

Válasz Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár bírálatára

Ezúton is szeretném megköszönni professzor úr fáradozását és a bírálatra szánt idejét, az alapos és részletes értékelést, az izgalmas kérdéseket, és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.

A felvett kérdésekre a válaszaim a következők:

1., *A vizsgálatok jelentős részénél használt egészséges kontroll csoportot és eredményeit is ennek tagjaihoz hasonlította. Kérem, határozza meg, Ön szerint ki az egészséges, milyen vizsgálatok szükségesek és egyben elégségesek ahhoz, hogy ezt ki lehessen jelenteni valakiről.*

Válasz: Az egészségnek, mint állapotnak már a definíciója sem egyszerű. Ha a WHO Alkotmányának előszavából indulunk ki, mely szerint „az egészség a teljes testi, szellemi és szociális jólét állapota, nem pusztán a betegség vagy fogyatékosság hiánya” (http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Megelozo_orvostan_nep_egessegtan/ch03s05.html), akkor nem egyszerű az egészséges egyének objektív azonosítása. Közelebb kerülünk a megoldáshoz ha a National Cancer Institute definícióját fogadjuk el: "az egészséges kontroll egy klinikai tanulmányban egy olyan személy, aki mentes a vizsgált betegségtől vagy kóros állapottól" (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=561403>). Megnézhetjük azt is, hogy a szakirodalomban hogyan történik az "egészséges" kontrollok beválasztása. Az irritábilis bél szindrómát (IBSZ) vizsgáló eset-kontroll tanulmányok metaanalízise alapján a kutatók nagy része a National Cancer Institute megközelítését követte, és az IBSZ tüneteinek/panaszainak kizárása alapján definiálta a kontroll populációt. Ez történhetett egy egyszerű kérdőív alapján, ahol általánosságban rákérdeztek a hasi és székelési panaszokra, vagy egy ún. széklet napló készítésével, ahol 7 napon keresztül kellett a széklet tulajdonságait és a székürítés jellemzőit rögzíteni. A másik gyakori megközelítés az egyének önértékelésén alapult; azok kerültek beválasztásra, akik egészségesnek tartották magukat (a bélműködésükkel kapcsolatban) (S. Ghorbani et al., *Annals of Gastroenterology*, 2015, 28:87-93).

A saját munkáink során, szinte mindegyik tanulmányunkban mi is az NCI definícióját alkalmaztuk. Olyan kontrollokat választottunk - leggyakrabban laboratóriumi/egészségügyi dolgozókat és családtagjaikat -, akik a vizsgálat tárgyát képező betegségtől mentesek voltak, és saját bevallásuk szerint általában is egészségesek. Két olyan vizsgálatunk volt, ahol ennél alaposabb és szigorúbb megkötelezéseket alkalmaztunk a kontrollok beválasztásánál. A HunMen study esetében 50 feletti férfiak csonttátságát vizsgáltuk, és itt az általános beválasztási kritériumok a következők voltak: >50 év, férfi, ambuláns, egészséges személy. A kizárási feltételek: ismert metabolikus csont, máj vagy vese betegség és bármilyen csontanyagcserét befolyásoló gyógyszer szedése (kivéve kalcium és D-vitamin). A betegségek "azonosítása" laboratóriumi paraméterek alapján történt: kizárásra került egy személy, ha a referencia tartomány felső küszöbének kétszeresénél nagyobb volt a szérum totál bilirubin, GOT, GPT, γ GT, alkalikus foszfatáz, LDH, urea, kreatinin és a húgysav értéke (illetve ezek közül

bármelyik). A másik vizsgálat az NKTH mAB-CHIC study, ahol a QP kitek hatékonyságát teszteltük rákos betegek szérum mintáin. Itt a kontrollok részletes kérdőívet töltöttek ki, és nyilatkoztak valamennyi szervrendszerüket érintő betegségek meglétéről/hiányáról. A kizárás abszolút kritériuma volt bármilyen aktuális vagy korábbi daganatos állapot megléte. Relatív kizárási feltétel volt bármilyen szív- és érrendszeri betegség, központi idegrendszeri betegség, vérzékenység, ismételt ájulási (syncope) epizódok vagy korábbi görcsrohamok, a gyomor-bél, a vizeletkiválasztó, vérképző, az immunológiai, az anyagcsere, a vese vagy a légzőrendszert érintő kórképek, cukorbetegség, fertőző betegségek, vakcináció, terhesség, szoptatás, kisebb sebészeti beavatkozás, fogászati kezelés, vértranszfúzió vagy vér/plazma adása, illetve bármilyen egyéb akut fázis reakciót kiváltó állapot. A kizárásról a beválasztó orvos döntött a beteg anamnesztikus adatai és a laborparaméterek alapján a HunMen study-hoz hasonlóan.

