

Zárójelentés

Analysis of interactions between inflammatory and vasoregulatory pathways in chronic heart failure: application of logical analysis of data, a novel data-mining tool

OTKA NF 72689

A pályázat során vállalt feladatokat időarányosan teljesítettük a kutatók terv szerinti közreműködésével, lényeges eltérés sem a munkatervtől sem a költségvetéstől nem volt. A teljes kutatási időszakra vonatkozó szakmai feladatok teljesítését az alábbiakban a munkatervben kitűzött célok szerinti bontásban adjuk meg:

Objective 1. Tasks 1-3

A SNP Stream rendszer összeállításához kiválasztottunk kutatásaink szempontjából 60 releváns gént és elvégeztük a génekben található nukleotidcserék annotálását. A kandidáns SNP-k kiválogatása során figyelembe vettük a prediktált/kísérletesen igazolt funkcionális hatást, korábbi asszociáció/kohorsz vizsgálatok eredményeit, a minor allél frekvenciát, az SNP környezetének szekvenciáját és kapcsoltági viszonyait. Kb. 150-200 SNP kiválogatása után a multiplex PCR rendszer tervezése során alakult ki a végső, 2*48-as panel összetétele.

A 96-lyukú plate-es rendszer nem elérhető a SNP Stream platformon, így a rendszer kipróbálására és validálására egy kollaboráció keretében került sor, melynek célja a major histocompatibility régióban illetve az azzal szomszédos szagló receptor gének klaszterében található, dohányzásra hajlamosító SNP-k és az ún. 8.1. ősi haplotípus azonosítása volt. Az adott kromoszóma régió valamint néhány kontroll lokusz analízisével két, 48 SNP-t tartalmazó panelt állítottunk össze, ezek felhasználásával egy 348-lyukú plate-en 170 CHF-es és 208 pneumonia eredetű szepszises beteget valamint kontroll személyt vizsgáltunk. A két panelben 8-8 SNP genotipizálása nem volt értékelhető (16,67%) valamint néhány SNP esetében egy-egy genotípust nem lehetett egyértelműen megállapítani (sikertelen: 1,21%). A SNP Stream rendszer validálására több SNP genotipizálását hagyományos módszerekkel (PCR-RFLP és real-time PCR) is elvégeztük, a genotípusok minden esetben megegyeztek (100% azonosság). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a SNP Stream rendszer megbízhatóan alkalmazható nagy mintaszámú beteganyag vizsgálatára, azonban a projektben vállalt 2*48 SNP beválogatásánál illetve a primerek/próbák tervezésénél szigorúbb kritériumrendszer alkalmazására volt szükség a sikertelen SNP-k arányának minimalizálására.

A LAD programmal végzett analízisek eredményeit figyelembe véve (ld. 1. táblázat) további génekkel bővítettük a szívélgtelenségben bekövetkező halálozás szempontjából releváns fehérjéket kódoló gének listáját. A Genomic Variation adatbázis (<http://projects.tcag.ca/variation/>) alapján kizártuk azokat a régiókat, amelyek esetében 5%-nál magasabb a kópiaszám variációk előfordulási gyakorisága a kaukázusi populációban. Elvégeztük a közel 80 kandidáns gén és nukleotidcserék annotálását, a kísérletesen igazolt vagy prediktáló programok (<http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>, http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/pages/input_CandidateGeneSearch.jsp, <http://compbio.utmem.edu/miRSNP/>, stb.) eredményei alapján valószínűsíthetően funkcionális SNP-k kigyűjtését, valamint feldolgoztuk a nemzetközi irodalomban megjelent, a kiválasztott gének polimorfizmusait vizsgáló asszociációs és kohorsz vizsgálatok eredményeit. A projektben elérhető mintaszámot figyelembe véve az analizálandó SNP-k kiválogatása során 5%-nál húztuk meg a minor allél frekvencia minimumát. A betegszám maximalizálására azon betegek esetében, akiknél a korábban izolált DNS minta nem volt megfelelő töménységű vagy a SNPStream platform kipróbálása során nem bizonyult megfelelő minőségűnek, újabb mintavétel és DNS izolálás történt.

