

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/29

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z2-7046
Naslov projekta	Nanosekundni električni pulzi za selektivno elektroporacijo celičnih organelov
Vodja projekta	10268 Damijan Miklavčič
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3.400
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	11.2007 - 05.2009
Nosilna raziskovalna organizacija	1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

2. Sofinancerji¹

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta²

V podoktorskem projektu smo si zastavili tri cilje: TC1 – Postavitev metode nanosekundnih pulzov, TC2 – Selektivna poracija celičnih organelov in TC3 – Povezava nanosekundnih električnih pulzov z elektroporacijo v nevirusni genski terapiji. Prva naloga projekta je bila vzpostavitev metode nanosekundnih, visokonapetostnih električnih pulzov v Laboratoriju za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko (TC1). Ker donirana oprema prof. dr. Neumanna z Univerze v Bielefeldu v Nemčiji ni omogočila

generiranja električnih pulzov, krajših od mikrosekunde, so člani naše raziskovalne skupine razvili nov generator pulzov, ki deluje po modificiranem principu Blumleinovega generatorja s sinhroniziranim nadzorom stikal. Z njim lahko generiramo pulze, dolge 30-200 ns, električno-poljsko jakostjo do 50 kV/cm ter zelo visokih ponavljalnih frekvenc, do 100 kHz. Nanosekundni generator je povezan z zlatimi elektrodami na krovnem stekelcu, ki ga namestimo pod fluorescenčni mikroskop, zato lahko z uporabo fluorescenčnih barvil neposredno spremljamo učinke nanosekundnih električnih pulzov (v nadaljevanju nsEP) na celice. Razdalja med elektrodami je 100 μm , kar nam omogoči doseganje visoke električno-poljske jakosti, ki je pri tako kratkih električnih pulzih potrebna za doseganje učinkov na bioloških sistemih. Razvili smo protokol aplikacije nsEP na celice v suspenziji za različne metode fluorescenčne mikroskopije. Pri tem smo uporabili celice celičnih linij B16 F1 (mišji melanom), CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka) ter A123 (mišji mielom). Določili smo najprimernejšo raztopino za elektroporacijo z nsEP (primerna ionska sestava, ozmolarnost, prevodnost), gostoto celic, volumen nanešene suspenzije, način osvetljevanja. Spremembe v obliki in fluorescenci celic pred, med in po pulzu smo posneli s kamero, digitalizirane slike pa smo analizirali z uporabo programske opreme (MetaMorph, MetaFluor, ImageJ) ter tako ovrednotili učinke nsEP na celice. Z novo tehnologijo aplikacije nanosekundnih pulzov na biološke sisteme smo prišli do novih znanstvenih izsledkov s področja nanosekundnih pulzov, ki je v svetu še precej nova (od leta 2001).

V drugem delu smo testirali hipotezo, da z uporabo različnih parametrov pulzov nsEP (trajanje, število, poljska jakost in ponavljalna frekvenca) lahko dosežemo selektivno poracijo celičnih organelov (TC2). Uporabili smo sledeča fluorescenčna barvila: propidijev jodid in YO-PRO (za permeabilizacijo plazemske membrane), lucifer yellow (LY), LysoSensor, LysoTracker, FITC-dekstrane (za endocitotske vezikle in lizosome), rodamin 123 in kalcein (za mitohondrije) ter Calcium Green (sproščanje kalcija iz notranjih zalog). Ugotovili smo, da hipoteza ne velja in da z nsEP pulzi dolžine 60 ns, električno-poljske jakosti 50 kV/cm ter ostalih parametrov pulzov, ki jih omogoča naš generator (število: 1-5, 10 ali 20 pulzov, frekvenca: 2 Hz – 100 kHz) povzročimo tako permeabilizacijo membran organelov kot tudi permeabilizacijo plazemske membrane. Z elektroporacijo notranjih membran smo povzročili sproščanje kalcija iz znotrajceličnih zalog, permeabilizacijo endocitotskih veziklov in mitohondrijev, vendar smo poleg tega vedno ugotovili tudi permeabilizacijo zunanje, plazemske membrane. Tako smo potrdili tudi teoretična predvidevanja, ki smo jih v času poteka projekta objavili. Namreč, da pri dovajanju nsEP lahko dosežemo elektroporacijo notranjih membran, vendar pa pri tem plazemska membrana ne ostane nepoškodovana. Razlike v dielektričnosti membran organelov ter prevodnosti raztopin, ki jih obdajajo, niso tako velike, da bi lahko prispevale k vzpostavitvi selektivne poracije organelov. Z metodo dvojnega barvanja celic z LY in PI smo prvi neposredno dokazali, da pride do permeabilizacije endocitotskih veziklov, vendar ne brez hkratne permeabilizacije membrane. Ugotovili smo tudi, da se LY po dovajanju nsEP sprosti iz endocitotskih veziklov. To pomeni, da bi bila lahko kombinacija endocitoze in nsEP nova metoda za vnašanje različnih učinkovin v celico. S spremljanjem fluorescence v času smo določili dinamiko permeabiliziranosti z nsEP tako pri plazemski kot tudi pri notranjih membranah (pri endocitotskih veziklih). Izsledke naših raziskav smo predstavili na več konferencah, strokovni javnosti pa smo jih prikazali tudi v dveh objavljenih člankih v mednarodnih SCI revijah. Novo metodologijo bomo uporabili za uvajanje različnih učinkovin (kemoterapevtike, gene) v nadaljnjih temeljnih in aplikativnih raziskavah.

