



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

<b>Šifra programa</b>	P3-0371	
<b>Naslov programa</b>	Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami II	
<b>Vodja programa</b>	12336 Primož Rožman	
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	7320	
<b>Cenovni razred</b>	C	
<b>Trajanje programa</b>	01.2009 - 12.2012	
<b>Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)</b>	311 312 7421	Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Univerzitetni klinični center Ljubljana EDUCELL podjetje za celično biologijo d.o.o. Ljubljana
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	3 3.04	MEDICINA Onkologija
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13.03	Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

#### 2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	3.02	
<b>- Veda</b>	3	Medicinske vede
<b>- Področje</b>	3.02	Klinična medicina

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

#### 3. Povzetek raziskovalnega programa<sup>2</sup>

SLO

Naš raziskovalni program je v Slovenijo uvedel napredna zdravljenja, to je zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo, ki temeljijo na matičnih celicah. Raziskave smo razdelili v dva sklopa:

##### 1. SKLOP - PREDKLINIČNE RAZISKAVE, v katerem smo izvedli naslednje projekte:

- Iz izbranih populacij matičnih (MC) celic smo pridobili celice vseh treh kličnih listov
- Osamili smo MC iz različnih virov, izdelali molekularne protokole za ugotavljanje tipičnih RNA ekspresijskih profilov in postopke za usmerjeno *ex-vivo* ekspanzijo

MC.

- Razvili smo metodo za osamitev celic s širokim razvojnim potencialom iz popkovnične krvi z imunomagnetsko deplecijo.
- Razvili smo metode osamitve, namnoževanja in diferenciacije mezenhimskega MC z imunomagnetskim in adherentnim ločevanjem.
- Dognali smo sestavo najprimernejšega okolja, ki omogoča dolgotrajno gojenje mezenhimskega MC.
- Razvili smo postopke za gensko manipulacijo MC na modelu poročevalnega vektorja z dvema poročevalcema, s katerim lahko spremljamo aktivacijo promotorja opazovanega gena v realnem času v živih celicah, kar predstavlja tudi osnovne tehnike za gensko zdravljenje.
- Razvili smo usmerjeno diferenciacijo krvotvornih MC v trombocitno celično linijo s pomočjo rastnega dejavnika TPO. S tem metodo *in vitro* vzgojimo izboljšan celični transplantat za presaditev bolnikom z levkemijo in drugimi boleznimi.
- Preučevali smo vlogo embrionalnih podobnih MC, odkritih pri odraslem človeku. Naši novejši rezultati kažejo, da je bilo veliko dosedanjih objav posledica zaznavanja alternativnih transkriptov in psevdogenov pri genih pluripotentnosti.
- Razvili smo novo metodo, ki omogoča natančno določanje izražanja gena OCT4.
- Spremljali smo klinično uspešnost zdravljenja bolnikov zdravljenih z vsaditvijo avtolognih hrustančnih celic ter ovrednotili primernost alternativnega celičnega vira (celice iz maščobnega tkiva) za omenjeno zdravljenje.
- Optimizirali smo hondrogeno diferenciacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva.
- Ovrednotili smo celice z roba lezije kot alternativni celični vir za zdravljenje poškodb hrustanca z metodo implantacije avtolognih hondrocytov.

**2. SKLOP - KLINIČNE RAZISKAVE** so opravile raziskovalne skupine na kliničnih oddelkih UKC (Ortopedska klinika, KO za kirurške okužbe, Interna klinika, KO za hematologijo in KO za gastroenterologijo). Izvedli smo naslednje raziskave:

- Klinično študijo ***Zdravljenje težko zaceljivih dolgih zlomov z uporabo rastnih faktorjev ter avtolognih MC kostnega mozga*** (sodelovanje s KO za kirurške infekcije)
- Klinično študijo ***Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z vsaditvijo avtolognih celic*** (sodelovanje z Ortopedsko klinikou)
- Pripravili smo vse postopke in registracije za izpeljavo klinične študije ***Transplantacija MC pri bolnikih z napredovalo jetrno cirozo in hepatoceličnim karcinomom***.

ANG

Our research programme brought the concept of advanced therapies to Slovenia. Advanced therapies consist of cell therapy, gene therapy and tissue engineering. Human stem cells represent the basis of all three forms of advanced therapies. Within this concept we divided the research into two parts.

#### PART 1 - PRECLINICAL RESEARCH

- Various growth factors were used to differentiate selected stem cell (SC) populations into all three germ layers
- We developed protocols for isolation of SC and progenitor cells from different cell sources, molecular protocols for determining typical RNA expression profiles and methods for directed *ex vivo* expansion.
- Immunomagnetic depletion of lineage restricted cells was used to isolate cells with broad developmental potential from umbilical cord blood
- Isolation, expansion and differentiation protocols for mesenchymal stem cells were optimized; immunomagnetic isolation of MSC was tested in comparison with classical

isolation.

- The best culture environment for prolonged expansion of mesenchymal stem cells was determined.
- Protocols for genetic manipulation of SC were developed. Vector with two reporters was used as a model. It allows us to monitor gene expression through the activation of promoter regions of gene of interest in real time in live cells, thereby representing essentials of gene therapy
- We developed a new specific method for accessing the expression of OCT4
- We have also studied the role and relevance of embryonic-like SC described in adults. Our results show that many previous reports about expression of pluripotency markers in adult stem cells were due to detection of alternative transcripts and pseudogenes of these genes.
- A protocol for differentiation of hematopoietic stem cells into platelets using TPO was developed. This differentiation improves *in vitro* developed cell transplants and makes them more successful to treat patients with leukemia and other diseases.
- Monitoring the effectiveness of clinical treatment of cartilage injuries with autologous cell implantation. We also evaluated an alternative cell source for this treatment.
- Optimization of chondrogenic differentiation of SC from adipose tissue
- Evaluation of cells from the edge of the lesion as an alternative cell source for treatment of cartilage injuries with transplantation of autologous chondrocytes

## 2. PART 2 - CLINICAL RESEARCH

- Clinical study: *Treatment of long bone fractures with the use of growth factors and autologous SC from bone marrow* (collaboration with Clinical Dept. for Surgical Infections)
- Clinical study: *Treatment of articular chondrocyte defects with transplantation of autologous chondrocytes* (collaboration with Department of Orthopaedic Surgery)
- Documents and permits for *Transplantation of SC in the patients with advanced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma* clinical study were prepared and accepted.

## 4. Poročilo o realizacijs predloženega programa dela na raziskovalnem programu<sup>3</sup>

SLO

Naš raziskovalni program je v Slovenijo uvedel napredno zdravljenje, ki ima podlagu v človekovih matičnih celicah (MC). Prvi sklop raziskav je bil namenjen razvoju **predkliničnih postopkov** za osamitev MC iz različnih tkiv, njihovi molekularni in fenotipski karakterizaciji ter usmerjeni ekspanziji in diferenciaciji *in vitro*. Izvedli sta ga programske skupini Transfuzijska medicina in Educell d.o.o. Drugi **klinični sklop** je potekal na kliničnih oddelkih UKC Ljubljana, ki so spoznanja bazičnih raziskav prevajali v klinične študije in jih uporabljali pri neposrednem zdravljenju več stotih bolnikov.

### KLOP - PREDKLINIČNE RAZISKAVE

#### Programska skupina Transfuzijska medicina

Izvedli smo vse načrtovane predklinične postopke, kot so zbiranje MC iz tkiv, ločevanje celic, osamitev subpopulacij MC, dolgotrajna kriokonzervacija ter karakterizacija. Osvojili smo tudi nova znanja na področju transkriptomike in metabolomike (sodelovanje z NIB). Poleg tega smo:

- iz izbranih populacij matičnih celic pridobili celice vseh treh kličnih listov (Eva Ogorevc, mentor P. Rožman).
- razvili postopke, ki omogočajo osamitev MC iz različnih virov (celično sortiranje na izbrane površinske označevalce) (Matija Veber, mentor M. Knežević).
- razvili osnovne metode za gensko manipulacijo matičnih celic, kar predstavlja tudi osnovne tehnike za gensko zdravljenje. Diplomant je razvil postopek izdelavo

poročevalnega vektorja z dvema poročevalcema, s katerim spremljamo aktivacijo promotorja opazovanega gena v realnem času v živih celicah (Nejc Rački, mentor M. Knežević, somentor P. Rožman, v sodelovanju z Univerzo WPI, Worcester, MA, USA).

- optimizirali metode osamitve, ekspanzije in diferenciacije mezenhimskih matičnih celic. Diplomat je primerjal dve metodi osamitve MMC iz humanega kostnega mozga. Celice smo osamili z imunomagnetskim ločevanjem ali z adherenco na plastiko ter jih gojili v dveh različnih gojiščih. Naš cilj je bil poiskati optimalno kombinacijo med načinom osamitve in vrsto uporabljenega gojišča (Gašper Klančar, mentor M. Knežević, somentor P. Rožman).
- izvedli usmerjeno diferenciacijo krvotvornih MC v trombocitno celično linijo s pomočjo rastnega dejavnika TPO. S to metodo lahko vzgojimo izboljšan celični transplantat *in vitro* za presaditev bolnikom z levkemijo in drugimi boleznimi (Kristina Marton, mentor P. Rožman, sodelovanje z Sanquin Blood Supply Foundation, Leiden, Nizozemska).
- raziskovali vlogo MC, podobnih embrionalnim, ki smo jih sami pred tem odkrili pri odraslem človeku. Naši novejši rezultati kažejo, da je bilo veliko dosedanjih objav o obstoju teh celic vprašljivih, ker niso bile posledica zaznavanja pravih označevalcev pluripotentnosti, temveč njihovih alternativnih transkriptov in psevdogenov. Zato smo razvili novo metodo, ki omogoča natančno določanje izražanja gena *OCT4*. (Mojca Jež, mentor P. Rožman, sodelovanje z Univerzo WPI, Worcester, MA, USA).

Naša skupna začetna hipoteza je bila, da se v kostnem mozgu odraslega človeka nahaja populacija matičnih celic s pluripotentnimi lastnostmi, ki so podobne embrionalnim celicam (okrajšava: ESC-A, Embryonic Like Stem Cells of the Adult). Celice ESC-A smo že zeleli izolirati, okarakterizirati in preveriti njihov razvojni potencial.