A kiválasztott SNP-k genotipizálására a kanadai Genome Québec cégnél elérhető Sequenom iPlex Gold technológiát választottuk. A genetikai analízisek elvégzésére 2010-ben sor került, az adatok folyamatos feldolgozása mellett (mely még jelenleg is tart) a következő megfigyeléseket tettük az 'Objective 1, Task 1-3'-ben nyert eredmények alapján a pályázat lezárultáig:

Az 5 SNP szimultán meghatározásával majd haplotípus elemzéssel megállapított 8.1-es ősi MHC haplotípus kapcsolatot mutatott pneumonia eredetű szepszisben enyhébb klinikai lefolyással, védelemmel szeptikus sokkal szemben(1).

Pneumónia eredetű szepszisben a fibrinolízis folyamatának fontos regulátora, az akut fázis fehérjék közé tartozó plazminogén-aktivátor inhibitor aktivitásának meghatározó allélikus variációja, a 4G/5G

polimorfizmus 4G allél hordozása a betegség súlyosabb lefolyásával, szeptikus sokk kialakulásával és többszervi elégtelenég fellépésével mutatott kapcsolatot(2).

Ezekről az eredményekről több konferencia prezentáció is született (ld. feltöltött listán).

A fenti feladatok kivitelezésében a terveknek megfelelően Szilágyi Ágnes, Aladzsity István és Szalai Csaba vettek részt, génszám meghatározást végzett Bánlaki Zsófia, az adatok feldolgozásában a korábban felveendő kutatóként jelzett kutató, Borgulya Gábor, Holeczky Rudolfné, Füst György és a témavezető vettek részt, valamint együttműködő klinikai partner volt Madách Krisztina (Semmelweis Egyetem, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika) a szepszises beteganyag vizsgálatában. A vizsgálatok eredményei alapján két PhD dolgozat (Madách Krisztina és Aladzsity István) készült, a védések 2012-ben várhatók.

Task 1.4: A betegek kiindulási mintáiban sikeresen megtörténtek a tervezett biomarker mérések. A komplementfehérjék és aktivációs markereinek mérését saját laborunkban valósítottuk meg, míg a vazóaktív peptid hormonok (arginin-vazopresszin, endothelin-1, atrialis natriuretikus peptid, adrenomedullin) szintjét a BRAHMS céggel való kollaborációban, Berlinben mértük meg. További biomarker meghatározások is történtek a pályázat időtartama alatt, melyek kiválasztására a menet közben felismert LAD-mintázatok adtak útmutatást, ezek alapvetően az endothelsejt-aktivációs markerek csoportjaiból kerültek ki (szolubilis E-selectin, von-Willebrand factor, von-Willebrand factor hasító proteáz ADAMTS13). A mérések kivitelezésében a terveknek megfelelően Varga Lilian vezetésével került sor, melyben részt vettek Szigeti Antalné, Kókai Márta, Czúcz Judit, Makó Veronika, Cervenak László, valamint az értékelésben a témavezető. A biomarkerekkel kapcsolatos elemzések eredményeit és a publikációk ismertetését ld. Objective 3.

Task 1.5. A krónikus szívelégtelenség vizsgálatba 195 beteget vontunk be, és 2008 augusztusáig az utolsó beteg esetében is eltelt legalább 1 év a bevonáshoz képest. Sikert mind a 195 beteg állapotáról adatot nyernünk személyes vizit, telefon, hozzátartozók vagy kórházi adatbázis lekérdezése után. Az egy éves követés alatt 47 beteg hunyt el, ami megfelel a szívelégtelenségben várható mortalitásnak. A betegek követési adatait és a biomarker meghatározásait adatbázisba rendeztük, és megtörtént a biológiai non-szensz értékek és outlierek utánvizsgálata. Kialakult így a további statisztikai és bioinformatikai elemzés alapját képező, a prospektív adatokat és a klinikai+biomarker adatokat is tartalmazó CHF adatbázis.

