



**ALBUMINURIA VIZSGÁLATA MÉRETKIZÁRÁSOS
KROMATOGRÁFIÁVAL
MÓDSZERJELLEMZÉS ÉS ÚJ PERSPEKTÍVÁK**

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DR. MARKÓ LAJOS

A DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE: PROF. DR. KOMOLY SÁMUEL

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. NAGY JUDIT

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. WITTMANN ISTVÁN

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
II. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA ÉS NEPHROLOGIAI CENTRUM
PÉCS, 2011**

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACN	acetonitril
ACR	albumin-kreatinin hányados
AusDiab	Ausztrál Diabétesz, Obezitás és Életmód tanulmány
CD	Crohn-betegség
CV	variációs koefficiens
DMR	vizelet dimer-monomer albuminhányados
DTNB	5, 5'-dithio-bisz (2-nitrobenzoesav)
FDA	Élelmezés és Gyógyszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration)
GSA	glikált humán szérumalbumin
GSH	redukált glutation
HDL	nagy denzitású lipoprotein
HPLC	nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia
HSA	humán szérumalbumin
IN	immun-nefelometria
ir-uAlb	immunreaktív vizeletalbumin
IT	immun-turbidimetria
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
MALDI-TOF/MS	mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő analízis/tömegspektrométer
MGO-HSA	metilglioxálal módosított humán szérumalbumin
MM	mikroalbuminuriás betegek IN és HPLC módszerekkel
MS	tömegspektrométer
NM	normalbuminuriás betegek IN-nel, de mikroalbuminuriás HPLC módszerrel
NN	normalbuminuriás betegek IN és HPLC módszerekkel
PMF	peptid tömeg ujjenyomat
RF	relatív fluoreszcencia
RP	fordított fázisú
SD	az átlag standard hibája
SDS-PAGE	nátrium dodecilsulfát poliakrilamid gél elektroforézis
SE	méretkizárásos
TFA	trifluoroecetsav
TFSG	összes, szabad szulfhidril csoport
t-uAlb	összes vizeletalbumin
UAC	vizeletalbumin-koncentráció
uAlb	vizeletalbumin

1. BEVEZETÉS

Az albumin vizeletbe történő kiválasztásának (albuminuria) pontos mérése rendkívül fontos a magas rizikójú páciensek azonosításához és ezáltal a minél előbbi kezelésükhöz. Nemrégiben egy új módszert fejlesztettek ki az albuminuria mérésre. Ez a dolgozat ennek az új módszernek a vizsgálatával, karakterizálásával foglalkozik. Ez a bevezetés egy rövid áttekintést ad az albuminról, annak kockázati szerepéről és méréséről.

1.1. AZ ALBUMIN DEFINÍCIÓJA ÉS TULAJDONSÁGAI

Az albumin az egyik legrégebb óta ismert és talán az egyik leginkább tanulmányozott fehérje. Definíció szerint az albumin megnevezés azon fehérjék csoportját jelöli, amelyek jól oldódnak vízben és mérsékelt koncentrált sóoldatban, és amelyek melegítés hatására kicsaphatóak. A humán szérumalbumin (továbbiakban albumin) az emberi vérplazmában előforduló leggyakoribb fehérje, melyet a máj szintetizál. A plazmafehérje közel 60%-át alkotja és ezáltal a kolloid ozmotikus nyomás mintegy 70%-át adja. Számatalan ligand megkötéséért felelős, mint például zsírsavak, fémionok, metabolitok. Jelentős szerepet játszik a gyógyszerek transzportjában, hatékonyságuk meghatározásában és detoxifikálásában. Minden albumin molekula egy szabad cisztein rezidummal rendelkezik, ezáltal az albumin a legnagyobb extracelluláris tiol forrás és reaktív oxigén és nitrogén gyök-kötő.

1.2. AZ ALBUMINURIA, MINT ELFOGADOTT KOCKÁZATI TÉNYEZŐ

Fiziológiás körülmények között a vizelettel naponta kevesebb mint 30 mg albumin ürül. A tartósan fennálló 30 és 300 mg/nap közötti albuminuria (mikroalbuminuria) bizonyítottan a diabeteszes nephropathia korai jelzője mind 1-es, mind 2-es típusú cukorbetegségben. Továbbá elfogadott és fontos markere és prediktora a szív-és érrendszeri betegségek okozta-, valamint az általános halálozásnak diabeteszes betegekben és az átlaglakosság körében is.

Tekintettel arra, hogy a cukorbetegség és a szív-érrendszeri betegségek a vezető halálokok a fejlett országokban, az albuminuria pontos mérése rendkívül fontos, ezen páciensek azonosításához és mielőbbi kezelésükhöz.

1.3. AZ ALBUMINRIA MÉRÉSE

A vizeletalbumin mérésére kifejlesztett első módszer (tesztcsík) csak 300 mg és a feletti albumin mennyiség kimutatására volt képes. Az első analitikai módszer, amelyet ennél alacsonyabb albumin detektálására fejlesztettek ki, egy radioimmun módszer volt melyhez ^{125}I jelölt albumint használtak. A módszer azonban időigényesnek és túl drágának bizonyult ahhoz, hogy a rutin labor részévé váljon. Ezért más immun-alapú (immun-nefelometria (IN) és immun-turbidimetria (IT)) automatizálható tesztek fejlesztettek ki, amelyek során az albumint tartalmazó mintát (szérum vagy vizelet) albumin ellenes antitesttel hozzák reakcióba, ami kisebb aggregátumok kialakulását eredményezi; ezen aggregátumok fényszórásának mérésével határozható meg a minta albumin tartalma. A klinikai alkalmazásban, az IN vagy IT módszerrel mért mikroalbuminuria fontos és értékes kockázati tényező.

Napjainkban egy új, a méretkizárásos kromatográfián alapuló nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás (HPLC) módszer is rendelkezésünkre áll a mikroalbuminuria detektálására. Az új módszert alkalmazó első vizsgálat kimutatta, hogy a vizeletalbumin koncentrációját a hagyományos immunológiai módszerek diabeteszes betegekben jelentősen alábecsülik. A HPLC-vel mérhető vizeletalbumint ezt követően összes (total) vizeletalbuminnak (t-uAlb) nevezték el. Azon vizeletalbumin frakciót, amely hagyományos immun-alapú módszerrel nem, de HPLC-vel mérhető, nem immunreaktív vagy immunkémiaiilag nem reaktív albuminnak nevezték el.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIÁVAL MÉRT VIZELETALBUMIN MÓDOSULTSÁGÁNAK ÉS INTERFERENCIÁJÁNAK MÉRÉSE (A DOLGOZAT I. RÉSZÉ)

Az albuminuria új HPLC-s mérésének bevezetése után a következő kérdés a nem-immunreaktív albumin mibenlétével kapcsolatban fogalmazódott meg. Egyes szerzők feltételezése szerint az oxidatív stressz okozta módosítás felelős az immun-reaktivitás elvesztéséért, míg más szerzők azt állították, hogy a méretkizárásos HPLC módszer egyszerűen nem rendelkezik megfelelő felbontással, azaz a mérés során az albumin mellett más hasonló méretű molekulák adják a nem-immunreaktív frakciót. A dolgozat első célkitűzése ezen felvetések vizsgálatával foglalkozik.

- Célul tűztük ki egy új HPLC-s módszer kidolgozását, mely segítségével tanulmányozható a feltételezett kapcsolat az oxidatív stressz és az immunreaktivitás elvesztése között.
- Mértünk a nem albumin természetű anyagok interferenciájának mértékét a méretkizárásos kromatográfiás albumincsúcsban.
- Ezen kívül mértünk a cukorbeteg vizeletalbuminjának glikoxidatív módosítását és összefüggést kerestünk a klinikai paraméterekkel.

