskega in progesteronskega receptorja ter 18 encimov vključenih v metabolizem estrogena. Rezultati kažejo, da analizirane celične linije predstavljajo različne vrste modelnih sistemov in da je potrebna nadaljna primerjava ekspresije z vzorci raka dojke.
		ANG Prolonged exposure to estrogens is a significant risk factor for the development of breast cancer, exerted by stimulating cell proliferation or through oxidative metabolism. In aim to provide a better understanding of estrogen metabolism in breast cancer, we determined the expression profiles of the genes for the estrogen and progesterone receptors, and for 18 estrogen-metabolizing enzymes in eight breast cancer cell lines. Our data show that the cell lines examined provide the full range of model systems and should further be compared with the expression profiles of breast cancer specimens.
	Objavljeno v	HEVIR, Neli, TROŠT, Nina, DEBELJAK, Nataša, LANIŠNIK-RIŽNER, Tea. Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. Chem.-biol. interact.. [Print ed.], 2011, doi: 10.1016/j.cbi.2010.12.013. JCR IF (2009): 2.457
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	27777753
3.	Naslov	SLO Poročilo o preizkusu izoelektričnega fokusiranja z namenom analize Epo v dveh vzorcih bolnikov med zdravljenjem s kemoterapijo in darbepoetinom
		ANG Report on isoelectric focusing trial of erythropoietin profiling in two cancer patients during chemotherapy and darbepoetin treatment
	Opis	SLO Na količino endogenega eritropoetina (eEpo) vpliva hipoksija, slabokrvnost, uporaba rekombinantnega eritropoetina (rHuEpo), kemoterapija in drugo. Izoelektrično fokusiranje (IEF) v povezavi z dvojnimi prenosom je metoda, ki omogoča analizo izooblik endogenega in rHuEpo. Namen naše raziskave je bila analiza vpliva zdravljenja s kemoterapijo in rHuEpo na vzorec izooblik eEpo pri anemičnih bolnicah z rakom dojke. Potrdili smo, da metoda omogoča spremljanje učinkov zdravljenja na nivo eEpo in indirektno nakazuje funkcijo ledvic.
		ANG The level of endogenous Epo (eEpo) is affected by hypoxia, anaemia, application of recombinant erythropoietin (rHuEpo), chemotherapy and others. Isoelectric focusing (IEF) combined with double immunoblotting is a method that enables distinct analysis of eEpo and rHuEpo isoforms. Aim of our study was to set up method to analyse the chemotherapy and rHuEpo treatment effects on the pattern of eEpo in anaemic breast cancer patient. We confirmed that IEF enables to monitor the effects of treatment on the level of eEpo and indirectly indicates kidney function.