Objective 2. Task 2.1: A LAD program továbbfejlesztett verziójának elkészítését a tervezett időhatáron belül elvégezte Csizmadia Zsolt és ellenőrizte Vizvári Béla (ELTE Operáció Kutatási Tanszék). A fejlesztett program segítségével előre beállított paraméterek szerint több futás is generálható automatikusan, és az adatok kinyerése táblázatos formában lehetséges. A LAD algoritmus fejlesztői a szoftvert további fejlesztés, felhasználás és esetleges értékesítés céljából átadták a 4DSoft Kft-nek.

Pályázatunkban a futási eredmények közül a legjobb paramétereket mutató patterneket táblázatosan összefoglaltuk és értékeltük, majd tovább elemeztük a 2.2 task-ban.

Task 2.2-2.3: A krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek adatbázisát (ld. Task 1.4., 1.5) elemeztük a LAD algoritmussal, amely alkalmas a matematikai validálás kivitelezésére (k-folding) is. A követési időszakot túlélte betegeket helyeztük a 0 oldalra, míg az elhunyt betegeket az 1 oldalra. Külön futásokban olyan változó-kombinációkat (pattern) kerestünk a 0 és az 1 oldalakra, melyek lehetőleg kellően nagy homogenitással (specifitással) és prevalenciával (szenzitivitással) jellemzik az érintett betegeket. A 0 oldalra 33 futás eredményét találtuk értékesnek és feldolgozásra hasznosnak, melyekkel 13999 pattern-t generáltunk. A legalább 10%-ban megjelenő változókat a következők voltak: ADAMTS13/vWF, Adrenomedullin, NT-proBNP, Arg-vasopressin, CN, creatinin, GFR, Diasztolés vérnyomás, CPK, RDW. Az 1 oldalra 21 futás eredményét analizáltuk részletesen, melyekkel 14526 pattern-t generáltunk. A leggyakrabban előforduló változók a következők voltak: A2-Acid glikoproteín, ADAMTS13/vWF, Adrenomedullin, NT-proBNP, Arg-vasopressin, CN, creatinin, GFR, Diasztolés vérnyomás, TNF-receptor II, RDW, komplement paraméterek. A futási eredményekkel megállapítottuk, melyek a leggyakoribb változók és változó kombinációk, melyek a szívelégtelenségben bekövetkező halálozás szempontjából befolyásosak.

A táblázatban (ld. 1-es táblázat) a patternekből leggyakrabban előforduló biomarkereket tüntettük fel, bemutatva a további (in vitro validálás) kiválasztáshoz alkalmazott szempontokat is.

1. Táblázat: A LAD analízis során feltárt, kiemelkedő prediktív értékkel rendelkező biomarkerek egyes tulajdonságai, az in vitro validálás szempontjai

A változó neve	A változó típusa	Fontossága a 0 oldalon	Fontossága az 1 oldalon	Vizsgálható in vitro?
A2-Acid glikoprotein	Gyulladásos marker		++	Igen
ADAMTS13/vWF	Endothel sérülés	++	++	Igen
Adrenomedullin	Vazoaktív és gyulladásos marker	++	++	Igen
NT-proBNP	Vazoaktív peptid	++	++	Igen
Arg-vasopressin	Vazoaktív peptid		+	Igen
CN, creatinin, GFR	Veseelégtelenség	++	++	Igen
Diasztolés vérnyomás	Szív pumpa funkció markere	++	+	Nem, állapotjelző
Creatinin foszfokináz	Izomtömeg markere, éhezési jelzője	+		Igen
TNF-receptor II	Gyulladásos marker		+	Igen
Red cell distribution width	Tápláltság, gyulladás, anémia markere	++	+	Nem, integrált állapotjelző
Komplement C3	Gyulladásos marker		+	Igen
Komplement C3a	Gyulladásos marker, komplement aktiváció		+	Igen

Hipotézisünknek és a klinikai tapasztalatnak megfelelően legtöbb esetben eltérő útvonalak kombinálódása (gyulladás, vazoreguláció, veseelégtelenség, alultápláltság, anémia) mutatkozott meg a patternekből.