2.2. HPLC-VEL MÉRT ALBUMINURIA ÉS MINTATÁROLÁS (A DOLGOZAT II. RÉSZÉ)

A HPLC-s módszer leírása után számos cikk jelent meg, amelyek mind bizonyították, hogy a HPLC-s módszerrel több albumin mérhető a vizeletben, mint az immunológia módszerekkel (először csak diabeteszes betegek mintáit, majd később átlagpopuláció vizeletét vizsgálva). Ugyanakkor a HPLC-vel mérhető összes vizeletalbumin klinikai jelentősége továbbra is tisztázatlan volt. Az első közlemény, amely ez utóbbi problémával foglalkozott az Ausztrál Diabétesz, Obezitás és Életmód tanulmány (AusDiab) volt. A tanulmány annak a kérdésnek a megválaszolására irányult, hogy vajon a HPLC-vel mért albuminuriával több nagy mortalitási rizikójú egyént tudnak-e megtalálni, mint az IN módszerrel. A vizsgálat eredményeként azt kapták, hogy az albuminuriának mindkét módszerrel mérve hasonló ereje van a mortalitás megjósolásában. A kérdés megválaszolásához az eredeti mintagyűjtéskor (1999-2000) mért IN-es vizeletalbumin mérési eredményeket használták. A HPLC-s mérésekhez pedig az akkor eltett vizeletekből (első felolvasztás, -80°C -on tárolt mintákból) határozták meg a vizeletalbumin koncentrációját (2007-ben).

Az irodalomban azonban még az immunalapú vizeletalbumin mérési módszerek esetében is megkérdőjelezett, hogy a vizelet minták hosszútávú tárolása - nemcsak 20°C -on, hanem akár -80°C -on - megengedhető-e a pontos albuminuria mérés elvégzéséhez. Sőt a HPLC-vel észlelt összes albumin és a vizeletek tárolása során fellépő esetleges változásokról gyakorlatilag nem állt információ rendelkezésre. Ezért a dolgozat második részében ezekre a kérdésekre kerestük a válaszokat.

- Ehhez 2,5 évvel ezelőtt HPLC-vel mért, majd -80°C -on tárolt vizeletminták albumin koncentrációját határoztuk meg újra. A vizsgálat során a HPLC-vel mérhető dimer és monomer albumin-forma változását is vizsgálni kívántuk.

- Mivel egyes irodalmi adatok arra utaltak, hogy a vizeletben mérhető albumin mennyiségének időbeli változását feltételezhetően a vizelet-pH-ja is befolyásolja, ezért a pH esetleges szerepét is vizsgálni kívántuk.
- Az irodalomból ekkora már ismerté vált, hogy a csak HPLC-vel mérhető nem-immunreaktív albumin redukáló környezetben könnyen fragmentálódik kisebb molekulásúlyú darabokra. A nem-immunreaktív albumin egy részben emésztett, de diszulfid hidak és nem-kovalens kötések segítségével még intakt relatív molekulásúlyú (66 kDa) állapotban lévő albuminforma. Ezért feltételeztük, hogy ezeknek a diszulfid hidaknak a redukáltsági állapota szintén szerepet játszat a HPLC-vel történő albuminmérés során. Így további célul tűztük ki a redukáló kapacitás mérését friss és a 2,5 évig tárolt mintákban az összes, szabad szulfhidril csoportok (TFSG) mérésével.

2.3. ÚJ, POTENCIÁLIS BIOMARKEREK KIMUTATÁSA CROHN BETEGSÉGBEN A HPLC-VEL TÖRTÉNŐ ALBUMINURIA MÉRÉS SORÁN (A DOLGOZAT III. RÉSZÉ)

Bár az albuminuria mérésének klinikai alkalmazása még mindig csak a diabetológia területére korlátozódik mára már bebizonyosodott, hogy számos egyéb kórállapotokban is hasznos lehet. Crohn-betegségben az albuminuria mérése immunalapú módszerekkel alkalmas a betegség monitorozására, a terápiára adott válasz és a betegség aktivitásának objektív megítélésére. Azonban a HPLC-vel mérhető összes albumin jelentőségét még nem vizsgálták. A dolgozat harmadik részében a két mérési módszert kívántuk összehasonlítani egy fiatal, gyakori relapszusoktól szenvedő Crohn beteg követéses vizsgálatával.

- Célul tűztük ki a vizeletalbumin koncentrációjának mérését a betegség különböző stádiumaiban HPLC-s és immun-alapú mérési módszerekkel.
- A két mérési módszerrel kapott eredmény olyan mértékű különbséget mutatott, amely Crohn betegünk vizeletalbumin kromatográfiás csúcsának további vizsgálatára ösztönzött minket. Ezért célunk volt olyan kutató módszerek alkalmazása, (fordított fázisú HPLC (RP-HPLC), nátrium dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE), mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő analízis/tömegspektrométer (MALDI-TOF/MS) amelyek lehetővé teszi akár újabb biomarkerek azonosítását.

3. MÓDSZEREK

3.1. MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIÁVAL MÉRT VIZELETALBUMIN MÓDOSULTSÁGÁNAK ÉS INTERFERENCIÁJÁNAK MÉRÉSE (A DOLGOZAT I. RÉSZÉ)

3.1.1. KÜLÖNBÖZŐ ALBUMINFORMÁK ELŐÁLLÍTÁSA IN VITRO

Az albumin glycoxidatív módosulásának immun-reaktivásra kifejtett hatásának vizsgálatához különböző albuminformákat használtunk: humán szérumalbumint (HSA; A9511, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), glikált humán szérumalbumint (GSA; A8301, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) és a metilglioxállal (MO252, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) módosított humán szérumalbumint (MGO-HSA). A metilglioxál az egyik legfontosabb előrehaladott glikoxidációs végterméket képző anyag, ezért ezt, mint maximális módosítást okozó anyagot használtuk. Az MGO-HSA előállítása Westwood és munkatársai módszerével történt. Röviden: aseptikus körülmények között 6,6 mg/ml HSA-t 1 mmol/l metilglioxállal inkubáltunk 37°C-on 24 órán át 7,4-es pH-jú nátrium foszfát-pufferben. Az inkubáció után az MGO által módosított albumint 4°C-on 72 óra hosszat ammóniumbikarbonát-puffer ellenében dializáltuk (pH=7,9), ezzel eltávolítva a felesleges MGO-t. A különböző albuminokból 6600 mg/l koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A HSA, GSA és MGO-HSA törzsoldatok sorozat-hígításával a következő koncentrációkat állítottuk elő: 132, 66, 33, 16,5 és 8,25 mg/l.

3.1.2. DIABETESZES BETEGEK VIZELET- ÉS ÁLTALÁNOS VIZSGÁLATA

A vizsgálat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével zajlott. Keresztszeti vizsgálatunkba 79 fő – ebből 59 IN-nel normoalbuminuriás és 20 IN-nel mikroalbuminuriás – 1-es és 2-es típusú cukorbeteg volt. Az akut betegségben, lázban, hemodinamikai stresszben szenvedő, valamint a terhes és menstruáló nőket kizártuk.

Reggeli első vizetletet gyűjtöttünk, a vizeletmintákat mérés előtt -80 °C-on legfeljebb két hétig tároltuk. A vizeletmintákat mérés előtt szobahőmérsékletűre olvasztottuk, 30 másodpercig rázattuk, majd centrifugáltuk (2500 x g, 10 perc). Továbbiakban a felülúszót vizsgáltuk.

Az anamnesztikus adatok, úgy, mint életkor, nem, diabetesz típusa, szedett gyógyszerek, dohányzás, szisztolés és diasztolés vérnyomás és a testtömeg-index a kórtörténetből rögzítésre kerültek. A vizelet-pH mérése egy mikroprocesszoros pH-mérőkészülékkel történt (HI 9024 pH-mérő, Geo Scientific Ltd., Vancouver, British Columbia, Kanada). Minden egyéb klinikai paraméter, mint például plazma glükóz, fruktózamin, hemoglobin A_{1c}, összkoleszterin, kis sűrűségű lipoprotein-(LDL), nagy sűrűségű lipoprotein-(HDL) koleszterin, teljes vérkép és szérum kreatinin a rutin labor keretein belül került mérésre. Ezek a vizsgálatok a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében történtek. A becsült glomerulus filtrációs ráta (eGFR) kiszámítása a Cockcroft-Gault képlettel történt.

Mivel reggeli, első vizeleteket vizsgáltunk, ezért a vizeletkreatinin koncentrációját (Jaffé-módszer szerint) is meghatároztuk és mind az IN-nel, mind a HPLC-vel mért albumin-koncentrációkkal albumin-kreatinin hányadost számoltunk.