Z analizo stopnje permeabiliziranosti plazemske membrane celic (z uporabo barvila PI) smo preučili tudi vpliv parametrov električnih pulzov (npr. dolžina pulza, frekvenca) na učinke nsEP. Posebnost našega generatorja nsEP je namreč zelo visoka ponavljalna frekvenca pulzov, ki je edinstvena v svetu. Ugotovili smo, da pri večanju frekvence permeabiliziranost plazemske membrane raste (predhodni pulzi omogočijo facilitacijo naslednjih pulzov v »vlaklu pulzov«), vendar pa pri visokih frekvencah (nad 1 kHz) prične

upadati, kar pomeni, da se učinki posameznih nsEP prekrivajo. Pri daljših pulzih se frekvenčni vrh premakne v smer manjše frekvence. Rezultati bodo prispevali k razjasnitvi mehanizmov učinkov električnih pulzov na biološke membrane. Z natančno analizo rezultatov in naslanjanjem na teoretične izračune lahko sklepamo na mehanizme odpiranja »por«, na njihovo naravo ter dinamiko odpiranja in zapiranja »por«. Prav tako pa bomo lahko primerjali elektroporacijo s klasičnimi (mili- in mikrosekundnimi) pulzi z nanoelektroporacijo. Ugotovili smo tudi, da se v času 20 min po nsEP plazemska membrana v veliki meri »zacepi«. Potek celjenja je podoben celjenju pri klasični elektroporaciji, pri kateri uporabljamo daljše, mikro- in milisekundne pulze z nižjo električno-poljsko jakostjo. Ker je celjenje biološko aktiven proces, smo tako posredno dokazali, da celice kljub permeabilizaciji membran po dovajanju nsEP preživijo. Rezultate raziskav smo predstavili na več konferencah, v nastajanju pa je tudi članek, ki ga bomo poslali v recenzijo v mednarodno SCI revijo.

V zadnjem delu našega projekta (TC3) smo želeli ugotavljati vpliv nsEP (v kombinaciji z mikro- in milisekundnimi električnimi pulzi) na gensko transfekcijo. Ker celice pri delu z našim sistemom nsEP naneseemo v drobni kapljici na elektrode pod mikroskopom, lahko opazujemo učinke nsEP le omejen čas (okoli 30 min). Zato nismo mogli uporabiti metode vnosa reporterskega gena GFP za ugotavljanje genske transfekcije, saj se izražanje GFP pokaže šele po 24 urah. Poskušali smo označiti plazmid s fluorescenčno molekulo rodaminom, ki bi jo bilo mogoče slediti pod mikroskopom pri transportu prek plazemske membrane, po citoplazmi in v jedru. Barvanje plazmida se je izkazalo za precej težavno, saj v raztopini ostane nevezan rodamin, ki pri elektroporaciji preide v celico in obarva nukleinske kisline celice. Zato smo trenutno še v fazi optimizacije metode. Sodelavci v skupini pa so tudi izdelali novo napravo za generiranje nanosekundnih pulzov, ki bo omogočila sterilno delo s celicami v suspenzijami, ki jih bo mogoče po pulziranju opazovati daljši čas. Zato bomo v kratkem nadaljevali z delom na genski elektrotransfekciji v sodelovanju z ostalimi člani raziskovalne skupine.