Dokaj nepričakovano so naši eksperimentalni rezultati do neke mere povečali dvom v že objavljene članke, ki to hipotezo podpirajo. Največji problem pri dokazovanju obstoja celic ESC-A v odraslih tkivih predstavlja njihovo izredno majhno število in to, da imajo vsi ključni pluripotentni označevalni geni (imenovani transkripcijski faktorji) mnogo psevdogenov, o katerih je bilo dosedaj malo znanega, a so bili »krivi« za številne dosedanje lažno pozitivne rezultate. Na podlagi omenjenega menimo, da so bile dosedanje metode premalo specifične za dokazovanje ekspresije označevalcev pluripotentnosti. Za potrditev naše hipoteze smo morali zagotoviti razvoj bolj zanesljivih molekularnih metod za karakterizacijo različnih matičnih celic in njihovih diferenciranih derivatov. S temi novo razvitimi molekularnimi metodami v somatskih celičnih tipih nismo uspeli pokazati izražanja embrionalne oblike gena *OCT4* na nivoju, ki bi bil pomemben za vzdrževanje pluripotentnosti.

### Programska skupina Educell

Programska skupina Educell d.o.o. se je ukvarjala z uporabo MC v regenerativne namene. Izpeljali smo naslednje raziskave:

V sklopu ***Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z vsaditvijo avtolognih celic*** smo:

- Spremljali klinično uspešnosti zdravljenja bolnikov s poškodbami sklepnega hrustanca, zdravljenih z vsaditvijo avtolognih celic in vzdrževali to podatkovno bazo. Na Ortopedski kliniki so ovrednotili 10-letno klinično uspešnost zdravljenja sklepnega hrustanca z avtolognimi celicami (sodelovanje Educell- Ortopedska klinika).
- Določili optimizacijo hondrogene diferenciacije MC iz maščobnega tkiva (ASC) (sodelovanje z ZTM). Gojenje celic v kulturi peletov smo poskušali nadomestiti z boljšim 3D-modelom. Proučevali smo tudi vpliv različnih okoljskih delavnikov in rastnih dejavnikov. Odziv celic smo spremljali z metodo RT-qPCR.
- Ovrednotili celic z roba lezije kot alternativnega celičnega vira za zdravljenje

poškodb hrustanca z metodo implantacije avtolognih hondrocytov (sodelovanje z Ortopedsko kliniko). Izsledki raziskave so objavljeni v J. of Bone and Joint Surgery.

- Proučevali celice iz osteoartričnega hrustančnega tkiva z namenom vrednotenja različnih načinov zdravljenja.
- V sodelovanju z Ortopedsko kliniko smo pripravili in pridobili dovoljenje Komisije za medicinsko etiko za raziskavo ***Hrustančne in kostne celice za testiranje biokompatibilnosti zdravil in umetnih implantov*** ter začeli z izvajanjem.

V sklopu **Diferenciacija MC v kost** smo v sodelovanju s kirurško klinikou UKC Ljubljana naredili pregled klinične uspešnosti zdravljenja težko celečih zlomov s celičnimi pripravki na osnovi avtolognih MC iz kostnega mozga. Delo je bilo predstavljeno na kongresu travmatologov v Dubrovniku in Simpoziju DCTIS »Raziskave in razvoj na področju sistemskih biologij in naprednih zdravljenj v Sloveniji«, 17.2.2012 ter v širšem kontekstu objavljeno kot poglavje v monografiji: Bone regeneration. Rijeka: InTech, 2012, str. 25-50.

V sklopu **Celična terapija poškodb hrustanca in drugih struktturnih tkiv v ortopedski kirurgiji** smo vzpostavili izboljšani 3D-celični model namesto kulture peletov. Preiskusili smo dva različna pristopa: gojenje celic v mikromasah ter na komercialno dostopnemu 3D-polistirenskemu nosilcu. Gojenje celic v kulturi mikromas ni bilo uspešno. Gojenje hondrocytov na polistirenskem 3D-nosilcu pa je bilo uspešno – celice so bile viabilne in so izražale hrustančni fenotip.

## KLOP - KLINIČNE RAZISKAVE

Klinične raziskave so opravile raziskovalne skupine na kliničnih oddelkih UKC Ljubljana (Ortopedska klinika, KO za kirurške okužbe, Interna klinika, KO za hematologijo in KO za gastroenterologijo).

### 2.1. Diferenciacija MC v jetrne celice in regeneracija jeter

Pripravili smo vse za izpeljavo klinične študije **Transplantacija MC pri bolnikih z napredovalo jetrno cirozo in hepatoceličnim karcinomom** (vsa potrebna dovoljenja, sodelovanje s KO za gastroenterologijo). **Namen študije je zdraviti napredovalo alkoholno jetrno cirozo.** **Hipoteza:** Infuzija avtolognih perifernih matičnih celic v lobusno hepatično arterijo izboljša več parametrov s katerimi vrednotimo jetrno cirozo. Poveča se prekrvitev jeter in poveča delež portalnega pretoka. **Zasnova raziskave, opis metod, preiskovancev:** desetim bolnikom z Child Pugh C alkoholno jetrno cirozo bomo s stimulacijo kostnega mozga in citaferezo zbrali periferne MC, ki jih bomo nato vrnili v levo ali desno lobusno hepatično arterijo. Z več laboratorijskimi in kliničnimi kriteriji bomo spremljali funkcijo jeter. **Pričakovani rezultati:** pričakujemo izboljšanje jetrne funkcije pri pacientih in spremembo krvnega pretoka v tarčnem lobusu jeter glede na stanje pred posegom in glede na kontralateralni lobus jeter. Opisane transplantacije bodo prve te vrste v Sloveniji in bi v prihodnosti lahko predstavljale nov način zdravljenja napredovale ciroze jeter.

### 2.2. Diferenciacija MC v kost

Klinična študija **Zdravljenje težko zacetljivih dolgih zlomov z uporabo rastnih faktorjev ter avtolognih MC kostnega mozga** (sodelovanje s KO za kirurške infekcije) je bila v 1. 2011 uspešno zaključena (Borut Gubina, mentor D. Smrke).

Dodatek trombocitnega gela, ki vsebuje veliko število rastnih faktorjev, dodan avtologni spongiosni kosti z MC– nastane kombinirani presadek, ki pomeni možnost hitrejšega celjenja spongiosne kosti. V raziskavi je bilo vključenih 10 pacientov s popoškodbenimi kostnimi defekti na dolgih cevastih kosteh, v velikosti volumna defekta od 15 do 45 ml. Raziskava je pokazala, da alogenski trombocitni gel dodan spongiosni kosti pospeši

vraščanje presadka v matično kost. Standardni trombocitni koncentrat iz krvne banke ne predstavlja pomembnega rizika za paciente. Rezultati kažejo, da je metoda primerna za uporabo zdravljenja kostnega defekta dolgih cevastih kost.

### **2.3. Celična terapija poškodb hrustanca in drugih strukturnih tkiv v ortopedski kirurgiji**

Klinična študija: ***Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z vsaditvijo avtolognih celic*** (Sodelovanje z Ortopedsko klinikom). Ena od novosti na tem področju je uvajanje novega biomateriala kot nosilca za implantirane celice. Nadalje smo:

- 1) nadaljevali izvajanje operativni posegov z avtolognimi gojenimi hondrocyti
- 2) izvedli analizo dolgoročnega uspeha zdravljenja z avtolognimi hondrocyti; abstrakt je bil predstavljen na ESSKA konferenci 2012, članek je v pripravi: Drobnič, Martincic, Radosavljević et al. Autologous chondrocyte implantation on the femoral condyles - Long term clinical and radiographic results.
- 3) v okviru sodelovanja pri ESSKA Cartilage Committe (=European society of sports traumatology, knee surgery, and arthroscopy) smo izdelali smernice za zdravljenje zgodnjne artroze kolena.

### **2.4. Celična imunoterapija čvrstih tumorjev**

Klinična študija: ***Modulacija imunskega odziva pri pacientih s pankreatičnim tubularnim adenokarcinomom*** (sodelovanje s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo UKC).

Za klinično študijo smo pripravili protokol in pridobili dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko. Zaradi razvoja zdravljenja raka trebušne slinavke je prišlo do spremembe zdravljenja, kar je vplivalo tudi na naš protokol ter povzročilo precejšen časovni zamik pri študiji. Zaradi sprememb smo morali ponovno pridobiti etično dovoljenje, registracijo pri agenciji JAZMP registracijo na [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), pripraviti nove SOP-je, ponoviti usposabljanje zaposlenih ipd. Dodatno je še slabo preživetje bolnikov vključenih v študijo zelo zmanjšalo število ustreznih bolnikov in povzročilo še dodaten časovni zamik študije. Zaradi navedenih razlogov in zaradi tehničnih težav z GMP/GLP laboratoriji je bila v letu 2010 ta klinična študija na projektu Systher opuščena.

Zaradi omenjenih razlogov se je delovna skupina WP3 namesto na zdravljenje raka pankreasa osredotočila na klinično študijo pri pacientih z gliomom. Nova klinična študija lepo dopoljuje že zaključeno študijo na zdravih prostovoljcih. Pri študiji GLIOMA smo se osredotočili na analizo transkriptoma v dveh populacijah imunskih celic: celicah CD4+ T in celicah CD56+ NK po kirurški odstranitvi tumorja. Vzporedno s transkriptomsko analizo je bila narejena tudi analiza imunološkega profila. Podatke smo primerjali s podatki pridobljenimi pri zdravih prostovoljcih. Primerjalna krosomična analiza je v teku in pričakujemo, da bomo identificirali nove diagnostične in prognostične markerje bolezni. Vanjo smo vključili tudi analizo primerjave izražanja miRNA pri zdravih posameznikih in bolnikih z glioblastomom. Pričakujemo, da bodo rezultati izboljšali razumevanje patologije glioma kot tudi mehanizmov trenutne terapije.

## **5.Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>4</sup>**

SLO

V letih 2009-2012 smo v **sklopu 1** (predklinične študije) izvedli vse zamišljene predklinične postopke, kot so zbiranje MC iz popkovnične in periferne krvi ter KM, ločevanje celic (imunomagnetki in celični ločevalec), osamitev subpopulacij MC, dolgotrajna krioprezervacija, tkivne kulture, ocena morfologije, fenotipska, molekularna karakterizacija, ELISA in farmakološko-toksikološki testi. Razvili smo različne oblike diferenciacij MC v krvne in druge celične linije *in vitro*, ter osvojili nova znanja na

področju transkriptomike matičnih celic ter tudi osnove sistemske biologije in različnih – omik kot novega sredstva za študij biologije matičnih celic ter osnove njihove genske manipulacije.