Összegezve, tehát, az "egészséges" kontrol definiálása nem egyszerű és jelentősen változhat az adott klinikai vizsgálat igényeinek megfelelően. A legszigorúbb megközelítés megfelelhet az általunk az NKTH mAB-CHIC study-ban alkalmazottaknak, ahol kizárási kritérium lehet szinte bármilyen kóros állapot jelenléte - a betegek bevallása, illetve a laboratóriumi vizsgálatok pozitivitása alapján. Ez nagyon hasonlít a véradásba bevonható személyek kiválasztására. Az ilyen "szupernormál" egyének kontrollként való alkalmazása, ugyanakkor veszélyeket is hordoz magában. Túlbecsülheti egy marker használhatóságát, vagy klinikailag nem releváns összefüggéseket tárhat fel. Ezzel szemben a legenyhébb beválasztási kritériumrendszer csak annyit ír elő, hogy az "egészséges" kontroll legyen mentes a vizsgálat tárgyát képező betegségtől. Ebben az esetben azonban pl. egy adott biomarker szérumkoncentrációját befolyásoló állapotok - vese-, máj-, epe-betegségek - jelenléte a kontrollokban szintén téves következtetések levonását eredményezheti. A legsikeresebb megoldás, az "arany középút": olyan kontrollok beválasztása, akik mentesek a vizsgálat tárgyát képező betegségtől, mentesek olyan állapotoktól, amelyek a tesztelt markerek teljesítményét befolyásolhatják, és az egyéb - populációs szinten gyakoribb - kísérő betegségek előfordulása a kontroll csoportban hasonló a vizsgált betegcsoportéhoz. Egy ilyen kontroll populáció kialakításához szükség van a kontrollok anamnesztikus adataira, laborvizsgálatokra és szükség esetén egyszerűbb, a kontrollok számára jelentős megterhelést nem jelentő, képalkotó vizsgálatokra.

Mi a véleménye: a véradók használata egészséges kontrollként milyen mértékben tükrözi az általános populációt (különösen akkor, ha a betegcsoport már idősebb)?

Válasz: Bár a véradás felső életkor határa rendszeres véradók esetében 65 év, azonban a véradásban résztvevők átlagéletkora ennél jóval alacsonyabb. Ennek megfelelően egy idősebb betegcsoporthoz való illesztés nehezebb lehet, ha véradókat szeretnénk kontrollként felhasználni egy klinikai vizsgálatban. A véradók ráadásul - ahogy ez a fentiekben szerepel - egy "szupernormális" egészséges populációnak tekinthetők, ami bizonyos mértékig problémát okozhat egy klinikai vizsgálat során, téves következtetések levonását is eredményezheti. Ennek megfelelően kontrollként való alkalmazásuk körültekintést igényel, és elsősorban olyan esetekben jön szóba, ahol a vizsgált betegpopuláció is homogénen kísérő betegségek mentes.

2. Az orvoshoz forduló emberek jelentős (túlnyomó) része valamilyen panasz miatt teszi ezt. A napi orvosi gyakorlatban a differenciál diagnosztika célja a panaszok háttérében álló különböző okok elkülönítése. Mi a véleménye: egy biomarker kutatása, értékelése során nem lenne-e célszerűbb az egészséges kontroll csoport helyett/mellett inkább hasonló panaszokkal járó, de más kórképekben szenvedő betegcsoportot használni?

Válasz: A bíráló felvetése teljesen jogos és észszerű, hiszen a mindennapi gyakorlatban valóban túlnyomó részt nem teljesen egészséges és beteg emberek között kell "különbséget tennünk", hanem az adott beteg panaszainak háttérében kell azonosítanunk sok kóros állapot közül egy (vagy néhány) konkrét betegséget. Ennek megfelelően a klinikai kutatás során is szükséges az egészséges kontrollok mellett egy (vagy több) klinikai/beteg kontroll csoportot is tesztelnünk. A gyakorlat az mutatja, hogy az ilyen jellegű kontrollok beválasztása általában a biomarker validálás egy későbbi fázisában történik meg. Az első kérdés az, hogy az adott teszt képes-e egyáltalán különbséget tenni az egészséges és a cél betegcsoport között, és ha az eredmények biztatóak lehet tovább finomítani a vizsgálatot klinikai kontroll csoportok bevonásával.

Az MTA Disszertációmban bemutatott vizsgálatok közül is volt olyan, amelyben nem csak egészséges kontrollok szerepeltek. A májcirrhosisos betegek ANCA vizsgálata során alkalmaztunk beteg kontroll csoportot az egészséges kontrollok mellett. Ebbe a vizsgálatba 385 különböző etiológiájú cirrhosisos beteg került bevonásra, és emellett 119 krónikus hepatitis C fertőzött, illetve 102 primer biliáris cirrhosisos beteg vett részt, akiknél még nem alakult ki cirrhosis. Ezek mellett 100 korban és nemben illesztett egészséges kontroll mintáit is megvizsgáltuk ebben a studyban. A másik májcirrhosis vizsgálatban pedig a fertőzéssel jellemezhető és infekció mentes betegek eredményeit hasonlítottuk össze.

Egy éppen most induló új vizsgálat során a glycoprotein-2 (GP2), mint biomarker alkalmazhatóságát vizsgáljuk az akut pancreatitis diagnosztikájában és a betegség kimenetelének előrejelzésében. Ebbe a vizsgálatba a sürgősségi osztályon akut, hasi panaszokkal jelentkező betegek kerülnek beválasztásra - tőlük veszünk vért a felvételkor. Attól függően, hogy később igazolódik-e a pancreatitis diagnózisa soroljuk két csoportba a betegeket - akut pancreatitis vs. beteg kontroll (Dr. Papp Mária tanárnővel közös munka).

Egy harmadik példa a saját munkáinkból. A QP69/QP300 array-k segítségével, egészséges kontrollok és tüdőrákos betegek összevetésével azonosított, 21 tüdőrák specifikus markert egy folyamatban lévő vizsgálatban már nem csak tüdőrákos betegeken és egészséges kontrollokon vizsgáltunk meg, hanem egy COPD-s betegpopuláción is (Dr. Takács László professzor úrral közös munka). Ebben az esetben ennek a kontroll csoportnak a vizsgálata azért is jelentős, mert van olyan elképzelés is, mely szerint a COPD a tüdő rák kialakulásának "előszobája". Néhány olyan betegünk is volt, akinél a végső diagnózis penumonia, illetve sarcoidosis volt, egy-egy ilyen klinikai kontroll csoport vizsgálatának szintén volna jelentősége.