3.1.3. A VIZELETALBUMIN KONCENTRÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE

A vizeletalbumint, illetve az in vitro készített különböző albuminformák koncentrációját IN-es módszerrel (IMMAGE Immunochemistry Systems, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA, szenzitivitás (méréshatár): 2 mg/l, méréstartomány: 2-8640 mg/l, intra- és inter-assay pontosság: 8% és 5%) és HPLC-módszerrel (Shimadzu SPD 10AVvp, Shimadzu Corp., Japán) mértük. HPLC-vel történt méréseinkhez az FDA által is jóváhagyott AccuminTM kitet használtuk (Accumin Diagnostics Inc., New York, NY, USA, szenzitivitás (méréshatár): 3 mg/l, méréstartomány: 3-2000 mg/l, inter- és intra-assay pontosság 5,8 % és 2,5%). Az AccuminTM kit méretkizárásos kromatográfián alapul, Zorbax Bio-Series GF 250 típusú oszlopot, Zorbax Diol típusú előoszlopot (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) és mobil fázisként sótartalmú foszfát puffert tartalmaz (pH=6,93). A HPLC mérésekhez használt rendszer a következő egységekből állt: DGU-14A négy soros vákuumos membrán gáztalanító, FCV-10ALvp oldószer elosztó szelep, LC-10ADvp oldószerszállító egység, SIL-10ADvp automata mintaadagoló, egy SPD-10AVvp UV-VIS detektor és SCL-10Avp rendszervezérlő (minden egység: Shimadzu Corp., Kioto, Japán). A vizsgálatok során 25 µl mintát vizsgáltunk duplikátumban. Az abszorbanciát 214 nm-en detektáltuk. A program egy 6 percig tartó 0,5 ml/perc áramlási sebességű, majd egy 6,5-től 11,5 percig tartó 2 ml/perc áramlási sebességű szakaszból állt. Ezt követően visszatértünk a 0,5 ml/perc áramlási sebességre, majd a vízszintes alapvonal visszatértéig mosás következett (általában a 22.

percig). A vizeletalbumin retenciós ideje $\pm 2\%$ -kal belül volt a gyártó által biztosított albumin standardnak. Az adatrögzítés és analízis az LC Solution szoftverrel történt (1.11 SP1 verzió, Shimadzu, Japán).

3.1.4. AZ ALBUMIN MÓDOSÍTÁSI FOKÁNAK MÉRÉSE

Az általunk alkalmazott HPLC-vizsgálat során az UV detektorhoz egy fluoreszcens detektort (Shimadzu RF 10AXL, Shimadzu Corp., Japan) kapcsolunk, így lehetőségünk nyílt ugyanannak a mintának egyidejűleg koncentráció és fluoreszcencia mérésére is. A fluoreszcenciát a glikoxidatív módosultság detektálására használt 370 nm-es excitációs és 440 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk. A fluoreszcens detektor szenzitivitása és erősítése az első 6 percben a maximális értékre volt állítva, majd ezt követően a futtatás végéig közepes értékre állítottuk. Az adatrögzítés és a kromatográfias csúcsok integrálása az alapvonalhoz történt (a kit gyártójának utasítása szerint) LC Solution szoftverrel (version 1.11 SP1, Shimadzu, Japán). Az albumin módosultsági fokának megítéléséhez bevezettük a relatív fluoreszcencia (RF) fogalmát, amelyet az alábbiak szerint számoltuk:

$$\frac{\text{Az albumin fluoreszcens detektálása során mért görbe alatti területe}}{\text{Az albumin UV detektálása során mért görbe alatti területe}} = \text{RF}$$

3.1.5. A HPLC-VEL MÉRT ALBUMINCSÚCS ELEMZÉSE

Az AccuminTM kittel kapott albumincsúcs tisztaságának megítélését egy külön kísérletben vizsgáltuk RP-HPLC rendszer segítségével. A vizsgálatához nyolc random módon választott cukorbeteg vizeletét vizsgáltuk meg. Ugyanabból a vizeletből egymást követő három futtatás során albuminfrakciót gyűjtöttünk. A gyűjtött frakciót Ultracel YM-3 Centricon (Millipore, MA, USA) szűrő segítségével sótlanítottuk és kb. 150 μl -re koncentráltuk a gyártó utasítása szerint. Az így kapott mintát RP-HPLC módszerrel tovább szeparáltuk nem-porózus Kovasil MS C18 oszlopon, (1,5 μm , 33x4,6 mm, Zeochem AG, Uetikon, Svájc) amely rövid idő alatt alkalmas komplex minták érzékeny szétválasztására. Az „A”-oldat 0,1% trifluoro-ecetsav (TFA) és 5% acetonitril vizes oldata volt a „B” oldat 0,1 % TFA és 5% víz acetonitriles oldata volt. Az alkalmazott gradiens a következő volt: 0-20 perc között 0% „B” oldatról 60% „B”-oldatra, majd a következő 5 percben 60%-ról 100%-ra. A HPLC rendszer egy Dionex P680 gradiens pumpából és egy Dionex UVD170U UV-VIS detektorból (Germering, Németország)

állt. Az adatok elemzéséhez Chromeleon szoftvert (6.60 SP3 verzió, Sunnyvale, CA, USA) használtunk. Ezen HPLC-elválasztás során 2-3 egymástól nagyon rövid elúciós időre levő csúcsot kaptunk. Az albumint külső albumin-standarddal azonosítottuk. Mivel a csúcsok közel eluálódtak, a kontamináció számítását a nem-albumin anyagok görbe alatti területe és az albumin görbe alatti területének hányadosaként meg tudtuk becsülni.

3.1.6. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Statisztikai elemzéshez az SPSS program 13.0 verzióját (SPSS Inc., IE, USA) és a MedCalc-t (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) használtuk. Az IN- és a HPLC-módszer összehasonlításához Bland-Altman analízist használtunk. A normális eloszlású adatokat egyutas ANOVA analízissel és Pearson korrelációval hasonlítottuk össze. A nem normális eloszlású adatok esetén Kruskal-Wallis tesztet, Mann-Whitney U-tesztet valamint Spearman rho-tesztet használtunk. A kategorikus változókat Chi-négyzet teszttel elemeztük. A normális eloszlást követő adatokat átlag \pm SEM, a nem normális eloszlású adatokat medián és interkvartilis tartományokkal jellemeztük. A p-értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak. Többváltozós lineáris regressziós analízist használtunk a vizeletalbumin relatív fluoreszcencia független prediktorainak megállapítására.

3.2. HPLC-VEL MÉRT ALBUMINURIA ÉS MINTATÁROLÁS (A DOLGOZAT II. RÉSZÉ)

3.2.1. VIZSGÁLT BETEGEK

A pécsi II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum diabetológia szakrendelésén 2005 májusában megjelent 30 IN módszerrel normo- és mikroalbuminuriásként diagnosztizált 2-es típusú diabeteses beteget vontuk be egy keresztmetszeti vizsgálatba. Ahhoz, hogy a friss vizelet összes, szabad szulfhidril csoportjainak koncentrációját is meg tudjuk határozni 2008-ban újabb 30 IN módszerrel normo- és mikroalbuminuriás 2-es típusú diabeteses beteget vontunk be a vizsgálatba. A két különböző időpontban vizsgált betegcsoport klinikai paraméterei nem különböztek egymástól. A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága jóváhagyta. A vizsgálatból minden olyan beteget kizártunk, akinek akut, zajló betegsége volt, lázas volt vagy jelentős

hemodinamikai stressznek volt kitéve a vizsgálatot megelőző héten, továbbá kizártuk a malignus betegségben szenvedő betegeket és a menstruáló és terhes nőket.