Poleg tega smo uspeli izvesti tudi in vivo diferenciacijo v krvne celične linije (trombocitna linija). Ocenujemo, da je predklinični del potekal v skladu z načrtom.

Hkrati smo iz **sklopa 2** (klinične raziskave) – končali priprave na naloge 2.1. *Transplantacija MC pri bolnikih z napredovalo jetrno cirozo in hepatoceličnim karcinomom*, za katero smo izdelali klinični protokol, ter študiji 2.2. *Zdravljenje težko zaceljivih dolgih zlomov z uporabo rastnih faktorjev ter avtolognih MC* in 2.3. *Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z vsaditvijo avtolognih celic*.

Ocenujemo, da smo program v celoti realizirali in da smo dosegli vse željene cilje, saj je bilo našega zdravljenja deležno kar nekaj sto bolnikov in so uspehi pozitivni.

Zelo pomembno je omeniti, da je naš raziskovalni program poleg znanstvene poti utiral tudi strokovno, infrastrukturno, edukacijsko in kadrovsko pot novim tehnologijam in študijskim programom. Tako smo:

- na Univerzi v Ljubljani vpeljali nove predmete v 4 dodiplomske programe (Fakulteta za farmacijo 1x, Biotehniška fakulteta 3x), v magistrski študij (Fakulteta za Farmacijo 1x) in v doktorski študijski program (doktorski študij Biomedicina 1x). Letno je v teh programih skupno vpisanih okrog 250 študentov.
- v slovenski in mednarodni literaturi smo v letih 2009-2012 objavili okrog 300 bibliografskih enot (od tega okrog 40 v revijah z SCI). Priredili smo tudi 10 konferenc in mednarodnih simpozijev ter imeli številne televizijske oddaje, intervjuje, vabljena predavanja in razstave.
- Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino smo ustanovili nov laboratorij za celično inženirstvo, ki je pri JAZMP akreditiran kot visoko tehnološki center za proizvodnjo terapevtskih celičnih produktov. Tak laboratorij nam omogoča nadaljnjo ekspanzijo predkliničnih in še posebno kliničnih aplikacij naprednega zdravljenja s celicami in s tem tudi nadaljni razvoj te panoge v Sloveniji.

#### **6.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine<sup>5</sup>**

Med potekom programa je prišlo do nekaterih sprememb, ki so bile posledica objektivnih dogodkov oz. okoliščin. V letu 2010 je prišlo do spremembe programa v točki klinične raziskave - 2.4. Celična imunoterapija čvrstih tumorjev - Klinična študija: Modulacija imunskega odziva pri pacientih s pankreatičnim tubularnim adenokarcinomom (sodelovanje s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo UKC). Omenjeno študijo smo morali od samega začetka dalje neprestano spremenjati zaradi spreminjačih se predpisov. Po pridobitvi vseh potrebnih dovoljenj za klinično študijo s strani javne agencije JAZMP, etične komisije in mednarodnega registra kliničnih študij (clinicaltrials.gov) in začetku zdravljenja 4 bolnikov po sprejetem protokolu, je mednarodno združenje nenadoma določilo spremembo protokola zdravljenja in uvedlo obvezen tretma takih bolnikov po operaciji raka trebušne slinavke z novim zdravilom Gemcitabin. Potrebno je bilo popolnoma spremeniti protokol naše klinične študije in spremembe vseh administrativnih listin, postopkov in pridobitev novih dovoljenj so nam vzele od 6-9 mesecev. Kot drugo je med tem časom večina naših izbranih bolnikov umrla, ali pa niso več zadostili vstopnim kriterijem študije, ki se je zaradi tega morala začeti od začetka. Poleg tega se nova terapija z Gemcitabinom ni izkazala za dovolj učinkovito. Kot tretje je v letu 2010 zaradi nepredvidenih vodstvenih sprememb na ZTM prišlo do razpada delovanja čistih celičnih laboratoriјev, ki bi lahko zdravilo izdelovali v GMP okolju. Na podlagi vseh teh okoliščin smo klinično študijo na bolnikih zaustavili in namesto nje načrtali alternativno študijo na podlagi obstoječih resursov, to je sistemsko biološko analizo sestavin serum in krvnih celic bolnikov z gliomom v primerjavi z zdravimi ljudmi. Komparativna analiza na nivoju transkriptomike, metabolomike in proteomike je

po pričakovanju odkrila določene potencialne biomarkerje za diagnozo in prognozo rakih bolezni. Osredotočili smo se tudi na analizo miRNA, kar doslej pri teh bolnikih še ni bilo opravljeno. Ime tega dela raziskovalnega programa je »Clinical trial Gene Expression Monitoring of Mononuclear Cells (MNC) Subpopulations and Immunological Status and Metabolome Defining of Glioma Patients" in je potekal v sodelovanju z Nacionalnim Inštitutom za biologijo in tremi nemškimi inštitucijami ter Univerzami. Poleg omenjenega je prišlo tudi do kadrovskih sprememb. Tako so ZTM zapustili trije člani RS Transfuzijska medicina, to so bili doc. Matjaž Jeras, doc. Miomir Knežević, dr. Darja Marolt in dr. Dragoslav Domanović, v skupino pa so vstopili naslednji novi člani: dr. Tina Cirman, mag. Dovč-Drnovšek Tadeja, mag. Marko Cukjati, dr. Polona Klemenc, in MR Mojca Jež (sedaj doktor znanosti). Raziskovalno skupino Educell pa je zapustila dr. Hana Krečič Stres, priključil pa se ji je doc. Miomir Knežević.

## 7. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine<sup>6</sup>

	Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	30233561	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Pasti fotokonverzije v imunokemičnem prikazovanju celičnih struktur
		ANG	The hazards of DAPI photoconversion
Opis	SLO		Imunocitokemija je močno orodje za zaznavanje določenih molekul v živih ali fiksiranih celicah. Omogoča določanje njihove lokacije ter relativne količine. Eno najpogosteje uporabljenih fluorescenčnih DNA barvil je 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, poznan po kratici DAPI. DAPI se močno veže na DNA in se široko uporablja za opazovanje celičnih jeder. Barvilo DAPI ekscitiramo z UV svetlobo, sprošča pa značilno modro fluorescenco. V pričujočem članku poročamo o pojavi, ki temelji na fotokonverziji barvila DAPI. Posledično lahko fluorescenco barvila DAPI zaznamo s standardnimi filteri, ki se drugače uporabljajo za zaznavanje zelene fluorescence ob eksitaciji v modrem. Vzorec smo obarvali le z barvilm DAPI in ga najprej opazovali z filtrom za zeleno fluorescenco (FITC/GFP). Opazili smo le šibko avtofluorescenco v citoplazmi celic. Nato smo uporabili set filterov za DAPI in po pričakovanjih zaznali močan jedrni signal. Na koncu smo ponovno uporabili set filterov FITC/GFP ter opazili močno zeleno fluorescenco v jedrih. Zaključili smo, da eksitacija z UV svetlobo povzroči fotokonverzijo barvila DAPI, katerega fluorescenco nato zaznamo v GFP/FITC kanalu. Ta pojav lahko vpliva na interpretacijo barvanja ter vodi do lažno pozitivnih rezultatov, kadar barvilo DAPI uporabljamo skupaj z drugim zelenim barvilm. Pojavu se lahko izognemo tako, da uporabljamo čim nižjo koncentracijo barvila DAPI pri barvanju, ne uporabljamo glicerola v mediju za pokrivanje preparatov ter zajamemo sliko pod UV svetlobo kot zadnjo. Testirali smo različna DNA barvila med katerimi je Hoechst33342 kazal najnižjo fotokonverzijo. Testirali smo tudi različne metode za fiksacijo celic in ugotovili, da nimajo pomembnega vpliva na fotokonverzijo.
			Immunocytochemistry is a powerful tool for detection and visualization of specific molecules in living or fixed cells, their localization and their relative abundance. One of the most commonly used fluorescent DNA dyes in immunocytochemistry applications is 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, known as DAPI. DAPI binds strongly to DNA and is used extensively for visualizing cell nuclei. It is excited by UV light and emits characteristic blue fluorescence. Here, we report a phenomenon based on an apparent photoconversion of DAPI that results in detection of a DAPI signal using a standard filter set for detection of green emission due to blue excitation. When a sample stained with DAPI only was first imaged with the green filter set (FITC/GFP), only a weak cytoplasmic autofluorescence was observed. Next, we imaged the sample with a DAPI filter set, obtaining a