V času podoktorskega projekta smo uspešno sodelovali s skupino strokovnjakov, ki so eni od vodilnih na področju nanosekundnih električnih pulzov, s skupino prof. dr. P.T. Vernierja z Univerze Južna Kalifornija, Los Angeles, ZDA. Rezultate skupnih poskusov bomo v kratkem poslali v objavo v mednarodno SCI revijo. Dobro smo sodelovali tudi s skupino prof. dr. L.M. Mira z Inštituta Gustave-Roussy, Villejuif, Francija, ki je eden vodilnih na področju elektroporacije. Z obema skupinama sodelujemo tudi formalno v okviru bilateralnih projektov.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Prva dva temeljna cilja, postavitve metode nsEP (TC1) in raziskovanje selektivne poracije celičnih organelov (TC2) smo kljub težavam pri realizaciji TC1 realizirali v celoti. Pri TC2 smo nekaj v projektnem predlogu predvidenih metod nadomestili z drugimi ter naredili dodatne preiskave. TC3 pa smo zaradi težav z metodo poskušali izvesti na drugačen način, z drugo metodo, ki pa je trenutno še v fazi optimizacije. Kljub navedenim zapletom lahko ugotovimo, da smo zastavljeno nalogo v večji meri realizirali.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta⁴

Pri TC2 smo nekatere metode, ki smo jih navedli v načrtu projekta (kristal vijolično, akridin oranž, aneksin, fluorogeni substrati kaspaz) nadomestili z drugimi (YO-PRO, LysoTracker, FITC-dekstrani, kalcein, Calcium Green), da smo bolje raziskali poracijo posameznih organelov in uspešneje testirali hipotezo o selektivni poraciji organelov z izpostavitvijo celic nsEP. Poleg tega smo podrobneje raziskali vplive parametrov nsEP na permeabilizacijo membrane, kar nam bo dalo pomembne podatke o mehanizmu elektroporacije bioloških membran. Pri TC3 pa smo imeli zaradi konfiguracije sistema