A további biológiai validáláshoz olyan modelleket választottunk ki, amelyek a CHF kimenetelének (súlyosbodás, halál) jó prediktor kombinációjának bizonyultak az elsődleges analízis során. Ezen eredmények és kiterjedt irodalomkutatás alapján kiválasztottunk 5 olyan biomarkert (a1-savas glikoprotein (orozomukoid), arginin-vasopresszin, komplement C3a, kreatinin és urea), amelyek más-más szerv működését tükrözhetik, és az irodalom szerint önmagukban hatnak az endotélsejtekre. Ezen molekulák további vizsgálatára került sor az in vitro modellkísérletekben (ld. Objective 4)

Objective 3, Task 3.1-3.3

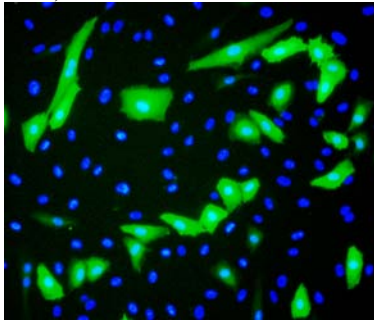
Megtörtént a CHF adatbázis részletes statisztikai elemzése, és több kéziratban és konferencián is beszámoltunk annak eredményeiről. Analízisünk során új, innovatív és potenciálisan üzletileg is hasznosítható megfigyeléseket tettünk egyes biomarkerek vonatkozásában, így szabadalmi bejelentést nyújtottunk be a tárgykörben. Megtörtént a LAD modellek elemzése és kalibrálása, mely eredmények felhasználásra kerültek az in vitro kísérletek (ld. Objective 4) tervezésekor.

Az ebben a feladatban vállalt kísérletek eredményei alapján a következő megfigyeléseket tettük: Potens, súlyosságtól és alap klinikai kovariánsoktól független biomarkereket határoztunk meg a szívelégtelenség kedvezőtlen klinikai kimenetelének előrejelzésére, melyek a következők: vörösvértest-szélesség eloszlás, adrenomedullin(3), endothelin 1(3), ADAMTS13 proteáz aktivitás és VWF szint(4), szolubilis E-Selectin(5), NT-proBNP(5). A LAD feldolgozás alapját képező adatbázis elemzésével egy további, új és potenciálisan gazdaságilag hasznosítható markert találtunk (komplement C3a). Ezt a megfigyelésünket szabadalmi bejelentés tárgyává tettük, emiatt a publikálást posztponáltuk. A magyar bejelentés (2009) később PCT fázisba is került (2010), a kézirat összeállítás 2011-ben befejeződött (Gombos et al: Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure), és 2012 elején a Clinical Research in Cardiology c. szaklapnál (kedvező kritikákat kapva) a végső döntés előtt áll. A szabadalom licenciába adásával kapcsolatosan számos lépést tettek a feltalálók közösen a Semmelweis Innováció Kft-vel, erről részletes beszámolót mellékletként csatolunk a beszámolóhoz.

A vállalt klinikai vizsgálaton felül 3 kapcsolódó klinikai vizsgálat kivitelezésével (sepsis, preeclampsia és kolorektális carcinoma) is foglalkoztunk, melyek eredményei és az azokat tartalmazó adatbázisok a LAD algoritmus további teszteléséhez lehetnek alkalmasak. Ezekről a meghatározásokról szintén beszámoltunk szaklapokban és konferenciákon(6-11). Lényegesnek tartjuk

ezeket a „követő” klinikai vizsgálatokat, hogy kezünkben legyenek olyan vizsgálatra alkalmas adatbázisok, melyek a jövőben tesztelésre alkalmasak további fejlesztések esetén. Biomarkerekkel kapcsolatos eredményeink alapján összefoglaló cikkek írására is sor került a támogatási időszakban(12, 13).