	Objavljeno v		ŠPANINGER, Klemen, BORŠTNAR, Simona, MATOS, Erika, MOŽINA, Barbara, SYTKOWSKI, Arthur J., KOMEL, Radovan, DEBELJAK, Nataša. Report on isoelectric focusing trial of erythropoietin profiling in two cancerpatients during chemotherapy and darbepoetin treatment. Acta chim. slov. [Tiskana izd.], 2011, vol. 58, issue 1, str. 139-143. http://acta.chem-soc.si/58/58-1-139.pdf. JCR IF (2009): 0.841
	Tipologija	1.01	Izvorni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	28208345	
4.	Naslov	SLO	Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija
		ANG	Erythropoietin, epoetins and detection
	Opis	SLO	rHuEpo se uspešno uporablja v medicini, deluje kot stimulator nastajanja rdečih krvnih celic. Tehnologija detekcije in ločevanja endogenega in eksogeno vnesenega Epo ni bila dostopna vse do leta 2000, ko so prvič uporabili metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) za analizo zlorabe v športu. Problem detekcije rHuEpo je strukturna podobnost endogenemu Epo (eEpo). Poleg tega je koncentracija Epo v človeških tekočinah zelo nizka. Metoda trenutno še ni v uporabi pri diagnostiki anemičnih bolnikov, vendar ima potencial za določanje vpliva rHuEpo in druge terapije na nivo izražanja in obliko eEpo.
		ANG	rHuEpo is used in medicine; it acts as a stimulus for production of red cells. Detection method that could differentiate between endogenous and exogenous Epo was developed in 2000, when the method called isoelectric focusing (IEF) was first used for detection of doping in sport. The problem of rHuEpo detection is structural similarity to endogenous Epo and low concentration of Epo in human blood and urine. IEF is currently not used as diagnostic method in clinical samples. It has potency to be used as method to identify the effects of rHuEpo and other therapy on endogenous Epo expression.
	Objavljeno v	ŠPANINGER, Klemen, DEBELJAK, Nataša. Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija = Erythropoietin, epoetins and detection. Farm. vestn., 2009, letn. 60, št. 5, str. 279-285.	
	Tipologija	1.02	Pregledni znanstveni članek
COBISS.SI-ID	26200537		
5.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Vpliv podporne terapije z eritropoetinom na nivo endogenega eritropoetina in izražanje genov
		ANG	The effects of recombinant human erythropoietin supportive therapy on the level of endogenous erythropoietin and gene expression
	Opis	SLO	Nivo izražanja endogenega Epo se pri bolnikih z anemijo dvigne, pri rakastih bolnikih pa pade zaradi vpliva kemoterapije, zdravljenja z rHuEpo, vpliva TNF ali IL-1. V namen določitve sovpilja terapije na nivo endogenega Epo pri bolnikih z rakom smo zbrali in z metodo IEF analizirali več vzorcev bolnikov, zdravljenih s kemoterapijo in z/brez rHuEpo. Na različnih celičnih linijah raka dojke smo analizirali vpliv kronične izpostavitve rHuEpo na nivo izražanje genov.
			Anaemia is a stimulus for increased level of endogenous Epo production, while in cancer patients its level decreases due to chemotherapy, treatment with rHuEpo or presence of TNF and IL-1. In the aim to address these co

		ANG	treatments effect on the level of endogenous Epo in cancer patients several samples from cancer patients treated with chemotherapy and with/without rHuEpo were collected and analyzed with IEF method. The effect of chronic rHuEpo treatment on the expression of genes was analysed on several breast cancer cell lines.
	Šifra		B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v		DEBELJAK, Nataša. Vpliv podporne terapije z eritropoetinom na nivo endogenega eritropoetina in izražanje genov : strokovni posvet Podporno zdravljenje z rastnimi dejavniki v onkologiji in hematologiji, 25. november 2010, Ljubljana. 2010.
	Tipologija		3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa
	COBISS.SI-ID		28144857
2.	Naslov	SLO	Izoelektrični profil eritropoetina v urinu in plazmi rakastih bolnikov
		ANG	Isoelectric profiles of erythropoietin in urine and plasma in cancer patients
	Opis	SLO	Nivo izražanja endogenega Epo pri rakastih bolnikih je lahko spremenjeno zaradi vpliva kemoterapije, anemije, zdravljenja z rHuEpo, vpliva TNF ali IL-1. Pri dveh bolnikih z metastasko obliko bolezni, zdravljenih s kemoterapijo in z/brez rHuEpo, so bili zbrani vzorci urina in krvi ter analizirani z metodo izoelektiričnega fokusiranja (IEF) z namenom določitve vpliva kemoterapije in rHuEpo na nivo endogenega Epo.
		ANG	Endogenous Epo production in cancer patients may be altered due to chemotherapy, anaemia, rHuEpo treatment, TNF and IL-1. Urine and blood samples were obtained from two metastatic cancer patient treated with chemotherapy with or without rHuEpo, analysed with isoelectric focusing (IEF) with the aim to determine the effect of chemotherapy and rHuEpo treatment on the level of endogenous Epo.
	Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v		SPANINGER, Klemen, DEBELJAK, Nataša, LASNE, Françoise, MARTIN, Laurent, MARTIN, Jean Antoine, BORŠTNAR, Simona, MATOS, Erika, MOŽINA, Barbara. Isoelectric profiles of erythropoietin in urine and plasma in cancer patients: EPO-Meeting, Luebeck 2009, American Journal of Hematology, 2009, letn. 84, št. 9, str. E20. <a href="http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122575721/PDFSTART">http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122575721/PDFSTART</a>
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		26050265
3.	Naslov	SLO	Četrty znanstveni seminar Centra za funkcijsko genomiko in biočipe "From arrays to understanding
		ANG	4th Scientific Symposium of Center for functional genomics and biochips "From arrays to understanding diseases"
	Opis	SLO	Ob četrti obletnici Centra za funkcijsko genomiko in biočipe (CFGBC) je bil 17. 6. 2009 je bil organiziran znanstveni seminarj z mednarodno udeležbo "From arrays to understanding diseases". Teme seminarja vključujejo različne pristope mikromrež s poudarkom na razumevanju bolezni. Seminar predstavlja aktivnosti članic Slovenskega konzorcija za bio-čipe in sodelujočih tujih inštitucij.
		ANG	The 4th Symposium "From arrays to understanding diseases" with international participation was organized on June 17th, 2009, to celebrate the fourth anniversary of Center for functional genomics and biochips (CFGBC). The symposium covered topics on various applications of bio-chips with a specific focus on gaining in-depth knowledge of diseases. Research activities of the members of the Slovenian Consortium for Bio-Chips and collaborating foreign institutions were presented.
	Šifra		B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v		4th CFGBC Symposium, June 17, 2009, Ljubljana, Slovenia, BAVEC, Aljoša (ur.). From arrays to understanding diseases. Ljubljana: Faculty of Medicine, 2009. 80 str. ISBN 978-961-267-012-2.
	Tipologija		2.30 Zbornik strokovnih ali nerecenziranih znanstvenih prispevkov na konferenci
	COBISS.SI-ID		245943808
4.	Naslov	SLO	Praktični vidiki prijave zaprtih sistemov za delo z gensko spremenjenimi

