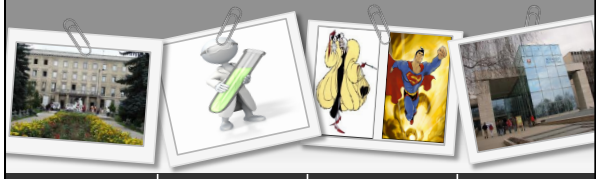
Áttekintés



1989	1993	2005 - 2010	2008 -
BAZ-megyei Kórház Központi Laboratórium	FMC Nephrológiai Központ	FMC Nephrológiai Központ	Miskolci Egyetem Egészségügyi Kar
ONKOHAEMATOLÓGIA	DIALÍZIS MODALITÁSOK TTV - HCV	eGFR ACR/PCR	NANOMEDICINA

Központi Laboratórium

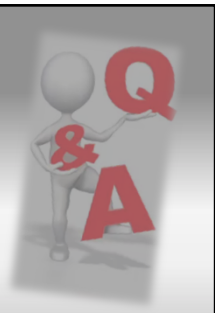
Rutin laboratóriumi diagnosztika

Regionális immunológiai vizsgálatok

- Celluláris
- Immunszerológia

Onkohaematológiai betegségek diagnosztikája

- Gyermekkori malignus haematológiai betegségek
- Felnőttkori laukaemiák immunfenotipizálása
- Flow cytometriai laboratórium rendszerbe állítása
- Flow cytometriai protokollok kidolgozása



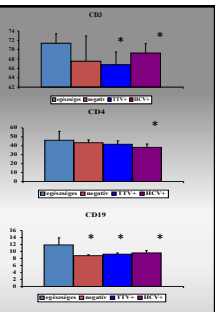
Simkó R, Nagy K, Tamáska J, Zsiros J, Hunyadi K, Velkey L, **Fodor B:** /Progression of cutan T cell lymphoma into leukaemia/ *Cutan T-sejtes lymphoma progressiója leukaemiába. Orvosi Hetilap, 1994;29:1595-1597*

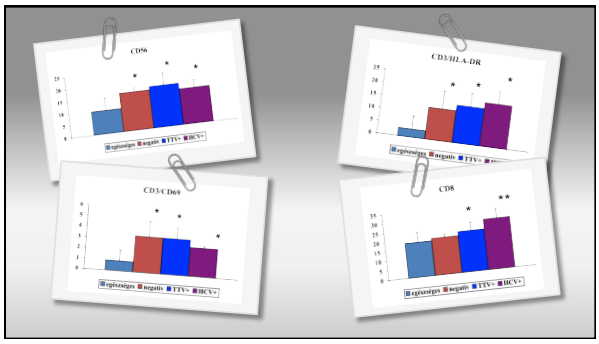
- Leukaemia immunfenotipizálási protokollok kidolgozása
- *A lymphoid rendszer vizsgálata a klinikai laboratóriumban (MTA MAB pályadíjas munka)*

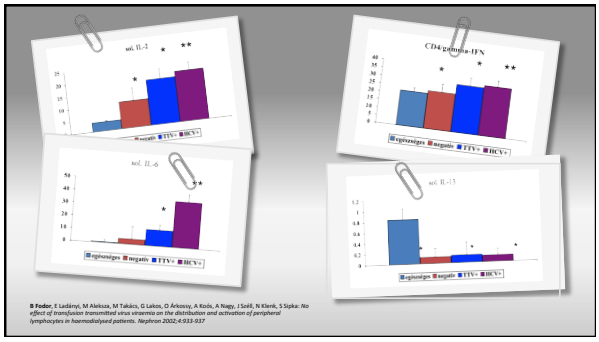
1

HCV és TTV hatásának vizsgálata

	n=	átlageletkor (év)	nem	HD tartama (hónap)	transzfúzió (E)
Egészséges	20	57,83±11,86	9 ffi/14 nő		
Virus neg. HD	17	59,65+11,96	7 ffi/10 nő	88	16
TTV+ HD	32	58,94+12,09	16 ffi/16 nő	83	25
HCV+ HD	23	54,96+15,5	9 ffi/14 nő	62	24



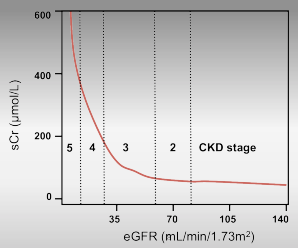




- A HCV jelentős további sejtaktivációt okoz HD betegekben. TTV esetében ez nem figyelhető meg.
- *Fodor et al: Nephron 2002; 4: 933-937*

2

Serum Creatinine
Hides Early Renal Damage



Adapted from D Newman

Problémák

Nem veseeredetű tényezők:
Nem, etnikum és életkor
Táplálkozás, diéta
Gyógyszerek (pl. cimetidin)
Izomtömeg

Klinikai vonatkozások:
CKD-ra vonatkozó rossz szenzitivitás
ARF-ben kevésbé használható
Izomtömeg vesztésével járó betegségek

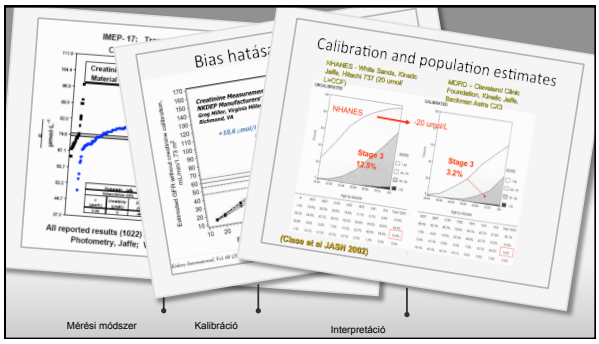
Analitikai problémák:
Biológiai variabilitás (4.3%)
Analitikai variabilitás (TE – 7.6%)
Nem specifikus
(pseudo-chromogenek)
Interferencia
(icterus/lipaemia/haemolysis)
JELENLEG NINCS NEMZETKÖZI STANDARDIZÁCIÓ

