

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/219

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z3-9403
Naslov projekta	Molekularni mehanizem delovanja rekombinantnega humanega eritropoetina na rakaste celice
Vodja projekta	21407 Sabina Berne
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3.400
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	01.2007 - 12.2008
Nosilna raziskovalna organizacija	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	11 Neusmerjene raziskave (temeljne)

2. Sofinancerji¹

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta²

Anemija ali slabokrvnost je pomanjkanje rdečih krvnih celic (eritrocitov) v krvnem obtoku. Med vzroki, ki botrujejo nastanku anemije, so nekateri še posebej v ospredju: krvavitve, hemoliza, odpoved ledvic, vnetni odgovor, tumorji v kostnem mozgu; lahko pa se pojavi tudi kot posledica zdravljenja raka s kemoterapijo oziroma obsevanjem. Anemija, kot neželeni stranski učinek kemoterapije, se pojavi pri 20-60% bolnikov in še dodatno poslabša kakovost njihovega življenja. Poleg tega je anemija tudi negativni napovedni dejavnik, povezan s kar 65% povečanjem tveganja zgodnejše smrti. Anemijo zdravimo s transfuzijo koncentriranih eritrocitov, vendar ta način

čedalje bolj izpodriva terapija z rekombinantnim humanim eritropoetinom (rHuEpo), ki se po mednarodno uveljavljenih standardih začne uporabljati takrat, ko vrednost hemoglobina v krvi pade pod 110 g/l krvi.

Eritropoetin (Epo) je glikoproteinski hormon, ki po vezavi na eritropoetinski receptor (EpoR) na površini celic sproži natančno uravnavan sistem signalnih poti, ki omogočijo eritropoezo. V zadnjih letih tečejo obsežne raziskave tudi o vlogi eritropoetina (Epo) izven krvnega sistema. Dokazano je, da ima Epo zaščitno vlogo in/ali da spodbuja delitev celic centralnega živčnega sistema, srca, mišic, prebavnega trakta, reprodukcijskih organov in endotelija ter da pospešuje angiogenezo. Ugotovili so tudi, da rHuEpo izboljša uspešnost kemo- in radio-terapije z zmanjšanjem hipoksije rakastega tkiva ter s povečano prekrvavljenostjo in oksigenacijo tkiva izboljšuje uspešnost terapije. Toda po drugi strani prisotnost Epo in njegovega receptorja (EpoR) pri mnogih tipih raka in rakastih celičnih linijah postavlja pod vprašaj terapevtske učinke rHuEpo pri bolnikih z rakom. Nakazuje se namreč možnost, da rHuEpo vpliva na hitrejšo rast tumorja, pospešuje njegovo ožiljenje in ščiti rakaste celice pred apoptozo. Dve nedavni klinični študiji sta pokazali, da je dolgoročno preživetje bolnikov, ki so prejeli rHuEpo krajše, kot pri bolnikih v kontrolni skupini, ki so za odpravo anemičnosti prejeli transfuzijo. V molekularni mehanizem delovanja rHuEpo pri obeh skupinah bolnikov se študiji nista poglobili.

V okviru podoktorskega projekta smo preučevali vpliv podporne terapije z rekombinantnim humanim eritropoetinom pri bolnicah z metastatskim rakom dojke, ki jih zdravijo s kemoterapijo in so anemične. Izhajali smo iz domnev, da i) rHuEpo vpliva na izražanje genov v rakastem tkivu ter s tem vpliva na lastnosti rakastih tkiv in da ii) obstaja v rakastem tkivu razlika v izražanju genov ter prenosu signala v Epo signalni poti v odvisnosti od načina zdravljenja (podporna terapija z rHuEpo oziroma transfuzija).

