

Fehérjevizsgálatok a Crohn-betegség laboratóriumi diagnosztikájában

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Szirmay Balázs

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető: Prof. Dr. Ludány Andrea

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécs, 2021

I. Bevezetés

A gyulladós bélbetegségek (IBD) előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat. Az újonnan diagnosztizált betegek több mint negyede 18 évesnél fiatalabb, így az IBD kezelése a gyermekgyógyászokat is kihívás elé állítja.

A Crohn betegség (CD) – mint az IBD egyik fő entitása – az emésztőrendszer aktív (relapszus) és inaktív (remisszió) periódusok váltakozásával jellemezhető, tisztázatlan etiológiájú gyulladós megbetegedés. A krónikus, hullámzó lefolyás következtében a betegek élethosszig tartó gondozást igényelnek. Ennek keretében a gyulladós aktivitás és a szövődmények rendszeres felmérését, értékelését végzi el a szakorvos, majd ennek alapján dönt a további kezeléstről. A nyálkahártya szintű remisszió elérését célzó („treat to target”), személyre szabott terápia elveit szem előtt tartva alapvető fontosságú, hogy minél pontosabb képet kapjunk a beteg aktuális állapotáról. A gyors, megközelítő állapotfelmérésre használatos aktivitási indexek gyakran nem tükrözik a bélrendszeri gyulladás valós mértékét. A CD aktivitásának objektív megítélésében kiemelt szerepet kapnak a laboratóriumi vizsgálatok, azonban a jelenleg használatban lévő markerek nem felelnek meg minden elvárásnak. Napjaink gold standard vizsgálómódszere az endoszkópia, mely azonban invazivitása, költségessége és a betegekre – kifejezetten a gyermekekre – gyakorolt megterhelő hatása miatt korlátozott gyakorisággal alkalmazható. A fenti tényezők felvetik a non-invazív labordiagnosztikai oldal erősítésének igényét, ezáltal a CD aktivitását megbízhatóan jelző, újabb biomarkerek felderítése aktív kutatás tárgyát képezi. A vérből és székletből (pl. calprotectin) vizsgált molekulákon túl a vizeletfehérjék diagnosztikus értéke többnyire felfedetlen területnek számít, holott hasznos információval szolgálhatnak mind akut mind krónikus gyulladós folyamatokban.

Az orosomuroid (ORM) – másnéven α -1 savanyú glikoprotein (AGP) – egy 41-43 kDa molekulatömegű akut fázis szérumfehérje. Nagyfokú glikoziláltságának és erős negatív töltésének köszönhetően jól oldódik savakban, rendkívül alacsony izoelektromos ponttal (pI: 2,8-3,8) rendelkezik. A májsejtek mellett a fehérvérsejtek, epithel és endothel sejtek is lehetnek szintézisének forrásai. Az immunocalin protein alcsoport tagjaként biológiai funkciója kettős: lipofil struktúrákat (köztük gyógyszermolekulákat) köt meg és szállít, valamint ismert anti-inflammatorikus és immunmoduláló szerepe is. A szérum ORM emelkedését gyulladós állapotokban és tumoros megbetegedésekben is leírták, ugyanakkor viszonylag hosszabb féléletideje (5-6 nap) miatt általában másodlagos szerepet kap a klinikai gyakorlatban. Az ORM valószínűleg – méretéből adódóan – filtrálódik a

glomerulusokon keresztül, ezáltal egészséges egyének vizeletéből is kimutatható, viszont pontos kiválasztási mechanizmusa tisztázatlan. Emelkedett vizelet ORM (u-ORM) szinteket figyeltek meg gyulladással járó kórképekben (pl. szepszis, cukorbetegség, SLE, RA) arra következtetve, hogy az u-ORM ígéretes marker lehet a klinikai diagnosztikában, azonban lehetséges szerepe a CD vonatkozásában még felderítetlen.

A cystatin-C (CYSC) egy cisztein-proteázokat gátló, 13 kDa molekulatömegű, nem glikozilált szérumfehérje, melyet a legtöbb magvas sejt állandó ütemben termel. A keringésből kb. 2 órás féléletidő mellett eliminálódik a vesék által. A szérum vagy plazma CYSC-t a GFR megbízható, a kreatininnél alkalmasabb indikátoraként tartják számon. A CYSC szabadon filtrálódik a glomerulusokon keresztül, majd a proximális tubulussejtek csaknem a teljes mennyiséget reabszorbeálják, így igen alacsony koncentrációban jelenik meg a vizeletben, egészséges állapotban. Tubuluskárosodás esetén a CYSC reabszorpciójának csökkenése fokozott vizelet CYSC (u-CYSC) ürítéshez vezet. Ezáltal az u-CYSC hozzájárulhat akár az akut vesekárosodás (AKI) akár a diabéteses nephropathia (DN) korai felismeréséhez. A közvetlen klinikai jelentőség mellett hasznos lehet az u-CYSC mérése bizonyos vizeletmarkerek vizsgálata kapcsán is, hiszen az esetleges tubuláris diszfunkció befolyásoló hatással lehet azok értékeire. A feltárt alkalmazási lehetőségek ellenére nem érhető el a kereskedelmi forgalomban rutin felhasználásra alkalmas, automatizált u-CYSC teszt.

A perklórsavas (PCA) kicsapás régóta ismert eljárás a nagyfokban glikozilált fehérjék és egyéb savoldékony kismolekulák kinyerésére a szérumból. Az eljárás lehetőséget teremt az oldatban maradó molekulák, mint potenciális biomarkerek további, érzékeny módszerekkel (pl. elektroforetikus technikák, tömegspektrometria) történő vizsgálatára, kizárva a főbb szérumfehérjék zavaró hatását. A savoldékony szérumfehérjéket ezidáig főképp malignus kórképekben tanulmányozták, ahol a mucoproteinek emelkedett koncentrációit és glikozilációs szerkezetük megváltozását írták le. Mivel fellelhető közöttük többféle akut fázis fehérje, a savoldékony frakció analízise magában foglalhat számos új diagnosztikus lehetőséget a gyulladással járó kórképek – köztük a CD – vonatkozásában, valamint kiindulópontja lehet új biomarkerek azonosításának.

II. Célkitűzések

Tanulmányunk elsődleges célja volt a Crohn betegség aktivitását jelző új fehérjediagnosztikai lehetőségek keresése. Figyelmünk egyrészt a vizelet ORM diagnosztikus értékének meghatározására irányult. A specifikus vizeletfehérje vizsgálat során felmerült az igény a vese tubuláris funkciójának megbízható ellenőrzésére, mivel e tényező befolyásolhatja a reabszorbeálódó fehérjék vizeletkoncentrációját. Ezt az ellenőrzést a vizelet CYSC – mint ismert tubuláris marker – mérésével kívántuk elérni, melyhez egy új automatizált teszt beállítását terveztük. Emellett vizsgálni kívántuk az új u-CYSC teszt további klinikai felhasználási lehetőségeit is. Ezt követően a savoldékony szérumfehérjék analízisére fókuszáltunk a CD további aktivitási markerei után kutatva.

Konkrét céljainkat az alábbiakban foglaltuk össze:

II.1.

- U-CYSC mérésre alkalmas automata immunturbidimetriás módszer beállítása, analitikai validálása
- A módszerünkhöz tartozó előzetes referencia tartomány meghatározása
- U-CYSC szintek vizsgálata olyan betegcsoportokban, akiknél felmerül akut vagy krónikus renális tubuláris károsodás lehetősége:
 - szepszishez társuló AKI
 - krónikus hipertenzió
 - 2-es típusú DM

II.2.

- Crohn betegek glomeruláris és tubuláris vesefunkciójának ellenőrzése se-CYSC és u-CYSC mérésekkel
- Jelzi-e az u-ORM szint a Crohn betegség aktivitását felnőtt és gyermekkorú pácienseknél
- Az u-ORM diagnosztikus értékének meghatározása az aktív és inaktív állapot elkülönítésében
- Összefüggések keresése az u-ORM és a hagyományos gyulladásos paraméterek, valamint a klinikai indexek között

II.3.