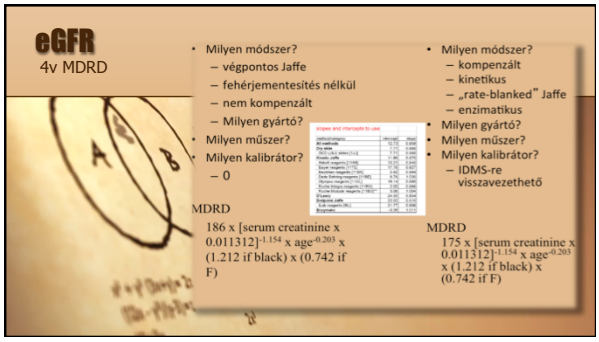
A szérum kreatinin nem megfelelő markere a vesefunkciónak

Reproduction courtesy of PE Stevens

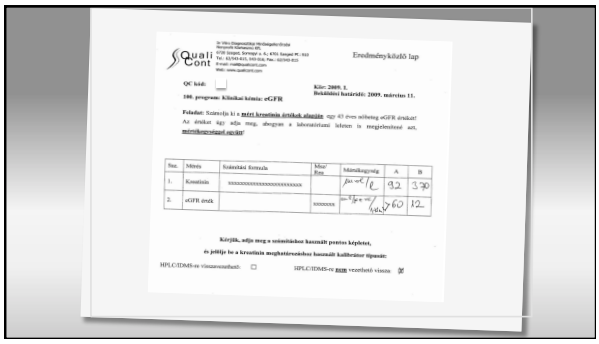
- **Életkor**
- **Nem**
- **Testsúly**
- **Izomtömeg**
- **Rassz**

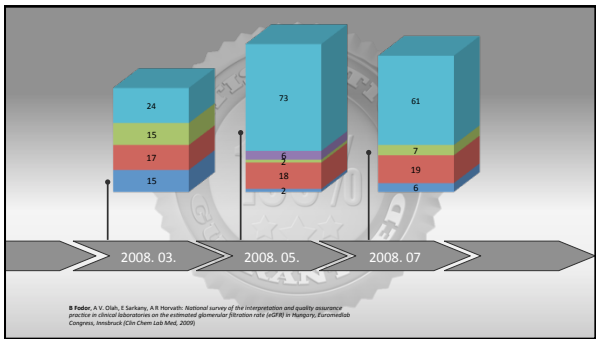
Se. Kreat.	**120 µmol/L**	=	**120 µmol/L**
GFR	**30 mL/min**	≠	**130 mL/min**

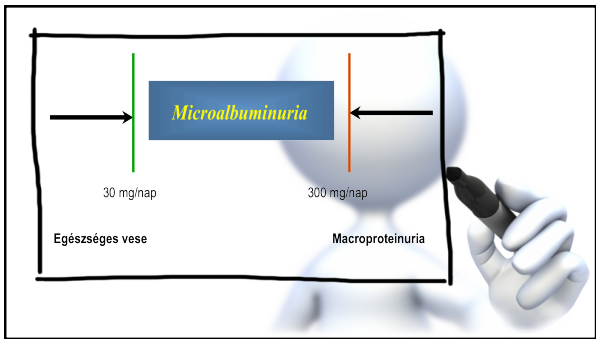


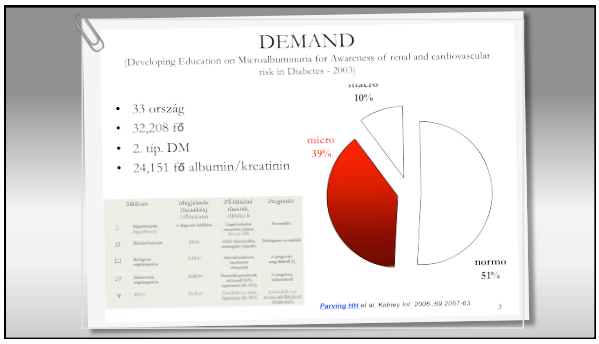

eGFR
4v MDRD
Milyen módszer?
– végpontos Jaffe
– fehérjementesítés nélkül
– nem kompenzált
– Milyen gyártó?
Milyen műszer?
Milyen kalibrátor?
– 0
MDRD
186 x [serum creatinine x 0.011312]-1.154 x age-0.203 x (1.212 if black) x (0.742 if F)
Milyen módszer?
– kompenzált
– kinetikus
– „rate-blanked" Jaffe
– enzimatikus
Milyen gyártó?
Milyen műszer?
Milyen kalibrátor?
– IDMS-re visszavezethető
MDRD
175 x [serum creatinine x 0.011312]-1.154 x age-0.203 x (1.212 if black) x (0.742 if F)

MAGYAR NEPHROLOGIAI TÁRSASÁG
A Magyar Nephrológiai Társaság (MANET) és a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság (MLDT) tájékoztatója a számított GFR bevezetéséről családorvosok és szakrendelések (diabetes, hypertonia, kardiológia, urológia) számára
B Fodor, A Szalai, É Kiss-Tóth, P Kosba, M Papp, E Kiss-Tóth, L Barkai.: Changing paradigm in the determination of serum creatinine and in glomerular filtration assaying. Laboratory Diagnostics, Laboratorno Diagnostika, 2011, 1-2:24-32
D Rácz, J Lapej, B Fodor, K Lepejova, P Jarčuška, A Kovácová: Pitfalls in the measurements and assessment of glomerular filtration rate and how to escape them. eJIFCC 2012; 23:1-8