			strong nuclear DAPI signal as expected. Upon reimaging the same samples with a FITC/GFP filter set, robust nuclear fluorescence was observed. We conclude that excitation with UV results in a photoconversion of DAPI that leads to detection of DAPI due to excitation and emission in the FITC/GFP channel. This phenomenon can affect data interpretation and lead to false-positive results when used together with fluorochrome-labeled nuclear proteins detected with blue excitation and green emission. In order to avoid misinterpretations, extra precaution should be taken to prepare staining solutions with low DAPI concentration and DAPI (UV excitation) images should be acquired after all other higher wavelength images. Of various DNA dyes tested, Hoechst 33342 exhibited the lowest photoconversion while that for DAPI and Hoechst 33258 was much stronger. Different fixation methods did not substantially affect the strength of photoconversion. (Abs. trunc. at 2000 ch.)	
	Objavljeno v		Springer; Histochemistry and cell biology; 2013; Vol. 139, iss. 1; str. 195-204; Impact Factor: 2.588; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.635; A': 1; A': 1; Avtorji / Authors: Jež Mojca, Bas Tuba, Veber Matija, Košir Andrej, Dominko Tanja, Page Raymond L., Rožman Primož	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	3192689	Vir: COBISS.SI	
	Naslov	SLO	Uporaba krosomike za analizo variabilnosti različnih komponent periferne krvi zdravih belcev	
		ANG	A "crossomics" study analysing variability of different components in peripheral blood of health caucasoid individuals	
	Opis	SLO	Sistemska biologija omogoča nove načine diagnostike in zdravljenja. Mešana raziskovalna skupina iz Slovenije in Nemčije uvaja nove metode sistemsko biologije, ki temeljijo na uporabi rezultatov proteomike, transkriptomike in metabolomike z uporabo mokročipov, množične MS in ustrezne statistične obdelave množičnih podatkov. Njen namen je med drugim določiti nove markerje rakavih bolezni in pomoč pri celični terapiji raka.	
		ANG	Background: Different immunotherapy approaches for the treatment of cancer and autoimmune diseases are being developed and tested in clinical studies worldwide. Their resulting complex experimental data should be properly evaluated, therefore reliable normal healthy control baseline values are indispensable. Methodology/Principal Findings: To assess intra- and inter-individual variability of various biomarkers, peripheral blood of 16 age and gender equilibrated healthy volunteers was sampled on 3 different days within a period of one month. Complex 'crossomics' analyses of plasma metabolite profiles, antibody concentrations and lymphocyte subset counts as well as whole genome expression profiling in CD4+T and NK cells were performed. Some of the observed age, gender and BMI dependences are in agreement with the existing knowledge, like negative correlation between sex hormone levels and age or BMI related increase in lipids and soluble sugars. Thus we can assume that the distribution of all 39.743 analysed markers is well representing the normal Caucasoid population. All lymphocyte subsets, 20% of metabolites and less than 10% of genes, were identified as highly variable in our dataset. Conclusions/Significance: Our study shows that the intra-individual variability was at least two-fold lower compared to the inter-individual one at all investigated levels, showing the importance of personalised medicine approach from yet another perspective.	
			Public Library of Science; PloS one; 2012; Vol. 7, no. 1; str. e28761; Impact Factor: 4.092; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.096; A': 1; Avtorji / Authors: Gruden Kristina, Hren Matjaž,	

	Objavljeno v	Herman Ana, Blejec Andrej, Albrecht Tanja, Selbig Joachim, Bauer Chris, Schuchardt Jochannes, Or-Guil Michal, Zupančič Klemen, Švajger Urban, Štabuc Borut, Ihan Alojz, Kopitar Andreja Nataša, Ravnikar Maja, Knežević Miomir, Rožman Primož, Jeras Matjaž	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	25944537	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Presadki kosti iz človeških adipoznih matičnih celic gojeni v perfuzijskem bioreaktorju
		ANG	Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture
	Opis	SLO	Iz maščobe, odvzete 4 odraslim dajalcem, smo osamili matične celice. Gojili smo jih na decelulariziranih kostnih nosilcih v perfuzijskem bioreaktorju. Ob dodatku ustreznih osteogenih dodatkov smo po 5 tednih dosegli ustrezeno kompaktno in živo kost.
		ANG	Human adipose-derived stem cells (hASCs) isolated from four donors were grown on decellularized bone scaffolds in perfusion bioreactor. With a combination of hASCs, decellularized bone scaffold, perfusion culture, and osteogenic supplements, 5 week cultivation resulted in the formation of compact and viable bone tissue constructs.
	Objavljeno v	Mary Ann Liebert, Inc.; Tissue engineering; 2010; Letn. 16, št. 1; str. 179-189; Avtorji / Authors: Fröhlich Mirjam, Grayson WL, Marolt Darja, Gimble JM, Kregar-Velikonja Nevenka, Vunjak-Novakovic Gordana	
4.	COBISS ID	26093785	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Oblikovanje anatomske oblikovanih presadkov človeške kosti
		ANG	Engineering anatomically shaped human bone grafts
	Opis	SLO	Za rekonstrukcijo kostnih defektov so potrebni anatomsko oblikovani koščki kosti. Iz MMC smo v biomimetičnem bioreaktorju na ustreznih nosilcih v 5 tednih uspeli ustvariti kostne konstrukte, katerih arhitektura in sestava odgovarja kosti. Ta postopek se bo lahko uporabil v kraniofacialni kirurgiji in ortopediji.
		ANG	The ability to engineer anatomically correct pieces of viable and functional human bone would have tremendous potential for bone reconstructions after congenital defects, cancer resections, and trauma. We report that clinically sized, anatomically shaped, viable human bone grafts can be engineered by using human mesenchymal stem cells (hMSCs) and a ČbiomimeticČ scaffold-bioreactor system. We selected the temporomandibular joint (TMJ) condylar bone as our tissue model, because of its clinical importance and the challenges associated with its complex shape. Anatomically shaped scaffolds were generated from fully decellularized trabecular bone by using digitized clinical images, seeded with hMSCs, and cultured with interstitial flow of culture medium. A bioreactor with a chamber in the exact shape of a human TMJ was designed for controllable perfusion throughout the engineered construct. By 5 weeks of cultivation, tissue growth was evidenced by the formation of confluent layers of lamellar bone (by scanning electron microscopy), markedly increased volume of mineralized matrix (by quantitative microcomputer tomography), and the formation of osteoids (histologically). Within bone grafts of this size and complexity cells were fully viable at a physiologic density, likely an important factor of graft function. Moreover, the density and architecture of bone matrix correlated with the intensity and pattern of the interstitial flow, as determined in experimental and modeling studies. This approach has potential to overcome a critical hurdle-in vitro cultivation of viable bone grafts of complex geometries-to provide patient-

		specific bone grafts for craniofacial and orthopedic reconstructions.			
	Objavljeno v	National Academy of Sciences; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2010; Vol. 107, issue 8; str. 3299-3304; Impact Factor: 9.771; A": 1; A': 1; Avtorji / Authors: Grayson Warren L, Fröhlich Mirjam, Yeager Keith, Vunjak-Novakovic Gordana			
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek			
5.	COBISS ID	29696217 Vir: COBISS.SI			
	Naslov	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><i>SLO</i></td><td>Avtologne celične terapije za regeneracijo kostnega tkiva</td></tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>ANG</i></td><td>Autologous cell therapies for bone tissue regeneration</td></tr> </table>	<i>SLO</i>	Avtologne celične terapije za regeneracijo kostnega tkiva	<i>ANG</i>
<i>SLO</i>	Avtologne celične terapije za regeneracijo kostnega tkiva				
<i>ANG</i>	Autologous cell therapies for bone tissue regeneration				
Opis	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><i>SLO</i></td><td>Delo povzema raziskave in različne pristope k regenerativnemu zdravljenju kostnega tkiva. Poudarek je na zdravljenju kostnega tkiva z avtolognimi celičnimi pripravki. V delu so povzete tudi raziskave avtorjev na področju osteogene diferenciacije razčličnih virov matičnih celic ter primeri klinične prakse.</td></tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>ANG</i></td><td>The chapter is reviewing research and development in regenerative treatment of bone tissue. Focus is on use of autologous cells for treatment. The work summarises research of the authors in the field of osteogenic differentiation of different stem cell sources and cases of clinical practice.</td></tr> </table>	<i>SLO</i>	Delo povzema raziskave in različne pristope k regenerativnemu zdravljenju kostnega tkiva. Poudarek je na zdravljenju kostnega tkiva z avtolognimi celičnimi pripravki. V delu so povzete tudi raziskave avtorjev na področju osteogene diferenciacije razčličnih virov matičnih celic ter primeri klinične prakse.	<i>ANG</i>	The chapter is reviewing research and development in regenerative treatment of bone tissue. Focus is on use of autologous cells for treatment. The work summarises research of the authors in the field of osteogenic differentiation of different stem cell sources and cases of clinical practice.
<i>SLO</i>	Delo povzema raziskave in različne pristope k regenerativnemu zdravljenju kostnega tkiva. Poudarek je na zdravljenju kostnega tkiva z avtolognimi celičnimi pripravki. V delu so povzete tudi raziskave avtorjev na področju osteogene diferenciacije razčličnih virov matičnih celic ter primeri klinične prakse.				
<i>ANG</i>	The chapter is reviewing research and development in regenerative treatment of bone tissue. Focus is on use of autologous cells for treatment. The work summarises research of the authors in the field of osteogenic differentiation of different stem cell sources and cases of clinical practice.				
Objavljeno v	InTech; Bone regeneration; 2012; Str. 25-50; Avtorji / Authors: Kregar-Velikonja Nevenka, Krečič Stres Hana, Maličev Elvira, Gantar Danica, Krkovič Matija, Senekovič Vladimir, Rode Matjaž, Knežević Miomir, Vunjak-Novakovic Gordana, Fröhlich Mirjam				
Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji				