- A savoldékony fehérjefrakció kinyerésének standardizálása egészséges egyének és Crohn betegek szérumból perklórsavas precipitációval
 - a savoldékony fehérjekoncentráció mérése
 - a perklórsavas kicsapás protokolljának optimalizálása elektroforetikus analízisekhez
- A savoldékony szérumból elválasztása egydimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE); a mintázatok összehasonlítása és értékelése egészséges egyének, aktív és inaktív állapotú Crohn betegek csoportjaiban
- A savoldékony szérumból elválasztása microchip gélelektroforézissel (MGE) nyert profiljainak vizsgálata
 - az elkülönülő frakciók relatív arányának meghatározása
 - azonosítható-e a CD aktív fázisát jelző jellegzetes mintázat

III. Anyagok és módszerek

III.1. Mintagyűjtés

Vizsgálataink az „Új biomarkerek vizsgálati lehetőségei szeptikus betegeknél” valamint a „Klinikai biokémiai vizsgálatok Crohn beteg gyermekekben” című klinikai tanulmány keretében zajlottak, melyet időközben felnőttkorú páciensekre is kiterjesztettünk. A tanulmányok kivitelezését a PTE Regionális Kutatás-Értékelési Bizottság engedélyezte (4327/KK15/2011 ill. 5133/KK15/2013), melyeket a rögzített protokolloknak megfelelően, a 2008-as Helsinkai Deklarációban foglalt etikai irányelvek betartásával végeztünk. A vizsgálatban résztvevő egyénektől egyszeri mintavétel történt, amely vizeletminta, vagy egyidejűleg vér- és vizeletminta vételét jelentette. Centrifugálást követően (1500g, 10 perc) a szérumból és vizeletmintákat további felhasználásig, porciókra osztva -70°C -on tároltuk.

III.2. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása

III.2.1. Módszer beállítások, validálási procedúra

Az u-CYSC méréséhez polisztrén szemcsék által erősített immunturbidimetriás tesztet (Cystatin C FS kit, Cat. No. 171589910930, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim,

Németország) adaptáltunk a Cobas 8000/c502 automata nyitott fejlesztői csatornájára (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország). Az u-CYSC meghatározáshoz a kitben található, kecskében termeltetett poliklonális anti-humán CYSC immunpartikulumokat tartalmazó reagenst és 100 mmol/l koncentrációjú Tris puffert (pH=7,5) használtuk fel. A kalibráció a kithez tartozó kalibrációs oldatokból (TruCal Cystatin C, Cat. No. 171509910059, DiaSys) készített hígítási sor felhasználásával történt, míg kontrollként a TruLab Cystatin C Level 1 és Level 2 kontroll oldatok (Cat. No. 598709910046, 598809910046, DiaSys) megfelelő hígításait alkalmaztuk. A kalibrátorok, kontrollok és humán minták hígítása minden esetben steril fiziológiás sóoldattal (154 mmol/l NaCl) történt, mely vak mintaként is szolgált a kalibrációkhoz.

Megfelelő analitikai érzékenység elérése érdekében a reakcióban részt vevő kalibrátor/kontroll/minta térfogatát 12 µl-re, a reagens térfogatát 50 µl-re, a puffer térfogatát 170 µl-re állítottuk be. A módszerhez 6 pontos kalibrációt és lineáris regressziós illesztést használtunk. A turbidimetriás reakciót 505 nm-es hullámhosszon detektáltuk. A készülék a 42-70 mérési pontok közötti abszorbancia-változás alapján számította ki a minta CYSC koncentrációját. A reakció 37 °C-on zajlott 10 perces időtartammal.

A módszer validálása során a precizitás, a linearitás és az analitikai szenzitivitás paramétereit a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlásai alapján értékeltük. A sorozaton belüli pontatlanság megállapításához 3 különböző szintű kontroll mintából mintánként 10 parallel mérést végeztünk, míg a sorozatok közötti pontatlanság megítéléséhez mintánként napi 2 parallel mérés történt 20 napig. A módszer linearitását egy adott vizeletmintából készített 7 tagú hígítási sor duplikált mérésével ellenőriztük. Az analitikai szenzitivitás határértékeinek megállapításához 5 vak minta, 5 alacsony koncentrációjú vizeletminta, valamint egy vizeletmintából készített 6 tagú hígítási sor analízisét végeztük el.

A high-dose hook (magas dózisú kioltási) effektust a 0,0-8,0 mg/l-es koncentráció-tartományban vizsgáltuk a kit legmagasabb koncentrációjú standardjából előállított hígítási sor mérésével. A visszanyerhetőség (recovery) vizsgálata a Westgard guidelines ajánlásai alapján történt kontroll oldattal, ill. fiziológiás sóoldattal addicionált 5 különböző vizeletminta mérésével. A kalcium, a karbamid, a glükóz, az albumin és a hemoglobin potenciális interferenciát okozó hatásának teszteléséhez vizeletmintákat addicionáltunk az adott anyag oldatával, ill. fiziológiás sóoldattal.

Az u-CYSC stabilitását adagokra osztott 10 vizeletmintán vizsgáltuk konzerváló szer hozzáadása nélkül. A szobahőmérsékleten és hűtőszekrényben (4°C) tárolt mintákból

kezdetben, majd 2, 4, 6 és 24 óra elteltével végeztünk u-CYSC méréseket. Továbbá teszteltük a -20°C-on 3 hónapig tartó tárolás és a fagyasztási-kiolvastási ciklusok analit stabilitásra gyakorolt hatását is.

III.2.2. Vizsgált csoportok

Az u-CYSC módszerünkhöz előzetes referencia tartományt határoztunk meg 117 fő, 10- és 60 év közötti egészséges egyén bevonásával. Az egészséges státusz megállapítása fizikális vizsgálaton és a korábbi egészségügyi dokumentáción alapult. Kizárási kritériumot jelentett bármilyen ismert krónikus betegség, akut betegségre utaló tünet vagy panasz, referencia tartományon kívüli hsCRP érték (>5 mg/l), illetve proteinuria jelenléte. Az u-CYSC teszt klinikai alkalmazási lehetőségeinek felderítéséhez szepszishez kapcsolt akut vesekárosodással (AKI) intenzív osztályon kezelt betegek (n=33), krónikus hipertenzióban szenvedő járóbetegek (n=43), valamint 2-es típusú cukorbeteg (n=41) vizeletmintáit vizsgáltuk. Szeptikus betegek esetében az AKI megállapítása a Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) ajánlásoknak megfelelően történt, megerősítve a szérumszámított kreatinin (sCr) értékekkel. A krónikus hipertenzív és cukorbeteg csoportokra vonatkozóan a beválasztási szempontok a következők voltak: klinikailag diagnosztizált és kezelt betegség, valamint akut gyulladásozó állapot és egyéb ismert krónikus betegség (autoimmun betegségek, tumor) hiánya.

A vizeletmintákból összfehérje és kreatinin méréseket is végeztünk rutin laboratóriumi módszerekkel. Az u-CYSC értékeket az abszolút koncentráció-adatok (mg/l) mellett vizelet kreatininre vonatkoztatva is megadtuk u-CYSC/u-CREAT hányadosok formájában.

III.3. U-ORM szintek vizsgálata Crohn betegeknél

III.3.1. Vizsgált csoportok

Klinikailag diagnosztizált felnőtt (n=55) és fiatalos (n=31) Crohn betegek alkották vizsgálati csoportjainkat, melyeket egészséges kontrollokkal (felnőtt, n=38; gyermek, n=30) hasonlítottunk össze. A gyermekos csoportokba a 18 évnél fiatalabb egyének kerültek. Kizárási kritériumot jelentett a Crohn betegek esetén bármilyen ismert vesebetegség, malignitás, azonosított gyomor-bélrendszeri fertőzés, továbbá a beleegyezés hiánya. A kontroll csoport tagjainál kizárási kritériumnak tekintettük bármilyen akut vagy krónikus betegség fennállását, a referencia tartományon kívüli hsCRP értéket (>5 mg/l) és proteinuria jelenlétét. A betegeket aktív és inaktív csoportokba soroltuk az életkornak

megfelelő klinikai pontrendszer alapján (Pediatric Crohn's Disease Activity Index, PCDAI; illetve Harvey-Bradshaw Index, HBI).

III.3.2. Laboratóriumi mérések

Az u-ORM szinteket egy általunk előzőleg beállított és validált immunturbidimetriás módszerrel mértük latex szemcsékhez kötött anti-humán ORM antitesteket tartalmazó reagens (ref. no. OA504, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia) és a hozzá tartozó reakciós puffer (ref. no. PO1812, Dako) felhasználásával. A teszt detektálási határértéke 0,02 mg/l volt, méréstartománya a 0,08–5,25 mg/l-es intervallumot fedte le.

Szérum, ill. alvadásgátolt vérmintákból összfehérje (se-TP), hsCRP, se-ORM, ESR, WBC, PLT mérések történtek, míg a vizeletmintákból összfehérje (u-TP), albumin (u-ALB) és kreatinin (u-CREAT) értékeket határoztunk meg a rutin diagnosztikában alkalmazott módszerekkel. A vesefunkció ellenőrzése végett szérum és vizelet CYSC méréseket is végeztünk. Az u-CYSC szinteket a III.2. fejezetben ismertetett módszerrel mértük.