Eredményközlő lap
QC kód:
Kiír: 2009. 1.
Beküldési határidő: 2009. március 11.
100. program: Klinikai kémia: eGFR
Feladat: Számítja ki a mért kreatinin értékek alapján egy 43 éves nőbeteg eGFR értékét!
Az értéket úgy adja meg, ahogyan a laboratóriumi leletben is megjelentetné azt, mértékegységgel együtt!
Sorszám
Mérés
Számítási formula
Mértékegység
A
B
1.
Kreatinin
xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
μmol/l
92
330
2.
eGFR érték
xxxxxxxx
ml/min
>60
12
Kérjük, adja meg a számításhoz használt pontos képletet, és jelölje be a kreatinin meghatározáshoz használt kalibrátor típusát:
HPLC/IDMS-re visszavezethető:
HPLC/IDMS-re nem vezethető vissza


24
15
17
15
73
6
2
18
2
61
7
19
6
2008. 03.
2008. 05.
2008. 07
B Fodor, A V. Oláh, E Sarkany, A R Horvath: National survey of the interpretation and quality assurance practice in clinical laboratories on the estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Hungary, Euromedlab Congress, Innsbruck (Clin Chem Lab Med, 2009)


Microalbuminuria
30 mg/nap
300 mg/nap
Egészséges vese
Macroproteinuria


DEMAND
(Developing Education on Microalbuminuria for Awareness of renal and cardiovascular risk in Diabetes - 2003)
33 ország
32,208 fő
2. tip. DM
24,151 fő albumin/kreatinin
macro
10%
micro
39%
normo
51%
Parving HH et al. Kidney Int. 2005 ;69:2057-63

Microalbuminuria – szisztémás keringési rendszer

- Steno hypothesis
  - Szisztémás vasculáris diszfunkció
    - albumin „szökés”
    - egyéb makromolekulák (LDL)
    - lokális gyulladás
    - atherosclerosis
  - Microvascularis nyomás ↑ -ET diszfunkció
    - ECM produkció ↑
    - kapilláris bazálmembrán vékonyodása
    - sclerosis
  - Macrovasculáris történések
    - szív adaptív balkamra hypertrophiája
    - megváltozott coronaria hemodinamia
    - secunder ischaemiás myocyta károsodás, stb.

ACR, PCR korrelációja a 24 órás gyűjtött vizelettel

ACR – 24 órás gyűjtött vizelet albumin (r=0,96, p<0.0001) (Chaiken RL, Khawaja R, Bard M et al. *Diabetes Care. 1997; 20(5):709-713.*, Gansevoort RT, Verhave JC, Hillege HL et al. *Kidney International - Supplement. 2005; 67(94):S28- S35.)*

PCR – 24 órás gyűjtött vizelet protein (r=0,932, p<0.0001) (Rodby RA, Rohde RD, Sharon Z et al.. *American Journal of Kidney Diseases. 1995; 26(6):904-909.*, Ruggenenti P, Gaspari F, Perna A et al.. *British Medical Journal. 1998;* 316(7130):504-509.)

Albuminuria/proteinuria interpretációja

	Vizelet tesztcsík	PCR mg/mmol	Vizelet összfehérje ürítés mg/24ó	ACR mg/mmol	Vizelet albumin ürítés mg/24 ó
Normális tartomány	negatív	< 15	< 150	< 2,5 (férfi) < 3,5 (nő)	< 30
Mikroalbuminuria	negatív „trace”	<15 15-45	<150 150-450	2,5-30 (férfi) 3,5-30 (nő)	30-300
Proteinuria (makroalbuminuria) jelentős nephrotikus	1+ 2+ 3+	> 45 >100 > 350	> 450 > 1000 > 3500	> 30 >70	> 300 >700

V. Oláh A, Mátyus J Sárkány E, Horváth A, **Fodor B** :New trends in the laboratory diagnosis of proteinuria and albuminuria/ Az újabb A proteinuria és albuminuria laboratóriumi diagnosztikájában. *Orvosi Hetilap, 2010:21;864-869*

- 4v MDRD eGFR implementálása
- eGFR körkontroll kialakítása, értékelése
- ACR/PCR implementálása

Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve A számított GFR (eGFR) bevezetéséről útmutató a háziorvosok és szakrendelések (diabetes, hypertonia, kardiológia, urológia) számára

3

Nanotechnológia

- A nanotechnológia egy olyan fogalom, amely számos különböző technológiát egyesít.
- Ezen technológiák közös jellemvonása, hogy extrém kis mérettartományban zajlanak – nano (törpe☺) nanométer, ami 10^{-9} m.
- A nanométer 10 egymás melletti hidrogén atom szélessége. Az emberi hajszál kb. 80.000 nanométer széles. A gombostű feje kb. 1 millió nm. A vvt átmérője átlagosan 7.000 nanométer.
- Nanométer mennyiség szükséges egy férfi szakállának növekedéséhez, hogy elérje a borotvát.