## 8.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine<sup>2</sup>

	Družbeno-ekonomski dosežek				
1.	COBISS ID	3697215	Vir: COBISS.SI		
	Naslov	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><i>SLO</i></td><td>Učinek trombocitnega gela na zgodnjo revaskularizacijo presadka po rekonstrukciji križnega ligamenta. Prospektivna, randomizirana, dvojno slepa klinična študija.</td></tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>ANG</i></td><td>Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: A prospective, randomized, double-blind, clinical trial</td></tr> </table>	<i>SLO</i>	Učinek trombocitnega gela na zgodnjo revaskularizacijo presadka po rekonstrukciji križnega ligamenta. Prospektivna, randomizirana, dvojno slepa klinična študija.	<i>ANG</i>
<i>SLO</i>	Učinek trombocitnega gela na zgodnjo revaskularizacijo presadka po rekonstrukciji križnega ligamenta. Prospektivna, randomizirana, dvojno slepa klinična študija.				
<i>ANG</i>	Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: A prospective, randomized, double-blind, clinical trial				
Opis	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><i>SLO</i></td><td>Uporaba rastnih faktorjev iz trombocitov za operativno zdravljenje pri operaciji križnega ligamenta. Operirali smo 40 bolnikov s poškodovanim križnim ligamentom. Polovici smo aplicirali trombocitne rastne faktorje, polovici pa ne. Raziskava kaže, da gre za pomembno izboljšanje v tretirani skupini, kar smo dokazali z novo mikro NMR radiološko metodo.</td></tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>ANG</i></td><td>Background: Slow graft healing in bone tunnels and a slow graft ligamentization process after anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction are some of the reasons for prolonged rehabilitation. Aims: The purpose of this study was to determine if the use of platelet gel (PG) accelerates early graft revascularization after ACL reconstruction. Methods: PG was produced from autologous platelet-rich plasma and applied locally. We quantitatively evaluated the revascularization process in the osteoligamentous interface zone in the bone tunnels and in the intra-articular part of the graft by means of contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). Results: After 4-6 weeks, the PG-treated group demonstrated a significantly higher level of vascularization in the osteoligamentous interface (<math>0.33 \pm 0.09</math>) than the control group (<math>0.16</math>)</td></tr> </table>	<i>SLO</i>	Uporaba rastnih faktorjev iz trombocitov za operativno zdravljenje pri operaciji križnega ligamenta. Operirali smo 40 bolnikov s poškodovanim križnim ligamentom. Polovici smo aplicirali trombocitne rastne faktorje, polovici pa ne. Raziskava kaže, da gre za pomembno izboljšanje v tretirani skupini, kar smo dokazali z novo mikro NMR radiološko metodo.	<i>ANG</i>	Background: Slow graft healing in bone tunnels and a slow graft ligamentization process after anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction are some of the reasons for prolonged rehabilitation. Aims: The purpose of this study was to determine if the use of platelet gel (PG) accelerates early graft revascularization after ACL reconstruction. Methods: PG was produced from autologous platelet-rich plasma and applied locally. We quantitatively evaluated the revascularization process in the osteoligamentous interface zone in the bone tunnels and in the intra-articular part of the graft by means of contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). Results: After 4-6 weeks, the PG-treated group demonstrated a significantly higher level of vascularization in the osteoligamentous interface ( $0.33 \pm 0.09$ ) than the control group ( $0.16$ )
<i>SLO</i>	Uporaba rastnih faktorjev iz trombocitov za operativno zdravljenje pri operaciji križnega ligamenta. Operirali smo 40 bolnikov s poškodovanim križnim ligamentom. Polovici smo aplicirali trombocitne rastne faktorje, polovici pa ne. Raziskava kaže, da gre za pomembno izboljšanje v tretirani skupini, kar smo dokazali z novo mikro NMR radiološko metodo.				
<i>ANG</i>	Background: Slow graft healing in bone tunnels and a slow graft ligamentization process after anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction are some of the reasons for prolonged rehabilitation. Aims: The purpose of this study was to determine if the use of platelet gel (PG) accelerates early graft revascularization after ACL reconstruction. Methods: PG was produced from autologous platelet-rich plasma and applied locally. We quantitatively evaluated the revascularization process in the osteoligamentous interface zone in the bone tunnels and in the intra-articular part of the graft by means of contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). Results: After 4-6 weeks, the PG-treated group demonstrated a significantly higher level of vascularization in the osteoligamentous interface ( $0.33 \pm 0.09$ ) than the control group ( $0.16$ )				

		+/- 0.09, p < 0.001). In the intra-articular part of the graft, we found no evidence of revascularization in either group. Conclusion: Locally applied PG enhanced early revascularization of the graft in the osteoligamentous interface zone after ACL reconstruction.
	Šifra	F.22 Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov
	Objavljeno v	Karger S.AG; European Surgical Research; 2010; Vol. 45, no. 2; str. 77-85; Impact Factor: 1.214; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.601; Avtorji / Authors: Vogrin Matjaž, Rupreht Mitja, Dinevski Dejan, Hašpl Miroslav, Kuhta Matevž, Jevšek Marko, Knežević Miomir, Rožman Primož
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	246507264 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p>SLO Uporaba odraslih matičnih celic za pripravo tkivnoinženirskeh kostnih nadomestkov</p> <p>ANG The use of adult stem cells for the preparation of tissue engineered bone substitutes.</p>
	Opis	<p>SLO Uporaba odraslih matičnih celic za pripravo tkivnoinženirskeh kostnih nadomestkov. Doktorsko delo, ki predstavlja metode in razvoj ter uporabo odraslih matičnih celic za pripravo tkivnoinženirskeh kostnih nadomestkov. Napravljeno v sodelovanju s Columbia University, New York, ZDA.</p> <p>ANG The use of adult stem cells for the preparation of tissue engineered bone substitutes. PhD thesis, which presents the methods and the differentiation followed by the use of adult stem cells for the preparation of tissue engineered bone substitutes. In collaboration with Columbia University, New York, USA.</p>
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[M. Fröhlich];[Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti; 2009; XIII, 69 f.; Avtorji / Authors: Fröhlich Mirjam
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija
3.	COBISS ID	266048512 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p>SLO Določanje označevalcev pluripotentnosti med diferenciacijo humanih matičnih celic</p> <p>ANG Characterization of pluripotency markers during differentiation of human stem cells</p>
	Opis	<p>SLO Naša študija je prva, v kateri je bil odkrit preklop med izražanjem embrionalnega OCT4A in njegovih psevdogenov kot posledica manipulacije pogojev gojenja ter spreminjanja diferenciacijskega statusa celic. Ta odkritja dajejo tudi nov pogled na funkcijo psevdogenov, saj kažejo, da je njihovo izražanje odvisno od diferenciranosti celic. Izražanje psevdogenov OCT4 smo zaznali samo v diferenciranih celicah, zato je mogoče, da se bodo izkazali za nove uporabne označevalce diferenciranosti. V prihodnosti bi radi ugotovili še ali se psevdogeni OCT4 tudi prevajajo v proteine in če se, kakšnaj en jihova funkcija. Na osnovi naših rezultatov lahko tudi drugače interpretiramo pretekle podatke o izražanju embrionalnega OCT4A v najrazličnejših somatskih, celičnih tipih kot tudi v embrionalnim podobnih matičnih celicah odraslega. V raziskavi smo preverjali tudi specifičnost objavljenih oligonukleotidnih začetnikov za metodo PCR, ter po pričakovanjih ugotovili, da jih večina, poleg embrionalne oblike, pomnožuje tudi po več psevdogenov ter izoformo B. Odkrili smo pojav imenovan fotokonverzija barvila DAPI in nekaterih drugih DNA barvil ter pokazali, kako lahko tudi ta vodi v napačno interpretacijo rezultatov, saj ga zlahkoto lahko zamenjamo zaobarvanje proteina OCT4.</p>

			Our work is the first report about the expression of OCT4A pseudogenes 1, 3 and 4 during ES cells differentiation. Our results show that during differentiation of stem cells there is a developmentally regulated balance between the expression of embryonic genes and pseudogenes. The switch between one transcription pattern to the other depends on differentiation status of the cells. Since pseudogenes were expressed only in mature somatic cells we propose that the expression of pseudogenes can be used as a novel marker of cell differentiation status. Our data also indicates that it is necessary to critically evaluate existing published conclusions on the expression of OCT4A in different cell types, because pseudogene expression can lead to false positive results of molecular analysis. We examined the specificity of published primers for PCR and our data show that most of them are not specific and in addition to embryonic form also amplify several pseudogenes and isoform B. We also discovered a phenomenon called DAPI photoconversion that can easily lead to false positive results and data misinterpretation in immunocytochemistry experiments.
	Šifra	D.09	Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[M. Jež]; 2013; XVIII, 153, [10] str.; Avtorji / Authors: Jež Mojca	
	Tipologija	2.08	Doktorska disertacija
4.	COBISS ID	764279	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Osamitev humanih matičnih celic iz popkovnične krvi in njihova priprava za celično terapijo
		ANG	Isolation of human stem cells from umbilical cord blood and their preparation for cellular therapy
	Opis	SLO	Popkovnična kri vsebuje različne tipe matičnih celic; največ je krvotvornih matičnih celic, prisotne pa so tudi pluripotentne matične celice. Le te so embrionalnim matičnim celicam podobne celice (CBE), ki imajo sposobnost diferenciacije tudi v insulin producirajoče celice in vitro. Ker matične celice iz popkovnične krvi lahko shranimo, predstavljajo potencialno neomejen vir celic namenjenih transplantacijam ter posledično način zdravljenja diabetesa tipa 1. Namen doktorske disertacije je osamiti različne tipe matičnih celic iz popkovnične krvi ter jih diferencirati v insulin producirajoče celice. Po odvzemu popkovnične krvi smo z imunomagnenimi delci osamili enojedne celice. Sledila je diferenciacija celic v smer pankreatičnih celic v štirih korakih. Izolirane celice smo najprej namnožili, nato diferencirali v serumskem gojišču z dodanimi rastnimi hormone.. Po začetni diferenciaciji v pankreatične prekurzorje, je sledilo zorenje celic. Vse stopnje diferenciacije, začenši z izhodno populacijo smo okarakterizirali s pretočnim citometrom ali imunocitokemično. Vzgojili smo celične linije, ki so imele pozitivni rezultat detekcije pankreatičnih označevalcev, kar kaže, da je možno s stimulacijo rastnih faktorjev in citokinov vzgojiti celice, ki kažejo fenotip pankreatičnega tkiva. Z metodo izolacije, diferenciacije in zorenja smo dokazali, da imajo celice popkovnične krvi sposobnost tvorjenja odraslih pankreatičnih celic, ki izločajo hormone, potrebne za sladkorno ravnotesje v krvi. Celice so izražale tudi c-peptid, ki je produkt proteolitične cepitve proinsulina. Pred uporabo v regenerativni medicini, bilo potrebno preveriti še njihovo funkcionalno sposobnost s poskusi in vivo
			One of the ethically accepted, most abundant and largest reservoirs of adult stem cells is umbilical cord blood. Cord blood contains different stem cell types, mostly hematopoietic stem cells, but other stem cells with pluripotent potential can also be found. Those are umbilical cord blood embryonic like stem cells (CBE), which have the ability to differentiate into insulin producing cells in vitro. As they can be stored in biobanks, they can provide a potentially unlimited source of cells for transplantation and consequently effective approach to treat if not cure type 1 diabetes. The purpose of this thesis is to isolate stem cells from cord blood units and

			differentiate them into insulin producing cells. After collection and centrifugation of the cord blood, mononuclear cells were purified immunomagnetically with antibodies against lineage committed cells (negative selection). Differentiation towards pancreatic lineage was induced by 4 steps protocol. Isolated cells were expanded in expansion medium followed by differentiation in serum medium containing growth factors that initiate growth towards pancreatic lineage. After initial differentiation, cells were removed into maturation medium. Initial cell population and final step of maturation was analyzed by flow cytometry or by immunocytochemistry. Positive staining for pancreatic markers showed that cells in culture under the direction of certain growth factors and cytokines are capable of differentiation to insulin/c-peptide/glucagon containing pancreatic phenotype. By our method of isolation differentiation and maturation we proved that stem cells from cord blood have potential to develop into mature pancreatic cells, which are capable of secretion of hormones that regulate sugar homeostasis in the humans. The detection of c-peptide in cells with immunocytochemistry is the result of proteolytic processing and de novo synthesis of hormone. Functional assays of these cells still have to be confirmed.
	Šifra	D.09	Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[M. Strbad]; 2012; XVII, 116 f., [10] f. pril.; Avtorji / Authors: Strbad Marko	
	Tipologija	2.08	Doktorska disertacija
5.	COBISS ID	255815680	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Matične celice in napredno zdravljenje
		ANG	Stem Cells and Advanced therapies
	Opis	SLO	Prvi univerzitetni učbenik s področja matičnih celic, ki poenoti terminologijo s tega področja. Recenzenti so bili strokovnjaki s področja biologije, veterine, medicine, histologije, embriologije in fiziologije. 289 str.
		ANG	The first Slovenian textbook for graduate study in the field of stem cells, which unifies the terminology in this field. Reviewers were experts in the field of biology, veterinary medicine, physiology, embryology and physiology. 289 p.
	Šifra	D.10	Pedagoško delo
	Objavljeno v	Društvo Mohorjeva družba; Celjska Mohorjeva družba; 2011; 289 str.;	Avtorji / Authors: Rožman Primož, Jež Mojca
	Tipologija	2.03	Univerzitetni ali visokošolski učbenik z recenzijo