Mivel spontán vizeletmintákat analizáltunk, az u-ORM és u-ALB értékeket vizelet kreatininre vonatkoztattuk (u-ORM/u-CREAT és u-ALB/u-CREAT), hogy csökkentsük a vizelet mennyiségéből és koncentrátságából adódó befolyásoló hatást. Ezen felül a vizelet összfehérjére vonatkoztatott értékeket is kiszámítottuk (u-ORM/u-TP és u-ALB/u-TP), hogy vizsgáljuk az ORM és az albumin %-os arányának változását a vizeletfehérjék között.

III.4. Savoldékony szérumfehérjék vizsgálata Crohn betegeknél

III.4.1. Vizsgált csoportok

Klinikailag diagnosztizált, felnőtt (n=32) és fiatalos (n=30) Crohn betegek vettek részt a vizsgálatban, továbbá 14 felnőtt és 11 gyermekkorú egészséges egyén szerepelt kontrollként. A betegek aktivitás szerinti csoportba sorolása, továbbá a kizárási kritériumok megegyeztek az u-ORM szintek vizsgálata kapcsán leírtakkal (ld. III.3.1.).

A vizsgálatban szereplő egyének vérmintáiból se-TP, hsCRP, se-ORM, WBC értékeket határoztuk meg.

III.4.2. A savoldékony szérumfehérjék perklórsavas extrakciója

A savoldékony szérumfehérjék kinyeréséhez 1000 µl szérumokat 1000 µl 1 M-os PCA-val elegyítettünk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk azokat. Centrifugálást

(3800g, 6 perc) követően a felülúszók 1200 µl térfogatait 800 µl 1,42 M-os NaOH oldattal neutralizáltuk. 10 perc inkubációt és centrifugálást (3800g, 6 perc) követően a felülúszók 1000 µl térfogatához 300 µl 2 M koncentrációjú Tris-HCl puffert adtunk, így az oldatok végleges pH-ja 8,5-8,8 közötti tartományba került. Az extrakció során nyert oldatok összfehérje koncentrációját Hitachi U-2910 UV/VIS spektrofotométerrel határoztuk meg 220 nm-es hullámhosszon, kalibrációs görbe alapján, majd kiszámítottuk a savoldékony fehérjék eredeti szérumkoncentrációját a végbemenő hígulások figyelembe vételével.

III.4.3. A savas extraktumok laboratóriumi analízise

A savoldékony szérumfehérjéket molekulatömegük szerint szeparáltuk Laemmli szerinti egydimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE). A felhasznált géllemezek 7,5% metilén-bisz-akrilamiddal keresztkötött akrilamid polimert tartalmaztak. A savas extraktumok 200 µl térfogatait 50 µl (SDS-t és β-merkaptóetanolt tartalmazó) 5-szörös töménységű mintapufferrel elegyítve 100 °C-os vízfürdőben 3 percig forraltuk. Az elektroforézist egységesen 10-10 µl mintatérfogatokkal végeztük. A fehérjemintázatok detektálásához Coomassie Brilliant Blue (CBB) festést, majd Willoughby és mtsai. szerinti kombinált ezüstözési eljárást alkalmaztunk a géllemezeken, melyekről ezután digitális képi dokumentációt készítettünk.

A savoldékony szérumfehérjék MGE analízisét Agilent 2100 Bioanalyzer készüléken High Sensitivity Protein 250 LabChip kit felhasználásával végeztük, mely 4,5%-os polidimetil-akrilamid alapú lineáris polimer mátrixot alkalmazott az elválasztáshoz. A mintákat – az elektroforézist megelőzően – DMSO-t tartalmazó reaktív fluoreszcens festékoldattal 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A festék felesleget ethanolamin hozzáadásával kötöttük meg. A jelölt mintákat desztillált vízzel 5-szörösre hígítottuk, majd azoknak 10 µl térfogatát 5 µl denaturáló oldattal elegyítettük. Ezután 5 perc forralás történt 100°C-on. 6-6 µl mintatérfogatok, valamint molekulásúly marker felvitelét követően az elválasztás 1000 V feszültség mellett 30°C hőmérsékleten 60 s-ig zajlott. A fehérjefrakciók detektálása a fluoreszcens festék fényemissziója alapján 680 nm-es hullámhosszon történt. Mivel a festékkötődés arányos a fehérjemennyiséggel, a görbe alatti területekből (AUC) kiszámítottuk az egyes fehérjefrakciók adott mintára vonatkoztatott relatív hányadát.

III.5. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az SPSS programmal (22-es verzió) végeztük (IBM Corporation, NY, USA). Adataink eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. A vizsgálati csoportok összehasonlításához nem parametrikus tesztek (Kruskal-Wallis ill. Mann-Whitney U teszt) alkalmaztunk. A folytonos változók közötti kapcsolatokat Spearman-féle korrelációs teszttel vizsgáltuk. A paraméterek diagnosztikus hatékonyságát ROC (receiver operating characteristic) görbék alapján ítéltük meg a görbe alatti terület (AUC ROC) kiszámításával. A folytonos változók adatait a medián és interkvartilis (IQR, 25-75% percentilis) értékek megadásával szemléltettük. A statisztikai elemzések során a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

IV. Eredmények

IV.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása

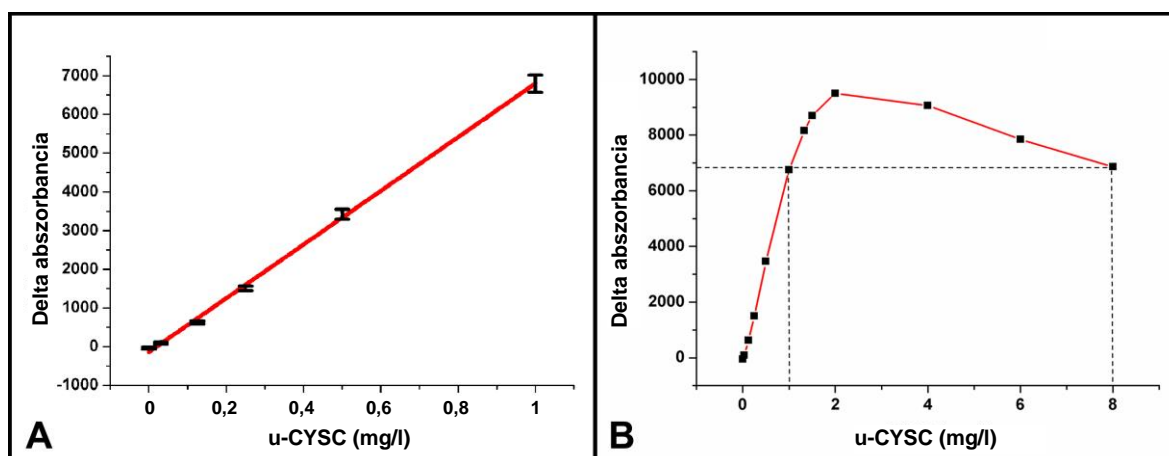
IV.1.1. Módszer validálás, interferencia, stabilitás vizsgálatok

A méréstartományt 0,0-1,0 mg/l közé állítottuk be (kalibrált tartomány), amelyen belül a dózis-válasz görbe lineárisnak bizonyult (1/A ábra). Az 1,0 mg/l-nél magasabb koncentrációjú minták mérését megfelelő mértékű hígítást követően ismételni kellett. A sorozaton belüli és a sorozatok közötti pontatlanság CV értéke is 5% alatt maradt minden vizsgált szint esetén. Az analitikai szenzitivitás paraméterei is megfelelőek voltak (limit of detection, LOD=0,017 mg/l; limit of quantification, LOQ=0,037 mg/l). A kvantifikálási határérték lehetővé tette a pontos meghatározást 0,037 mg/l legkisebb értéktől a kalibrált tartományon belül. A módszer linearitását jónak találtuk ($R^2=0,991$), a 0,04-0,86 mg/l tartományban vizsgálva azt.

A high dose hook effektus vizsgálata során 2,0 mg/l u-CYSC koncentráció felett tapasztaltuk a jelintenzitás csökkenését, a biztonsági zóna határa pedig 8,0 mg/l u-CYSC értéknél mutatkozott (1/B ábra). A visszanyerhetőség vizsgálata során 2,1%-os hibaértékét találtuk, melyet a guideline alapján elfogadhatónak minősítettünk.