Objective 4. Task 4.1: A HUVEC sejtek transzfekciós hatékonysága az irodalom szerint alacsony. Ezért első célunk az volt, hogy összehasonlítsunk és optimalizáljunk különböző transzfekciós protokollokat. A könnyű követhetőség érdekében EGFP génkonstrukciót tartalmazó pcDNA3 vektort alkalmaztunk, amelyet különböző technikákkal juttattunk be a sejtekbe. Ezek a polietilén imin- (PEI), a $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, valamint több liposzómaalapú (Superfect - Qiagen, GeneJammer - Stratagene, Lipofectin, Lipofectamine és Lipofectamin 2000 - Invitrogen) módszerek voltak. E módszerek közül csak a PEI és a Lipofectamine eredményezett EGFP pozitív transzfektánsokat. PEI-vel kevésbé hatékonyan lehetett transzfektálni (rendszerint 3% alatti hatékonyság), míg Lipofectamine-nal elértük az 5-10%-ot is. Minthogy a normális endotélsejt működéséhez elengedhetetlen a sejt-sejt kapcsolatok kialakulása, és ez alacsony konfluenciánál alig alakul ki, ezért fontos minél jobb kezdeti hatékonyság elérése, hogy a szelekció során is végig megmaradjanak (legalább részben) a sejt-sejt kapcsolatok. A transzfekciós hatékonyság növelése érdekében a Lipofectamine-os módszerünket továbbfejlesztettük Plus reagens (Invitrogen) alkalmazásával, így végül 15-20%-os hatékonyságot is el tudtunk érni (1. ábra).

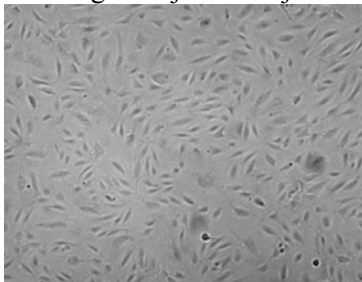


1. ábra Az endotélsejteket Hoechst 33342 magfestékkel festettük két nappal a transzfekció után. A transzfektáns sejtek az eGFP zöld fluoreszcenciája alapján jól

Az immortalizálás több módon is megvalósítható. Néhány protokoll virális gének bevitelével (mint pl. az SV40 T Ag-je) tartja a sejteket a sejtciklusban. A mi elsődleges célunk azonban az volt, hogy a létrehozott immortalizált endotélsejtek tulajdonságai a lehető legközelebb legyenek a normális endotélsejtekéhez, így kerültük a virális gének bevitelét, és csak a humán telomeráz (hTERT) konstrukció használatára szorítkoztunk. Ennek érdekében

Lipofectamine/Plus reagens segítségével pCI-neo-hEST2 vektort (Addgene) juttattunk HUVEC sejtekbe. Annak ellenére, hogy a transzfekciós protokoll az EGFP-ével megegyezett (tehát okunk volt feltételezni, hogy itt is 15-20%-os hatékonyságot értünk el), nagyon kevés sejt élte túl a G418 antibiotikus szelekciót. A szelekció után az immortalizált endotélsejteket (IEC) alacsony dóziszú G418-ban tartottuk, hogy megelőzzük a hTERT gén elvesztését. Végül 4 IEC vonalat hoztunk létre, amelyeket több hónapig fenntartottunk és részletesen karakterizáltunk.

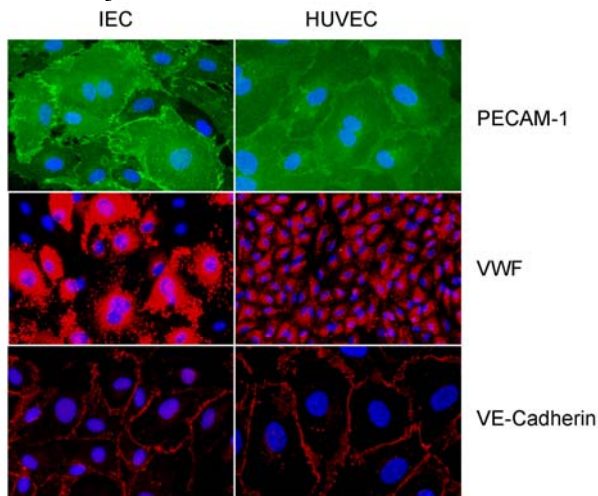
A karakterizálás kiterjedt a növekedési tulajdonságok elemzésére, sejtfelszíni molekulák és szignalizációs utak vizsgálatára, valamint a folyékony nitrogénben történő tárolhatóság vizsgálatára. Az IEC-k a HUVEC-re jellemző „kockakö” morfológiájú sejtek (2. ábra). Habár az endotélsejtekre jellemző markerek expressziós mintázatában nem találtunk lényeges különbséget (3. ábra), az IL-1 β kisebb mértékben okozott endotélsejt aktivációt IEC sejtekben, mint HUVEC-ben. Ezt az E-Szelektin expresszió sejt ELISA módszerrel történő vizsgálatával (4. ábra) és NF κ B nukleáris transzlokációs vizsgálattal is igazoltuk. Ezen kívül kimértük, hogy az IEC sejtek jóval lassabban osztódnak, mint a HUVEC sejtek, ami jelentős hátrányt jelent, hiszen az IEC bevezetésének egyik fő oka, hogy szinte korlátlan hozzáférésünk legyen az endotélsejtekhez. Végezetül a sejtek folyékony nitrogénben történő lefagyasztása, és az ezt követő felolvasztás (több protokollt és fagyasztó médiumot is kipróbálva) jelentősen csökkentette az életképességet. Így nem láttuk biztosítottak a sejtek biztonságos tárolását, ami megkérdőjelezné a jövőbeni kísérletek reprodukálhatóságát.