## 9.Druži pomembni rezultati programske skupine<sup>8</sup>

V okviru programa so nastali naslednji fakultetni študijski programi:

1. Univerza v Ljubljani, Univerzitetni znanstveni podiplomski študij. Doktorski študij: Biomedicina. Ime predmeta: Izbirni teoretični predmet K-2-547 Transfuzijska medicina, transplantacija in napredne celične terapije. Nosilec: Primož Rožman. Od 2008.
2. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: Univerzitetni znanstveni dodiplomski študij +3. Laboratorijska biomedicina. Ime predmeta: Osnove transfuzijske medicine in transplantacije. Nosilec: Primož Rožman in Matjaž Jeras. Od 2008
3. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Magistrski študij +2: Laboratorijska biomedicina (120 ECTS), Ime predmeta: Laboratorijska transfuzijska medicina in transplantacija. Nosilec: Primož Rožman in Matjaž Jeras. Od 2009.

V okviru programa smo izvedli naslednje mednarodne simpozije in kongrese:

1. Damjan Radosavljević. Predsednik org. odbora. 4th CARTILAGE WEEKEND: Symposium on Cartilage Repair and Regenerative Medicine. Portorož - Piran, Morska biološka postaja, 9-10 maj 2008
2. SMRKE, Dragica. Predsednik org. odbora. III. konferenca o ranah z mednarodno udeležbo, Portorož, 24.-25. april 2008
3. SMRKE, Dragica. Predsednik org. odbora. IV. konferenca o ranah z mednarodno udeležbo, Portorož, 23.-24. april 2009
4. SMRKE, Dragica. Predsednik org. odbora. 5. simpozij o kronični rani, okužbi mehkih tkiv in skeleta, Portorož, 22. - 23.april 2010 z mednarodno udeležbo.
5. Primož Rožman. Predsednik org. odbora. Konferenca: Mednarodna poletna šola ISS2010: ISS2010: Advanced Methods in Cell Biology, Piran, 20-28.8.2010, Slovenija.
6. SMRKE, Dragica. Predsednik org. odbora. 6. simpozij o ranah z mednarodno udeležbo, Portorož, 12. do 13. maj 2011.
7. Primož Rožman. Predsednik znanstvenega in org. odbora. Mednarodni znanstveni simpozij »MATIČNE CELICE, POPKOVNIČNA KRI IN POSTELJICA V REGENERATIVNI MEDICINI« Ljubljana, 27. Maj 2011, Hotel Mons.

## 10. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>9</sup>

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

SLO

Napredno zdravljenje s celicami je ena temeljnih razvojno-raziskovalnih usmeritev biomedicine v zadnjem desetletju. Dokaz izjemne aktualnosti tega področja je tudi Nobelova nagrada, podeljena leta 2012 avtorjemu Siru Johnu B. Gurdonu in Shinya Yamanaka za odkritje, da se lahko v pluripotentno stanje vrnejo tudi odrasle celice. Osrednja znanstvena vprašanja se dotikajo embrionalnih MC, ki imajo zaradi svoje pluripotentnosti najboljše terapevtske karakteristike, a je njihova uporaba zaradi etičnih zadržkov sporna. Zaradi tega so zelo pomembni alternativni pristopi, ki uporabljajo embrionalnim celicam podobne pluripotentne celice, ki jih lahko dobimo iz poporodnih in odraslih tkiv, npr. iz popkovnice, kostnega mozga ali periferne krvi odraslih oseb.

Dognanja iz 1. sklopa (predklinični postopki) in razvoj uspešnih postopkov dozorevanja MC v celice treh zarodnih plasti endo-, ekto- in mezoderma in vitro nam omogočajo razumevanje razvoja MC odraslega, s katerimi bomo lahko kmalu nadomestili uporabo embrionalnih MC, kar je izjemno velik korak v razvoju naprednega zdravljenja s celicami. Tehnike gojenja MC in vitro in diferenciacija v diferencirane celice, npr. v trombocite, nam bodo omogočile izdelavo krvnih celic v umeritih pogojih, ki bo v prihodnosti najprej potrebna pri gojenju presadkov kostnega mozga ex-vivo. Te tehnike bodo v prihodnosti nadomestile tudi klasične oblike transfuzije s pomočjo krvodajalcev.

Dognanja iz 2. sklopa (klinične raziskave) so osnova za širšo klinično uporabo različnih vrst matičnih in drugih celic. Pozitiven izid teh študij je privedel v razširitev indikacij za napredno zdravljenje s celicami na področje degenerativnih obolenj gibal, zdravljenje poškodb, zdravljenja kardiovaskularnih obolenj, bolezni jeter in imunoadoptivno zdravljenja raka. Indikacije za uporabo celične terapije se bliskovito širijo, saj opazujemo letno povečanje teh postopkov za 400%. Te tehnike danes že nadomeščajo presaditve organov, ki jih zelo primanjkuje, npr. presaditve srca pri bolnikih s hudo miokardiopatijo. Omogočajo tudi učinkovite imunoadoptivne terapije raka in so hkrati vzor za ostale veje klinične medicine, ki bodo lahko naše metodologije uporabile za praktično terapijo.

ANG

Advanced therapies including cell therapies are one of the fundamental research and development orientations of biomedicine in the last decade. The proof of outstanding relevance of this field is Nobel Prize in 2012 awarded to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka for discovery that adult differentiated cells can be returned to the pluripotent state. Central questions refer to embryonic SC, which have, because of their pluripotency the best therapeutic characteristics, but their use is still controversial due to ethical concerns. Because of this alternative approaches using embryonic-like cells are very important. Alternative cell sources are post-natal and adult tissues, for example cord blood, bone marrow or peripheral blood of adults.

Findings from the first part of the project (preclinical research) and the development of effective procedures for stem cell differentiation into all three germ cell layers (endo-, ecto- and

mesoderm) in vitro allows us to understand the development of adult SC. This knowledge will soon help us to replace the use of embryonic SC, which is a huge step in the development of cell therapies. Cell culture in vitro and various differentiation techniques that enable us to produce mature specialized cells for example platelets will allow us to produce blood cells in vitro. In the future we will be able to grow bone marrow transplants in the laboratory. These techniques will in future replace the traditional forms of transfusions using blood donors. Findings from the second part of the project (clinical research) are the basis for wider clinical use of different types of stem and other cells. The positive outcome of these studies has led to expansion of indications for advanced cell treatments in the area of degenerative disorders of the skeletal system, wound healing, treatment of cardiovascular diseases, liver disease and cancer. Indications for the use of cell therapy are rapidly expanding, observed annual increase in these procedures is 400%. Today these techniques have already replaced organ transplants where the number of donor organs is very low, for example heart transplantation in patients with severe myocardopathy. They also allow efficient immunoadaptive cancer therapy and are at the same time a model for other branches of clinical medicine where our methodology will be used for practical therapy in clinics in the future.

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

SLO

Nacionalni program P3-0371 - Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami II je prvi te vrste v Sloveniji. Ima široke in številne aplikativne učinke.

Pomemben je ker ima neposreden učinek za gospodarstvo in družbo. Kvalitetne in vrhunske storitve v medicini omogočajo državljanom uspešne načine zdravljenja in visok nivo kakovosti življenja. Nadomeščanje okvarjenih ali obolelih tkiv veliko pripomore k uspešnemu zdravljenju in hitri rehabilitaciji. Tako dosežemo odlične neposredne in posredne učinke za bolnike in celotno družbo.

Ima tudi pomen za gospodarstvo, saj je napredno zdravljenje s celicami postalo nova panoga v zdravstvu, ki v razvitih državah odpira številna nova delovna mesta. V Sloveniji z razvojem teh tehnologij še zaostajamo. Zato ocenujemo, da je naš predlagani raziskovalni program pripomogel k prepoznavnosti, uporabnosti in uveljavljanju medicinske biotehnologije.

Ocenujemo, da se je v okviru novega programa odprlo več novih delovnih mest. Prišlo je tudi do pospešenega razvoja intelektualne lastnine, nove mednarodne patente in do nastanka spin-off podjetij. Logično je pričakovati, da bodo podobno kot v tujini na podlagi razvoja te dejavnosti tudi pri nas nastala mala medicinska biotehnološka podjetja.

Ima tudi pomen za družbeno infrastrukturo. V zadnjih 10 letih smo prijavitelji, zavedajoč se novih tokov v znanosti, uspeli ustvariti solidno infrastrukturo, kadre in dosežke na področju medicinske biotehnologije. Ta panoga medicine je zelo propulzivna tudi kot proizvodna panoga, ker je okolju prijazna in omogoča trajen razvoj gospodarstva, medicine kot tudi zdravstvenega turizma ter sistema Univerze – visokega šolstva in seveda znanosti.

Ima tudi pomen za javno upravo, za kulturni razvoj, za varovanje naravne in kulturne dediščine. Gre namreč za ekološko čisto in neoporečno dejavnost, ki temelji na visoki tehnologiji in znanju. Program je nadaljna prilika za mednarodno uveljavitev Slovenije, ker omogoča vključitev v mednarodne tokove, odprl je možnosti za sodelovanje v evropskem programu FW7, omogočil je tudi ustrezno vzgojo kadrov ter nadaljni razvoj stroke.