težave z vrednotenjem genske transfekcije. Skušali smo metodo izražanja reporterskega gena GFP nadomestiti z opazovanjem fluorescenčno označenega plazmida, vendar smo trenutno še v fazi optimizacije označevanja plazmida s fluorescirajočo molekulo. Ker TC3 nismo mogli v celoti realizirati, smo povečali obseg dela v okviru TC2, saj nam je visokofrekvenčni pulzni generator (rezultat TC1) omogočal edinstven vpogled v vlogo ponavljalne frekvence na permeabilizacijo membrane.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO Elektropermeabilizacija endocitotskih veziklov v B16 F1 mišjih melanomskih celicah	
		ANG Electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells	
	Opis	SLO Visokonapetostni nanosekundni električni pulzi lahko permeabilizirajo membrane celičnih organelov. V članku smo opisali elektropermeabilizacijo endocitotskih veziklov v B16 F1 mišjih melanomskih celicah, ki smo jo spremljali s fluorescenčno mikroskopijo. Z uporabo dveh fluorescenčnih barvil (lucifer yellow in propidijev jodid) smo ugotovili, da permeabilizacijo notranjih membran pri uporabi pulzov s parametri 1-20 pulzov, 60 ns, 50 kV/cm, 1 kHz vedno spremlja tudi permeabilizacija plazemske membrane. Metoda bi lahko bila uporabna za vnašanje različnih učinkovin v celice.	
		ANG High-voltage, nanosecond electric pulses can permeabilize membranes of cell organelles. In the paper, we described the electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells, observed by a fluorescence microscopy. With the use of two fluorescent dyes (lucifer yellow and propidium iodide) we found that the permeabilization of internal cell membranes by pulses of chosen parameters (1-20 pulses, 60 ns, 50 kV/cm, 1 kHz) is always accompanied by a permeabilization of plasma membrane. The method can be useful for introducing various substances into the cell.	
	Objavljeno v	BATISTA NAPOTNIK, Tina, REBERŠEK, Matej, KOTNIK, Tadej, LEBRASSEUR, Eric, CABODEVILA, Gonzalo, MIKLAVČIČ, Damijan. Electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells. Med. biol. eng. comput.. [Print ed.], 2010, vol. , no. , str. 1-7, ilustr. http://www.springerlink.com/content/v2g312n52g27078p/fulltext.pdf , doi: 10.1007/s11517-010-0599-9. JCR IF (2008): 1.379	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	7642708		
2.	Naslov	SLO Blumleinov generator visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov z visoko ponavljalno frekvenco, nastavljivo dolžino in polariteto	
		ANG Blumlein generator for high-voltage, nanosecond electric pulses with high-repetition rate and variable duration and polarity	
	Opis	SLO Blumleinove generatorje uporabljamo za različne namene: v radarjih, laserjih, v zadnjem času pa tudi v biomedicinskih raziskavah za generiranje visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov, s katerimi lahko dosežemo poriranje notranjih membran celic. V članku smo opisali zgradbo in delovanje različice Blumleinovega generatorja, s katerim lahko dosežemo visoko ponavljalno frekvenco (do 100 kHz) ter poljubno dolžino in polariteto pulzov. Opisali smo tudi učinke teh pulzov na celice – poracijo endocitotskih veziklov in plazemske membrane.	
		ANG Blumlein generators are used for various purposes: in radars, lasers, and recently, also in medical research for generation high-voltage, nanosecond electric pulses which can be used for electroporation of internal membranes of cells. In this paper, we described the structure and function of Blumlein generator that can achieve a high-repetition rate (up to 100 kHz) and variable duration and polarity of pulses. We also described the effects of these pulses to cells – the poration of endocytotic vesicles and plasma membrane.	
	REBERŠEK, M., KRANJC, M., PAVLIHA, D., BATISTA NAPOTNIK, T., VRTAČNIK, D., AMON, S., MIKLAVČIČ, D. Blumlein configuration for high-		

	Objavljeno v		repetition-rate pulse generation of variable duration and polarity using synchronized switch control. IEEE trans. biomed. eng., 2009, 56, 11, 2642-2648. JCR IF (2008): 2.496
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		7346772
3.	Naslov	SLO	Učinki visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov na celice in tkiva
		ANG	The effects of high-voltage, nanosecond electric pulses on cells and tissues
	Opis	SLO	Visokonapetostni nanosekundni električni pulzi (dolžine do nekaj sto nanosekund, in električno poljsko jakostjo več deset kV/cm) lahko povzročijo, da se pojavi napetost na notranjih membranah celic, kar vodi v pojav por v membranah organelov. Učinki teh pulzov so večji na notranjih membranah kot na plazemski membrani celice. V preglednem članku smo opisali različne učinke pulzov na celice (poriranje membran veziklov, sproščanje kalcijevih ionov, sproščanje citokroma c iz mitohondrijev, poškodbe DNA, apoptozo) ter njihov pomen za biomedicino in biotehnologijo.
		ANG	High-voltage, nanosecond electric pulses (up to few hundreds nanoseconds, electric field strength of a few tens of kV/cm) can induce voltage at internal membranes of cells. This leads to permeabilization of organelle membranes. Effects of these pulses at internal membranes can exceed to those at plasma membrane. In the review article, we described various effects of nanosecond pulses on cells (permeabilization of vesicle membranes, release of calcium ions, release of cytochrome c from mitochondria, DNA damage, apoptosis) and their important role in biomedicine and biotechnology was discussed.
	Objavljeno v		BATISTA NAPOTNIK, T., REBERSEK, M., KOTNIK, T., MIKLAČIČ, D. Učinki visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov na celice in tkiva = The effects of high-voltage nanosecond electrical pulses on cells and tissues. Med. razgl., 2008, 3, 271-281
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		25426905
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	Elektropermeabilizacija endocitotskih veziklov v B16 F1 mišjih melanomskih celicah
		ANG	Electropermeabilization of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells
	Opis	SLO	Visokonapetostni nanosekundni električni pulzi lahko permeabilizirajo membrane celičnih organelov. V članku smo opisali elektropermeabilizacijo endocitotskih veziklov v B16 F1 mišjih melanomskih celicah, ki smo jo spremljali s fluorescenčno mikroskopijo. Z uporabo dveh fluorescenčnih