		organizmi : gradiva delovne skupine SBD za pripravo vlog
	ANG	Practical aspects of Registration of closed systems working with genetic modified organisms: material of SBD working group for application preparation
Opis	SLO	Gensko spremenjen organizem (GSO) je organizem, v katerega je z uporabo sodobnih metod biotehnologije vnesen točno določen gen za točno določeno lastnost iz drugega organizma. GSO so lahko mikroorganizmi (bakterije, glive, virusi), rastline in živali. Brošura zajema navodila in vse dokumente, ki so potrebni za registracijo laboratorijev, ki delajo z GSO v 1. in 2. varnostnem razredu, na Ministrstvu za okolje in prostor.
	ANG	Genetically modified organism (GMO) is an organism that was changed using methods of modern biotechnology. In such organism defined gene for exactly defined characteristic from other organism has been inserted. GMO are microorganisms (bacteria, fungi, and viruses), plants and animals. Brochure includes instruction and all documents required for registration of laboratories, working with GMO from 1. and 2. safety level, at Ministry of the Environment and Spatial Planning, Republic of Slovenia.
Šifra	F.34 Svetovalna dejavnost	
Objavljeno v	ACCETTO, Tomaž, DEBELJAK, Nataša, DOLJAK, Bojan, KARAS KUŽELIČKI, Nataša, KRAŠEVEC, Nada, MAJERLE, Andreja, RUPREHT, Ruth, SABOTIČ, Jerica, DOLINAR, Marko, MILAVEC, Mojca (ur.), RUPREHT, Ruth (ur.), BATIČ, Martin (ur.). Praktični vidiki prijave zaprtih sistemov za delo z gensko spremenjenimi organizmi : gradiva delovne skupine Slovenskega biokemijskega društva za pripravo vlog. Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor, 2009. V, 87 str., ilustr. ISBN 978-961-6024-52-5.	
Tipologija	2.02 Strokovna monografija	
COBISS.SI-ID	249167872	
5.	Naslov	SLO
		ANG
	Opis	SLO
		ANG
	Šifra	
	Objavljeno v	
	Tipologija	
	COBISS.SI-ID	