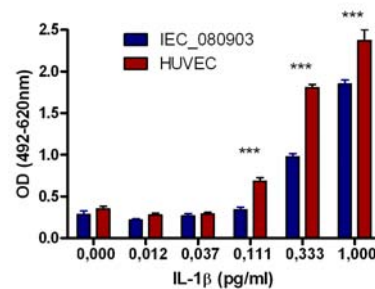
2. ábra. Az IEC-k Relief Contrast technológiával készült fényképe 14 nappal a szelekció után.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy bár sikerült létrehoznunk több IEC vonalat, a fent említett okok miatt jobbnak ítéltük a hagyományos, arany standardnak minősülő HUVEC használatát. Hogy kiküszöböljük a HUVEC preparálásához szükséges köldökzsinórok

beszerzéséből adódó bizonytalanságot, kidolgoztunk egy protokollt, ami lehetővé teszi a Kutatólabor számára, hogy a Kútvolgyi Klinikai Tömbben működő Szülészeti részlegről és az I. Sz. Szülészeti Klinikától jóval több köldökzsinórt kaphasson, és így biztosítsa a projekthez szükséges endotélsejteket.



3. ábra. Az IEC és a HUVEC sejtek fenotípusos összehasonlítása PECAM-1-, von Willebrand faktor (VWF)- és VE-Cadherin expresszió alapján.



4. ábra. A sejteket különböző dóziszú IL-1β-val kezeltük, majd meghatároztuk az E-Szelektin expressziót sejtes ELISA módszerrel. Jól megfigyelhető az IEC és a HUVEC közötti szignifikáns különbség a válaszképességben magasabb IL-1β dózisoknál.

Task 4.2 -4.4: Sikerült beállítanunk egy olyan sejtes ELISA módszert, amely az ICAM-1 adhíziós molekula expresszióját méri. Ismert ICAM-1 expressziót növelő faktorokkal (IL-1b, LPS) igazoltuk, hogy a dóziszfüggő hatás jól mérhető rendszerünkben(14), ami a 96-lyukú sejtenyésző lemez formátum miatt alkalmas lehet az 5 biomarker kombinatorikus tesztelésére. Az endotélsejtek proinflammatorikus indukcióját tudjuk mérni az IL-8 és MCP-1 ELISA segítségével is, amit szintén IL-1b, LPS kalibrációval ellenőriztünk. A koagulációs út szabályozásának vizsgálatára PAI-1 ELISA módszert állítottunk be.

Meghatároztuk a kiválasztott anyagok, biomarkerek (α1-savas glikoprotein (orozomukoid), arginin-vazopresszin, komplement C3a, kreatinin és urea) citotoxicitási értékét endotélsejtekre. Egyik biomarker sem volt toxikus abban a koncentrációtartományban, amelyet a további kísérleteinkben használtunk. Ezután IL-8 és MCP-1 citokinek, valamint ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 adhíziós molekulák expresszióját vizsgáltuk a fenti markerek összes lehetséges kombinációjában. Vizsgálataink során nem sikerült kimutatnunk semmilyen változást a HUVEC sejtek alap, valamint a TNF-α aktiválta citokintermelésében és adhíziós molekula mintázatában az anyagok bármely kombinációban történő alkalmazásakor sem.