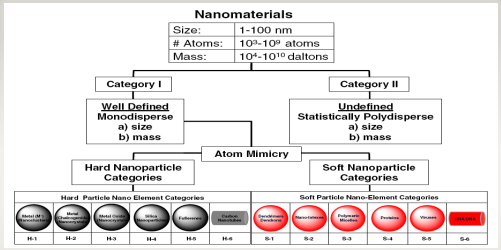
Nanomedicina

- A nanotechnológiai vívmányainak alkalmazása az elméleti és gyakorlati orvostudományokban:
  - a diagnózis megállapításában
  - a kezelésben
  - a megelőzésben
  - a betegségek lefolyásának követésében
  - és az orvosi kutatásokban
- Az életfolyamatok vizsgálata és/vagy gyógyítása nano-mérettartományú eszközökkel/gyógyszerekkel

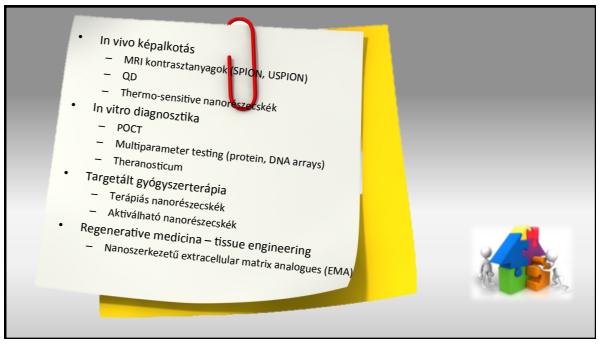
Néhány jellemző irány a nanomedicinális kutatásban

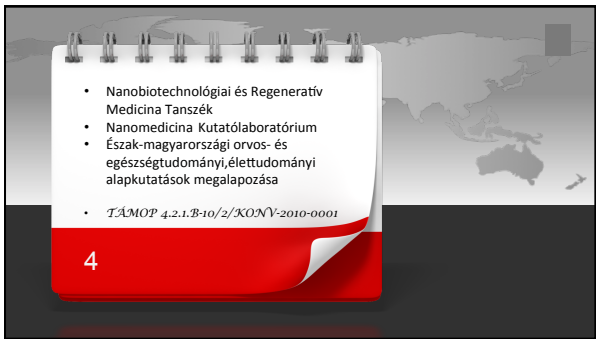
- Fő vonalak: cardiovascularis, fertőző betegségek, tumor, diabetes, izomdegeneráció, mentális betegségek
- Korai és pontos diagnózis– **Nanodiagnosztika** - bioszenzorok, nanomérettartományú eszközök (pl. glükóz monitor, etc.)
- **Irányított gyógyszerterápia** – beteg szövet, sejt megcélozása
- **Regenerativ medicina** – helyreállítás, magukat összeszerelő polimerek, implantátumok, etc.
- Etikai, jogi, szociális, toxicológiai kérdések!!

Nano-periódusos rendszer



Tomalia, 2009 J. Nanoparticle Research





1. Nanotoxicológia
2. Liposzomális készítményfejlesztés
   - Teranosticum (NSAID, SPIO, siRNA + microbubble)
   - SNAPL
   - LEH (*Bay Zoltán Közalap.*)
3. Regenerativ medicina

   (ACI, pancreas béta sejt)

Nanotoxiológiai vizsgálóeljárások

- Méret (DLS)
- Zéta potenciál
- Hőmérséklet függő stabilitás (DLS)
- pH
- Fehérvérsejt aktiváció (áramlási sejtanalízis – FACS)
  - Bazofil
  - Dendritikus sejtek
  - Komplementrendszer - immunkémia
  - (SC5b-C9, C5a)
- Haemostasis

Méret-meghatározás (DLS) nehézsége nanoanyagok esetén – hidrodinamikus radius

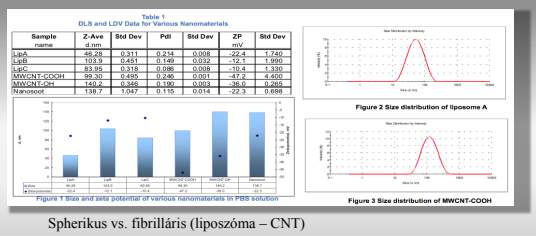


Table 1
DLS and LDV Data for Various Nanomaterials

Sample name	Z-Ave d.nm	Std Dev	PdI	Std Dev	ZP mV	Std Dev
LipA	46.28	0.311	0.214	0.008	-22.4	1.740
LipB	103.9	0.451	0.149	0.032	-12.1	1.990
LipC	83.95	0.318	0.086	0.008	-10.4	1.330
MWCNT-COOH	99.30	0.495	0.246	0.001	-47.2	4.400
MWCNT-OH	140.2	0.346	0.190	0.003	-36.0	0.265
Nanosoot	138.7	1.047	0.115	0.014	-22.3	0.698

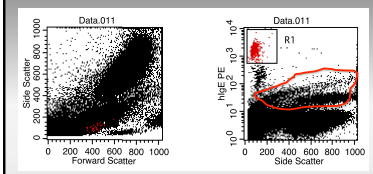
Figure 1 Size and zeta potential of various nanomaterials in PBS solution

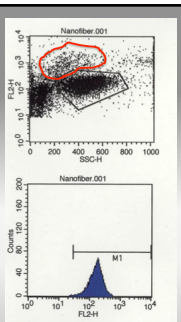
Figure 2 Size distribution of liposome A

Figure 3 Size distribution of MWCNT-COOH

Spherikus vs. fibrilláris (liposzóma – CNT)