3. *Atópiás dermatitises betegek*nél az allergén specifikus IgE szintek alapján sorolta be a beteget *intrinsic* vagy *extrinsic* csoportba. Milyen spec IgE szinteket határozott meg? Mekkora volt annak a valószínűsége, hogy az *intrinsic* csoportba sorolt beteg tulajdonképpen *extrinsic* atópiás volt, csak az össz IgE szint emelkedésért felelős spec IgE-t nem sikerült azonosítani?

Válasz: Az atópiás dermatitises vizsgálatok végzésének idején az allergén specifikus IgE vizsgálatokat egy MAST CLA1 analízátor segítségével végeztük el a DOTE III. sz. Belgyógyászati Klinikai Regionális Immunológiai Laboratóriumában. Az inhalatív és nutritív allergének közül 40-40 ellen termelődött IgE ellenanyag meghatározása történt meg a vizsgált betegek szérumában (1. táblázat).

Az inhalatív panel tartalma (allergének)		A nutritív panel tartalma (allergének)	
Alternaria-	Corn Pollen-	Almond-	Onion Mix-
Aspergillus-	Oat Pollen-	Banana-	Orange-
Candida-	Rape-	Bean-	Pea-
Penicillium-	Wheat Pollen-	Beef-	Peanut-
Box Elder-	Ragweed Mix (short, giant)-	Lamb-	Tomato-
3 Trees Mix (Black alder, White birch, American haselnut)	English plantain-	Carrot-	Pork-
Acacia-	Mogwort-	Casein-	Potato-
Ash-	Rumex Mix-	Chicken-	Peach-
Oak Mix-	Goldenrod-	Dried fruit mix-	Rye-
London Planetree-	Cow-epithel	Olive black-	Shellfish Mix-
Poplar Mix (Cottonwood, Willow)-	Cat-epithel	Codfish-	Soybean-
Pigweed Mix-	Dog-epithel	Corn-	Celery-
Orchard-	Horse-epithel	Egg White-	Tuna-
Timothy Grass-	Hamster-epithel	Egg Yolk-	Turkey-
Kentucky Blue-	Cockroach Mix-	Garlic-	Walnut-
Bermuda Grass-	Feather Mix-	Milk-	Wheat-
Reed-	Mite-d pterony-	Rabbit-	Yeast-
Cultivated Rye-	Mite-d farine-	Cereal Mix-	

1. táblázat A tesztelt specifikus IgE allergének

Ez a panel lefedi a Magyarországon leggyakrabban előforduló allergéneket, de természetesen előfordulhatnak olyan ritkább allergének is, amit ez a teszt nem vizsgál. Különösen igaz ez az atópiás dermatitises betegekre, ahol a klasszikus allergén-specifikus IgE szenzitizáltság mellett speciális allergének/antigének ellen is kimutatható IgE mediálta immunválasz. Ide sorolhatók bizonyos mikrobiális antigének, melyek közül a *Staphylococcus aureus* és a *Malassezia* (egy kommenziális bőr gomba) család tagjainak antigénjei a legjelentősebbek, melyek gyakran bizonyos humán antigénekkal mutatnak keresztreaktivitást (pl. a *Malassezia sympodialis* egyes antigénjei a humán mangán-szuperoxid-dizmutáz, illetve a humán thioredoxin enzimek epitópjaival). Másrészt, bizonyos autoantigének - elsősorban az epithel sejtek bizonyos komponensei - ellen is kimutathatóak lehetnek IgE molekulák,

melyeket nem vizsgálnak a hagyományos tesztek. A mikrobiális és a humán epithel sejtek allergénjei ellen termelődött specifikus IgE viszonylag nagy gyakorisággal (34-62%) mutathat pozitivitást az AD-s betegek között (*I. Mitterman et al., PLOS One, 2016, 11:e156077*).

Másrészt nagy különbség lehet a specifikus IgE kimutatására használt tesztek között is. A modernebb assay-k akár 120 különböző allergén elleni IgE azonosítására képesek, ráadásul nagy lehet a különbség a tesztek analitikai érzékenysége között is. Egy 2008-as publikációban 56 klinikailag egyértelműen AD-s beteg allergén-specifikus IgE szintje volt negatív egy hagyományos teszttel. Ugyanezen betegeket megvizsgálva a "state-of-the-art" specifikus IgE mérő Phadia rendszerrel és prick teszttel 18 esetében a specifikus IgE jelenléte kimutatható volt (*EEA. Brenninkmeijer et al., J Am Acad Dermatol, 2008, 58:407-414*).

Összegezve tehát megállapítható, hogy az alkalmazott allergén-specifikus IgE teszt tulajdonságaitól (vizsgált allergének száma, érzékenység) függően akár az esetek egyharmadában is elképzelhető olyan scenario, hogy a szérumban totál IgE szint emelkedett, de allergén-specifikus IgE pozitívítás nem mutatható ki. Ugyanakkor az általunk bemutatott vizsgálatban ez nem jelentett gondot, mert az intrinsic AD-s betegek közé csak olyan személyek kerültek be, akiknél a totál IgE és a specifikus IgE eredmények is negatívak voltak. Amennyiben akár a totál IgE, akár valamelyik tesztelt allergén-specifikus IgE pozitivitást mutatott, az adott beteget az extrinsic csoportba soroltuk be.