Poleg tumorskih celic v odvzetem tkivu pogosto najdemo tudi normalne celice, celice imunskega in hematopoetskega sistema, ki niso zaželeni pri raziskavah izražanja genov v rakastem tkivu. Zato smo v prvem delovnem sklopu razvili metodo za ločevanje tumorskih od normalnih celic v aspiracijskih biopsijah s tanko iglo s pomočjo gradientnega centrifugiranja. Zaradi majhnega števila primernih bolnic (ki ustrezajo vsem vključitvenim pogojem) smo delovne protokole vzpostavili na kodiranih ostankih biopsij, za kar smo pridobili soglasje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko. Na kratko: Ostanek biopsije smo prenesli v sterilno epico s pufrom in inhibitorji RNaz. Suspenzijo celic smo nato nanесли na predhodno pripravljen medij (raztopina Percolla) z vzpostavljenim gradientom gostote. Vzoredno smo pripravili tudi kontrolno centrifugirko, v katero smo nanесли mešanico različno obarvanih markerskih kroglic in nam je služila za oceno gostote gradienta. Tumorske celice so se pri centrifugiranju zaradi različne gostote ločile od normalnih celic. Po centrifugiranju smo celice sprali s pufrom. Celično suspenzijo smo nanесли na citospin. Preparate po citospinu smo pobarvali po Giemsi in jih pod mikroskopom citopatološko ovrednotili. Ugotovili smo, da se tumorske celice pojavijo v frakcijah 2-4 (v gostotnem območju od 1,035-1,064 g/ml). V frakcijah 5 in 6 (gostotno območje 1,064-1,074 g/ml) smo zasledili limfocite in posamezne granulocite. Večina granulocitov je bila v frakciji 7 (gostotno območje 1,074-1,088 g/ml). V frakciji 8 so bili posamezni eritrociti, večina eritrocitov pa je bila v frakciji 9 (gostotno območje okrog 1,09 g/ml). Frakcije, ki so vsebovale tumorske celice smo združili in uporabili za izolacijo celokupne RNA. Preverili smo koncentracijo in kvaliteto RNA na Bioanalizatorju 2100 ter ugotovili, da je izbrani komplet (RNAqueous[®]-Micro, Ambion) primeren za izolacijo RNA iz majhnega števila celic (<500.000).

Drug delovni sklop je obsegal raziskave vpliva rHuEpo in transfuzije na globalno izražanje genov v rakastem tkivu. Na testnih vzorcih krvi smo preverili ustreznost kompleta za izolacijo RNA iz krvi (The LeukoLOCK[™] Total RNA Isolation System, Ambion) in se odločili za njegovo uporabo, saj smo uspeli pridobiti zadostno količino in ustrezno kvaliteto celokupne RNA. Iz krvi bolnic vključenih v študijo smo izolirali celokupno RNA ter njeno koncentracijo in kvaliteto preverili na Bioanalizatorju 2100. Vzorce RNA smo shranili na -80°C, dokler se ne bo nabralo dovolj vzorcev (po 20 bolnic v testni in kontrolni skupini) za analizo izražanja genov. Vpliv rHuEpo in transfuzije na globalno izražanje genov v rakastem tkivu bomo ugotavljali s pomočjo mikromrež in kvantitativnim PCR v realnem času. Načrtujemo uporabo enega izmed komercialno dostopnih

oligonukleotidnih bio-čipov humanega genoma (Affymetrix ali Agilent). Tako bomo pridobili celosten vpogled v transkriptomiko, kot tudi v niz genov, vključenih v onkogenezo, proliferacijo, apoptozo in angiogenezo. Kvantitativni PCR bo služil kot samostojna metoda kvantifikacije za nekatere izbrane gene, kot tudi referenčna metoda za ovrednotenje rezultatov, pridobljenih po hibridizaciji DNA-čipov. Pri tem bomo uporabili enake vzorce kot pri analizi z DNA-mikromrežami. V večini primerov bomo uporabljali relativno kvantifikacijo, kjer se izražanje določenega gena v vzorcu primerja z izražanjem istega gena v kontrolnem vzorcu. Poskuse kvantitativnega PCR bomo izvedli na aparatu LightCycler 480 (Roche).