Basotest

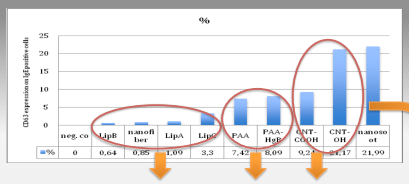




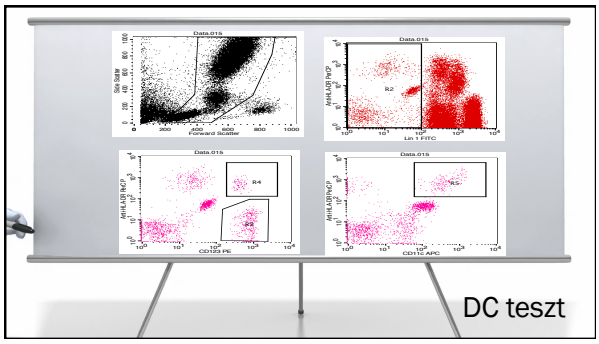
*J Emmer, Z Lovity, E Kiss-Toth, **B Fodor**: Methods for the Physicochemical Characterization of Liposomal Delivery Systems. Laboratory diagnostics, Laboratorna Diagnostika 2011, 1-2:7-15*

*E Kiss-Tóth, Z Lovity, J Emmer, A Szabó, P Rozsa, J Szebeni, **B Fodor**: Effect of different physico-chemical properties of nanomaterials on basophil leukocyte activation in vitro. CLINAM Conference, Basel, 2012*

Bazofil sejtek aktivációja nanoanyagok jelenétében

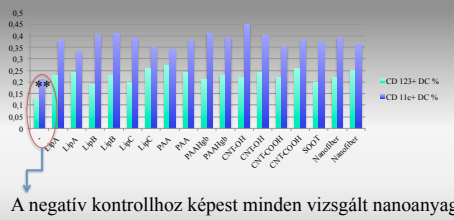


1. Lipid alapú ‹ polimer (PAA) ‹ CNT
(a "soft" alapú kevésbé aktivál, mint a "hard")
2. A CNT felszíni módosítás, funkcionalizálás (OH vs. COOH) jelentősen módosítja a biológiai hatást.



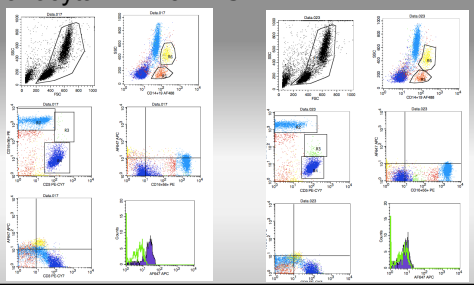
DC teszt

DC CD123 és CD11c expresszió



A negatív kontrollhoz képest minden vizsgált nanoanyag szignifikánsan aktiválja a dendritikus sejteket

Monocyta/NK – JAK/STAT

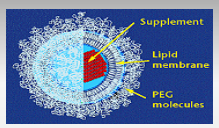


- GLP kompatibilis - Nanotoxicológiai viszgáló laboratórium létrehozása
- Nanotoxicológiai vizsgálatok (haemokompatibilitás) fejlesztése
- Soft- és hard nanoanyagok vizsgálata
- *Bionanonet, Euronanotox – European Nanotox Network- résztvevő partenerként*

5

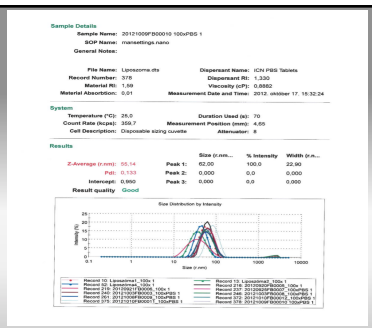
Liposzomális gyógyszerek előnyei

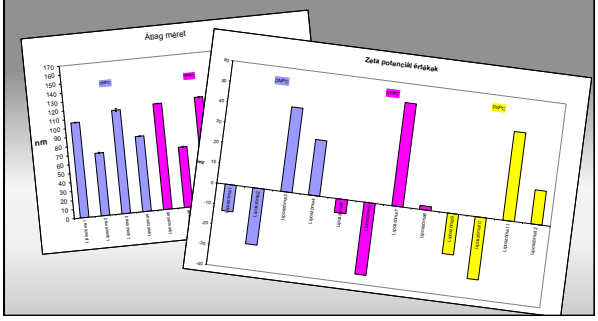
- Kontrollált és irányított hatóanyagleadás
- Hatékonyabb terápiás válasz
  - Megfelelő szöveti- és vérszintek
- Csökkent mellékhatás
  - Kevesebb gyógyszer szükséges
  - Targetált gyógyszercélbajuttatás (aktív, passzív)
- Csökkent gyógyszerelési "frekvencia"
  - Eredményesebb beteg-compliance
  - Egyszerűbb adagolási sémák
  - Dózisonkénti alacsonyabb költségek
- Egyébként nem alkalmazható hatóanyagok felhasználhatósága

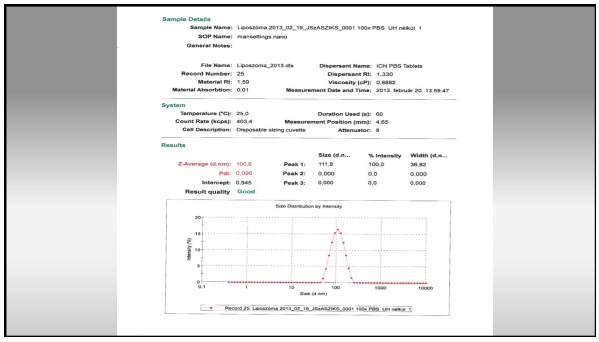


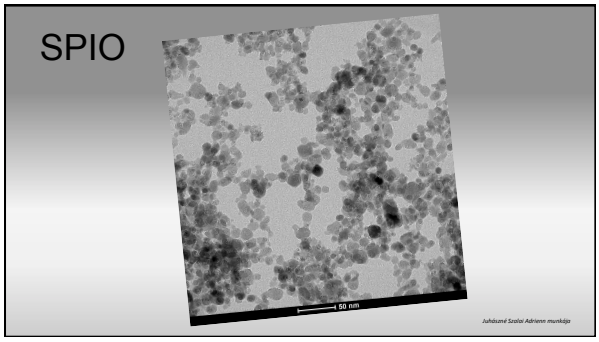
Foszfolipid neve	Rövidítése
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	DMPC
1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	
1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium-propan	
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(methoxy(polyethylen glycol)-2000)	