4. A CD14 vizsgálatok során milyen módszerrel zárták ki az esetlegesen fennálló infekciót?

Válasz: A bakteriális fertőzések diagnosztikája a megfelelő klinikai tünetek, laboratóriumi paraméterek, a vizelet üledék, és képalkotó vizsgálatok (hasi ultrahang és mellkas röntgen felvétel), valamint ascites esetében a diagnosztikus punkció (neutrophil meghatározás és tenyésztés) eredményei alapján történt. A vizsgálatok eredményeitől függően az adott fertőzés helyének megfelelően mikrobiológiai vizsgálatot végeztünk. Szepszis gyanúja és nem azonosított fertőzésforrás esetén hemokultúrát is vettünk.

A laboratóriumi paraméterek közül a következők támogatták a bakteriális fertőzés jelenlétét: a fehérvérsejt szám abszolút ($>10,8 \times 10^9/L$) vagy relatív (leukopenia esetében a sejtszám duplázódása az utolsó vizitchez képest) emelkedése balra tolt vérképpel, emelkedett neutrophil granulocytá aránnyal ($>76\%$). A bakteriális fertőzéseket a következőképpen diagnosztizáltuk: (1) Spontán bakteriális peritonitis: ascites neutrophil sejtszám: $>250/mm^3$ és/vagy pozitív eredményű ascites tenyésztés, másodlagos abdominális infekcióforrás hiányában. (2) Húgyúti fertőzés: dysuriás panaszok, pyuria, (vizelet fehérvérsejtszám $>10/mm^3$) és/vagy pozitív vizelettenyésztési lelet. (3) Tüdőgyulladás: köhögés, pozitív mellkas röntgen vizsgálat, pozitív köpettenyésztés. (4) Vegyes - bőr- és lágyrész fertőzések, epeúti fertőzések, osteomyelitis, endocarditis: klinikai kép, ultrahang és röntgen vizsgálat, tenyésztések. (5) Bacteraemia (véráram fertőzés) a jellegzetes klinikai tünetek mellett, akkor volt kimondható, ha a lokális fertőzések jelei nem voltak kimutathatóak és hemokultúra igazolta oki szereppel bíró, véráramban lévő kórokozó jelenlétét.

A követéses vizsgálatok során az elhunyt betegek esetében a kórbonctani vizsgálatok eredményei is áttekintésre kerültek utólagosan, illetve az antibiotikum terápia alkalmazása és annak hatékonysága is értékelésre került.

5. Az sCD14 az mCD14 lehasadásával keletkezik. A hasítást proteázok végzik. Nem lehet-e, hogy az sCD14 marker tulajdonképpen csak egy olyan pótló (ún. surrogate) marker, amely a proteáz aktivitásra (ill. a proteáz aktivitását befolyásoló tényezőkre) utal? Van-e olyan terápiás eszköz, vagy fiziológiai állapot (pl. stressz), ami a proteáz aktivitását befolyásolja?

Válasz: A bíráló felvetése teljesen logikus, a CD14 és egyéb hasonló fehérje természetű szérumbiomarkerek proteolitikus hasítása általános jelenség lehet. A CD14 esetében is jól ismert ez, hiszen a rutin diagnosztikus tesztként elérhető Presepsin assay - melyet nemrégiben mi is részletesen teszteltünk cirrhotikus betegek mintáin (*M. Papp et al., World J Gastroenterol, 2016, 22:9172-9185*) - is a CD14 molekula egy proteolitikus hasítási termékét méri. Nagyon hasonlóan viselkedhet a CD163 (hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor) is - melyet szintén vizsgáltunk ebben a betegcsoportban (*T. Tornai et al., Liver Int, 2016, 36:1628-1638*). Ez a molekula a gyulladásos reakció során lehasadhat a monocyták-macrophagok felszínéről, és megjelenik a szérumban szolubilis formában. A cirrhotishoz társuló fibrosis kialakulása során a májszövet extracelluláris mátrixában (ECM) is számos proteáz aktiválódása következik be (leginkább matrix-metalloproteinázok), amelyek az ECM különböző komponenseit hasítják. Az így keletkező kollagén vagy proteoglycan fragmentek bekerülhetnek a keringésbe, és a fibrotikus folyamat biomarkerei lehetnek cirrhotisban (*SS. Veidal et al., Disease Markers, 2010, 28:15-28*).

Proteázok normálisan is jelen vannak a szérumban, de egyrészt inaktív zimogén formában találhatók, vagy különböző anti-proteáz rendszerek (inhibitorok) kordában tartják őket. A legismertebb ilyen kaszkád-szerű proteáz rendszerek a véralvadás és a komplement rendszer, amelyek megfelelő stimulus hatására aktiválódhatnak. A gyulladásos folyamatok mediálásában nagy szerepe van még a kallikrein-kinin rendszernek is. Számottevő mértékben befolyásolhatja ezeknek a rendszernek az "alap" aktivitását különböző implantátumok vagy intravénás katéter jelenléte (*G. Pampalakis et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1776:22-31; BN. Jukema et al., Frontiers in Medicine, 2016, 3:52; AH. Schmaier et al., J Thromb Hemost, 2016, 14:28-39*). Befolyásolja a proteolitikus kaszkádok aktiváltsági állapotát a mentális stressz is (*R. van Kanel et al., Psychosom Med, 2001, 63:531-544*).