			barvil (lucifer yellow in propidijev jodid) smo ugotovili, da permeabilizacijo notranjih membran pri uporabi pulzov s parametri 1-20 pulzov, 60 ns, 50 kV/cm, 1 kHz vedno spremlja tudi permeabilizacija plazemske membrane. Metoda bi lahko bila uporabna za vnašanje različnih učinkovin v celice.
		ANG	High-voltage, nanosecond electric pulses can permeabilize membranes of cell organelles. In the paper, we described the electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells, observed by a fluorescence microscopy. With the use of two fluorescent dyes (lucifer yellow and propidium iodide) we found that the permeabilization of internal cell membranes by pulses of chosen parameters (1-20 pulses, 60 ns, 50 kV/cm, 1 kHz) is always accompanied by a permeabilization of plasma membrane. The method can be useful for introducing various substances into the cell.
	Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Objavljeno v	BATISTA NAPOTNIK, Tina, REBERŠEK, Matej, KOTNIK, Tadej, LEBRASSEUR, Eric, CABODEVILA, Gonzalo, MIKLAVČIČ, Damijan. Electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells. Med. biol. eng. comput.. [Print ed.], 2010, vol. , no. , str. 1-7, ilustr. http://www.springerlink.com/content/v2g312n52g27078p/fulltext.pdf , doi: 10.1007/s11517-010-0599-9. JCR IF (2008): 1.379	
	Tipologija	1.01	Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	7642708	
2.	Naslov	SLO	Blumleinov generator visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov z visoko ponavljalno frekvenco, nastavljivo dolžino in polariteto
		ANG	Blumlein generator for high-voltage, nanosecond electric pulses with high-repetition rate and variable duration and polarity
	Opis	SLO	Blumleinove generatorje uporabljamo za različne namene: v radarjih, laserjih, v zadnjem času pa tudi v biomedicinskih raziskavah za generiranje visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov, s katerimi lahko dosežemo poriranje notranjih membran celic. V članku smo opisali zgradbo in delovanje različice Blumleinovega generatorja, s katerim lahko dosežemo visoko ponavljalno frekvenco (do 100 kHz) ter poljubno dolžino in polariteto pulzov. Opisali smo tudi učinke teh pulzov na celice – porazporeditev endocitotskih veziklov in plazemske membrane.
		ANG	Blumlein generators are used for various purposes: in radars, lasers, and recently, also in medical research for generation high-voltage, nanosecond electric pulses which can be used for electroporation of internal membranes of cells. In this paper, we described the structure and function of Blumlein generator that can achieve a high-repetition rate (up to 100 kHz) and variable duration and polarity of pulses. We also described the effects of these pulses to cells – the poration of endocytotic vesicles and plasma membrane.
	Šifra	F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
	Objavljeno v	REBERŠEK, M., KRANJC, M., PAVLIHA, D., BATISTA NAPOTNIK, T., VRTAČNIK, D., AMON, S., MIKLAVČIČ, D. Blumlein configuration for high-repetition-rate pulse generation of variable duration and polarity using synchronized switch control. IEEE trans. biomed. eng., 2009, 56, 11, 2642-2648. JCR IF (2008): 2.496	
3.	Tipologija	1.01	Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	7346772	
	Naslov	SLO	Učinki visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov na celice in tkiva
		ANG	The effects of high-voltage, nanosecond electric pulses on cells and tissues
	Opis	SLO	Visokonapetostni nanosekundni električni pulzi (dolžine do nekaj sto nanosekund, in električno poljsko jakostjo več deset kV/cm) lahko povzročijo, da se pojavi napetost na notranjih membranah celic, kar vodi v pojav por v membranah organelov. Učinki teh pulzov so večji na notranjih membranah kot na plazemski membrani celice. V preglednem članku smo opisali različne učinke pulzov na celice (poriranje membran veziklov, sproščanje kalcijevih ionov, sproščanje citokroma c iz mitohondrijev, poškodbe DNA, apoptozo) ter njihov pomen za biomedicino in biotehnologijo.
			High-voltage, nanosecond electric pulses (up to few hundreds nanoseconds,