3.2.2. LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK

A vizeletek albumin koncentrációját (reggeli első vizeletminta, 10 perces 2500 g-s centrifugálást követően minden betegről 3 Eppendorf-csőnyi vizeletet tettünk félre -80°C-ra, az első mérés 2 héten belül történt) a korábbiakban részletezett (3.1.3), az FDA által jóváhagyott HPLC-s AccuminTM kittel határoztuk meg az eredeti gyűjtéskor (2005) és 2008-ban. A vizeletek pH-ját mikroprocesszoros pH-mérő készülékkel mértük meg (HI 9024 pH-meter, Geo Scientific Ltd., Canada). A betegek egyéb laboratóriumi paramétereit a rutin labordiagnostika segítségével határoztuk meg a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében. Vizsgálatunk során külön vizsgáltuk az albumin dimer és monomer formáját (a méréshez szintén AccuminTM Kit-et használtunk, a gyártó útmutatásának megfelelően, miszerint a közvetlenül az albumin (a vizsgált és mért monomer forma) előtt eluálódó csúcs a dimer-albumin. A dimer és a monomer albumincsúcs alatti területének hányadosát (DMR) is kiszámoltunk. A dimer forma elúciós idejének meglétét és pontosságát a csúcsvisszanyerési módszerrel állapítottuk meg, humán albumin standard hozzáadásával. A standard mindkét albumin-formát tartalmazta.

Két és fél éves -80 C-on történt tárolás után minden betegről egy Eppendorf-csőnyi, a vizsgálat előtt korábban fel nem olvasztott, vizeletet vettünk elő. Megmértük a vizeletalbumin-koncentrációt HPLC-módszerrel, továbbá mind a dimer, mind a monomer albumin-forma csúcs alatti területét meghatároztuk és a DMR-t ismételtén kiszámoltuk.

3.2.3. AZ ÖSSZES, SZABAD SZULFHIDRIL CSOPORTOK KONCENTRÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE

A tárolt és frissen gyűjtött vizeletminták TFSG szintjét is megmértük. A vizeletminták előkészítése a HPLC-s vizeletalbumin-mérések során alkalmazott eljárással megegyeztek. Ezt követően, 0,98 ml vizeletmintához 10 µl, 100 µM-os, feleslegben hozzáadott Ellman-reagenst (5, 5'-dithio-bis-t (2-nitrobenzoe) sav, DTNB, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Németország) mértünk be egy 3 ml-es quartz küvettába. A maximum abszorbanciát DTNB-mentes vizelet ellenében 412 nm-en mértük Hitachi U-2001 típusú spektrofotométer segítségével (Tokyo, Japan) 3600 másodperces

megfigyelés során. Amint a platót elérte a folyamat (lejátszódott a reakció), 10 µl, 10 µM-os frissen készített redukált glutationt (GSH, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Németország) adtunk a mintákhoz és ismét lemértük az így kapott maximális abszorbanciát. Ezekből az adatokból a vizelet TFSG szintjét µM GSH ekvivalens egységekre a következőképpen számoltuk: GSH hozzáadásával mért maximum abszorbancia mínusz DTNB feleslegben való hozzáadásával mért maximum abszorbancia; majd a DTNB hozzáadásával mért maximum abszorbanciát osztottuk az előbb számolt különbséggel és ezt szoroztuk 10-zel. Mind a frissen gyűjtött, mind a tárolt vizeletmintákat szobahőmérsékleten mértük. A TFSG szint mérését a friss illetve a felolvasztott minták esetében a mintavétel illetve a felolvasztást követő 1 órán belül elvégeztük.

3.2.4. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Statisztikai számításainkhoz az SPSS program 13.0-ás verzióját használtuk (SPSS Inc., IE, USA). A tárolt minták változásainak elemzésére Wilcoxon-tesztet, a DMR változásainak elemzésére, pedig párosított t-próbát használtunk. Független mintás t-próbát alkalmaztunk a friss és tárolt vizeletminták közötti különbségek vizsgálatára és a két vizsgálati populáció klinikai paramétereinek összehasonlítására. A korrelációs analízist Pearson-korrelációval végeztük el. Chi-négyzet tesztet alkalmaztunk a kvalitatív változók összehasonlítására. Az adatokat átlag±SD formában adjuk meg. A p-értékét 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.

3.3. ÚJ, POTENCIÁLIS BIOMARKEREK KIMUTATÁSA CROHN BETEGSÉGBEN A HPLC-VEL TÖRTÉNŐ ALBUMINURIA MÉRÉS SORÁN (A DOLGOZAT III. RÉSZÉ)

3.3.1. VIZSGÁLT BETEG

Vizsgálatunkba egy 23 éves, nem dohányzó, férfi beteget vontunk be, aki a Crohn-betegség (CD) gyakori relapszusaitól szenvedett. A betegséget korábban (2006) az endoszkópos (Montreal besorolás: A2, L1, B1) és a szövettani kép alapján diagnosztizálták és kezelték a pécsi II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrumban. A páciens a CD-n kívül egyéb betegségben nem szenvedett. Rendszeres gyógyszeres kezelése mesalazin (3x1000 mg/nap) és azatioprin (2,5 mg/kg/nap) volt. Betegségének relapszusa során rendszeres gyógyszerelését parenterális szteroiddal

(metilprednizolon 1 mg/kg/nap) egészítettük ki. A betegség aktivitásának megállapítására a Crohn-betegség aktivitási indexet (CDAI) használtuk (150 vagy a feletti pontszám minősül aktív állapotnak).

Reggeli első vizeletet gyűjtöttünk a betegvizit alkalmával. A vizeletmintákat 30 másodpercig rázattuk, majd centrifugáltuk (2500 x g, 10 perc) és a vizeletalbumin koncentrációmérést ezt követően azonnal elvégeztük HPLC-vel, illetve elküldtük IT-s meghatározásra. A betegvizit alkalmával rutin laborra is vettünk vért, ezeket a vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében végezték. Későbbi vizsgálatokra mind szérum-, mind vizeletmintát is félretettünk -80°C-ra. A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága jóváhagyta.

3.3.2. A VIZELETALBUMIN KONCENTRÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE

Az immunreaktív vizeletalbumin (ir-uAlb) koncentrációját IT módszerrel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) mértük duplikátumban, Roche/Hitachi 812 Moduláris P analizátorral (érzékenység: 3 mg/l, linearitás: 3000-3000 mg/l, inter-assay-és intra-assay pontosság 4,3% illetve 2,6%). A vizelet összes albumin koncentrációját (t-uAlb) triplikátumban a korábban leírt SE-HPLC (3.1.3) protokoll alapján mértük.

3.3.3. A MÉRETKIZÁRÁSOS HPLC-S ALBUMINCSÚCS VIZSGÁLATA FORDÍTOTT FÁZISÚ HPLC-MÓDSZERREL

A méretkizárásos HPLC-s albumincsúcsot a korábbiakban leírt (3.1.5) előkészítés és fordított fázisú HPLC-módszerrel vizsgáltuk. Az eluálódott csúcsokat összegyűjtöttük, beszárítottuk, az így kapott exsikkátumot 5 µl bidesztvízben feloldottuk, majd vagy közvetlenül, vagy oldószerben való emésztés után MALDI-TOF/MS vizsgálatot végeztünk.

3.3.4. GÉLELEKTROFORÉZISES VIZSGÁLATOK

A méretkizárásos HPLC-s albumincsúcsot a korábbiakban leírt (3.1.5) módon gyűjtöttük és sótlanítottuk. A nátrium dodecilszulfát (SDS) gélelektroforézis sóérzékenysége miatt a korábbi sótlanítási módszeren kívül további eljárással sómentesítettük a mintát, majd beszárítást követően 5 µl bidesztvízben feloldottuk.

Az így elkészített minta fehérjét Laemmli szerinti SDS poliakrilamid gél elektroforézissal választottuk el. A futtatás során két mikrogramm fehérjét vizsgáltunk 12,5%-os géllal. A gél Willoughby szerinti ezüstözésre került a klasszikus Coomassie brillantkék R-250 festést követően. Az azonosított fehérje sávokat a gélből kivágtuk, gélben történő emésztés után pedig MALDI-TOF/MS-el vizsgáltuk.