Az aktív formában jelenlévő enzimek egy másik része celluláris eredetű lehet, különösen a neutrophil granulocyták granulumaiból felszabaduló neutrális és savas proteázoknak van nagy jelentősége. Ezek release-ét számos faktor indukálhatja, melyek közül a gyulladásos állapotok és infekciók a legjelentősebbek. A keringésbe kerülő vagy lokálisan felszabaduló bakteriális virulencia faktorok (LPS, peptidoglikán, stb.), valamint a monocyták és endothelialis sejtek által szekretált citokinek képesek a neutrophilek degranulációját indukálni, ami a proteolitikus enzimek felszaporodásához vezethet. Az aktív proteázok további szérumban lévő, zimogén formában lévő enzim aktiválásra is képesek, illetve lehasíthatják az immunválaszban résztvevő fontosabb sejtfelszíni receptorokat, ami az immunválasz leregulálását is eredményezheti (*PH. Leliefeld et al., Critical Care, 2016, 20:73*).

Mindezek alapján a bíráló által felvetett gondolat teljesen reális. Az infekció, gyulladásos reakció aktiválja a neutrophileket, és a vérben lévő proteolitikus rendszereket, megemelkedik a szérumban lévő aktív proteázok mennyisége, ami hasítja a mCD14-et emelve ezzel a sCD14 majd az ebből képződő Presepsin (CD14 fragment) mennyiségét.

6. A cirrhotikus betegek esetében a cirrhosis háttérében álló alapbetegség hogyan függött össze a kapott eredményekkel, elsősorban az autoantitest pozitivitással?

Válasz: Az anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek (ANCA) és a cirrhosishoz társuló fertőzések valamint a betegség mortalitásának összefüggését vizsgáló közleményünkben 385 cirrhotikus beteg adatait dolgoztuk fel. Ezek közül 246 (63,9%) esetében krónikus alkoholizmus, 115 (29,9%) beteg esetében hepatitis C vírus fertőzés, míg 24 (6,2%) esetben egyéb etiológiai ok állt a betegség háttérében. Az alkoholos cirrhosis esetében az előrehaladottabb stádiumú betegek (Child B és C) aránya szignifikánsan magasabb volt, és ennek megfelelően magasabb MELD score-ral, szérumbilirubinnal, de alacsonyabb szérumbilirubinnal voltak jellemezhetőek.

Az ANCA pozitivitás megoszlását illetően ha az IgA és IgG osztályú antitesteket összevontan vizsgáltuk, akkor a súlyosabb esetekben (Child B és C stádium, ascites jelenléte) emelkedett volt az ANCA pozitivitás aránya alkoholos etiológia esetében, a nem-alkoholos eredetű betegek adataihoz képest. Amikor az ANCA IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ eseteket külön analizáltuk ez a különbség már a Child A stádium és az ascites mentes betegek esetében is észlelhető volt (2. táblázat).

Érdekes módon az izolált ANCA IgG pozitivitás (IgA-/IgG+ betegek) pontosan fordítva változott: a nem-alkoholos etiológia esetében és az enyhébb esetekben (Child A vagy ascites hiánya) volt emelkedett az alkoholos esetekhez képest, ami az előrehaladottabb stádiumban lecsökkent és nem tért el az alkoholos esetekben mért ANCA IgG pozitivitás arányától (2. táblázat). (M. Papp et al., *Journal of Hepatology*, 2013, 59:457-466).

Table 3. Prevalence of ANCA positivity in patients with cirrhosis. (A) Impact of disease severity according to Child-Pugh stages. (B) Impact of ascites.

	A Child-Pugh stages			B Patients without ascites Patients with ascites	
	A	B	C	Patients without ascites	Patients with ascites
Total	144	136	105	204	181
Non-alkoholics	86	35	18	93	46
Alcoholics	58	101	87	111	135
ANCA IgA and/or IgG	100 (69.4%)	100 (73.5%)	81 (77.1%)	141 (69.1%)	140 (77.3%)
Non-alkoholics	60 (69.8%)	24 (68.6%)	10 (55.6%)	64 (68.8%)	30 (65.2%)
Alcoholics	40 (68.9%)	76 (75.2%)	71 (81.6%)	77 (69.4%)	110 (81.5%)
ANCA IgA	55 (38.2%)	78 (57.4%)	68 (64.8%)*	86 (42.2%)	115 (63.5%)*
Non-alkoholics	24 (27.9%) [§]	14 (40.0%) [‡]	8 (44.4%) [§]	24 (25.8%) [§]	22 (47.8%) [§]
Alcoholics	31 (53.4%)	64 (63.4%)	60 (69.0%)	62 (55.9%)	93 (68.9%)
ANCA IgG only	45 (31.2%)	22 (16.2%)	13 (12.4%)*	55 (27.0%)	25 (13.8%)*
Non-alkoholics	36 (41.9%) [§]	10 (28.6%)	2 (11.1%) [□]	40 (43.0%) [§]	8 (17.4%)*
Alcoholics	9 (15.5%)	12 (11.9%)	11 (12.6%)	15 (13.5%)	17 (12.6%)

(A) ANCA IgA = cases with IgA+/IgG- or IgA+/IgG+.

ANCA IgG only = cases with IgA-/IgG+.

*p < 0.001 and □p = 0.031 between three different Child groups.

§p < 0.01, †p = 0.016, *p = 0.047 and ‡p < 0.001 between non-alkoholics vs. alcoholics, by using Fisher's exact test or χ^2 -test with Yates correction.

(B) ANCA IgA, cases with IgA+/IgG- or IgA+/IgG+.

ANCA IgG only, cases with IgA-/IgG+.

*p < 0.001 and **p < 0.01 between patients with and without ascites.