Tretji sklop raziskav je bil namenjen postavitvi protokola za analizo Epo z metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) v raziskovalne namene. V svetu se ta metoda uporablja predvsem za potrditev dopinga z rHuEpo in je strogo varovana, poleg tega pa v Sloveniji še ni razvita. Metoda izoelektričnega fokusiranja, ki jo je razvila dr. Lasne, je bila prvič uporabljena leta 2000 na olimpijskih igrah v Sydneyu. Mladi raziskovalec K. Španinger se je posebej za to izšolal v WADA (World Anti Doping Agency) laboratoriju v Franciji. Izoelektrično fokusiranje (IEF) temelji na ločevanju izoform molekul Epo s pomočjo električnega toka v gelu z gradientom pH. Mesto posamezne izoforme epoetina v gelu z gradientom pH je določeno z njeno izoelektrično točko (pI). Izoforme epoetina se med seboj ločijo po stopnji glikoziliranosti (različno število sialičnih kislin) in s tem povezanim različnim nabojem na molekuli. Metoda temelji na 4 glavnih korakih: koncentriranja urina, ločevanje na gelu s pH gradientom, dvojni prenos in detekcija s kemoluminiscenco. Metoda ni primerna samo za uporabo določevanja Epo v urinu bolnic, temveč sedaj tudi za določevanje Epo v plazmi.

Količina endogenega Epo med posameznimi bolnicami niha in lahko vpliva na potek podpornega zdravljenja z rHuEpo. Zato bomo bolnicam ob prvem in drugem odvzemu vzorcev (V1 in V2, pred začetkom podpornega zdravljenja z rHuEpo) določili količino endogenega Epo v krvi in urinu. Uporabili bomo encimsko-imunski test s protitelesi proti Epo (Epo ELISA), s katerim določimo količino celokupnega Epo. V tretjem vzorcu krvi ali urina (V3, odvzetim med zdravljenjem z rHuEpo) bomo količino endogenega in rekombinantnega Epo določili z metodo IEF, ki omogoča razlikovanje med endogeno in rekombinantno obliko Epo ter določitev količine posamezne oblike Epo. S primerjavo vseh treh vzorcev pri isti bolnici bomo lahko časovno spremljali nihanje nivoja endogenega Epo ter preučili, kako kemoterapija in podporno zdravljenje z rHuEpo vplivata na raven endogenega hormona.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev³

V prvem letu raziskav smo načrtovali zbiranje krvi, urina in biopsij bolnic z metastatskim rakom dojke, ki se zdravijo s kemoterapijo in so anemične. Opravili smo naslednje delovne naloge:

1. Izdelali smo protokol za ločevanje tumorskih od normalnih celic v aspiracijskih biopsijah s tanko iglo na podlagi gradientnega centrifugiranja. Na ta način smo celice imunskega in hematopoetskega sistema, ki niso zaželjene pri raziskavah izražanja genov v rakastem tkivu, uspešno odstranili od populacije tumorskih celic.
2. Postavili in optimizirali smo protokol za izolacijo RNA iz krvi in biopsije. Izolirano RNA bolnic hranimo na -80°C, dokler se ne bo nabralo dovolj vzorcev (po 20 v vsaki skupini bolnic), da bomo izvedli globalne analize ekspresije genov na mikromrežah in preverili izražanje posameznih genov s kvantitativnim PCR v realnem času.
3. Uvedli smo novo tehniko določanja rHuEpo v vzorcih urina in krvi s pomočjo IEF v raziskovalne namene. Omogočila nam je razlikovanje med različnimi oblikami Epo (endogeni in rekombinantni hormon) v krvi in urinu bolnic. Metoda je primerna tudi za diagnostične namene pri anemičnih bolnikih z rakom, ki se zdravijo s kemoterapijo in bolnikih, ki imajo okvarjeno delovanje ledvic.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta⁴

Število bolnic z metastatskim rakom dojke, ki ustrezajo zastavljenim vključitvenim pogojem je manjše, kot smo pričakovali. Poleg tega sta v času študije dve od treh sodelujočih zdravnic odšli na novo delovno mesto, kar je še dodatno zmanjšalo število bolnic vključenih v raziskavo. Zbiranje vzorcev se zato nadaljuje v okviru temeljnega projekta doc. dr. N. Debeljak (J3-0124) in z delom dveh mladih raziskovalcev (K. Španinger in N. Trošt), ki sta se priključila raziskovalni skupini.

Odločili smo se, da v tem času (dokler se ne zbere dovolj vzorcev tkiva in krvi bolnic) za preučevanje vpliva rHuEpo na izražanje genov v rakastih celicah, uporabimo dve celični liniji. Model za normalno populacijo celic je MCF-10A (netumorska epitelna celična linija tkiva dojke), kot model rakastih celic pa smo si izbrali celično linijo MCF-7 (tumorska epitelna celična linija iz adenokarcinoma dojke).