Nem tapasztaltunk az u-CYSC méréssel interferáló hatást a minta 15 mmol/l kalcium, 1350 mmol/l urea, 280 mmol/l glükóz, 12 g/l albumin valamint 5 g/l hemoglobin tartalma esetén sem. Az u-CYSC stabil maradt 6 óra szobahőmérsékleten, ill. 24 óra 4°C-on való tárolás során. 3 hónapig tartó -20°C-on tárolást, valamint 3 fagyasztási-kiolvasztási ciklust

követően is megfelelő stabilitást találtunk. Azonban valamennyi vizsgálati körülmény mellett 1 vagy 2 vizeletminta esetén jelentős u-CYSC veszteséget észleltünk.



1. Ábra. A: Az u-CYSC teszt 30 kalibrálás során nyert, 6 pontos kalibrációs egyenese a 0,0-1,0 mg/l közötti tartományban (lineáris illesztés). **B:** Dózis-válasz görbe 0,0-8,0 mg/l között, valamint a “high dose hook effektus” és a biztonsági zóna meghatározása.

IV.1.2. Előzetes referencia tartomány meghatározása

Nem találtunk különbséget egészséges férfiak és nők között sem az u-CYSC sem az u-CYSC/u-CREAT értékek tekintetében. A kontroll csoporton belül a fiatalok (<18 éves korcsoport) magasabb u-CYSC/u-CREAT értékeket mutattak a felnőttekhez képest (8,9 mg/mol vs. 6,5 mg/mol, $p < 0,001$), ugyanakkor az u-CYSC koncentrációik a felnőttekével megegyezőnek bizonyultak (0,060 mg/l vs. 0,061 mg/l, $p > 0,05$). Néhány kontroll minta esetében az LOQ alatti u-CYSC szintet detektáltunk, ezért csak felső referencia határértéket (<95 percentilis) állapítottunk meg: u-CYSC <0,14 mg/l életkortól függetlenül; u-CYSC/u-CREAT <19,7 mg/mol fiatalok és <12,4 mg/mol felnőttekre vonatkozóan.

IV.1.3. Az u-CYSC teszt alkalmazása különböző betegcsoportok vizsgálatára

Szignifikánsan emelkedett u-CYSC szinteket (0,91 (0,28-3,25) vs. 0,06 (0,04-0,09) mg/l, $p < 0,001$) és u-CYSC/u-CREAT hányadosokat (309,6 (123,1-1010,8) vs. 6,5 (5,3-7,8) mg/mol, $p < 0,001$) figyeltünk meg szepszis-indukálta AKI-val diagnosztizált betegeknél a felnőtt kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a krónikus hipertenzióban szenvedő (0,05 (0,03-0,09) mg/l; 6,9 (5,4-9,1) mg/mol), valamint a 2-es típusú diabeteses betegek értékei

(0,06 (0,04-0,08) mg/l; 6,2 (5,0-8,2) mg/mol) nem különböztek az egészséges csoportban megfigyeltektől.

IV.2. Az u-ORM vizsgálata Crohn betegeknél az aktivitás függvényében

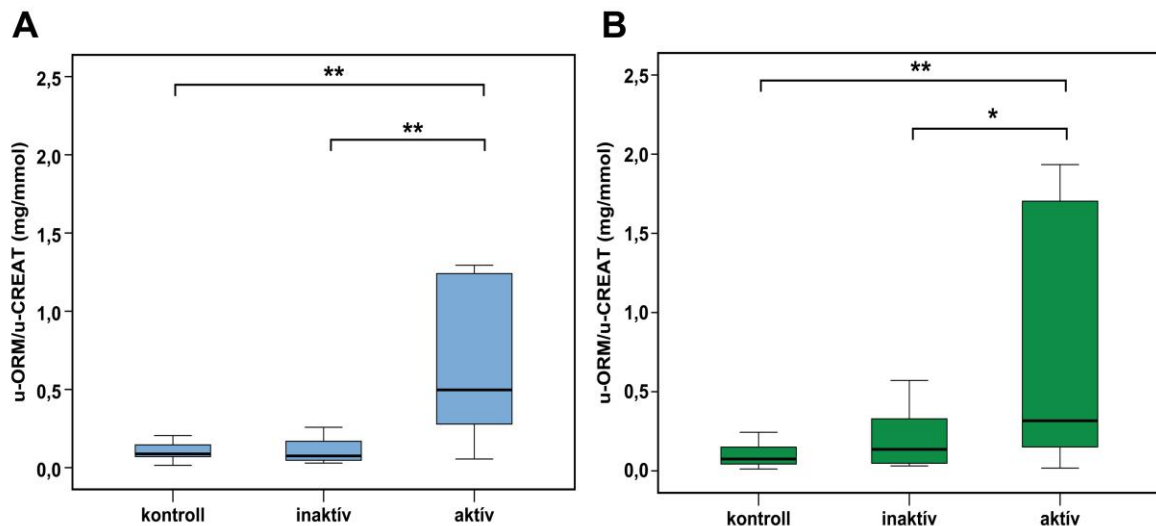
A 86 vizsgált Crohn beteg közül 38 esetében aktív, 48 esetében pedig inaktív fázist állapítottak meg a gasztroenterológus szakorvosok az aktivitási indexek alapján. A felnőtt betegek 47%-a, a gyermekek 39%-a volt aktív fázisban. Nem találtunk különbséget férfiak és nők u-ORM/u-CREAT értékei között. Valamennyi vizsgált egyén vesefunkciója megtartottnak bizonyult a szérum és vizelet CYSC mérések alapján.

A hsCRP, ESR, se-ORM szignifikáns emelkedéssel jelezték a CD aktív stádiumát, továbbá a felnőtt aktív betegeknél a WBC, PLT értékek is szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0,01$) az inaktívakhoz képest. Az előbbieket mellett az u-ORM is jól tükrözte a gyulladás mértékét a betegcsoportokban. Aktív fázis esetén az u-ORM/u-CREAT hányados nagyobb arányú emelkedést mutatott, mint a se-ORM, különösképpen a gyermekeknél.

Gyermekekori aktív betegeknél hétszer magasabb u-ORM/u-CREAT értékeket találtunk (0,50 (0,33-1,21) mg/mmol), mint az inaktív csoportban (0,07 (0,05-0,17) mg/mmol, $p < 0,001$). A felnőtt aktív betegek esetében viszont csak kétszeres emelkedést figyeltünk meg (0,32 (0,16-1,54) mg/mmol) az inaktívakhoz viszonyítva (0,14 (0,05-0,33) mg/mmol, $p = 0,01$) (2. ábra). Összehasonlítva a gyermekek és felnőttek u-ORM/u-CREAT értékeit, nem találtunk szignifikáns eltérést.

Az u-ALB/u-CREAT hányados nem mutatott szignifikáns különbséget az aktív és inaktív csoportok között (fiatalkorúak: 0,52 (0,41-1,09) vs. 0,70 (0,42-1,79), felnőttek: 0,79 (0,31-2,53) vs. 0,61 (0,40-1,16) mg/mmol).

A vizeletfehérjék összetételét tekintve az u-ORM/u-TP arány szintén emelkedettnek bizonyult aktív CD esetén (3,2 (2,0-6,4) %) mind az inaktív állapothoz (1,0 (0,6-2,8) %, $p < 0,001$), mind az egészséges egyénekhez (1,0 (0,6-1,7) %, $p < 0,001$) viszonyítva. Az u-ALB/u-TP arány viszont nem mutatott különbséget a 3 csoport között (aktív CD: 6,7 (3,4-14,8) % vs. inaktív CD: 8,3 (6,3-10,5) % vs. kontroll csoport: 6,7 (4,9-12,6) %).