Ennek több oka lehet, egyrészt lehetséges, hogy a vizsgált anyagok csak biomarkerek, és nincsenek direkt összefüggésben az endotél diszfunkcióval vagy más biológiai hatásokkal bírnak, és nem az endotél sejtek működésének befolyásolásán keresztül fejtik ki biológiai funkciójukat. Másrészt lehet hogy a modellünk valamelyik része nem alkalmas az összefüggés kimutatására. Az köztudott, hogy nagyfokú különbségek vannak a különböző eredetű endotél sejtek között, így lehetséges, hogy valamilyen más, nem HUVEC sejttel kimutatható lenne a kezeléseket endotél funkciót befolyásoló hatása. Az is felmerült, hogy a vizsgált kimeneteli jelek változtatásával, pl a gyulladásos markerek helyett, a trombózisra való hajlamot, a vazomotorikus szabályozásának vagy az érszerveződés szabályozásának elemeit vizsgálva fényt deríthetnénk a direkt kapcsolatra az endotél diszfunkció és a LAD analízissel talált 5 biomarker között. Valamint, mivel ebben a rendszerben csak a mintázatokban

5 leggyakrabban előforduló változó hatását vizsgáltuk meg, és akadtak más, hasonlóan gyakran szereplő változók is, így lehet hogy más anyagok bevonásával, szerezhethetnénk információt az endotél diszfunkciót befolyásoló mechanizmusokról. Az elvégzett biológiai validálási kísérletekről 2011-ben számoltunk be (15).

Az Objective 4, Task 4.1 – 4.4 kivitelezésében résztvevő kutatók voltak: Cervenak László, Csuka Dorottya, Jani Péter Károly, Makó Veronika, Kajdácsi Erika, Schaffer Gyula.

Task 4.5. A LAD analízis során kiválasztott prediktív biomarkerekkel kapcsolatban nem merült fel további immunoassay beállítására igény, tekintettel arra, hogy minden tervezett mérést kereskedelembe kapható reagenskészlettel el tudtunk végezni.

Task 4.6. Hagyományos molekuláris biológiai technikák alkalmazásával validáltuk a PAI-1 4G/5G polimorfizmus és a 8.1-es ősi haplotípust felépítő SNP-k és egyes klinikai fenotípusok közötti kapcsolatot. A szívelégtelenségben szenvedő betegeken kívül a további klinikai állapotokban (súlyos szepszis, coloproctalis carcinoma) is kimutattott a fenti genetikai variációk klinikai összefüggéseit(1, 2). A kísérletek kivitelezésében Aladzsity István, Bánlaki Zsófia és Szilágyi Ágnes vettek részt.

Hivatkozások:

1. Aladzsity I, Madach K, Szilágyi A, Gal J, Penzes I, Prohaszka Z, et al. Analysis of the 8.1 ancestral MHC haplotype in severe, pneumonia-related sepsis. *Clin Immunol.* 2011;139(3):282-9. Epub 2011/03/19.
2. Madach K, Aladzsity I, Szilágyi A, Fust G, Gal J, Penzes I, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Crit Care.* 2010;14(2):R79.
3. Gombos T, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Wallentin S, Papassotiriou J, Kunde J, et al. Adrenomedullin and endothelin-1 are related to inflammation in chronic heart failure. *Inflamm Res.* 2009;58(6):298-305.
4. Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Harsfalvi J, et al. Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost.* 2009;102(3):573-80.
5. Czucz J, Cervenak L, Forhecz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, et al. Serum soluble E-selectin and NT-proBNP levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2011.
6. Kocsis J, Madaras B, Toth EK, Fust G, Prohaszka Z. Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15(2):143-51.
7. Kocsis J, Meszaros T, Madaras B, Toth EK, Kamondi S, Gal P, et al. High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16(1):49-55.
8. Molvarec A, Derzsy Z, Kocsis J, Boze T, Nagy B, Balogh K, et al. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(5):491-8.
9. Molvarec A, Rigo J, Jr., Boze T, Derzsy Z, Cervenak L, Mako V, et al. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost.* 2009;101(2):305-11.
10. Molvarec A, Rigo J, Jr., Lazar L, Balogh K, Mako V, Cervenak L, et al. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(2):151-9.