V prvem delu raziskav smo z MTT testom preučevali, kako različne koncentracije rHuEpo vplivajo na proliferacijo tumorskih (MCF-7) in normalnih (MCF-10A) celic po 24, 48 in 72 urni inkubaciji. Ugotovili smo, da eritropoetin v izbranih testnih razmerah ni statistično značilno spremenil viabilnosti niti hitrosti rasti celic MCF-10A in MCF-7, kar je v skladu z ugotovitvami večih raziskovalcev po svetu.

V drugem delu študije smo celični liniji izpostavili akutnemu delovanju rHuEpo za različne časovne intervale. Iz obdelanih in neobdelanih celic smo izolirali celokupno RNA, jo prepisali v cDNA in uporabili kot matrico za pomnoževanje med kvantitativnim PCR v realnem času. Ugotavljali smo, kakšno je izražanje eritropoetina in različnih oblik eritropoetskega receptorja (EPOR – normalna oblika receptorja, EPOR-T – okrnjena oblika receptorja in EPOR-S – topna oblika receptorja) ter večih normalizacijskih genov (SDHA, SF3A1, TOP1, UBC, YWHAZ, 18 S rRNA). Zanimala nas je primerjava med netretirano in tretirano tumorsko celično linijo ter izražanje izbranih genov v tumorskih celicah, obdelanih z rHuEpo, v primerjavi s tretiranimi normalnimi celicami. Poleg tega smo obe celični liniji kronično (do 9 tednov) izpostavili rHuEPO in tedensko izolirali celokupno RNA iz tretiranih in netretiranih celic. Raziskave izražanja izbranih genov iz teh vzorcev so v teku.

Iz MCF-7 in MCF-10A celic (obdelanih z rHuEPO in netretiranih) smo pripravili tudi proteinske celične lizate, ki smo jih poslali v analizo na Kinex servis (Kanada). Vzorce bodo nanesti na mikromreže s spotiranimi protitelesi (KAM-1.1), ki omogočajo kvalitativno in kvantitativno analizo izražanja in fosforilacijskega stanja preko 650 proteinov, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju ter nadzorujejo celično proliferacijo, stres in apoptozo. Na ta način bomo pridobili številne informacije o prenosu signala Epo v tumorskih celicah v primerjavi z normalnimi celicami. Ta preiskava pomeni dodaten metodološki (proteomski) pristop, ki sicer v zasnovi projekta ni bil predviden, vendar menimo, da bo prinesel nova koristna spoznanja.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Aegerolizini: struktura, funkcija in domnevna biološka vloga.
		ANG	Aegerolysins : structure, function, and putative biological role.
	Opis	SLO	Aegerolizini, odkriti v glivah, bakterijah in rastlinah, so močno podobni proteini z zanimivimi biološkimi lastnostmi. Delujejo protitumorsko, antiproliferativno in antibakterijsko, poleg tega pa bi se jih lahko uporabljalo za preprečevanje ateroskleroze ali kot cepiva. Aegerolizini so primerni tudi kot specifični označevalci za raftom podobne membranske domene. Biokemijsko so dobro okarakterizirani proteini s prevladujočo β -strukturo in naslednjimi skupnimi lastnostmi: nizko izoelektrično točko, podobnimi molekulskimi masami (15-17 kDa) in stabilnostjo v širokem razponu pH vrednosti.

		ANG	Aegerolysins, discovered in fungi, bacteria and plants, are highly similar proteins with interesting biological properties. Certain aegerolysins possess antitumoral, antiproliferative, and antibacterial activities and could be exploited in the prevention of atherosclerosis, or as vaccines. Besides, some aegerolysins could be used as specific markers for raft-like membrane domains. They are biochemically well characterized all- β structured proteins sharing the following common features: low isoelectric points, similar molecular weights (15-17 kDa), and stability in a wide pH range.
	Objavljeno v		Protein sci., 2009, issue 4, vol. 18, str. 694-706.
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		4098586
2.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
3.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
4.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
5.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO	Rekombinantni humani eritropoetin - prenos signala v celicah raka dojke.
		ANG	Recombinant human erythropoietin - signal transduction in breast cancer cells.
	Opis	SLO	Raziskovali smo, kako zdravljenje anemije s transfuzijo oziroma rHuEpo vpliva na lastnosti tumorskih celic pri bolnicah z rakom dojke, ki se zdravijo s kemoterapijo in kakšna je signalna transdukcija rHuEpo v rakastih celicah.
			We investigated how the treatment of anemia with rHuEpo/transfusion