3.3.5. MALDI-TOF/MS MÉRÉSEK

A tömegspektrometriás mérésekhez egy Autoflex II MALDI készüléket (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) használtunk. Az emésztett fehérjék méréséhez mátrixként 8 mg α -ciano-4-hidroxi-fahéjsavat oldottunk fel 1 ml 50% acetonitrilt (ACN) és 0,1% trifluoro-ecetsavat (TFA) tartalmazó vizes oldatban. Az emésztetlen, intakt fehérjék méréséhez mátrixként telített mustársav oldatot használtunk (az oldószer ez esetben is 50% ACN és 0,1% TFA vizes oldata volt). A mérések során minden esetben 1 μ l mátrixot és 1 μ l mintát cseppentettünk fel rozsdamentes acél mintatartóra. Minden tömegspektrumot pozitív módban pulzatilis ionizáció mellett monitorizáltunk ($\lambda = 337$ nm; nitrogén lézer, maximális frekvencia: 50 Hz; a lézerintenzitás: a maximális 20-30 %-a a peptidek vizsgálata során). Az emésztmények peptidjeit reflektrom detektálási módban, 120 nsec-os késleltetési idővel, a fehérjéket lineár módban 550 nsec-os késleltetési idővel regisztráltuk. A gyorsító feszültség +19 kV, a reflektrom feszültség pedig + 20 kV volt. A peptidek és a fehérjék spektrumai 1000 lövés összegzései. A vizsgálatok során külső kalibrációt végeztünk. A kapott spektrumokat az Flex Analysis (2.4-es verzió) szoftverrel értékeltük ki. Az oldatban emésztett minták analizálásához a Sequence Editor (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert használtuk a következő kritériumok alkalmazásával: 1, minden cisztein jódacetamiddal kezelt (a tripszines emésztés során); 2, csak monoizotópos tömegek megengedettek; 3, az elvett hasítások száma maximum kettő.

4. EREDMÉNYEK

4.1. MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIÁVAL MÉRT VIZELETALBUMIN MÓDOSULTSÁGÁNAK ÉS INTERFERENCIÁJÁNAK MÉRÉSE (A DOLGOZAT I. RÉSZÉ)

4.1.1. AZ UV-FLUORESCZENS HPLC RENDSZER JELLEMZÉSE

Az UV és fluoreszcens mérések napi mérés közötti pontatlanságát öt különböző napon mért HSA, GSA és MGO-HSA minta (koncentrációk: 8,25, 16,5, 33, 66 és 132 mg/l) ötszöri mérésével ellenőriztük egy héten belül. A HPLC-s csúcsterületek napi mérések közötti pontatlansága (százalékos variációs koefficiensként kifejezve) a legalacsonyabb koncentráció tartományban (8,25 mg/l) a következők voltak: 3,5% (UV) és 11,8% (fluoreszcencia) a HSA, 3,7% és 11,6% a GSA és 5,9% és 5,6% az MGO-HSA esetében. A HPLC-s csúcsterületek napi mérések közötti pontatlansága (százalékos variációs koefficiensként kifejezve) a legmagasabb koncentráció tartományban (132 mg/l) a következők voltak: 1,1% (UV) és 5,1% (fluoreszcencia) a HSA, 1,5% és 3,0% a GSA és 1,8% és 2,0% az MGO-HSA esetében. Az UV és fluoreszcens mérések időbeni stabilitásának vizsgálatához ugyanazon mintákat 12 hónapos -80°C fagyasztás után felolvasztva öt alkalommal mértük le egy új kittel. A mérések teljes pontatlansága (a két 1 év különbséggel mért napi mérés közötti pontatlanság százalékos variációs koefficiense) a legalacsonyabb koncentráció tartományban (8,25 mg/l) a következők voltak: 10,7% (UV) és 13,9% (fluoreszcencia) a HSA, 12,5% és 10,9% a GSA és 11,7% és 11,5% az MGO-HSA esetében, míg a legmagasabb koncentráció tartományban (132 mg/l) a következők voltak: 2,6% (UV) és 8,9% (fluoreszcencia) a HSA, 7,5% és 9,1% a GSA és 3,4% és 7,8% az MGO-HSA esetében.

A pontatlansági értékeket a vizeletminták esetében is meghatároztuk. A számításához 10 véletlenszerűen kiválasztott vizeletminta egy héten belül kétszeri mérését végeztük. A betegek vizeletmintáinak UV és fluoreszcens napi mérések közötti pontatlanság variációs koefficiensei 6,1% és 8,8% voltak. A mérés reprodukálhatóságát szintén 12 hónapos -80°C fagyasztás utáni méréssel határoztuk meg egy új kittel. Érdekes módon, míg az albumin UV-csúcs alatti területében szignifikáns csökkenést ($-25\pm 9\%$, átlag \pm SD, $p<0,05$), addig a fluoreszcens csúcs alatti területében nem szignifikáns ($11\pm 20\%$ átlag \pm SD, $p=0,093$) növekedést észleltünk.

4.1.2. AZ IN VITRO ELŐÁLLÍTOTT KÜLÖNBÖZŐ ALBUMINFORMÁK IN-NEL ÉS A HPLC-VEL MÉRT KONCENTRÁCIÓINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

A különböző albuminformák (HSA, GSA és MGO-HSA) különböző koncentrációkban előállított oldatait (8,25, 16,5, 33, 66 és 132 mg/l) mind IN-nel, mind HPLC-vel triplikátumban mértük. A három-három mérést átlagoltuk és minden albumin-koncentrációra és in vitro preparált albumin minden formájára IN/HPLC hányadost számoltunk majd az értékeket egyutas ANOVA analízissel hasonlítottuk össze. A

hányadosok átlaga között szignifikáns különbséget nem találtunk (HSA: $132\pm 10\%$, GSA: $120\pm 8\%$, MGO-HSA: $142\pm 8\%$, $p=0,210$, ANOVA-teszt).

4.1.3. AZ IN VITRO ELŐÁLLÍTOTT KÜLÖNBÖZŐ ALBUMINFORMÁK RELATÍV FLUORESZCENCIÁJA

A fluoreszcens mérés esetleges zavaró tényezőinek - mint például a fluoreszcens jel koncentrációval való nem linearitása - vizsgálatára korrelációs analízist végeztünk. A különböző albuminformák UV és fluoreszcens jelének korrelációs analízise alapján kapott eredmények az alábbiak voltak: HSA: $r=0,9998$, GSA: $r=0,9999$, MGO-HSA: $r=0,9997$.

Az in vitro albuminformák relatív fluoreszcenciáját kiszámoltuk, az eredmények könnyebb interpretálásához, a HSA relatív fluoreszcenciáját 100%-nak vettük. A HSA-hoz viszonyítva mind a GSA, mind az MGO-HSA relatív fluoreszcenciája magasabb (mindkét esetben $p<0,001$) volt, ami jelentős glycooxidatív módosulást jelent.

4.1.4. A DIABETESZES BETEGEK PARAMÉTEREI

A mikroalbuminuria diagnózisához jelenleg használt albumin-kreatinin hányados (ACR) értékek (férfi: 2,5-25 mg/mmol, nő: 3,5-35 mg/mmol) alapján a következő betegcsoportokat képeztük: IN-nel és HPLC-vel egyaránt normoalbuminuriás (NN, $n=47$), IN-nel normo-, de HPLC-vel mikroalbuminuriás (NM, $n=12$), végül mindkét módszerrel mikroalbuminuriás (MM, $n=20$) betegek csoportja. A HPLC-módszer esetében is a hagyományos ACR kritériumrendszert használtuk a mikroalbuminuria diagnózisához, mivel egyelőre nincs HPLC-mérésekre adaptált változat.

A betegcsoportok klinikai paramétereit között a következő különbségeket találtuk: az NM- és MM-csoportokban a szérumkreatinin értékek szignifikánsan magasabbak, míg az eGFR értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az NN-csoporthoz viszonyítva, de az NM- és MM- csoportok között ezen paraméterekben nem mutatkozott szignifikáns különbség. Az MM- csoportban több páciens szedett angiotenzinkonvertáló-enzim gátlót, mint az NM-csoportban. Ezen kívül egyéb különbség nem volt a betegcsoportok között.

A kétféle albumin-koncentráció-meghatározás Bland-Altman analízise alapján azt találtuk, hogy az IN-hez viszonyítva a HPLC a mérések túlnyomó többségében magasabb vizeletalbumin-koncentrációkat mér és az eltérés nagysága a vizeletalbumin-koncentrációval fordított arányban áll.