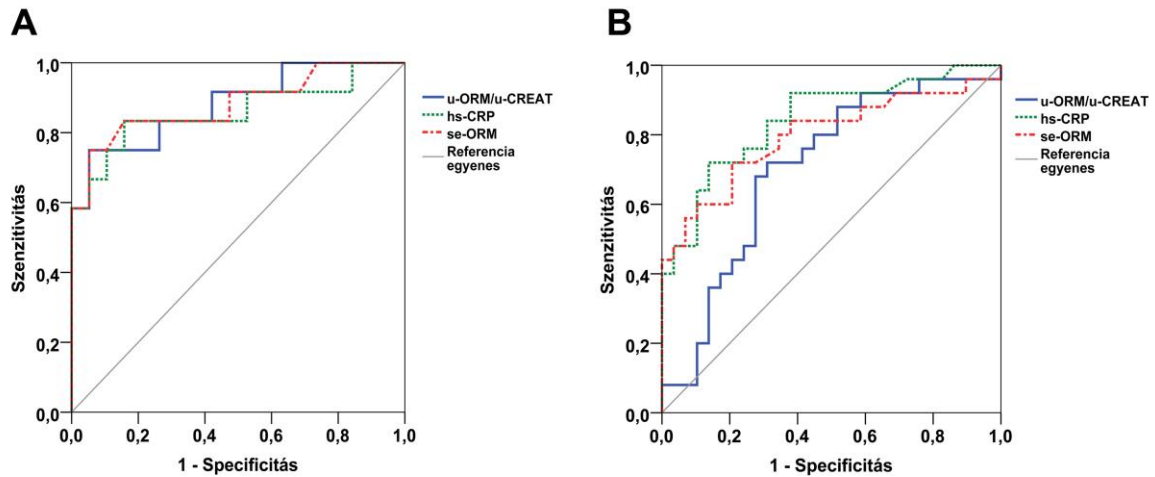
2. Ábra: Gyermek (A) és felnőtt Crohn betegek (B) valamint kontroll egyének u-ORM/u-CREAT adatai. * $p=0,01$; ** $p<0,001$

IV.2.3. Korrelációs vizsgálatok

Szignifikáns ($p\leq 0,01$) korrelációkat találtunk az u-ORM/u-CREAT hányadosok és a gyulladási markerek között, azonban a korrelációs kapcsolatok kissé gyengébbnek bizonyultak a felnőtt betegek esetén (hsCRP: 0,44; ESR: 0,37; se-ORM: 0,49; PLT: 0,44), mint a gyermekgyógyászati páciensek csoportjában (hsCRP: 0,55; ESR: 0,47; se-ORM: 0,59; PLT: 0,45). A WBC-vel való kapcsolat csak a felnőtteknél bizonyult szignifikánsnak. Az u-ORM/u-CREAT szembetűnően gyengébb összefüggést mutatott a felnőtt betegek aktivitási indexével (HBI: 0,33; $p=0,018$), mint a gyermekekével (PCDAI: 0,59; $p<0,001$).

IV.2.4. ROC analízis

A ROC analízis során nyert eredmények azt mutatták, hogy a hsCRP (AUC: 0,86; $p<0,001$) és a se-ORM (AUC: 0,88; $p<0,001$) mellett az u-ORM/u-CREAT (AUC: 0,88; $p<0,001$) is hasonló szignifikáns diszkriminatív erővel képes különbséget tenni aktív és inaktív állapot között fiatalokú Crohn betegek esetén (3/A ábra). Felnőtt betegeknél azonban az u-ORM/u-CREAT görbe alatti terület (AUC) értéke (0,70; $p=0,01$) valamelyest elmaradt a hsCRP-re (0,84; $p<0,001$) és a se-ORM-re (0,80; $p<0,001$) kapott értékektől (3/B ábra).



3. Ábra: ROC analízisek a Crohn betegség aktív és inaktív fázisának elkülönítésére gyermekgyógyászati (A) és felnőtt betegeknél (B).

IV.3. Savoldékony szérumfehérjék vizsgálata Crohn betegeknél

IV.3.1. A vizsgált csoportok rutin laboratóriumi adatai

A 28 betegből álló aktív csoport gyulladáshoz kapcsolódó paraméterei (WBC, hsCRP, se-ORM) szignifikánsan emelkedettek voltak a 34 fős inaktív csoporthoz és a kontrollokhoz viszonyítva ($p < 0,01$). Az aktív Crohn betegek szérum összfehérje koncentrációja jelzett csökkenést mutatott az inaktív betegekhez képest ($p < 0,05$).

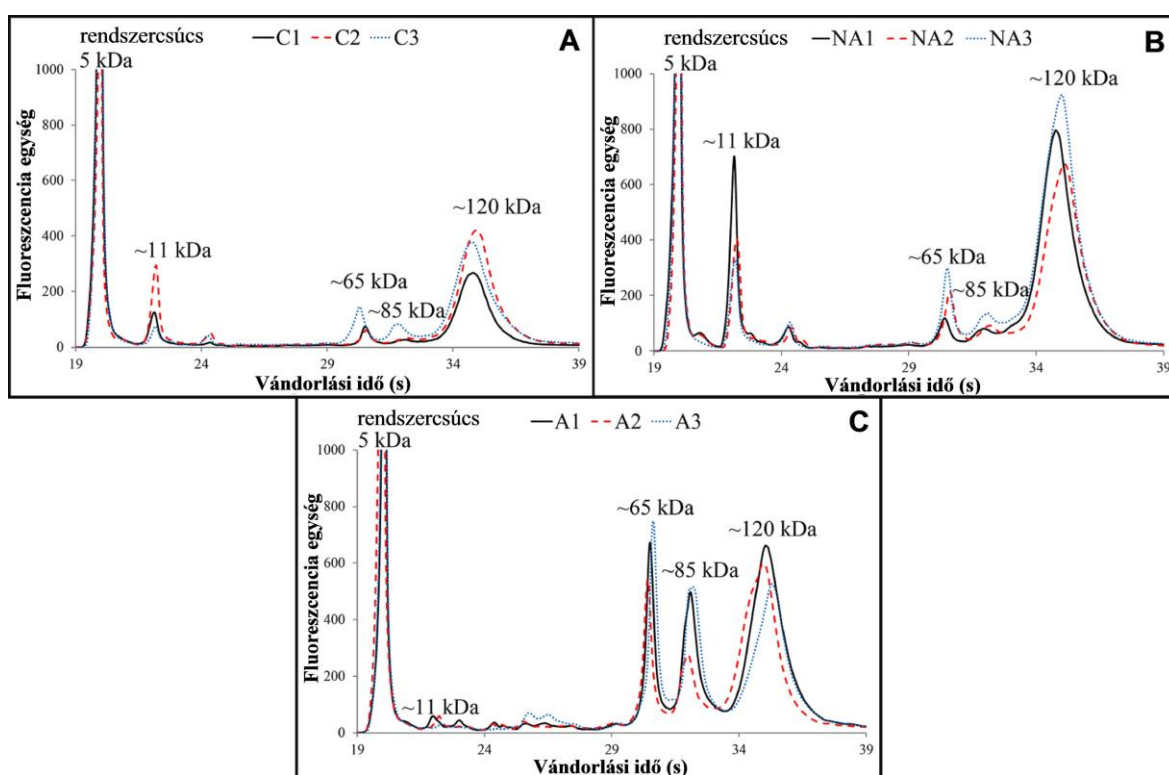
IV.3.2. A savoldékony szérumfrakció laboratóriumi analízise

Összehasonlítva a kontroll (1,2 (1,0-1,5) g/l) ill. az inaktív betegcsoporttal (1,7 (1,4-2,1) g/l), az aktív Crohn betegek esetében (2,9 (2,2-3,7) g/l) szignifikánsan emelkedett savoldékony fehérjeszinteket mértünk ($p < 0,001$).

A PCA-oldékony szérum frakció SDS-PAGE analízissel nyert mintázatait kvalitatívan értékelve markáns különbségeket észleltünk a vizsgált csoportok között. Összehasonlítva az egészséges egyének mintázatával, az aktív Crohn betegeknél szembetűnően több fehérje frakció volt detektálható, továbbá a 30-67 kDa közötti régió frakciói erőteljesebb festődést mutattak. Az inaktív stádiumú betegek fehérjeképe a kontrollokéhoz volt hasonló.

A savoldékony szérumfehérjék MGE analízise során mindhárom csoport mintái esetében négy, jól elkülöníthető frakciót detektáltunk, melyek a ~11, ~65, ~85 és ~120 kDa körüli régióban jelentek meg. Az inaktív Crohn betegek mintázata az egészséges egyénekére hasonlított, míg az aktív periódusban lévő betegek mintázata markánsan eltért az

előbbiektől (4. ábra). A ~11 kDa-nál detektált csúcs relatív aránya mintegy háromszor nagyobb volt a kontroll (12,2 (7,2-23,8) %) és az inaktív betegcsoportban (12,1 (9,5-17,2) %), mint az aktív stádiumú betegeknél (4,4 (2,9-9,0) %; $p < 0,001$). A ~65 és ~85 kDa-nál elhelyezkedő frakciók szignifikánsan magasabb értékeket mutattak aktív gyulladásos állapot esetén (10,8 (6,5-18,5) %; $p < 0,05$ ill. 11,7 (8,2-17,5) %; $p < 0,001$), összehasonlítva az inaktív (7,2 (5,3-11,1) % ill. 3,1 (2,5-5,8) %), valamint az egészséges állapottal (5,5 (3,3-10,3) % ill. 1,7 (1,2-2,9) %). A ~120 kDa-nál látható komponens relatív aránya alacsonyabb volt az aktív betegcsoportban a többi csoporthoz képest, ez a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak.