		ANG	affects the properties of tumor cells in breast cancer patients receiving chemotherapy and to investigate the signal transduction of rHuEpo in cancer cells.
	Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v		POKLAR ULRIH, Nataša (ur.), ABRAM, Veronika (ur.), CIGIČ, Blaž (ur.). 7. srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, 26.-29. september 2007 = 7th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Maribor, September 26th to 29th, 2007. Zbornik povzetkov. Ljubljana: Slovensko biokemijsko društvo: = Slovenian Biochemical Society, 2007, str. 186a.
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		3802138
2.	Naslov	SLO	Molekularni mehanizem delovanja rekombinantnega humanega eritropoetina na rakaste celice.
		ANG	Molecular mechanism of recombinant human erythropoietin action on cancer cells.
	Opis	SLO	Preučevali smo prenos signala Epo po signalnih poteh ter skušali pojasniti delovanje rHuEpo na rakaste celice na molekularni ravni.
		ANG	We studied transfer of the Epo signal in signaling pathways and attempted to elucidate the action of rHuEpo on cancerous cells on the molecular level.
	Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v		4th Inter-American Breast Cancer Conference (IABCC), 24-26 July, 2008, Cancun : What to Do With Your Patient at the Bedside: The Road to Survivorship: Living Longer and Better. Cancun: UMSylvester Comprehensive Cancer Center, 2008, str. 103.
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		24544473
3.	Naslov	SLO	Rekombinantni humani eritropoetin spremeni signalno transdukucijo in ekspresijo genov pri bolnicah z rakom dojke.
		ANG	Recombinant human erythropoietin induced changes in signal transduction and gene expression in breast cancer patients.
	Opis	SLO	Vpliv rHuEPO/transfuzije na globalno izražanje genov v rakavih celicah smo preučevali z uporabo humanih oligonukleotidnih mikromrež in PCR v realnem času.
		ANG	The effect of rHuEPO/transfusion on global gene expression in cancer cells was studied by the use of human whole-genome oligonucleotide micro arrays and real-time PCR.
	Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v		FEBS-EMBO advanced lecture course Molecular mechanisms in signal transduction and cancer, August 15-24, 2007 Spetses.
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		23370713
4.	Naslov	SLO	Biokemija za študente veterine.
		ANG	Biochemistry for veterinary students.
	Opis	SLO	V učbeniku želimo kemijske in fizikalne osnove biokemijskih metod, ki se v veterinarski medicini uporabljajo v analitske, diagnostične in raziskovalne namene, približati študentom veterine, pa tudi vsem "ne-kemikom", ki se z njimi srečujejo pri vsakodnevem delu v laboratoriju ali na terenu.
		ANG	The textbook describes chemical and physical basis of biochemical methods used in veterinary medicine in analytical, diagnostic and research purposes and is designed for veterinary students as well as for all "non-chemists" who encounter biochemistry in their everyday laboratory practice or in fieldwork.
	Šifra		D.10 Pedagoško delo
	Objavljeno v		Zbirka Scripta. Ljubljana: Študentska založba, 2009
	Tipologija		2.03 Univerzitetni ali visokošolski učbenik z recenzijo
	COBISS.SI-ID		243842048
5.	Naslov	SLO	

	ANG	
Opis	SLO	
	ANG	
Šifra		
Objavljeno v		
Tipologija		
COBISS.SI-ID		

8. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁷

8.1. Pomen za razvoj znanosti⁸

SLO

Raziskave v tem podoktorskem projektu so odprle novo področje raziskav, ki na molekularnem nivoju preučujejo delovanje rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) pri bolnicah z metastatskim rakom dojke. Vse dosedanje klinične študije so analizirale le stopnjo preživetja oziroma napredovanje bolezni ter zgolj posamezne molekularne označevalce, kot sta na primer eritropoetin in njegov receptor. Študije, ki so podrobneje preučevale molekularne mehanizme, pa so bile opravljene na celičnih linijah ali modelnih živalih, ki ne podajo ravno najboljše slike dogajanja pri bolnikih z rakom.