4.1.5. A DIABETESZES BETEGEK VIZELETALBUMINJÁNAK RELATÍV FLUORESZCENCIÁJA

Az MM-csoport vizeletalbuminjának relatív fluoreszcenciája magasabbnak adódott mind az NN-, mind az NM-csoportéhoz képest ($p < 0,001$ és $p = 0,007$), de az NN- és NM-csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,201$). A vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott a szérumkreatinin szinttel ($r = 0,295$, $p = 0,009$) és negatív korrelációt az eGFR értékekkel ($r = -0,255$, $p = 0,026$), de nem korrelált a glikémiás paraméterekkel (plazmaglukóz: $p = 0,766$, fruktózamin: $p = 0,979$, HbA_{1c}: $p = 0,442$). Többváltozós lineáris regressziós vizsgálatunk alapján a szérumkreatinin és az eGFR bizonyult a vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája független prediktorának ($\beta = 0,397$, $p = 0,014$ illetve $\beta = -0,337$, $p = 0,039$). Az első modell elemei az életkor, plazmaglukóz, fruktózamin, HbA_{1c}, szisztolés és diasztolés vérnyomás, triglicerid, LDL- és HDL-koleszterin, hemoglobin és szérumkreatinin voltak, míg a második modell elemei az előbb felsoroltak voltak, annyi különbséggel, hogy a szérumkreatinin helyett az eGFR normál alapú logaritmizált értékét tartalmazta.

4.1.6. A MÉRETKIZÁRÁSOS HPLC ALBUMINCSÚCS INTERFERENCIÁJA

Az RP-HPLC vizsgálatok alapján a nem albumin természetű anyagok a méretkizárásos HPLC-vel detektálható albumincsúcsban $12,7 \pm 5,2\%$ (átlag \pm SD) arányban voltak jelen.

4.2. HPLC-VEL MÉRT ALBUMINURIA ÉS MINTATÁROLÁS (A DOLGOZAT II. RÉSZÉ)

4.2.1. A TÁROLÁS HATÁSA A HPLC-VEL MÉRHETŐ VIZELETALBUMIN-KONCENTRÁCIÓRA

A HPLC-vel mérhető albuminuria 2,5 éves -80°C -os tárolás után $24 \pm 9\%$ -kal csökkent (vizeletalbumin-koncentráció 2005-ben: 88 ± 259 mg/l, 2008-ban: 55 ± 187 mg/l, $p = 0,002$). Ha a betegeket a vizeletalbumin-koncentráció csökkenése (az inter-assay alatti és feletti csökkenés) és a vizelet-pH-ja szerint (a minták átlagos pH-ja alatt és felett) kategorizáltuk, szignifikáns összefüggést kaptunk ($p = 0,030$).

A vizelet dimer és monomer formáinak vizsgálata során a DMR-ben szignifikáns növekedést észleltünk ($p < 0,001$). A két formát külön vizsgálva azonban azt

találtuk, hogy csak a monomer albumin-forma csúcs alatti területe (azaz az albumin koncentrációja) csökkent szignifikánsan ($p < 0,001$), míg a dimer albumin-forma csúcs alatti területe nem mutatott szignifikáns változást ($p = 0,275$).

4.2.2. A TÁROLÁS HATÁSA A HPLC-VEL MÉRHETŐ VIZELETALBUMIN-KONCENTRÁCIÓRA

Exponenciális összefüggést találtunk a vizelet-pH és a friss vizeletek TFSG-je között (a lineáris korreláció értékei: $r = -0,795$, $p < 0,001$), amely összefüggés már nem volt kimutatható a 2,5 évig tárolt vizeletminták vizsgálata során (a lineáris korreláció értékei $r = -0,216$; $p = 0,261$). Az átlagos TFSG-szint szignifikánsan alacsonyabb volt a tárolt vizeletmintákban a frissekhez képest (tárolt vizeletek: $6,6 \pm 7,7$ és friss vizeletek: $22,7 \pm 14,3$ μM GSH-ekvivalens, $p < 0,001$). Továbbá szignifikáns összefüggést találtunk a DMR-növekedés és a pH között ($r = -0,382$, $p = 0,041$).

4.3. ÚJ, POTENCIÁLIS BIOMARKEREK FELFEDEZÉSE A HPLC-VEL TÖRTÉNŐ ALBUMINURIA MÉRÉS SORÁN (A DOLGOZAT III. RÉSZÉ)

4.3.1. A KÜLÖNBÖZŐ VIZELETALBUMIN MÉRÉSI MÓDSZEREK EREDMÉNYE

A SE-HPLC-vel mért összes uAlb sokkal magasabb növekedést mutatott a betegség aktív szakaszában az IT-vel mért értékhez képest. A két módszer által mért uAlb-koncentráció különbség a betegség aktív stádiumában csaknem 15-szörös volt, amely 6-10-szeresre csökkent a betegség inaktív fázisában. Ez a váratlanul nagy különbség a t-uAlb és ir-uAlb koncentráció eredményeink további vizsgálatára ösztönzött minket.

4.3.2. A MÉRETKIZÁRÁSOS HPLC-S ALBUMINCSÚCS VIZSGÁLATA FORDÍTOTT FÁZISÚ HPLC-MÓDSZERREL ÉS GÉLELEKTROFORÉZISSSEL

A beteg akut stádiumában nyert vizeletminta SE-HPLC-s uAlb-frakciójának RP-HPLC-s kromatogramján több csúcsot fedeztünk fel. Két frakciót gyűjtöttünk az RP-elválasztás során. Az első frakció tartalmazta azon fehérjéket, amelyek 12,40 percnél és 12,69 percnél eluálódtak, amelyek az RP-elválasztás során csak részben elválasztható komponensek voltak, míg a második, sokkal később eluálódó kisebb frakció bizonyult ténylegesen az albumin-frakciónak (mind a mintához külső albuminstandard hozzáadásával (koncentráció: 306 mg/l), mind MALDI-TOF/MS-sel megerősítve). A

remisszióban kapott vizeletek SE-HPLC-s uAlb-frakciójában jelentős csökkentést az első frakció fehérjéi mutattak, míg a második, az albuminé jóval szerényebbet. Az RP-HPLC eredményeit az SDS-PAGE is megerősítette, melyen az albuminon kívül két másik fehérje csík is megjelent.

4.3.3. MALDI-TOF/MS-MÉRÉSSEL KAPOTT EREDMÉNYEK

Az RP-HPLC első frakciójának emésztetlen mintájának vizsgálatával a következő tömegspektrumokat kaptuk: 23,5 kDa, 34,7 kDa és 70,3 kDa (amit a 34,7 kDa tömegspektrumú fehérje dimer tömegének tekinthető).

Az emésztett minták vizsgálatával kapott peptidtömeg-ujjlenyomatot a Mascot adatbázis keresőjével elemezve három fehérjét, az α 1-savas-glikoprotein-1-et, az α 1-savas-glikoprotein-2-öt (az előző izoformáját) és a Zn- α 2-glikoproteint azonosítottuk magas találati pontszámmal és magas szekvencia lefedettséggel (39,3%, 56,2% és 48,1%). Ezen fehérjék jelenlétét az emésztett fehérjék peptidjeinek ún. forrás utáni bomlásspektrum-analízise is alátámasztotta.

A beteg akut stádiumában nyert vizeletminta SE-HPLC-s uAlb-frakciójának SDS-PAGE után a gélből kimetszett fehérjék MALDI-TOF/MS-vizsgálata a fenti eredményeket megerősítették. Kontrollként egy egészséges beteg vizeletét is az előzőeknek megfelelően analizáltuk. A mintában azonban csak az albumin jelenléte volt kimutatható.