4. Ábra: MGE során nyert savoldékony fehérjeprofílok, csoportonként 3-3 reprezentatív minta bemutatásával. A: kontroll csoport. B: inaktív CD. C: aktív CD.

V. Megbeszélés

V.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer beállítása, validálása, klinikai alkalmazása

Megfelelően gyors, precíz és szenzitív, teljesen automatizált turbidimetriás u-CYSC meghatározási módszert dolgoztunk ki Roche Cobas 8000/c502 készüléken, mely rutin

diagnosztikai felhasználásra is ideális. A kiemelkedő analitikai szenzitivitásnak köszönhetően az u-CYSC kvantitatívan meghatározható a renális diszfunkcióval rendelkező betegek mellett az egészséges populáció vizeletében is. A kalibrált tartomány feletti (>1 mg/l) u-CYSC érték esetén a mérés ismétlése szükséges megfelelő mértékű hígítást követően. Súlyos AKI esetén ajánlott a vizeletminták előhígítása, mivel előfordulhatnak a biztonsági zóna határértékét (8 mg/l) is meghaladó u-CYSC szintek.

Az általunk beállított módszer analitikai teljesítménye hasonló, vagy előnyösebb az eddig közölt turbidimetriás tesztekhez viszonyítva.

Egyetértésben korábbi vizsgálatokkal, nem tapasztaltunk számottevő interferenciát a vizelet lehetséges endogén összetevői (albumin, hemoglobin, kalcium, karbamid, glükóz) és az u-CYSC mérés között.

Stabilitás vizsgálataink felfedték, hogy egyes vizeletmintákban a CYSC instabil lehet a tárolási hőmérséklettől függetlenül, megerősítve Sohrabian és mtsai. korábbi megfigyelését. Ennek alapján célszerű a mérést friss vizeletmintákból végezni, vagy a mintákat hűtve, proteáz gátló hatású tartósítószer hozzáadásával tárolni.

Mivel a CYSC vizelettel történő exkréciója nem mutat cirkadián ritmust, nem szükséges a vizeletgyűjtés. A spontán ürített vizeletminták esetében indokolt lenne az eredményeket vizelet kreatininre vonatkoztatva kifejezni az eltérő hidráltási állapotok befolyásoló hatásának csökkentése érdekében. Az abszolút u-CYSC koncentrációadatok, ill. az u-CYSC/u-CREAT arány megbízhatósága viszont vita tárgyát képezi, ezért tanulmányunkban a kétféle érték egyidejű megadása mellett döntöttünk.

A kontroll csoportot vizsgálva csak felső referencia határértéket határoztunk meg <95 percentilis értéknek megfelelően, mivel az igen alacsony u-CYSC szintek nem mindig kvantifikálhatók és nem is rendelkeznek klinikai jelentőséggel. Az egészséges egyének körében mért u-CYSC ill. u-CYSC/u-CREAT értékeink és referencia tartományunk összhangban állnak a korábban közölt adatokkal. A tizenévesek és a felnőttek u-CYSC/u-CREAT értékei között tapasztalt különbség valószínűleg a vizelet kreatinin kiválasztás életkor függéséből adódhat, amelynek hátterében a kamaszkor alatt végbemenő izomtömeg-növekedés áll.

Szignifikánsan emelkedett u-CYSC szinteket és u-CYSC/u-CREAT hányadosokat találtunk az AKI betegek csoportjában a kontroll csoportéhoz képest, mely jelezte a szepszishez kapcsolt AKI következtében fellépő tubuláris vesekárosodást.

Habár a krónikus magas vérnyomás a nephropathia rizikófaktora, vizsgálati csoportunk adatai szerint nem volt hatással a krónikus hipertenzió az u-CYSC szintekre. A diabeteses

csoportban mért u-CYSC értékekből arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált betegeknek még nem alakult ki tubuláris károsodás. Korábbi tanulmányok alapján a tubuláris károsodás megelőzheti a mikroalbuminuria megjelenését a cukorbetegség egy kisebb hányadánál, amely esetek korai felismerésében hasznos marker lehet az u-CYSC. Eredményeink és a rendelkezésre álló adatok alapján az u-CYSC alkalmas – különösen AKI esetén – a vese tubuláris károsodásának korai jelzésére, igényt teremtve a mindennapi klinikai használatra. Az általunk beállított és validált teszt egyszerűen adaptálható a forgalomban lévő laboratóriumi analizátorokra, elősegítve, hogy az u-CYSC a rutin diagnosztikai paletta részévé válhasson.

V.2. Az u-ORM, mint a Crohn betegség aktivitásának lehetséges markere

A Crohn betegek gondozása során a megfelelő terápia megválasztása szempontjából kiemelt fontosságú a gyulladással járó aktivitás objektív megítélése. A klinikai indexek szubjektív volta és az endoszkópos vizsgálatok invazivitása miatt egyre inkább felértékelődik a laboratóriumi diagnosztika szerepe, ami aktív kutatást eredményez újabb, non-invazív biomarkerek irányába. Az ORM vizeletből mérhető szintjeinek információs értékét – legjobb tudásunk szerint – még nem vizsgálták a CD vonatkozásában.

Vizsgálatunkban az u-ORM/u-CREAT hányados képes volt különbséget tenni a CD aktív és inaktív fázisa között; gyermekkorú betegek körében hasonló teljesítménnyel, mint a hsCRP és a se-ORM. Felnőttkorú Crohn betegeknek viszont valamelyest elmaradt a diagnosztikus ereje a szérumban mérhető markerekétől. Habár a vizsgálati csoportok viszonylag kis elemszámúak voltak, a korcsoportok között tapasztalt teljesítménybeli különbség összefüggésben állhat a betegek aktivitási index-alapú kategorizálásával: a gyermekeknek alkalmazott PCDAI több objektív tényezőt tartalmaz, mint a felnőttek HBI pontrendszeré. Az u-ORM/u-TP arányban látott különbség arra enged következtetni, hogy a gyulladással járó aktivitás egy bizonyos mértékű változást idéz elő a vizeletfehérjék összetételében. Ezt a hatást már szepszishez kapcsolt súlyos akut gyulladással járó állapotban is megfigyeltük, ahol markánsabb változás volt detektálható, mint a CD aktív fázisában.

A fokozott u-ORM kiválasztás feltételezhetően az immunrendszer aktivációjával függ össze. Az aktív CD csoportban talált többszörös emelkedés összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, melyek más akut (pl. szepszis, nyitott szívű műtét) és krónikus (pl. SLE, 2-es típusú DM, RA) gyulladással járó állapotokban írtak le hasonló, vagy magasabb értékeket.

Ezt a feltevést támogatják az u-ORM és a hagyományos gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek között megfigyelt szignifikáns korrelációk is.

Az u-ORM kiválasztásának pontos mechanizmusa jelenleg még tisztázatlan. A szérumban és vizeletben ORM közepes erősségű korrelációja arra utal, hogy a se-ORM emelkedése önmagában nem magyarázza az emelkedett u-ORM szinteket. Munkacsoportunk korábbi, szepszis betegekkel kapcsolatos eredményei azt sugallták, hogy a vesefunkciónak fontos hatása lehet az u-ORM kiválasztására. Ezért a glomeruláris és/vagy tubuláris diszfunkció esetleges fennállásának kizárása céljából se-CYSC és u-CYSC méréseket végeztünk, melyek nem igazoltak vesefunkciós eltéréseket az általunk vizsgált Crohn betegekben. Felmerült az ORM vese általi lokális szintézisének és szekréciójának lehetősége, mely hozzájárulhat az u-ORM emelkedéséhez. Ezt a feltevést támogatja, hogy intraperitoneális LPS injekcióval ORM génexpressziót váltottak ki egerek veséjében.

Az u-ORM/u-CREAT – kifejezetten gyermekeknél – a nagyobb mérvű emelkedéséből következően a gyulladáshoz kapcsolódó aktivitásnak egy érzékenyebb markere lehet a se-ORM-hez képest. Korábbi megfigyelésekkel ellentétben, a mi vizsgálati anyagunkban nem tükrözte az u-ALB/u-CREAT hányadosa a CD aktivitását. Az u-ORM és az u-ALB a CD aktivitására nézve különböző válaszkésztséget mutatott, melynek hátterében a két fehérje eltérő kiválasztódási mechanizmusa állhat.