## 8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>8</sup>

<p>1. Naslov: Vzpostavitev analize Epo z metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) v Sloveniji          Opis: Analiza Epo z metodo IEF omogoča določitev števila in količine različnih Epo izoform. Metodo je vzpostavila dr. Francois Lasne, WADA, Francija z namenom dopinških kontrol športnikov. V omenjenem laboratoriju smo se izšolali in metodo IEF uspešno postavili v domačem laboratoriju z namenom analize vpliva kemoterapije in rHuEpo na nivo endogenega Epo. Trenutno smo edini laboratorij v Sloveniji, ki omogoča analizo Epo s to metodo.          F.01 pridobitev novih praktičnih znanj, informacij, veščin</p> <p>2. Naslov: Vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina na izražanje genov in prenos signala pri raku na dojkah          Opis: Nataša Debeljak vodi temeljni raziskovalni projekt in koordinira raziskave med sodelujočimi institucijami IBK-Medicinska fakulteta UL, Onkološki inštitut Ljubljana in KIKKB-Univerzitetni klinični center Ljubljana (<a href="http://sicris.izum.si/">http://sicris.izum.si/</a>)          D.01 vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov</p> <p>3. Naslov: Neuroprotektivno delovanje humanega rekombinantnega eritropoetina in analiza celokupnega eritropoetina z izoelektričnim fokusiranjem pri bolnikih z rakom          Opis: V okviru doktorske naloge mladi raziskovalec Klemen Španinger na sistemu celičnih linij nevrnalnega izvora analizirala globalno ekspresijo genov in vpliv rHuEpo na rast celic. Vzpostavil je detekcijo Epo z metodo IEF ter jo prvič uporabil za analizo endogenega Epo pri bolnikih z rakom.          D.09 mentorstvo doktorandom</p>
--

4. Naslov: Vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina in njegovega receptorja na rast in preživetje celic raka dojke ter njihovo odzivnost na cisplatin in tamoksifen.  
Opis: V okviru doktorske naloge mlada raziskovalka Nina Trošt analizira vpliv rHuEpo na proliferativni potencial celičnih linij raka dojke, zaščitno vlogo rHuEpo pred citotoksičnimi učinki cisplatina ter negativen vpliv povečanega izražanja EpoR na antagonistično delovanje tamoksifena.  
D.09 mentorstvo doktorandom

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>9</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>10</sup>

SLO

Raziskava je zasnovana tako, da je podrobno proučila molekularne mehanizme delovanja rekombinantnega človeškega eritropoetina (rHuEpo) na nivoju signalizacij in uravnavanja izražanja genov v rakastem tkivu.

Je prva raziskava, ki je analizirala vpliv sočasnega zdravljenja z rHuEpo in kemoterapijo na nivo endogenega Epo na vzorcih bolnikov z rakom dojke ali mehurja. V ta namen smo v domačem laboratoriju vzpostavili metodo analize Epo z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) ter potrdili primernost uporabe za semikvantitativno analizo na več vzorcev bolnikov z rakom. Trenutno smo edini laboratorij v Sloveniji, ki omogoča analizo endogenega Epo z metodo IEF in jo uporabljamo v raziskovalne namene.

Tekom raziskave smo podrobno proučili mehanizme delovanja rHuEpo in vitro, na več celičnih linijah raka dojke in živčnega izvora. Z analizo RT-qPCR in mikromrežami smo določili gene, ki so diferencilano izraženi med akutno in kronično izpostavitvijo rHuEpo. Gre za gene vključene v signalizacijo in celični cikel.

Z testom kolonigenosti smo potrdili vpliv rHuEpo na tvorbo kolonij. Pri celičnih linijah živčnega izvora smo z metodo GCA nakazali dvojni način delovanja rHuEpo glede na čas izpostavitve. Vpliv na rast celic nismo uspeli potrditi z metodo MTT in Wst-1.

Potrdili smo zaščitno vlogo rHuEpo na celicah raka dojke in živčnega izvora. Analiza nevroprotektivne vloge rHuEpo na živčnih celičnih linijah je pokazala, da je zaščitna vloga posredovana preko monomernega EpoR. V dosedanjih študijah so dokazali, da rHuEpo deluje zaščitno pri mehanskih poškodbah nevronov, protektivni vpliv ima verjetno tudi pri različnih nevrodegenerativnih boleznih. Vendar je bilo predvidevano, da zaščitno vlogo posreduje preho heteroreceptora EpoR-betaCR.

ANG

The research project is designed to provide integral and detailed answers to important molecular questions regarding the mechanisms of action of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) on the signalling transduction and on the regulation of genes in cancerous tissue.