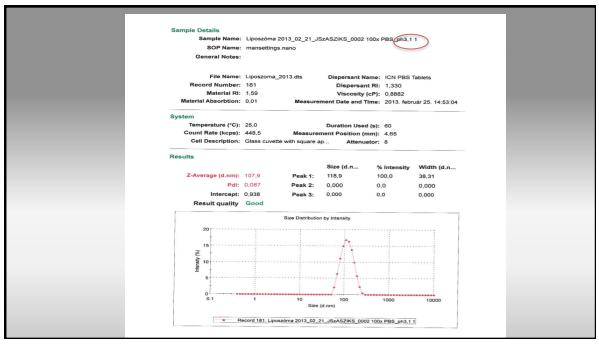
Termék neve	Alkalmazott foszfolipidek molaránya
Liposzóma 1	*DMPC*:koleszterin=2:1
Liposzóma 2	*DMPC*:koleszterin: **DMPE-PEG**=2:1:0,1
Liposzóma 3	*DMPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE =6:3:1:1
Liposzóma 4	*DMPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE:**DMPE-PEG** = 56:28:10:10:6,25
Liposzóma 5	*DPPC*:koleszterin = 2:1
Liposzóma 6	*DPPC*: koleszterin: **DMPE-PEG**=2:1:0,2
Liposzóma 7	*DPPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE =6:3:1:1
Liposzóma 8	*DPPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE:**DMPE-PEG** = 56:28:10:10:6,25
Liposzóma 9	*DSPC*:koleszterin = 2:1
Liposzóma 10	*DSPC*: koleszterin: **DMPE-PEG** =2:1:0,2
Liposzóma 11	*DSPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE =6:3:1:1
Liposzóma 12	*DSPC*:koleszterin:DOTAP:DOPE:**DMPE-PEG** = 56:28:10:10:6,25

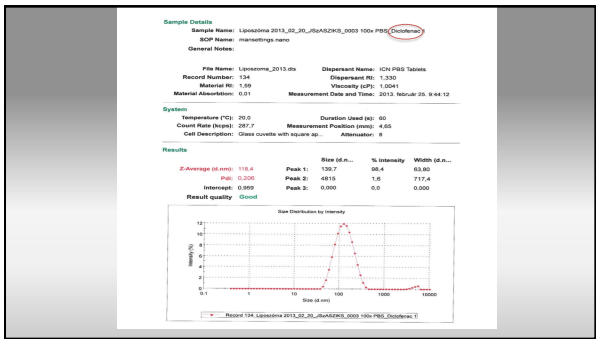


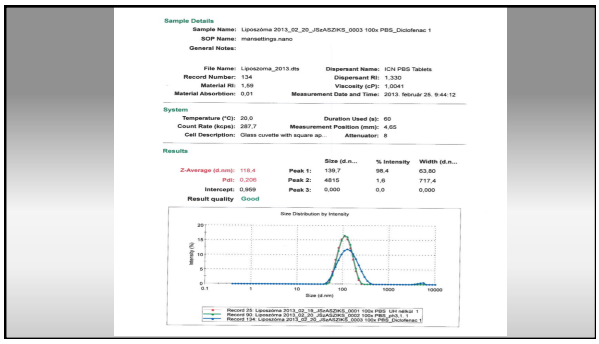


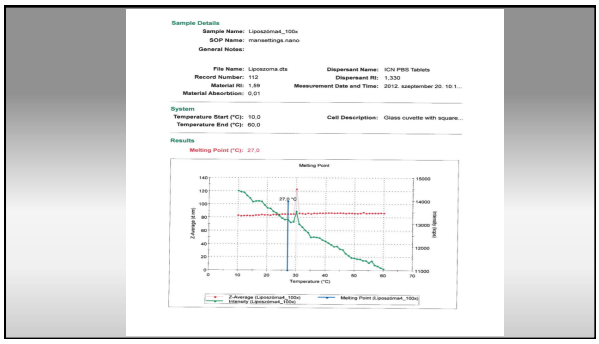

Sample Details
Sample Name: Liposzóma 2013_02_19_JSzASZIKS_0001 100x PBS UH nélkül 1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:
File Name: Liposzoma_2013.dts
Record Number: 25
Material RI: 1,59
Material Absorbtion: 0,01
Dispersant Name: ICN PBS Tablets
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8882
Measurement Date and Time: 2013. február 20. 13:59:47
System
Temperature (°C): 29,0
Count Rate (kcps): 403,4
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8
Results
Size (d.n... % Intensity Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 100,6 Peak 1: 111,8 100,0 36,82
PdI: 0,096 Peak 2: 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,945 Peak 3: 0,000 0,0 0,000
Result quality Good
Size Distribution by Intensity
Intensity (%)
Size (d.nm)
Record 25: Liposzóma 2013_02_19_JSzASZIKS_0001 100x PBS UH nélkül 1