Az u-ORM meghatározása értékes, objektív információt nyújtva egészítheti ki a meglévő diagnosztikus eszköztárat, hozzájárulva a pontosabb állapotfelméréshez. A mintavétel non-invazív jellegének és a gyors, automatizált mérési módnak köszönhetően az u-ORM ideális a rutin diagnosztikai felhasználásra.

V.3. Savoldékony szérumban lévő fehérjék vizsgálata Crohn betegekben

Legjobb tudásunk szerint mi vizsgáltuk először aktív és inaktív stádiumú Crohn betegek vonatkozásában a PCA-oldékony szérumban lévő fehérje-frakció diagnosztikus értékét.

A Crohn betegekben – különösen aktív stádium esetén – tapasztalt emelkedett savoldékony fehérjekoncentráció a generalizált gyulladáshoz kapcsolódó állapotban állhat kapcsolatban. Ebben meghatározó tényező lehet, hogy a jelentős szénhidrát komponenssel rendelkező akut fázis fehérjék (pl. ORM, haptoglobin, α -1 antitripszin) képesek oldatban maradni a PCA kezelés során.

A mennyiségi változás (pozitív akut fázis fehérjék emelkedése) mellett a minőségi változás is szerepet játszhat a savoldékony frakció koncentráció-növekedésében. Különböző

betegségek kapcsán ismerten megváltozik a glikoproteinek szénhidrát-szerkezete, ezáltal ellenállóbbá válhatnak a PCA-val szemben, nagyobb arányban kerülve a savas extraktumba. A glikozilációban bekövetkező specifikus változások akár gyulladással és daganatos betegségek biomarkereiként is funkcionálhatnak.

Munkacsoportunk korábbi megfigyelései szerint katabolikus állapotok (kiterjedt műtéti beavatkozások, kemoterápia) is eredményezhetnek emelkedett savoldékony fehérjemennyiséget a keringésben, melynek hátterében sejttanyagcsere-folyamatokból, szöveti nekrozisból származó molekuláknak a keringésbe lépése állhat. Ennek alapján CD-ben egy krónikus gyulladással asszociált katabolikus állapot is hozzájárulhat a magasabb savoldékony fehérjeszinthez.

Szeptikus betegekkel végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy markánsan csökkent se-TP mellett a savoldékony fehérjék mennyisége az egészségesekre jellemző érték többszörösére emelkedett. Ebből arra következtethetünk, hogy a savoldékony fehérjekoncentráció változását nem a se-TP változása határozza meg.

Az egyes csoportjaink SDS-PAGE mintázatai között látott különbségek a PCA-oldékony frakciók eltérő fehérjeösszetételéről tanúskodnak. Az ezüst akkumulációja bár nem egyenesen arányos a fehérjemennyiséggel, az aktív betegek 30-67 kDa molekulatömegű frakcióinak erőteljesebb festődése utal a savas extraktumok magasabb fehérjetartalmára. Ebben a tartományban helyezkedik el például az ORM (42 kDa), melyet a savoldékony frakció jelentős komponensként is számon tartanak.

MGE analízis során a CD gyulladással aktivitásának fokozódásával markáns változásokat észleltünk a savoldékony fehérjeprofilokban. Bár az elkülönülő domináns frakciók pontos fehérjeösszetétele nem ismert, valószínűsíthető, hogy nagyfokban glikozilált akut fázis fehérjék (pl. ORM, α -1 antitripszin, complement faktorok) lehetnek alapvetően felelősek a négy frakció relatív arányának változásáért. A mennyiségi variabilitás mellett a glikoproteinek szénhidrát struktúráiban gyulladás hatására bekövetkező változások is befolyásolhatják az MGE mintázatokat.

Szemben az SDS-PAGE módszer időigényességével és kvalitatív jellegével, az MGE egy miniatürizált, lineáris polimert alkalmazó, gyors eljárás, mely lehetővé teszi a relatív arányokon alapuló számszerű értékelést és a nagyfokú reprodukálhatóságot. Az MGE profil változásáért felelős PCA-oldékony fehérjék proteomikai módszerek segítségével történő azonosítása új potenciális biomarkereket fedhet fel, melyek azután tovább vizsgálhatók a klinikai alkalmazási lehetőségek irányába.

VI. Összegzés, új megállapítások

Adaptáltunk egy u-CYSC mérésre alkalmas automatizált immunturbidimetriás módszert Cobas 8000/c502 laboratóriumi analizátorra, mely analitikai tulajdonságait tekintve (érzékenység, precizitás, rövid reakcióidő) alkalmas a rutin klinikai használatra.

Gyermek- és felnőttkorú egészséges egyének vizsgálatával a módszerhez tartozó előzetes referencia tartományt határoztunk meg.

Szepszis-indukálta AKI-val diagnosztizált betegeknél markánsan emelkedett u-CYSC ürítést találtunk, mely indikátora lehet az akut vesekárosodás tubuláris komponensének.

Mind gyermek-, mind felnőttkorú, aktív stádiumban lévő Crohn betegeknél emelkedett u-ORM/u-CREAT értékeket mértünk az inaktív állapothoz képest. Megállapítottuk, hogy az u-ORM – elsősorban gyermekeknél – érzékenyebb gyulladási marker, mint a se-ORM.

Fontos megfigyelésünk, hogy az u-ORM/u-CREAT hányados hasonló teljesítménnyel képes elkülöníteni a gyermekkori CD aktív és inaktív fázisát, mint a hagyományos gyulladási paraméterek (hs-CRP, se-ORM).

Az u-ORM/u-CREAT és a közismert gyulladási paraméterek, valamint a CD klinikai indexei között megfigyelt korrelációk utalnak az u-ORM emelkedés és a gyulladási aktivitás összefüggésére.

Az u-ORM mérése hozzájárulhat a Crohn betegek, kiemelten a gyermekek aktivitásának pontosabb, objektív megítéléséhez.

Emelkedett savoldékony fehérjekoncentrációt mértünk aktív állapotú Crohn betegek szérumból.

A PCA-oldékony szérumból SDS-PAGE analízise során minőségi különbséget tártunk fel aktív és inaktív Crohn betegek mintázatai között.

Elsőként analizáltuk Crohn betegek savoldékony szérumból MGE-vel. Aktív stádiumú Crohn betegeknél jellegzetes profilt azonosítottunk, melyben az egyes frakciók relatív aránya markánsan eltért az inaktív betegektől, valamint az egészséges egyének esetén detektálhatóktól.

A savoldékony szérumból mennyisége és összetétele is tükrözi a CD gyulladási aktivitását, mely további biomarker kutatások kiindulópontját képezheti.

VIII. Publikációs lista

VIII.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Wittmann I, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis*. 2018 Mar 1;10(6):377-384. doi: 10.4155/bio-2017-0228. **IF: 2,321**

Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Miseta A, Kőszegi T. Elevated urinary orosomuroid excretion as a novel biomarker in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest*. 2019 Mar;49(3):e13054. doi: 10.1111/eci.13054. **IF: 3,481**

Makszin L, Kustán P, **Szirmay B**, Páger C, Mező E, Kalács KI, Pászthy V, Györgyi E, Kilár F, Ludány A, Kőszegi T. Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders. *Electrophoresis*. 2019 Feb;40(3):447-454. doi: 10.1002/elps.201800378. **IF: 3,081**

VIII.2. Egyéb közlemények

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Christensen PH, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Urinary orosomuroid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016 Oct 15;26(3):421-430. doi: 10.11613/BM.2016.044. **IF: 2,934**

Kustán P, **Szirmay B**, Kőszegi T, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Mühl D, Németh B, Kiss I, Németh Á, Szabados S, Ajtay Z. Monitoring urinary orosomuroid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clin Biochem*. 2017 Dec;50(18):1002-1006. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.010. **IF: 2,584**

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Kőszegi T, Mühl D. Urinary orosomuroid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Feb 1;55(2):299-307. doi: 10.1515/cclm-2016-0840. **IF: 3,556**

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis. *J Clin Lab Anal*. 2018 Mar;32(3). doi: 10.1002/jcla.22321. **IF: 1,728**

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Jul 26;56(8):1373-1382. doi: 10.1515/cclm-2017-0782. **IF: 3,638**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 8,883

Az értekezéshez nem használt közlemények összesített impakt faktora: 14,44

Kumulatív impakt faktor: 23,323

VIII.3. Könyvfejezetek

Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Ludány A. Human orosomuroid in the clinical laboratory. In: Laboratory techniques with applicability in medical practice. Editors: Tamás Kőszegi, Antonella Chesca. Lambert Academic Publishing, 2015. ISBN-13: 978-3-659-31724-8, ISBN-10: 3659317241.