		ANG	electric field strength of a few tens of kV/cm) can induce voltage at internal membranes of cells. This leads to permeabilization of organelle membranes. Effects of these pulses at internal membranes can exceed to those at plasma membrane. In the review article, we described various effects of nanosecond pulses on cells (permeabilization of vesicle membranes, release of calcium ions, release of cytochrome c from mitochondria, DNA damage, apoptosis) and their important role in biomedicine and biotechnology was discussed.
	Šifra		F.05 Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
	Objavljeno v		BATISTA NAPOTNIK, T., REBERŠEK, M., KOTNIK, T., MIKLAVČIČ, D. Učinki visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov na celice in tkiva = The effects of high-voltage nanosecond electrical pulses on cells and tissues. Med. razgl., 2008, 3, 271-281
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		25426905
4.	Naslov	SLO	Učinki visokonapetostnih nanosekundnih električnih pulzov na plazemsko membrano celic v kulturi
		ANG	Effects of high-voltage, nanosecond electric pulses on plasma membrane of cells in culture
	Opis	SLO	Na konferenci smo opisali nov Blumleinov generator visokonapetostnih nanosekundnih pulzov, ki smo ga razvili v naši raziskovalni skupini. Je edinstven v svetu, saj omogoči poljubno nastavljanje dolžine in polaritete pulzov pa tudi visoko ponavljalno frekvenco (do 100 kHz). Opisali smo prve učinke naših pulzov na celice: ugotovili smo, da vlak pulzov poveča prepustnost plazemske membrane. Več kot je pulzov, obsežnejša je permeabilizacija plazemske membrane, kar se odraža v večji obarvanosti celic s fluorescenčnim barvilom propidijevim jodidom.
		ANG	At the conference, we presented a new Blumlein generator for generating high-voltage, nanosecond electric pulses, that was developed in our research group. The generator is unique in the world, by allowing variable duration and polarity of pulses, as well as a high pulse repetition rate (up to 100 kHz). We described the effects of our pulses to the cells: we found that the train of pulses increases the permeability of plasma membrane of cells. Longer pulse trains cause higher plasma membrane permeabilization, resulting in higher propidium iodide fluorescence intensity in cells.
	Šifra		F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Objavljeno v		BATISTA NAPOTNIK, T., REBERŠEK, M., VRTAČNIK, D., AMON, S., MIKLAVČIČ, D. High-voltage nanosecond electrical pulses affect plasma membrane of cultured cells. V: SERŠA, G. (ur.), KOS, J. (ur.), LAH TURNŠEK, T. (ur.), KRANJC, S. (ur.), JEVNIKAR, Z. (ur.), OBERMAJER, N. (ur.). 5th Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska gora, Slovenia, March, 26-30, 2008. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2008, 83.
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		6443348
5.	Naslov	SLO	Učinki nanosekundnih, visokonapetostnih električnih pulzov na mitohondrije
		ANG	Effects of nanosecond, high-voltage electric pulses on mitochondria
	Opis	SLO	Visokonapetostni nanosekundni električni pulzi učinkujejo na notranje membrane v celicah in v določenih primerih sprožajo apoptozo. Mitohondriji igrajo pomembno vlogo pri apoptozi, saj se pri tem iz njih sproščajo številne molekule, ki vodijo apoptozo. Na srečanju smo predstavili rezultate študije vplivov nanosekundnih električnih pulzov na mitohondrije. Z uporabo fluorescenčne mikroskopije smo ugotovili, da ti pulzi povzročajo permeabilizacijo mitohondrijskih membran. Za permeabilizacijo plazemske membrane pa je potrebno celicam dovesti večje število pulzov kot za mitohondrije.
		ANG	High-voltage, nanosecond electric pulses affect internal membranes in cells and in some cases induce apoptosis. Mitochondria play an important role in apoptosis, because during apoptosis, numerous molecules that are involved in apoptosis are released from the mitochondria. At the meeting, we presented results of the study on effects of nanosecond electric pulses on mitochondria. Using fluorescent microscopy, we found that these pulses cause permeabilization of mitochondrial membranes. Plasma membrane