SPIO
50 nm
Juhászné Szolár Adrienn munkája


Sample Details
Sample Name: Liposzóma 2013_02_21_JSzASZIKS_0002 100x PBS pH3,1 1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:
File Name: Liposzoma_2013.dts
Record Number: 181
Material RI: 1,59
Material Absorbtion: 0,01
Dispersant Name: ICN PBS Tablets
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8882
Measurement Date and Time: 2013. február 25. 14:53:04
System
Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 448,5
Cell Description: Glass cuvette with square ap...
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8
Results
Size (d.n... % Intensity Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 107,9 Peak 1: 118,9 100,0 38,31
PdI: 0,087 Peak 2: 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,938 Peak 3: 0,000 0,0 0,000
Result quality Good
Size Distribution by Intensity
Intensity (%)
Size (d.nm)
Record 181: Liposzóma 2013_02_21_JSzASZIKS_0002 100x PBS pH3,1 1

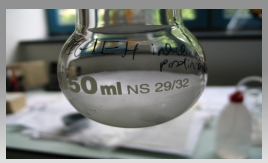

Sample Details
Sample Name: Liposzóma 2013_02_20_JSzASZIKS_0003 100x PBS Diclofenac 1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:
File Name: Liposzoma_2013.dts
Record Number: 134
Material RI: 1,59
Material Absorbtion: 0,01
Dispersant Name: ICN PBS Tablets
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 1,0041
Measurement Date and Time: 2013. február 25. 9:44:12
System
Temperature (°C): 20,0
Count Rate (kcps): 287,7
Cell Description: Glass cuvette with square ap...
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8
Results
Size (d.n... % Intensity Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 118,4 Peak 1: 139,7 98,4 63,80
PdI: 0,206 Peak 2: 4815 1,6 717,4
Intercept: 0,969 Peak 3: 0,000 0,0 0,000
Result quality Good
Size Distribution by Intensity
Intensity (%)
Size (d.nm)
Record 134: Liposzóma 2013_02_20_JSzASZIKS_0003 100x PBS_Diclofenac 1

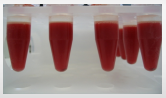

Sample Details
Sample Name: Liposzóma 2013_02_20_JSzASZIKS_0003 100x PBS_Diclofenac 1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:
File Name: Liposzoma_2013.dts
Record Number: 134
Material RI: 1,59
Material Absorbtion: 0,01
Dispersant Name: ICN PBS Tablets
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 1,0041
Measurement Date and Time: 2013. február 25. 9:44:12
System
Temperature (°C): 20,0
Count Rate (kcps): 287,7
Cell Description: Glass cuvette with square ap...
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8
Results
Size (d.n... % Intensity Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 118,4 Peak 1: 139,7 98,4 63,80
PdI: 0,206 Peak 2: 4815 1,6 717,4
Intercept: 0,969 Peak 3: 0,000 0,0 0,000
Result quality Good
Size Distribution by Intensity
Intensity (%)
Size (d.nm)
Record 25: Liposzóma 2013_02_19_JSzASZIKS_0001 100x PBS UH nélkül 1
Record 90: Liposzóma 2013_02_20_JSzASZIKS_0002 100x PBS_pH3,1 1
Record 134: Liposzóma 2013_02_20_JSzASZIKS_0003 100x PBS_Diclofenac 1


Sample Details
Sample Name: Liposzómad_100x
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:
File Name: Liposzoma.dts
Record Number: 112
Material RI: 1,59
Material Absorbtion: 0,01
Dispersant Name: ICN PBS Tablets
Dispersant RI: 1,330
Measurement Date and Time: 2012. szeptember 20. 10:1...
System
Temperature Start (°C): 10,0
Temperature End (°C): 60,0
Cell Description: Glass cuvette with square...
Results
Melting Point (°C): 27,0
Melting Point
Z-Average (Liposzómad_100x)
Intensity (Liposzómad_100x)
Melting Point (Liposzómad_100x)
Temperature (°C)

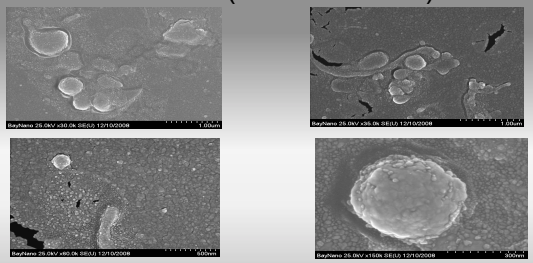
- NSAID, SPIO tartalmú teranosticum fejlesztés megalapozása
- Integrin alpha siRNS – SNALP

6



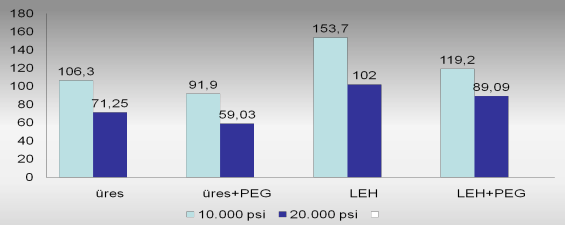


HSPC LEH SEM (extruzió nélkül)



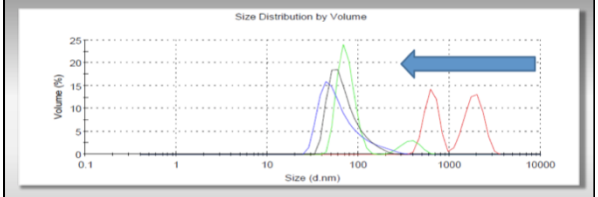
Extrúzió

A méret nyomásfüggése 10x homogenizálva (nm)