ANG

The National Research Program P3-0371 - Human stem cells- advanced cell therapies II is the first of its kind in Slovenia. It has a broad and numerous range of effects.

It is important because it has a direct effect on the economy and society. Quality and superior medical services enable citizens successful treatments and a high level of quality of life.

Replacement of damaged or diseased tissues greatly aids to the successful treatment and rapid rehabilitation. In this way, excellent direct and indirect effects on patients and society as a whole can be achieved.

It also has significance for the industry, as the advanced cell therapies have become a new branch of medicine, which in developed countries generates many new jobs. In Slovenia, the development of these technologies still lags behind. Therefore, we believe that our research program contributed to the visibility, usability and promotion of medical biotechnology. We estimate that in the new program, several jobs were open. We can expect further development of intellectual property, new international patents and the creation of spin-off companies. It is logical to expect that, like in the rest of the world, through the development of these activities

in our country small medical biotech companies are created. It also has significance for social infrastructure. In the past 10 years, being aware of new flows in the world of science, we succeeded to create a solid infrastructure, human resources and solid achievements in the field of medical biotechnology. This branch of medicine is very propulsive as a manufacturing industry, being environmentally friendly and enabling sustainable development of the economy, medicine as well as medical tourism, and of the Academia, i.e. higher education and science. It also has certain relevance for public administration, cultural development, protection of natural and cultural heritage. Namely, these activities are ecologically pure and virtuous, based on the high technology and knowledge. The program is a further opportunity for international recognition of Slovenia, it allows integration at the international level, and it has opened opportunities for participation in the EU's FW7, enabled appropriate education and professional development.

## **11. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju**

**1.1.2009-31.12.2012<sup>12</sup>**

### **11.1. Diplome<sup>13</sup>**

vrsta usposabljanja	število diplom
bolonjski program - I. stopnja	25
bolonjski program - II. stopnja	0
univerzitetni (stari) program	32

### **11.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti<sup>14</sup>**

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	MR	
25484	Mirjam Froehlich	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
30197	Lenart Girandon	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
27650	Marko Strbad	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
30968	Mojca Jež	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
23433	Živa Mrevlje	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
0	Zmago Kranjc	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
0	Manfred Mervic	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
28213	Igor Frangež	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
0	Primož Krapenc	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
0	Boštjan Kušar	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	

Legenda:

**Mag.** - Znanstveni magisterij

**Dr.** - Doktorat znanosti

**MR** - mladi raziskovalec

## **12. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju<sup>15</sup>**

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	Zaposlitev	
25484	Mirjam Froehlich	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo	
30197	Lenart Girandon	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo	

27650	Marko Strbad	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo	
30968	Mojca Jež	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod	

Legenda zaposlitve:

- A - visokošolski in javni raziskovalni zavodi
- B - gospodarstvo
- C - javna uprava
- D - družbene dejavnosti
- E - tujina
- F - drugo

**13. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2012**

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Sodelovanje v programske skupini	Število mesecev	
27650	Marko Strbad	<input type="radio"/> A -	12	

Legenda sodelovanja v programske skupini:

- A - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja
- B - uveljavljeni raziskovalec iz tujine
- C - študent – doktorand iz tujine
- D - podoktorand iz tujine

**14. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2012<sup>16</sup>**

SLO

Raziskovalna skupina **Transfuzijska medicina** je sodelovala v naslednjih mednarodnih projektih/programih

- Mednarodni bilateralni projekt **INREMOSS – SYSTHER**, sponzorja sta MVŠŠ Republike Slovenije in Ministrstva za šolstvo in raziskovanje ZR Nemčije. Vodja raziskave za slovenski del je bil doc. dr. Miomir Knežević. Sodelovali so **Nacionalni inštitut za biologijo, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Institute for Theoretical Biology Humboldt University Berlin, Ludwig-Maximilians-University of Munich, University of Potsdam**, in podjetje **Micro Discovery GmbH**). Gre za klinično študijo faze III s področja celične terapije raka. Trajanje 2006-2012.
- Sodelovanje z univerzo **Columbia University** (New York), kjer so se šolali 4 naši sodelavci, z **Univerzo Newcastle** (UK), kjer je bil 1 sodelavec, ter z ustanovama **Imperial College London** (prof. Habib) in **King's college London** (prof. S.Minger), sodelovanje z univerzo **WPI Worcester Polytechnic Institute**, MA, USA, kjer so se izobraževali 4 naši sodelavci.

**Educell d.o.o. je sodelovala** v naslednjih mednarodnih raziskovalnih projektih:

- Evropskem mednarodnem znanstveno raziskovalnem projektu **FP7 GENODISC Collaborative Project** (EC HEALTH-2007-A, Grant Agreement No. 201626), vodja Jill Urban, Oxford University. Član programske skupine: Nevenka Kregar-Velikonja. Trajanje 2008-2013.
- **BIOMIMETIKA**, EUREKA, sodelujejo BIA, Univerza v Beogradu, vodja: prof. dr. Bojana Obradović, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia. Član programske skupine: Nevenka Kregar-Velikonja. trajanje 2012 – 2014.
- **COATIM**, FP7 (Health), vodja: Prof. Dr. Jos Vanderleyden, Katholieke

Universiteit Leuven, Faculty of Bioscience Engineering, Department of Microbial and Molecular Systems, Centre of Microbial and Plant Genetics, trajanje 2012 – 2015. Član programske skupine: Nevenka Kregar-Velikonja.

- **nPOSCCOG - MNT ERANET**, Nano-POlySaccharides containing Scaffolds with Controlled pOrosity and degradability. trajanje 2012 – 2015. MNT ERAnet project. Coordinator: Assoc. Prof. Dr. Vanja Kokol, University of Maribor, Slomškov trg 15, SI-2000, Slovenia. Član programske skupine: Nevenka Kregar-Velikonja.

**Raziskovalna skupina prof. Smrketove (UKC)** je sodelovala v mednarodnem programu čezmejnega sodelovanja Slovenija- Italija 2007-2013 “**E-Zdravje na čezmejnem območju (E-Health nella macroarea transfrontaliera)**”. Odobren je bil v okviru 1. javnega razpisa za predložitev strateških projektnih predlogov št. 1/2009 Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija- Italija 2007-2013 in sodi v prednostno nalogu 3: Socialna integracija. Trajanje projekta je od 2010 do 2013. Član programske skupine: Prof. D. Smrke.

#### **15. Vključenost v projekte za uporabnike, ki v so obdobju trajanja raziskovalnega programa (1. 1. 2009 – 31. 12. 2012), potekali izven financiranja ARRS<sup>17</sup>**

SLO

- **TP MIR 07/RR/18** (projekt Ministrstva za obrambo RS) »Potencial regenerativne medicine pri zdravljenju in rehabilitaciji poškodovancev«, vodja dr. Nevenka Kregar Velikonja, (Zavod RS za transfuzijsko medicino in Educell d.o.o.); trajanje 2007– 2009.
- Mednarodni projekt MVŠZŠ Republike Slovenije in Ministrstva za šolstvo in raziskovanje ZR Nemčije **INREMOS – SYSTHER**, vodja raziskave doc.dr.Miomir Knežević (Nacionalni inštitut za biologijo, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Institute for Theoretical Biology Humboldt University Berlin, Ludwig-Maximilians-University of Munich, University of Potsdam, in podjetje MicroDiscovery GmbH); 2006-2012.
- **GENODISC Collaborative Project** (EC Grant Agreement No. 201626), vodja Jill Urban, Oxford University, 2008-2012. Član programske skupine: Nevenka Kregar-Velikonja.
- Raziskovalna skupina UKC – prof. Smrke, sodeluje v mednarodnem programu čezmejnega sodelovanja Slovenija- Italija 2007-2013. Naslov projekta je “**E-Zdravje na čezmejnem območju (E-Health nella macroarea transfrontaliera)**”. Odobren je bil v okviru 1. javnega razpisa za predložitev strateških projektnih predlogov št. 1/2009 Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija- Italija 2007-2013 in sodi v prednostno nalogu 3: Socialna integracija. Trajanje projekta je od 2010 do 2013. Član programske skupine: prof. D.M. Smrke.

#### **16. Ocena tehnološke zrelosti rezultatov programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)<sup>18</sup>**

SLO

Raziskovalni program P3-0371- Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami I je doprinesel k razvoju nove medicinske panoge v Sloveniji, to je zdravljenju s celicami (celična terapija), ki je del t.i.m. naprednega zdravljenja. Na ZTM smo prvo terapijo s celicami izvedli v 1980ih letih in sicer je šlo za presaditev kostnega mozga. Leta 1999 smo uredili laboratorij za celično biologijo, l. 2012 pa smo jih prenovili in v njih vzpostavili kategorijo čistosti C (ISO 7). Kot spremiščevalni produkti v raziskovalnem programu so rasli naslednji tehnološko zreli postopki in se prenesli v vsakodnevno praks:

- shranjevanje matičnih celic (MC) iz popkovnične krvi v okviru Enote za shranjevanje popkovnične krvi (ESPOK),
- sodobno shranjevanje KMC iz periferne krvi,

- postopki zunajtelesne fotokemoterapije kot obdelava pripravkov enojedrnih celic s kombinacijo reagenta 8-MOP (8-metoksipsoralen) in UVA žarkov za zdravljenja bolezni presadka proti gostitelju (GVHD), T-celičnega kožnega limfoma, zavnitvenih reakcij pri presaditvi organov, nekaterih avtoimunskih in drugih bolezni,
- imunskomagnetna izolacija KMC s pomočjo selektivnih monoklonskih protiteles konjugiranih s superparamagnetskimi nanodelci. Trenutno izvajamo izolacijo CD34+ celic za zdravljenje srčnega popuščanja v sodelovanju s KO za kardiologijo.

Ti postopki omogočajo, da lahko nastane državni center za tkivne/celične terapevtske storitve z ustreznou infrastrukturo, opremo in usposobljenim osebjem. To nam tudi omogoča, da potencialni terapevtski postopek prenesemo iz laboratorija do pacienta (t.i. *bench-to-bedside*): izvedemo validacijo postopka, uskladimo postopek z zakonodajo ter uredimo oz. pomagamo pri ureditvi dokumentacije, potrebne za pridobiteve dovoljenja za izvajanje storitve pri agenciji JAZMP.