This is the first study addressing the mechanism of contemporary rHuEpo and chemotherapy treatment on the level of endogenous Epo in breast or bladder cancer patients. The Epo analysis with isoelectric focusing (IEF) was established enabling the semi quantification of several samples. We are at the moment the only laboratory in Slovenia enabling the analysis of Epo with IEF.

During research the mechanisms of rHuEpo action was studied in details in vitro, on several breast and bladder cancer cell lines. The RT-qPCR determined genes differentially expressed during acute and chronic rHuEpo treatment. These are genes involved in signalization and cell cycle.

Colony formation test confirmed the effect of rHuEpo on the formation and number of colonies. The use of rHuEpo in cells showed, that rHuEpo has two modes of action depending on the exposure time. This effect could not be confirmed with MTT and Wst-1, t-1.

rHuEpo neuro-protection effects was confirmed on several breast cancer and neuronal cell lines. It was previously shown that rHuEpo acts in tissue-protective manner during mechanical injury of neurons. Its protective role is also suspected in several neurodegenerative diseases. rHuEpo act as neuroprotectant in neuronal damage as well as in different neuronal diseases. It is

hypothesized that the protection role is mediated through hetero receptor EpoR-betaCR.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>11</sup>

SLO

Z novimi spoznanji, ki so rezultat te raziskave, smo poglobili razumevanje vpliva rHuEpo na rakaste celice ter postavili modelni mehanizmi delovanja. Delo je bilo predstavljeno na več mednarodnih konferencah in v znanstveno-raziskovalnih revijah s faktorjem vpliva SCI.

V okviru študije smo v domačem laboratoriju v raziskovalne namene vzpostavili metodo izolektrično fokusiranje (IEF), ki omogoča analizo Epo na vzorcih urina in krvi z. Trenutno smo edini laboratorij v Sloveniji, ki omogoča analizo Epo s to metodo. Metoda poleg analize zlorabe Epo v športu, omogoča tudi ovrednotenje sovpilva kemoterapije in podpornega zdravljenja z rHuEpo na nivo endogenega Epo in indirektno nakazuje funkcijo ledvic. Metoda IEF je bila prvič uporabljena v namen analize profila eritropoetina pri bolnikih z rakom.

Raziskava je potekala v sodelovanju z zdravniki Onkološkega inštituta, ki so bili tekom celega projekta celovito seznanjeni z rezultati in ugotovitvami študije. Neposredno sodelovanje raziskovalcev z zdravniki je omogočilo hiter pretok novih znanj in spoznanj iz laboratorijev v klinično prakso, in s tem sočasno neposredno vplivalo tudi na kakovost in učinkovitost zdravljenja bolnikov.

ANG

Novel findings, resulting from the proposed research not only deepen our knowledge about the mechanisms of rHuEpo action on cancer tissue, but also enable to establish the model system of the EpoR action. Conducted research was presented at several international meetings and in SCI cited scientific papers.

The analysis of Epo with isoelectric focusing (IEF) was established in the home laboratory enabling the analysis of Epo in blood and urine samples. At the moment we are the only laboratory in Slovenia enabling analysis of Epo with this methodology. IEF enables to detect Epo misuse in sport, as well as semi quantification of co treatment with chemotherapy in rHuEpo on the level of endogenous Epo and indirectly also on the kidney function. IEF was used for the first time for the analysis of Epo profile in cancer patients.

The research will be done in collaboration with physicians at the Institute of Oncology, informed in full with the results and findings of the presented study. A direct cooperation of researchers and physicians enables fast transfer of research findings and knowledge from laboratories to clinical practice; what in the end affects also the quality and efficacy of treatment of cancer patients.

## 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		
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE



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

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

**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	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

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

**Komentar**

--

**12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)**

1.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		

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

**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:

Nataša Debeljak	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

20.4.2011

#### Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/152

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

<sup>2</sup> Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

<sup>3</sup> 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](#)

<sup>4</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> 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](#)

<sup>6</sup> 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., PREMZL, 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](#)

<sup>7</sup> 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](#)

<sup>8</sup> 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](#)

<sup>9</sup> 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](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>12</sup> 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

B7-5C-7A-23-BD-CA-F9-87-7F-F1-3F-8B-B9-BA-27-19-88-14-3E-CB