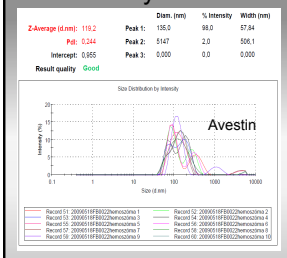


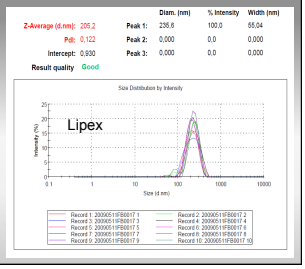
Nagyobb nyomás jelentősen alacsonyabb méretű liposzómát eredményez

A ciklusszám változás hatása a méretre 20.000 psi-n (LEH+PEG)

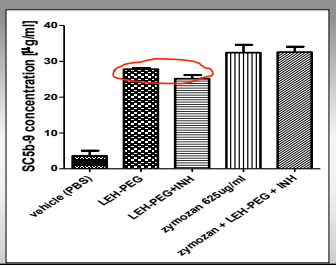


Avestin és Lipex homogenizálási eredmények





Komplementgátlás



- Jó fiziko-kémiai paraméterekkel rendelkező, komplementinhibitort tartalmazó "művérkészítmény" fejlesztése

7

1
- Leukaemia immunfenotipizálási protokollok kidolgozása
- *A lymphoid rendszer vizsgá a klinikai laboratóriumban (MTA MAB pályafutás mun*

2
- A HCV jelentős további sejtaktivációt okoz HD betegekben. TTV esetében ez nem figyelhető meg.
- *Fodor et al.:Nephrom 2002; 4: 552-557*

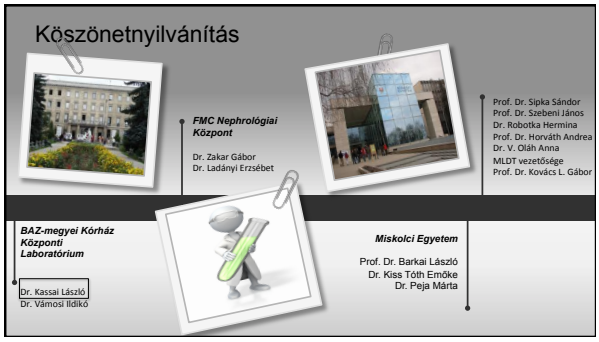
3
- 4v MDRD eGFR implementálása
- eGFR kérkontroll kialakítása, értékelése
- ACR/PCR implementálása
- *Az Egészségügyi Minőségfejlesztési Intézet [illegible] A jelenleg [illegible] eGFR [illegible] szerint [illegible] de [illegible] [illegible], [illegible], [illegible], [illegible] szükséges*

4
- Nanobiotechnológiai és Regenerativ Medicina Tanszék
- Nanomedicina Kutatólaboratórium
- Észak-magyarországi orvos- és egészségtudományi, élettudományi alapkutatások megalapozása
- *TÁMOP 4.2.2.B-10/2/KONV-2010-0001*

5
- GLP kompatibilis - Nanotoxicológiai vizsgáló laboratórium létrehozása
- Nanotoxicológiai vizsgálatok (haemokompatibilitás) fejlesztése
- Soft- és hard nanoanyagok vizsgálata
- *Biananomed, Euronanotox – European Nanotox Network- résztvevő partnerként*

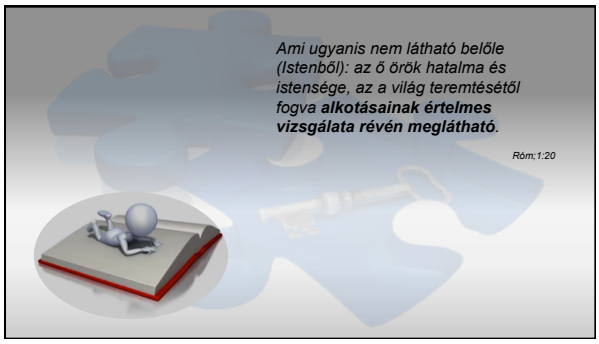
6
- NSAID, SPIO tartalmú teranosticum fejlesztés megalapozása
- Integrin alpha siRNS – SNALP

7
- Jó fiziko-kémiai paraméterekkel rendelkező, komplementinhibitort tartalmazó "művérkészítmény" fejlesztése


Köszönetnyilvánítás
FMC Nephrológiai Központ
Dr. Zakar Gábor
Dr. Ladányi Erzsébet
Prof. Dr. Sipka Sándor
Prof. Dr. Szebeni János
Dr. Robotka Hermina
Prof. Dr. Horváth Andrea
Dr. V. Oláh Anna
MLDT vezetősége
Prof. Dr. Kovács L. Gábor
BAZ-megyei Kórház Központi Laboratórium
Dr. Kassai László
Dr. Vámosi Ildikó
Miskolci Egyetem
Prof. Dr. Barkai László
Dr. Kiss Tóth Emőke
Dr. Peja Márta

Dr. Lovrity Zita
Dojcsákné Kiss-Tóth Éva
Dr. Emmer János
Szálkai Istvánné
Juhászné Szalai Adrienn
Balatoni Enikő
Kacsmarik Sándorné
2013.03.11

Szüleim


*Ami ugyanis nem látható belőle (Istenből): az ő örök hatalma és istensége, az a világ teremtésétől fogva **alkotásainak értelmes vizsgálata révén meglátható**.*
Róm;1:20