§p = 0.035 and †p < 0.01 and ‡p < 0.001 between non-alkoholics vs. alcoholics ANCA IgA in non-alkoholics vs. alcoholics by using Fisher's exact test or χ^2 -test with Yates correction.

2. táblázat Az IgG és IgA izotípusú ANCA előfordulása különböző etiológiájú cirrhotikus betegek esetében, a Child stádium függvényében (M. Papp et al., *Journal of Hepatology*, 2013, 59:457-466., Table 3).

Utólagosan analizálva a különböző kórokozó ellenes IgA és IgG antitestek előfordulását nagyon hasonló eredményeket kaptunk. (Ezeket a vizsgálatokat 267 beteg mintáján végeztük el.) Az anti-outer membrane protein (OMP) antitestek esetében a betegség súlyosságának fokozódásával növekedett az IgA antitestek előfordulásának aránya függetlenül a betegség etiológiájától. Ugyanakkor az alkoholos eredetű betegség esetében valamennyi Child stádiumban, de különösen az enyhébb Child A és B esetében magasabb volt az IgA anti-OMP antitest pozitivitás aránya (3. táblázat).

	Child A	Child B	Child C
Total	92	101	74
Non-alcoholics	58	28	12
Alcoholics	34	73	62
OMP IgA	35	71	60
	38,0%	70,3%	81,1%
Non-alcoholics	17	11	9
	29,3%	39,3%	75,0%
Alcoholics	18	60	51
	52,9%	82,2%	82,3%

3. táblázat Az IgA izotípusú anti-OMP antitestek előfordulása különböző etiológiájú cirrhotikus betegek esetében, a Child stádium függvényében. (A zölddel jelölt rész a vizsgálatba bevont betegek számát mutatja a különböző etiológiai és súlyossági csoportokban. A fehér cellákban felül az antitest pozitív betegek száma, alul ezek százalékos aránya látható a zöld részen szereplő számokhoz viszonyítva.)

Az anti-Saccharomyces cerevisiae antitestek is nagyon hasonlóan viselkedtek. Az IgA antitestek gyakorisága nagyobb volt az alkoholos cirrhosis esetében a Child A és különösen a Child B stádium esetében (4. táblázat).

	Child A	Child B	Child C
Total	92	101	74
Non-alcoholics	58	28	12
Alcoholics	34	73	62
ASCA IgA and/or IgG	21	39	45
	22,8%	38,6%	60,8%
Non-alcoholics	12	7	7
	20,7%	25,0%	58,3%
Alcoholics	9	32	38
	26,5%	43,8%	61,3%
ASCA IgA	13	35	43
	14,1%	34,7%	58,1%
Non-alcoholics	7	5	7
	12,1%	17,9%	58,3%
Alcoholics	6	30	36
	17,6%	41,1%	58,1%
ASCA IgG only	8	4	2
	8,7%	4,0%	2,7%
Non-alcoholics	5	2	0
	8,6%	7,2%	0,0%
Alcoholics	3	2	2
	8,8%	2,7%	3,2%

4. táblázat Az IgA és IgG izotípusú ASCA előfordulása különböző etiológiájú cirrhotikus betegek esetében, a Child stádium függvényében. (A zölddel jelölt rész a vizsgálatba bevont betegek számát mutatja a különböző etiológiai és súlyossági csoportokban. A fehér cellákban felül az antitest pozitív betegek száma, alul ezek százalékos aránya látható a zöld részen szereplő számokhoz viszonyítva.)

Összegezve tehát megállapítható, hogy az alkoholos etiológia esetében magasabb mind az ANCA mind a baktérium/gomba ellenes IgA antitestek előfordulásának aránya (és titere az ANCA esetében) a nem alkoholos esetekhez képest, míg az ANCA IgG esetében fordított a helyzet vagy nincs számottevő különbség.

Az IgA típusú antitestek keletkezésében nagy valószínűséggel jelentős szerepe van az intestinális traktus permeabilitás fokozódásának, és ezzel összefüggésben a bélbaktériumok és a baktérium komponensek fokozott transzmurális transzlokációjának. Ezek a komponensek immunogének és képesek az IgA osztályváltás elősegítésére is, így vezethetnek kórokozó specifikus antitestek, illetve - pl. molekuláris mimikri révén - autoantitestek képződéséhez. Az alkohol szerepe ebben a folyamatban viszonylag jól tetten érhető. A kapszula-endoszkópián átesett cirrhosis betegek 2/3-ának vékonybelében lehetett kimutatni mind makroszkóposan, mind szövettani vizsgálattal gyulladásos jeleket, és az alkohol direkt toxicus hatása a bélfal epithel sejtjeire lényeges szerepet játszhat ebben a folyamatban (A. van de Wiel, et al., *Scand J Gastroenterol*, 1987, 22:1025-1030; S. Bhonchal et al., *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23:e43-e48). Ráadásul a krónikus alkohol expozíció direkt módon gátolhatja a T-sejt mediált immunválaszokat is (B. Leber et al., *Wien Klin Wochenschr*, 2009, 121:732-744). Az alkohol és az IgA antitestek képződésének összefüggését mutatják immunizációs vizsgálatok is. Az alkoholos eredetű májcirrhosisos betegek esetében pneumococcus poliszacharid vaccinációt követően az IgA osztályú anti-PPS antitestek titere jóval magasabb, míg az IgG antitestek titere alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest (TM. McCashland et al., *J Infect Dis*, 2000, 181:757-760).