VIII.4. Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek

Ludány A, **Szirmay B**, Györgyi E, Szigeti N, Kőszegi T, Kovács GL. Urinary orosomuroid as an activity marker in Crohn's disease. 56th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. Budapest, August 30–September 1, 2012. Clin Chem Lab Med. 50:(8) pp. eA1-eA46. (2012).

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Módszer a vizelet és könny orosomuroid vizsgálatára (2013) PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, 2013.02.07-08.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Módszer a vizelet és könny orosomuroid vizsgálatára. In: Rakonczay Z, Boros M (szerk.) XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Orvos- és Egészségtudományi Szekció : Előadáskivonatok. Szeged, Magyarország, Szegedi Tudományegyetem, (2013) pp. 294-294, 1 p.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Method for the examination of urinary and tear orosomuroid. HMAA Summer Conference, Balatonfüred, August 16-17, 2013. In: Somkúti István (szerk.) Archives of the Hungarian Medical Association of America. (2013) p. 52 Paper: P/3.

Szirmay B, Kustán P, Ludány A. Humán orosomuroid a klinikai laboratóriumi diagnosztikában. In: Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavaszi szél konferencia: Absztraktkötet 2015, Budapest, Magyarország, Publio Kiadó, (2015) p. 397.

Szirmay B, Kustán P. Human orosomuroid in the clinical laboratory. 7th International Student Medical Congress in Kosice, Slovakia, June 24-26, 2015. FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA 70 : 1/2015 pp. 125-126. Paper: 179 , 2 p. (2015)
ISBN: 9788081522499.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Informational value of orosomuroid in acute and chronic inflammatory diseases. In: Irena Prodan Žitnik, Janja Marc (szerk.) International CEEPUS Summer School on Complex Diseases 2015 - Hematologic Diseases, Hormonal Dysfunction, Neurodegenerative Diseases. University of Ljubljana, (2015) p. 32.

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Miseta A, Mühl D, Kőszegi T. Urinary orosomuroid- automated immunoturbidimetric test and its clinical relevance. The 8th Conference of PhD Students, Marosvásárhely, Románia, December 9 -10, 2015. Acta Medica Marisiensis 61:(7) p. 8. (2015).

Szirmay B, Tárnok A, Kőszegi T, Ludány A. A Crohn betegség aktivitásának laboratóriumi markerei a gyermekgyógyászatban. In: Keresztes Gábor (szerk.) Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavaszi szél 2016, Nemzetközi multidiszciplináris konferencia: Absztraktkötet. Budapest, Magyarország, (2016) pp. 377-377, 1 p.

Szijařt A, Kustán P, **Szirmay B**, Györgyi E, Kilr F, Kszegi T, Ludány A, Makszin L. Microchip electrophoretic analysis of acid soluble serum proteins of patients. Magyar Labortoriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygylse, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA207-eA208. (2016).

Szirmay B, Kustán P, Christensen PH, Ludány A, Kszegi T. An automated immune turbidimetric test for urinary orosomuroid: validation and clinical usage. Magyar Labortoriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygylse, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA186 Paper: YF12 (2016).

Szirmay B, Kustán P, Christensen PH, Ludány A, Kszegi T. An automated particle-enhanced immune turbidimetric test for urinary orosomuroid: validation and clinical usage. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA365 Paper: 0123 (2016).

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kszegi T. Urinary cystatin-C: a new automated particle-enhanced immune turbidimetric test for the routine evaluation of kidney tubular function. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S803. (2017).

Makszin L, Pger C, Mez E, Kustán P, **Szirmay B**, Györgyi E, Kszegi T, Ludány A, Kilr F. Electrophoretic Analyses of Perchloric Acid Soluble Serum Proteins of Patients. In: Felinger Attila (szerk.) 11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Ern Tyihk: Book of abstracts. Pcs, Magyarország: Hungarian Society for Separation Sciences, (2017) Paper: P-50.

Szirmay B, Pger C, Kustán P, Györgyi E, Kszegi T, Ludány A, Kilr F, Makszin L. Electrophoretic analyses of perchloric acid soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders. Magyar Labortoriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygylse, Pcs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) pp. eA151-eA151. Paper: P16, 1 p. (2018).

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kszegi T. Urinary orosomuroid as a novel laboratory marker of the inflammatory activity in Crohn’s disease. Magyar Labortoriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygylse, Pcs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) pp. eA124-eA124. Paper: SE1.2, 1 p. (2018).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragn D, Ludány A, Miseta A, Mhl D, Kszegi T. A novel urinary cystatin-C assay for monitoring kidney function in sepsis. Magyar Labortoriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygylse, Pcs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA144 Paper: SE7.6, 1 p. (2018).

Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Kszegi T. Urinary orosomuroid: A new approach for the assessment of Crohn's disease activity. 23rd IFCC-EFLM EuroMedLab Barcelona, Spain, May 19-23, 2019. Clin. Chim. Acta 493 pp. S369-S370. (2019).

VIII.5. Egyéb előadások és poszterek

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as sepsis markers. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA200. (2016).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Novel urinary protein markers in sepsis. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA199-eA200. (2016).

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Synergistic, predictive protein markers in sepsis: serum Gc globulin and gelsolin. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA365. (2016).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA324-eA325. (2016).

Kustán P, Horváth-Szalai Z, **Szirmay B**. Urinary Orosomuroid as a Potential Diagnostic Marker of Sepsis. 13th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Kralove, Czech Republic, November 24-25, 2016.

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Németh B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Vizelet orosomuroid: új, gyulladáshoz kapcsolódó biomarker szepszisben. In: Bódog Ferenc, Csiszár Beáta, Hegyi Dávid, Pónusz Róbert (szerk.) DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban: Absztraktkötet. Pécs, Magyarország, Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, (2017) p. 37.

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as potential early predictors of sepsis. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S585. (2017).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S588. (2017).

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Kőszegi T. Aktinkötő fehérjék szepszisben. III. Mediterrán Intenzív Randevű (MIRA), Pécs, október 20-21, 2017.

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kőszegi T. Novel immune turbidimetric detection and predictive values of serum actin-binding proteins in sepsis. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA127 Paper: 10.1515/cclm-2018-0718, 1 p. (2018).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Miseta A, Németh B, Mühl D, Kőszegi T. Orosomuroid in urine: a promising novel marker for monitoring systemic acute inflammation. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA152 Paper: P20, 1 p. (2018).

IX. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Ludány Andreának, aki már tudományos diákkörösként bevezetett a laboratóriumi kutatások világába és munkámat kezdettől fogva mindvégig irányította. Kiemelt köszönettel tartozom Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak, aki mentorként folyamatosan támogatta munkámat, szakmai útmutatásokkal és hasznos tanácsokkal látott el.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Miseta Attilának, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, valamint Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, a Szentágotthai Kutatóközpont korábbi igazgatójának, hogy lehetőséget és háttérrel biztosítottak intézeti munkámhoz és vizsgálataim elvégzéséhez. Hálás vagyok Györgyi Erzsébet tudományos segédmunkatársnak, aki bevezetett a laboratóriumi munka gyakorlatába és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a mintagyűjtés és mintafeldolgozás folyamataiban. Köszönet illeti Dr. Lakatos Ágnes és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait, kiemelten Rózsai Ágnes, akik a turbidimetriás módszerbeállítások és mérések kivitelezését technikailag segítették. Hálás vagyok a fehérjekutatásokkal foglalkozó közvetlen munkatársaimnak, Dr. Kustán Péternek és Dr. Horváth-Szalai Zoltánnak, akik értékes ötletekkel, sok biztatással, baráti légkör megteremtésével járultak hozzá munkám egészéhez.

Hálával tartozom Dr. Makszin Lillának és Prof. Dr. Kilár Ferencnek a microchip elektroforézis kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Tárnok András, Dr. Sarlós Patrícia és Dr. Szigeti Nóra gasztroenterológusoknak, valamint Prof. Dr. Mühl Diána intenzív terápiás osztályvezetőnek a betegek beválogatásában nyújtott szakmai irányításukért és tanácsaikért.

Köszönöm családomnak és páromnak a sok bátorítást és támogatást.

A vizelet cystatin-C mérési módszer beállítása és a mérések, továbbá a vizelet orosomuroid mérések a DiaSys Diagnostic Systems GmbH, a Dako-Agilent A/S vállalat, valamint a Roche Magyarország Kft. támogatásával valósultak meg.