11. Tamasi L, Bohacs A, Tamasi V, Stenczer B, Prohaszka Z, Rigo J, Jr., et al. Increased circulating heat shock protein 70 levels in pregnant asthmatics. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15(3):295-300.
12. Girardi G, Prohaszka Z, Bulla R, Tedesco F, Scherjon S. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Mol Immunol*. 2011;48(14):1621-30. Epub 2011/05/24.
13. Szeplaki G, Varga L, Fust G, Prohaszka Z. Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2784-93.
14. Megyeri M, Mako V, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohaszka Z, Cervenak L, et al. Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol*. 2009;183(5):3409-16.
15. Kajdáci E, Jani Péter Károly, Cervenak László, Gombos Tímea, Prohaszka Zoltán. Logikai adatanalízis alkalmazásával azonosított prediktív biomarkerkombinációk szívelégtelenségben: in vitro validálás endothelsejt kultúrákban. *Immunológiai Szemle*, 2010(4): 56-, 2010

A cikkek feltöltése a REAL (MTAK) repozitóriumba megtörtént.



Záró beszámoló

2011. 11. 29.

Projekt neve: Szívelégtelenség előrejelző marker

Feltalálók: Prohászka Zoltán, Gombos Tímea, Förhécz Zsolt, Pozsonyi Zoltán, Jánoskúti Livia

Szabadalmi státusz:

Magyar szabadalmi bejelentés beadva 2009. augusztus 29-én

Bejelentés alapszáma: P0900534

PCT benyújtva 2010. augusztus 19-én.

Bejelentés alapszáma: **PCT/IB2010/053750**

Együttműködő felek: feltalálók és a Semmelweis Innováció Kft. (továbbiakban SI)

Az együttműködés célja: licenciába adás

Értékesítéssel kapcsolatos tevékenységek

A találmány értékesítésével (licenciába adás) kapcsolatban a következő cégekkel vettük fel a kapcsolatot:

1, **BRAHMS (Thermo-Fisher)**, Berlin, Németország

Tekintettel arra, hogy saját hasonló fejlesztésű biomarkereikre, melyeket ugyanabban a vizsgálati kohorszban mértünk meg, mint a találmány lényegét képező markert, majd adatelemzés és több forduló tárgyalás után a BRAHMS arra a következtetésre jutott, hogy nem kívánja licenciába venni a találmányt.

2, **Roche Diagnosztika** (Németország)

Megkeresésünkre a Roche érdeklődését fejezte ki, azonban a részletek megismerése után nem kívánta hasznosításba venni a találmányt.

3, **Quidel (USA)**

A találmány lényegét képező marker mérésére szolgáló eljárás legnagyobb piaci szereplője nem látott lehetőséget további kutatások és befektetések végzésére ezen a területen.

4, **Diagnosticum Zrt.** (Siemens Healthcare). Inkább a magasabb bekerülési árú, de kisebb kockázatú fejlesztések érdeklik.

További cégeket az European Enterprise Network adatbázison keresztül és a Medica ill. Biotechnika kiállításokon kerestünk meg, melyek felsorolásszerűen a következők voltak:

DCN Corp UK

GE Healthcare UK

Operon, Spanyolország

Axis-Shield, UK

DIAsource ImmunoAssays, Belgium

CorTAG GmbH. Dortmund, Németország

A*Star, Singapore

Protagen AG, Dortmund, Németország

Krishgen Biosystems, India

A tárgyalások lezárása a feltalálókkal közösen a PCT nemzeti fázisainak megindulása előtt történt meg. Tekintettel a licenciába adás sikertelenségére valamint arra, hogy aktuálisan a PCT további fenntartására ill. nemzeti fázisba való juttatására Egyetemi források nem állnak rendelkezésre, a találmányt lezártuk tekintjük, további ezzel kapcsolatos implementáció nem történik.

Lacza Zsombor, Prohászka Zoltán

2011-11-29