7. Cirrhosisban a CRP-szint emelkedésével kapcsolatos megfigyelései – tekintve, hogy a CRP-t a máj termeli – igen érdekesek. Az eredmények változnak-e, ha a CRP-t valamilyen májfunkciós vizsgálat eredményére, pl. a protrombin időre korrigáljuk?

Válasz: A bíráló felvetése nagyon izgalmas. A cirrhosishoz társuló infekciók esetében a CRP szint változását két tényező befolyásolja: a fertőzés CRP emelkedést indukál, ugyanakkor a májparenchima destrukciója csökkenti a CRP termelését. Így súlyosabb cirrhosisban ugyanolyan "intenzitású" fertőzés kisebb CRP szint emelkedéssel járhat. Ezt a jelenséget tapasztaltuk is, hiszen a CRP hatékonysága az infekciók jelenlétének kimutatására a cirrhosis súlyosságával párhuzamosan csökkent. A bíráló felvetése az, hogy ha valamilyen a májfunkciók beszűkülését jellemző faktorról korrigáljuk a CRP mért értékét, úgy a korrigált CRP előrehaladott májbetegségben hatékonyabban működhet. A javasolt protrombin idő (INR) mellett a szérum albumin szintet és a Child score értékét használtuk fel a CRP módosítására. A Child score komplex módon tükrözi a betegség súlyosságát, mind a parenchymas, mind a portális elégtelenségre vonatkozóan, hiszen a totál bilirubin, szérum albumin és az INR mellett az ascites, illetve a hepatikus encephalopatia értékelése is része a Child pontszám kalkulálásának (5. táblázat).

Measure	1 point	2 points	3 points
Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$ (mg/dl)	<34 (<2)	34-50 (2-3)	>50 (>3)
Serum albumin, g/dl	>3.5	2.8-3.5	<2.8
PT INR	<1.7	1.71-2.30	> 2.30
Ascites	None	Mild	Moderate to Severe
Hepatic encephalopathy	None	Grade I-II (or suppressed with medication)	Grade III-IV (or refractory)

Points	Class	One year survival	Two year survival
5-6	A	100%	85%
7-9	B	81%	57%
10-15	C	45%	35%

5. táblázat A Child-score értéke (https://en.wikipedia.org/wiki/Child%E2%80%93Pugh_score)

A bíráló javaslatának megfelelően újraanalizáltuk a publikált kísérletes adatokat. Ennek során a mért CRP értéket megszoroztuk az INR-rel, és a Child pontszámmal, illetve osztottuk az albuminnal, és az így kapott új paraméterek hatékonyságát teszteltük ROC analízissel az összes betegen, illetve a Child A, B és C csoportokban. A 6. táblázatban látható, hogy ez a megközelítés nem hozott számottevő előrelépést. Talán a Child B csoport esetében mutatott a CRP x Child pontszám jobb hatékonyságot az önmagában alkalmazott CRP-hez képest.

	Összes beteg	Child A	Child B	Child C
CRP	0,928 (0,894 - 0,954)	0,965 (0,910 - 0,991)	0,901 (0,832 - 0,949)	0,888 (0,805 - 0,943)
CRP x INR	0,803 (0,752 - 0,849)	0,611 (0,499 - 0,716)	0,641 (0,544 - 0,729)	0,544 (0,432 - 0,653)
CRP / Albumin	0,933 (0,897 - 0,959)	0,960 (0,896 - 0,990)	0,895 (0,822 - 0,946)	0,898 (0,814 - 0,953)
CRP x Child	0,934 (0,899 - 0,959)	0,958 (0,893 - 0,989)	0,913 (0,845 - 0,957)	0,878 (0,792 - 0,937)

6. táblázat A CRP és a korrigált CRP értékek hatékonysága a fertőzőes és infekció mentes cirrhosis betegek megkülönböztetésében. A táblázat a ROC-AUC (95%CI) értékeket mutatja.

8. *Rheumatoid arthritises betegek esetén feltétel volt, hogy a beteg nem szenvedett malignus megbetegedésben. A malignus megbetegedés hiányát milyen módszerekkel igazolták? Mit javasolna klinikus számára: egy rheumatoid arthritises beteg esetében használjon-e, és ha igen, milyen feltételekkel használjon tumormarkert a meglévő daganat monitorozására?*

Válasz: A malignus megbetegedések kialakulása kismértékben, de fokozott a rheumatoid arthritis-es (RA-s) betegekben az átlagpopulációhoz képest. Egy nemrégiben publikált metaanalízis alapján a malignus limfómák (Hodgkin betegség és Non-Hodgkin limfómák), valamint a tüdőrák standardizált incidenciája magasabb, míg a colorectalis- és emlőrák incidenciája minimálisan alacsonyabb, mint az átlag populációban (Simon et al., *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17:212). Éppen ezért az RA-s betegek tumorainak diagnosztizálása majd monitorozása fontos klinikai feladat. Az RA-s betegek kivizsgálása majd gondozása során mellkas röntgen, hasi ultrahang, valamint általános laboratóriumi tesztek (vérkép, CRP, süllyedés, vizelet vizsgálat) mindig elvégzésre kerülnek, azonban komplett tumor irányú kivizsgálás csak megalapozott klinikai kép esetében történik, szakmai, etikai és finansziális okok miatt. Az új betegek esetében a megelőző anamnesztikus adatok is áttekintésre kerülnek a tumorok kizárásának érdekében, és akinél korábban nem igazolódott daganat azt tumor mentesnek tekintik.