5. MEGBESZÉLÉS ÉS KONKLÚZIÓK

A hagyományos mindennapi labor diagnosztikában a vizeletalbumin-koncentrációhoz használt mérési módszerek immunreakción alapulnak. A felhasznált antitesteket szérumalbumin ellen termelik nem pedig a vizeletben található albumin ellen. Ezekkel a módszerekkel a nem immunreaktív albumint és egyéb, 12 kDa feletti albumin-fragmentumokat lehet detektálni. 2003-ban egy új módszert közöltek az albuminuria mérésére, amely a méretkizárásos kromatográfia elvén alapult. A módszert használó első vizsgálatok kimutatták, hogy a vizeletben mérhető albumin koncentrációja magasabb, mint ami a rutin, immun-alapú módszerekkel mérhető. Másként megfogalmazva a vizeletalbumin egy része nem immunreaktív. Az ezt követő cikkek a méretkizárásos nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával mérhető albumin természetét kezdték vizsgálni. Sőt némely szerzők azt feltételezték, hogy egyszerűen

csak a módszer felbontása nem elegendő, azaz a kromatográfiás albumincsúccsal egyéb fehérjék is eluálódnak.

A **dolgozat első részében** ezeket a felvetéseket vizsgáltuk. A vizeletalbumin (elsősorban glicoxidációs) módosultságai fokának vizsgálatához illetve ahhoz, hogy ez befolyásolja-e a vizeletalbumin immunológiai detektálhatóságát, először is létrehoztunk és jellemeztünk egy tandem UV és fluoreszcens detektorral felszerelt nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás rendszert. A mérésekhez in vitro különbözőképpen módosított albuminformákat használtunk. Vizsgálataink célja között szerepelt továbbá diabeteszes betegek vizeletalbumin módosultsági fokának és klinikai paraméterekkel való potenciális kapcsolatának vizsgálata. Vizsgálataink eredményeképp megállapítottuk, hogy az albumin glikoxidatív módosítása nem befolyásolja az immun-reaktivitást. A diabeteszes betegek vizeletének vizsgálatával érdekes módon azt találtuk, hogy az összes vizeletalbumin-módosítás mértéke a diabéteszes betegekben nem a szénhidrát-anyagcsere, hanem a vesefunkció paramétereivel korrelál. A méretkizárásos kromatográfiás vizeletalbumin-csúcs interferencia vizsgálatához (azaz annak megállapításához, hogy az albuminnal együtt eluálódnak-e más anyagok és milyen mennyiségben) egy fordított fázisú nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás módszert dolgoztunk ki. Ezen módszer alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az albuminnal ugyan egyéb fehérjék is eluálódnak, de ezek mennyisége átlagosan a mért albumin 12,7%-a, ami nem magyarázza az immun-alapú és nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás módszerek közötti átlagosan kétszeres koncentráció különbséget.

Négy évvel az új vizeletalbumin mérési módszer leközlése után olyan nagy tanulmányok újraértékelésével, mint például az Ausztrál Diabétesz, Obezitás és Életmód tanulmány, arra a kérdésre keresték a választ, hogy vajon a nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás albuminuria mérési módszernek van-e valamilyen klinikai jelentősége az eddigi módszerekkel szemben. A vizsgálat azonban azt találta, hogy a hagyományos immun-nefelometriai módszerrel és az új folyadék-kromatográfiás módszerrel mért albuminuriának ugyanolyan mortalitás-előrejelző értéke volt. A folyadék-kromatográfiás mérésekhez azonban több évig tárolt mintákból határozták meg az albumin koncentrációját, míg az immun-nefelometriás értékek az eredeti gyűjtési időpontban mért értékek voltak.

Az irodalomból már ismert, hogy a tárolás jelentősen csökkentheti a vizeletben mérhető immunreaktív albumin koncentrációját. Ezért **a dolgozat második részében** azt vizsgáltuk, hogy a tárolás milyen hatással van a nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás módszerrel mérhető összes vizeletalbumin-koncentrációra. Továbbá célul tűztük ki esetleges változás mérése esetén a lehetséges mechanizmusok vizsgálatát. Eredményeink azt bizonyították, hogy a hosszú idejű, -80°C -os tárolás utáni nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás albuminuria-mérés megbízhatatlan eredményeket hoz, melyek félrevezethetik a klinikai előrejelzést, mivel a 2,5 évig -80°C -on tárolt mintákban átlagosan 24%-os vizeletalbumin-koncentráció-csökkenést észleltünk. A csökkenést pH-függőnek találtuk. A nem immunreaktív albumin tulajdonságát vizsgáló egyik munkacsoport azt találta, hogy a nem immunreaktív vizeletalbumin egy proteolitikusan részben emésztett, de nem-denaturáló közegben diszulfid hidak által még intakt mólsúlyú albuminforma, mely redukáló ágensek hatására kisebb darabokra fragmentálódik. Ezen megfigyelés alapján célul tűztük ki mind a tárolt, mind pedig frissen gyűjtött vizeletek összes, szabad szulfhidril csoportjainak mennyiségi mérését (mint potenciálisan redukáló ágenseket), hogy megállapítsuk, vajon a szabad szulfhidril csoportok szerepet játszanak-e a kromatográfiás módszerrel detektálható albuminuria-csökkenésben a diszulfid kötések redukálása, így a fragmentálódás elősegítése által. Szoros összefüggést találtunk friss vizeletekben a szabad szulfhidril csoportok száma és a vizeletek pH-ja között, amely összefüggés a tárolt vizeletekben már nem volt kimutatható. Továbbá azt találtuk, hogy a szabad szulfhidril csoportok száma szignifikánsan csökkent a tárolt vizeletmintákban. Ezt úgy értelmeztük, hogy a vizeletnek potenciálisan magas redukáló kapacitása van, amely pH-függő, és amely szerepet játszhat a kromatográfiás módszerrel mérhető albuminuria-csökkenésben azáltal, hogy a nem immunreaktív albumint fragmentálja.

Habár az albuminuria mérésének klinikai alkalmazása egyelőre csak a diabetológia területére szorítkozik, kimutatott hogy egyéb más klinikai állapotban is értékes lehet az albuminuriának a mérése. Például kimutatott, hogy a gyulladásoos bélbetegségek aktivitásának monitorizálásában és a kezelésre adott válasz lemerésében is használható objektív paraméterként az albuminuria mértéke. Ezen a klinikai területen a folyadék-kromatográfiás albuminuria mérési módszert még nem vizsgálták. **A dolgozat harmadik részeként** egy fiatal, a Crohn-betegség gyakori relapszusaitól szenvedő beteget követtünk és hasonlítottuk össze az immunturbidimetriás és folyadék-

kromatográfiás albuminuria mértékét a betegség lefolyása alatt. A két mérési módszerrel kapott eredmény olyan mértékű különbséget mutatott, amely Crohn betegünk vizeletalbumin kromatográfiás csúcsának további vizsgálatára ösztönzött minket, amely vizsgálatokkal akár új biomarkerek felfedezése is lehetséges. Vizsgálatunk rámutatott, hogy a Crohn-betegség akut stádiumában a folyadék-kromatográfiás albuminuria mérés nem megbízható, mivel potenciálisan jelentős mennyiségű egyéb fehérje interferál a méréssel. A másik részről ezek az egyéb fehérjék, melyeket α 1-savas-glikoproteinként és Zn- α 2-glikoproteinként azonosítottuk, megjelenése illetve elmaradása tökéletesen egybevágott a Crohn-betegség klinikai stádiumaival, amely alapján potenciális, nem invazív, könnyen meghatározható biomarker jelöltekké váltak.

6. A PHD TÉZISEI

- 1) Az albumin glikoxidatív módosulása nem befolyásolja az immun-reaktivitást.
- 2) Diabetesz betegek teljes vizeletalbumin glikoxidációja a vese patológiás elváltozásait tükrözi.
- 3) A méretkizárásos nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás albumincsúcsban az együtt eluálódó fehérjék kevesebb, mint 20%-ban vannak jelen diabetesz betegek vizeletében. Ez az interferencia mérték nem magyarázza az immun-alapú és a méretkizárásos nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás módszerrel mért vizeletalbumin-koncentrációban jelentkező különbséget.
- 4) A nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás módszerrel mért vizeletalbumin-koncentráció a vizelet tárolásával jelentősen csökken -80°C -os tárolás ellenére is. Ez a csökkenés a vizelet-pH-val összefüggést mutat.
- 5) A friss, nem tárolt vizeletnek potenciálisan magas redukáló kapacitása van. Ez a redukáló kapacitás a vizelet-pH-val összefüggést mutat és jelentősen csökken tárolás során.
- 6) A Crohn-betegség akut stádiumában a nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiás albuminuria mérés nem megbízható.
- 7) Az alfa-1-savas-glikoprotein és a cink-alfa-2-glikoprotein vizeletben való megjelenése a Crohn-betegség aktivitásának potenciális új biomarkerei.

7. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

Kumulatív impakt faktor: közlemények: 32,159, absztraktok: 43,311

A téziszhez felhasznált kumulatív impakt faktor: közlemények: 4,766 absztraktok: 3,154

A tézisek az alábbi közleményeken alapulnak

1. **Markó L**, Cseh J, Kőszegi T, Szabó Z, Molnár GA, Mohás M, Szigeti N, Wittmann I. Storage at -80 degrees C decreases the concentration of HPLC-detected urinary albumin: possible mechanisms and implications. *J Nephrol* 2009;22(3):397-402. **IF: 1.252**
2. **Markó L**, Molnár GA, Wagner Z, Böddi K, Koszegi T, Szabó Z, Matus Z, Szijártó I, Mérei A, Nagy G, Wittmann I. Measurement of the modification and interference rate of urinary albumin detected by size-exclusion HPLC. *Physiol Meas* 2009;30(10):1137-1150. **IF: 1.430**
3. **Markó L**, Szigeti N, Szabó Z, Böddi K, Takátsy A, Ludány A, Kőszegi T, Molnár GA, Wittmann I. Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2010 Jul 26. [Epub ahead of print] **IF: 2.084**
4. **Markó L.**, Mikolás E., Molnár G. A., Wagner Z., Kőszegi T., Szijártó I. A., Mohás M., Matus Z., Szabó Z., Böddi K., Mérei Á., Wittmann I. Normo- és mikroalbuminuriás cukorbetegekben a HPLC-vel mért vizeletalbumin-fluoreszcencia a vesefunkciós paraméterekkel függ össze, nem a glikémiás értékkel. *Diab Hung* 2009;17(3):229-238.
5. **Markó L.**, Szijártó I. A., Cseh J., Kőszegi T., Szabó Z., Molnár G. A., Matus Z., Mérei Á., Wittmann I. A HPLC-vel mérhető vizeletalbumin koncentrációja -80 °C-os tárolás során jelentősen csökken: lehetséges mechanizmusok és következmények. *Hypertonia és Nephrologia* 2009;13(2):88-93.

A tézisek az alábbi kongresszusi előadásokon illetve absztraktokon alapulnak:

1. **Markó L.**, Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Kőszegi T., Nagy J., Wittmann I.: Determination of protein glycoxidation-products in the urine of diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(S5):v84-85. **IF: 3.154** *Előadás helyszíne:* XLIII ERA-EDTA (European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association) Congress, 2006, Július 15-18, Glasgow, Egyesült Királyság
2. **Markó L.**, Molnár G.A., Wagner Z., Wagner L., Matus Z., Kőszegi T., Laczy B., Tamaskó M., Mohás M., Cseh J., Nagy J., Wittmann I.: Vizelet fehérje glikoxidációs termékek meghatározása diabeteses betegekben. *Magyar Belorvosi Archivum* 2006;59(S2):111-112. *Előadás helyszíne:* Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának LIII. Vándorgyűlése, Sopron, 2006. június: Legjobb fiatal előadók díja: 3. helyezés
3. **Markó L.**, Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Matus Z., Kőszegi T., Laczy B., Tamaskó M., Mohás M., Cseh J., Nagy J., Wittmann I.: Determination of protein glycoxidation-products in the urine of diabetic patients. *Acta Physiologica Hungarica* 2006;93(2-3):210. *Előadás helyszíne:* Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június
4. **Markó L.**, Wagner Z., Cseh J., Kőszegi T., Matus Z., Wittmann I.: HPLC és nephelometria (NM) összehasonlítása a mikroalbuminuria diagnózisában. *Hypertonia és Nephrologia* 2006;10(S5):107. *Poszterelőadás helyszíne:* Magyar Nephrológiai Társaság XXIII. Nagygyűlése, Eger, 2006. október
5. **Markó L.**, Molnár G. A., Kőszegi T., Cseh J., Mohás M., Matus Z., Wittmann I. Analysis of albuminuria with high performance liquid chromatography (HPLC) and immunonephelometry (IN) in diabetic and/or hypertonic patients. *Acta Physiologica Hungarica* 2009;96(1):101. *Poszterelőadás helyszíne:* A Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2008.
6. **Markó L.**, Cseh J., Kőszegi T., Szabó Z., Molnár G. A., Mohás M., Szigeti N., Szijártó I., Wittmann I. A HPLC-vel mérhető vizelet albumin mennyisége a -80°C-os tárolás során jelentősen csökken. Lehetséges mechanizmusok és következmények. *Hypertonia és Nephrologia* 2008;12(S5):222. *Poszterelőadás helyszíne:* Magyar Nephrológiai Társaság XXIII. Nagygyűlése, Szeged, 2008. szeptember

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezt a dolgozatot Nagyszüleim emlékének ajánlom, akik közül sokan sajnos már nem élnek. Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre számos egyén segítsége nélkül, amely miatt rendkívül hálás vagyok és ezúton is szeretném megköszönni a dolgozathoz nyújtott jelentős és fontos hozzájárulásukat.

Elsőként köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek és testvéremnek az életem során nyújtott támogatást és, hogy segítettek elérni életem céljait.

Hálás vagyok témavezetőmnek Wittmann István Professzor Úrnak, aki még medikus koromban meghívott kutatócsoportjába; aki megtanított mind a kutatásbeli, mind a klinikai gondolkodásmódra; aki időt és energiát nem spórolva támogatott. Hálás vagyok Nagy Judit Professzor Asszonynak is, aki szintén segítette dolgozatom kivitelezését a pécsi 2-es számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumban.

Hálás vagyok a Laborban dolgozó korábbi és jelenlegi Ph.D. hallgatótársaimnak a Laborban együtt töltött évekért és a Ph.D. munkámban nyújtott segítségükért; kiemelten hálás vagyok közülük Molnár Gergőnek, aki mind kezdő medikus kutatói, mind kezdő Ph.D. hallgatói éveimben rengeteget segített. Hálás vagyok Sámikné Varga Ilonának egész Ph.D. éveim alatt nyújtott asszisztenciájáért és Bodor Enikőnek az adminisztratív munkákban való segítségéért.

Hálával tartozom a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet munkatársainak, Szabó Zoltánnak, Böddi Katalinnak és Takátsy Anikónak. Nélkülük a dolgozatban feltett kérdések jelentős része megválaszolatlan maradt volna. Nagyon hálás vagyok Matus Zoltán, volt orvosi kémia tanáromnak a HPLC-s témákban nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok a Laboratóriumi Medicina Intézetből Kőszegi Tamásnak és Ludány Andrea Professzor Asszonynak, akik a számtalan vizelet minta immun-alapú méréseit végezték illetve a gélelektroforézises vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Ezen kívül hálás vagyok a pécsi 2-es számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum összes dolgozójának és betegeinek, hogy lehetővé tették tudományos kérdéseim megválaszolását és a kollégáknak a klinikai és ügyeleti munkámban nyújtott segítséget és türelmet. A kollégák közül külön hálával tartozom Szigeti Nórának, aki kiváló ötletével tovább segítette dolgozatomat. A Klinikai dolgozói közül külön hálával tartozom a nővéreknek, akik mindig a segítségemre voltak.

Külön hálával tartozom Friedrich Luft Professzor Úrnak és Dominik Müllernek, akik lehetőséget nyújtottak, hogy Ph.D. hallgatóként Berlinben az Experimentális és Klinikai Kutatóközpontban folytathattam kutatói tevékenységemet.

És végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom kedvesemnek, Melis Anettnek, aki szerelmével támogatott.

Az itt elvégzett kutatói munkák a következő Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok támogatásával készült: T-043788 (Wittmann István), PD 76395 (Szabó Zoltán), PD 78599 (Takátsy Anikó). Ezen kívül a kutatást a Sanofi-Aventis Zrt. támogatta.