		permeabilization requires larger number of pulses than for mitochondrial membranes.
Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
Objavljeno v	WU, Y.-H., BATISTA NAPOTNIK, T., GUNDERSEN, M.A., MIKLAVČIČ, D., VERNIER, P.T. Intracellular effects of nanosecond, high field electrical pulses. V: Biophysical Society, 54rd Annual Meeting, February 20-24 2010, San Francisco, California. Abstract CD. Rockville Pike: Biophysical Society, 2010, cop. 2009, 1	
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
COBISS.SI-ID	7590484	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

F.03 večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
F.05 sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

S postavitvijo sistema nsEP je omogočeno pionirsko delo s tehnologijo, ki je nova tako v Sloveniji kot tudi v Evropi. Rezultati so dali jasnejši vpogled v delovanje same metode in odkrili nove možnosti aplikacij tako v biotehnologiji kot tudi v biomedicini. Prav tako so prispevali k razjasnitvi mehanizmov elektroporacije bioloških membran.

ANG

A new system for nsEP generation that was designed in our research group can enable us to perform a pioneering work with this new technology that is new both in Slovenia and in Europe. The results provide a clearer insight into the method itself and discover new opportunities for applications in biotechnology and biomedicine. They also contribute to clarifying the mechanisms of electroporation of biological membranes.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Metoda nsEP je zanimiva tudi za aplikacije v biotehnologiji in biomedicini, vključno s kliniko, saj že danes vemo, da ima velik potencial za nove pristope k zdravljenju (npr. raka, preoblikovanju tkiv in celjenju ran). Razvoj sistema nsEP bi lahko omogočilo novo sodelovanje z Onkološkim inštitutom v Ljubljani, s katerim naša raziskovalna skupina uspešno sodeluje že vrsto let. Metoda poracije endocitotskih veziklov je kot potencialna metoda vnašanja snovi v celico zanimiva za mnoge raziskovalne skupine s področja biomedicine, biokemije in biotehnologije, s katerimi sodelujemo že zdaj oziroma bomo sodelovali v prihodnosti (Onkološki inštitut, Inštitut Jožef Stefan, Biotehnična fakulteta). Infrastrukturni center Celična elektrotehnika, ki deluje v okviru Laboratorija za biokibernetiko na FE, UL, in je del Mreže raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRIC UL), se tako lahko postavi ob bok redkim centrom v svetu, ki imajo na voljo tehnologijo in znanje za opazovanje vpliva nsEP na celice in celične organele.

ANG

nsEP method can be used for applications in biotechnology and biomedicine, including the clinic, as we know today that it has great potential for new approaches to treatment (eg treating cancer, tissue remodelling and wound healing). Developing the nsEP system can lead to a new partnership with the Institute of Oncology in Ljubljana, with which our research group has cooperated successfully for many years. A method of endocytotic vesicle poration as a potential method for introducing various substances into the cells can be of interest to many research groups in the field of biomedicine, biochemistry and biotechnology, that we are curenly colaborating with or are we going to do so in the future (Institute of Oncology, Institute Jožef Stefan, Biotechnical Faculty). Infrastructural Center Cellular Electrical Engineering, which operates in the Laboratory of Biocybernetics, at Faculty for Electrical Engineering, and is a part of The Network of Infrastructural Centers at the University of Ljubljana (MRIC UL), can thus be placed alongside the few centers in the world that have a technology and knowledge to observe effects of nsEP on cells and organelles.

10. Samo za aplikativne projekte!

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/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

--

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	

G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki[11](#)

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

Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Damijan Miklavčič	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

14.4.2010

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/29

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 β 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 Sifrantu 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 Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

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

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2010 v1.00a

D3-96-CE-A3-9D-0A-69-F8-C9-84-62-B3-02-6A-B2-AE-5D-F5-D1-B9