Glede na obsežnost študije se raziskave nadaljujejo v okviru temeljnega projekta doc. dr. N. Debeljak (J3-0124) in z delom dveh mladih raziskovalcev (K. Španinger in N. Trošt). Raziskovalni projekt je zasnovan tako, da bo celovito in podrobno odgovoril na pomembna molekularna vprašanja glede mehanizmov delovanja rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) na prenos signala Epo in uravnavanje genov v rakastem tkivu ter vplivu na nivo endogenega Epo.

ANG

This postdoctoral project has introduced a new field of research addressing the mechanism of action of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) on the molecular basis in the metastatic breast cancer patients. All the clinical studies up to date analyzed only the survival rate / disease progression and specific molecular markers like erythropoietin and its receptor. Studies that addressed the molecular mechanisms have been performed on cell lines or on animal models, giving results that can only predict the mechanisms in cancer patients.

Due to the extensiveness of the study our research continuous within the framework of basic research project of Asst. Prof. N. Debeljak (J3-0124) and with the work of two young researchers (K. Španinger and N. Trošt). The study is designed with the aim to provide integral and detailed answers to important molecular questions regarding the mechanisms of action of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) on the signaling transduction, gene regulation in cancerous tissue and effect on endogenous Epo levels.

8.2. Pomen za razvoj Slovenije⁹

SLO

Raziskava poteka v sodelovanju z zdravniki Onkološkega inštituta Ljubljana, ki bodo celovito seznanjeni z rezultati in ugotovitvami študije. Neposredno sodelovanje raziskovalcev z zdravniki namreč omogoča hiter pretok novih znanj in spoznanj iz laboratorijev v klinično prakso, kar neposredno vpliva tudi na kakovost in učinkovitost zdravljenja bolnikov.

V okviru podoktorskega projekta smo uspešno razvili postopek ločevanja tumorskih od normalnih celic v aspiracijskih biopsijah s tanko iglo na podlagi gradientnega centrifugiranja. Metoda je primerna tudi za diagnostične namene, kjer so zaradi boljšega načina zdravljenja potrebne nadaljne analize populacij tumorskih celic (na primer odzivnost na kemoterapijo in podobno) in je prisotnost normalnih celic nezaželjena.

V raziskovalne namene smo uvedli novo tehniko določanja rHuEpo v vzorcih urina in krvi s pomočjo izoelektričnega fokusiranja (IEF). Doslej se je ta metoda uporabljala predvsem za potrditev dopinga z rHuEpo pri športnikih, poleg tega pa v Sloveniji še ni bila privzeta. Čeprav je metoda zelo kompleksna, omogoča razlikovanje med večimi oblikami Epo (endogeni in rekombinantni hormon) v krvi in urinu ter bi se lahko uporabljala za rutinsko preverjanje stanja hormona pri anemičnih bolnikih z rakom in bolnikih z okvarjenim delovanjem ledvic.

ANG

The research is performed in a collaboration with physicians at the Institute of Oncology Ljubljana, who will be 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 also affects the quality and efficacy of treatment of cancer patients.

Within postdoctoral project we successfully developed a procedure for separation of tumor from normal cells in fine needle aspiration biopsies on the basis of gradient centrifugation. The method is suitable also for diagnostic purposes, where further analyses of tumor cell populations are needed for better treatment options (in eg. responsiveness to chemotherapy and similar) and the presence of normal cells is undesirable.

For research purposes we employed a new technique for determination of rHuEpo in urine and blood samples by isoelectric focusing (IEF). Thus far the method was used for confirmation of rHuEpo doping usage in sport and it was not available in Slovenia. Although the method is very complex, it enables the differentiation of various Epo forms (endogenous vs. recombinant hormone) in blood and urine and could be used for routine monitoring of hormone state in anemic cancer patients and patients with kidney malfunction.

9. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju 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

10. Samo za aplikativne projekte!**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	

G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo: 	☐	☐	☐	☐	

Komentar

11. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki¹⁰

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

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

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS

Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki

Podpisi:

Sabina Berne	in/ali	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

20.4.2009

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/219

¹ Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

² 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](#)

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

⁴ Samo v primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

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

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

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

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

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

⁶ 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](#)

⁷ 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](#)

⁸ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

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

¹⁰ 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-ZV-RPROJ-ZP/2008 v1.00