Program je torej omogočil praktično translacijo v klinično medicino in je poleg pridobitve za znanost izredna tehnološko zrela pridobitev za slovensko medicino.

**17. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšni finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali**

možnost ustanovitve spin-off podjetja	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
potrebni finančni vložek	1,500.000 euro
ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>19</sup>	Potrebno je 300m <sup>2</sup> laboratorija, 100m <sup>2</sup> pisarn. Laboratorij se deli na čisti del GMP - 100m <sup>2</sup> in običajni GLP laboratorij 200m <sup>2</sup> . Potrebna je oprema za celične laboratorije ter ureditev čistih prostorov za GMP proizvodnjo.

**18. Izjemni dosežek v 2012<sup>20</sup>**

**18.1. Izjemni znanstveni dosežek**

JEŽ, Mojca, BAS, Tuba, VEBER, Matija, KOŠIR, Andrej, DOMINKO, Tanja, PAGE, Raymond L., ROŽMAN, Primož. The hazards of DAPI photoconversion : effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. Histochemistry and cell biology, 2013, vol. 139, iss. 1, str. 195-204, ilustr., Barvilo DAPI je eno najpogosteje uporabljenih DNA barvil za imunofluorescenco. Ugotovili smo, da lahko ob določenih pogojih DAPI spremeni svoje spektralne lastnosti tako, da njegov signal zaznamo tudi z zelenim filtrom. Odkritje smo poimenovali fotokonverzija barvila DAPI. Raziskali smo kateri parametri med pripravo preparatov imajo nanjo vpliv in ali je prisotna tudi pri drugih DNA barvilih s podobnimi spektralnimi karakteristikami kot jih ima DAPI. Odkritje je pomembno, saj lahko fotokonverzijo barvila DAPI in nekaterih drugih DNA barvil zamenjamo za obarvanje tarčnega jedrnega proteina.

**18.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek**

ROŽMAN, Primož, JEŽ, Mojca. Matične celice in napredno zdravljenje : zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo : pojmovnik. Celje: Društvo Mohorjeva družba: Celjska Mohorjeva družba, 2011. 289 str.  
Prvi univerzitetni učbenik s področja matičnih celic, ki poenoti terminologijo s tega področja. Recenzenti so bili strokovnjaki s področja biologije, veterine, medicine, histologije, embriologije in fiziologije. 289 str.

Slovarček poenoti različno terminologijo s področja raziskav matičnih celic. Pojmovnik nudi obširnejšo razlago bioloških in medicinskih pojmov, ki se uporabljajo pri raziskavah matičnih celic. Namenjen je dijakom in študentom biomedicinskih usmeritev, zdravnikom, zdravnikom specialistom, raziskovalcem s področja biomedicine in širšemu občinstvu. Uporaben je tako na naravoslovnih področjih, kot so biologija, medicina, veterina, farmacija, biotehnologija in biokemija, kot tudi v družboslovju in tehniških vedah.

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamо z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski oblikи identični podatkom v obrazcu v papirnatи oblikи
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa

### Podpisi:

zastopnik oz. pooblaščena oseba JRO  
in/ali RO s koncesijo:

in

vodja raziskovalnega programa:

Zavod Republike Slovenije za  
transfuzijsko medicino

Primož Rožman

## ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana 29.3.2013

### Oznaka prijave: ARRS-RPROG-ZP-2013/43

<sup>1</sup> Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani ARRS (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifrant/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve 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 dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite 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 znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskoga dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustavnovitev podjetja kot rezultat programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [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 program, 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> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1. 1. 2009 – 31. 12. 2012), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite število opravljenih diplom v času trajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času trajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite MR. [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1. 1. 2009 do 31. 12. 2012), ustrezeno označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

<sup>16</sup> Navedite naslove projektov in ime člena programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>17</sup> Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člena programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>18</sup> Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma tržne niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>19</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>20</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapositiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapositiv/-a priložite kot príponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapositiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavite dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROG-ZP/2013 v1.00  
CC-02-D9-98-FD-3F-58-46-C2-D9-EB-4E-6D-47-51-B8-64-AB-54-23

## MEDICINA

### Področje: 3.01 – Mikrobiologija in imunologija

Dosežek 1: [The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem.](#)

Jež M, Bas T, Veber M, Košir A, Dominko T, Page R, Rožman P.  
Histochem Cell Biol. 2013 Jan;139(1):195-204. doi: 10.1007/s00418-012-1039-8.  
Epub 2012 Oct 14. PMID: 23064788 [PubMed - in process] IF: 2.7 (2012)

Histochem Cell Biol  
DOI 10.1007/s00418-012-1039-8

ORIGINAL PAPER

#### **The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem**

Mojca Jež · Tuba Bas · Matija Veber ·  
Andrej Košir · Tanja Dominko ·  
Raymond Page · Primož Rožman

Accepted: 29 September 2012  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

**Abstract** Immunocytochemistry is a powerful tool for detection and visualization of specific molecules in living or fixed cells, their localization and their relative abundance. One of the most commonly used fluorescent DNA dyes in immunocytochemistry applications is 4',6-diamidino-2-

green emission due to blue excitation. When a sample stained with DAPI only was first imaged with the green filter set (FITC/GFP), only a weak cytoplasmic autofluorescence was observed. Next, we imaged the sample with a DAPI filter set, obtaining a strong nuclear DAPI signal as expected.

Barvilo DAPI je eno najpogosteje uporabljenih DNA barvil za imunofluorescenco. Ugotovili smo, da lahko ob določenih pogojih DAPI spremeni svoje spektralne lastnosti tako, da njegov signal zaznamo tudi z zelenim filtrom. Odkritje smo poimenovali fotokonverzija barvila DAPI. Raziskali smo kateri parametri med pripravo preparatov imajo nanjo vpliv in ali je prisotna tudi pri drugih DNA barvilih s podobnimi spektralnimi karakteristikami kot jih ima DAPI. Odkritje je pomembno, saj lahko fotokonverzijo barvila DAPI in nekaterih drugih DNA barvil zamenjamo zaobarvanje tarčnega jedrnega proteina.

# MEDICINA

Področje: 3.01 – Mikrobiologija in imunologija

Dosežek 2: **Matične celice in napredno zdravljenje**

Društvo Mohorjeva družba; Celjska Mohorjeva družba; 2011; 289

str.; Avtorji / Authors: Rožman Primož, Jež Mojca

**Matične celice  
in napredno zdravljenje**

Zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo

POJMOVNIK

Primož Rožman  
Mojca Jež

 

[Tweet](#) [Like](#) [Share](#)

CLOSE 

Izraz	Angleški izraz	Slovenski medicinski slovar	Opis - komentar
Matična celica odrasla (sin. somatska matična celica, tkivna na matična celica)	Adult stem cell (sin. somatic stem cell, tissue stem cell)	somatske ~e: navadno diploidne celice organizma, ki niso spolne ...	Matična celica odrasla je nediferencirana matična celica, ki jo v majhnem številu najdemo v različnih tkivih in organih ploda ali odrasle osebe. Do določene mere ima sposobnost samoobnavljanja in ustvarjanja potomk, ki se diferencirajo v specializirane celice tega tkiva oz. organa. Odkritih je več tipov teh celic, npr. živčna, mezenhimska ali krvotvorna matična celica. Ni še jasno, ali in na kakšen način se lahko odrasle matične celice diferencirajo v celice drugih tkiv, kar imenujemo »plastičnost« (glej tam).
Matična celica iz popkovnične krvi	Umbilical cord blood stem cell (UCBSC)	matične ~e iz popkovnične krvi: matične celice, ki se nahajajo v popkovnični krv in jih lahko zberemo ob rojstvu z odzvom krvi iz popkovnične vene; sin. UCBSC	Matične celice se nahajajo tudi v popkovnični krv in jih lahko zberemo ob rojstvu z odzvom krvi iz popkovnične vene. V popkovnični krvi se nahaja več vrst MC, npr. KMC, MSC, ESC-A in druge.
Matičnost	Stemness	mátičen ·čna -o 1. nanašajoč se na cébelj matico; -i mleček 2. ki je v čem prvi, začetni, iz katerega kaj izvirat; -a snov; sin. progenitor; -a celica, -o tkivo, plastičnost -ih celic, prenos -ih celic	Matičnost je sposobnost vzdrževanja pluripotentnosti navkljub delitvam. Matične celice vzdržujejo matičnost s pomočjo aktivnega izražanja določenih genov in z različnimi drugimi mehanizmi. Glej še matična celica.
MEF		MEF [méf ali emeéf] krajš. (mišji embrionalni fibroblast): mišji embrionalni → fibroblast	Glej mišji embrionalni fibroblast.
Mejoza (tudi meioza)	Meiosis	meiôza -e žaga v zorenju spolnih celic, sestavljena iz dveh delitev, od katerih je prva redukcijska in druga ekvacijška, ki vodita do haploidnega števila kromosomov v zrelih jajčecih ali semenčicah; sin. meiosi, meiotična delitev, zoritvena delitev	Mejoza ali zoritvena delitev je podobno kot mitoza proces delitve celic, vendar pri mejozi namesto dveh hčerinskih celic nastanejo štiri. Pri mejozi se razpolovi diploidno število kromosomov (2n), tako da so štiri hčerinske celice haploidne (n) in med seboj dedno različne. Te celice imenujemo gamete, pri moškem semenčice in pri ženski jajčecu. Mejoza pri živalih se imenuje gametogeneza, pri rastlinah pa sprogeneza.

Prvi univerzitetni učbenik s področja matičnih celic, ki poenoti terminologijo s tega področja. Recenzenti so bili strokovnjaki s področja biologije, veterine, medicine, histologije, embriologije in fiziologije. 289 str.

Slovarček poenoti različno terminologijo s področja raziskav matičnih celic. Pojmovnik nudi obširnejšo razlago bioloških in medicinskih pojmov, ki se uporabljajo pri raziskavah matičnih celic. Namenjen je dijakom in študentom biomedicinskih usmeritev, zdravnikom, zdravnikom specialistom, raziskovalcem s področja biomedicine in širšemu občinstvu. Uporaben je tako na naravoslovnih področjih, kot so biologija, medicina, veterina, farmacija, biotehnologija in biokemija, kot tudi v družboslovju in tehniških vedah.