Ahogy saját és mások munkái is igazolták az RA-s betegek esetében bizonyos tumormarkerek pozitivitást mutathatnak, annak ellenére, hogy az adott beteg esetében daganat nem mutatható ki. Ez lehet akár az RA-s betegek 5-10%-a (CA19-9, CA125, CA72-4) vagy 20-25%-a (CEA, CA15-3, NSE) is. Ugyanakkor ez az arány - és a markerek szérumszintje - nem tér el számottevően az egészséges kontrolloktól a CEA, CA72-4 és az NSE esetében, így ez a három teszt az átlag populációhoz hasonlóan használható egy potenciális daganat monitorozásában. Az általunk vizsgált markerek közül a CA19-9, CA125 és CA15-3 gyakrabban volt pozitív RA-s betegekben, mint az egészséges kontrollokban, azonban a szérumszintje csak a CA19-9-nek és a CA125-nek volt magasabb a kontrollokhoz képest. Így ezen két teszt alkalmazása már nagyobb körültekintést igényel. Miután azonban ezen két marker szérumszintje is csak minimálisan emelkedett értékeket mutatott az RA-s betegekben a referencia tartomány felső határához képest, ezért egy jelentősen emelkedett érték mindenképpen alarmizáló egy daganatos RA-s beteg követése során. Éppen ezért a tesztelt valamennyi marker vizsgálata hasznos lehet és alkalmazható a tumoros állapot követésére, azzal a megköttéssel, hogy az alacsony pozitív CA19-9 és CA125 értékek fenntartással kezelendők, és néhány héten belül megismétlendők a változás dinamikájának megítélésére. Nagyon fontos az is, hogy egyetlen tesztelt tumormarker sem mutatott összefüggést a CRP-vel és a DAS28-cal, azaz a betegség aktivitásával sem, így ez sem befolyásolhatja számottevően a tumormarker méréseket, és nem okozhat fals pozitivitást.

Mi a véleménye: kell-e interferenciával számolni az autoimmun betegeknél jelen levő autoantitestek és a használt immunoassayk között?

Válasz: A rheuma faktor zavaró hatása a különböző immunoassay-k esetében jól ismert jelenség, ez azonban elsősorban a humán autoantitestek, illetve kórokozók ellen termelődött humán antitestek mérését zavarhatja számottevően. Sporadikus publikációk fellelhetők

ugyanakkor olyan esetekről is, amikor a magas RF titer bizonyos szérumszintek kimutatását befolyásolta. Nagy mennyiségű RF jelenlétében csökkent B-típusú nátriuretikus peptid szintet mértek egy Architect 2000 analízátorral (Wen Fan et al., Plos One, 2014, 9:e105304), míg emelkedett CA19-9 érték volt mérhető egy Advia Centaur készüléken (M Berth et al., Clin Chem Lab Med, 2006, 44:1137–1139). Ezekben az esetekben egér antitesteket alkalmaztak mindkét immunoassayben, így feltehetően az RF pozitivitást okozó autoantitestek, esetleg heterofil tulajdonsággal is bírtak, és ezért zavarták meg ezt a két tesztet. Ráadásul a rheumatoid arthritis és a szelektív IgA hiány viszonylag gyakran társul egymással, az IgA hiány esetében ugyanakkor relatíve gyakrabban fordulnak elő heterofil antitestek (A.K. Knight et al., Clinical and Experimental Immunology, 2005, 141:333-337).

Az általunk vizsgált 6 tumormarker mérése egy Modular E170 analízátoron történt, ahol a kit leírások szerint a CA125 esetében 1200 IU/mL, míg a többi teszt esetében 1500 IU/mL-ig a RF jelenléte nem befolyásolja a meghatározást. Ilyen magas RF érték a mi vizsgálatunkban nem fordult elő. Ráadásul a gyártók blokkoló anyagot is adnak a reagenseikhez, amelyek képesek gátolni a zavaró RF hatását.

Összegezve elmondható, hogy az esetek domináns részében a RF jelenléte nem befolyásolja a tumormarker méréseket. Nagyon magas titerben, esetleg heterofil tulajdonsággal is rendelkező RF antitestek esetében azonban elképzelhető RF interferencia, Mindezek alapján a váratlanul és indokolatlanul magas tumormarker mérések esetében érdemes a RF és heterofil antitestek és esetleg a szelektív IgA hiány jelenlétét megvizsgálni. Az egyéb RA-hoz társuló szisztémás autoantitestek tumormarker mérést befolyásoló hatása nem valószínű, hiszen ezek jól definiált sejtalkotókhoz és nem az ismert tumormarkerekhez kötődnek.

9. Tüdőtumoros betegek esetében kombinálta a különböző markereket. Ezzel kapcsolatos felvetésem: nem próbálkoztak-e a kombináció kapcsán az egyidejű mérés helyett olyan megközelítéssel, hogy szekvenciálisan mérik a különböző markereket (pl. a nagy specifitású- alacsony szenzitivitású markert mérik le először és kizárólag ennek kóros mivolta esetén került volna sor az alacsony specifitású – nagy szenzitivitású marker mérésére)? Mi a véleménye, ez a megközelítés (különösen költséghatékonysági megfontolásokból) mennyire lehet életképes a napi gyakorlat számára?

Válasz: A bíráló felvetése izgalmas és több szempontból is releváns; ez a megközelítés a multiplex biomarker analízisnek lehet egy potenciális stratégiája, ami valóban alkalmas lehet a diagnosztikus vagy szűrő vizsgálatok költségének a csökkentésére. A tüdőrákos betegek esetében a biomarkerek szintjén nem végeztünk ilyen analízist, de érdemes ebbe az irányba is lépéseket tennünk, és a rendelkezésre álló adatbázison újabb analíziseket végezni.

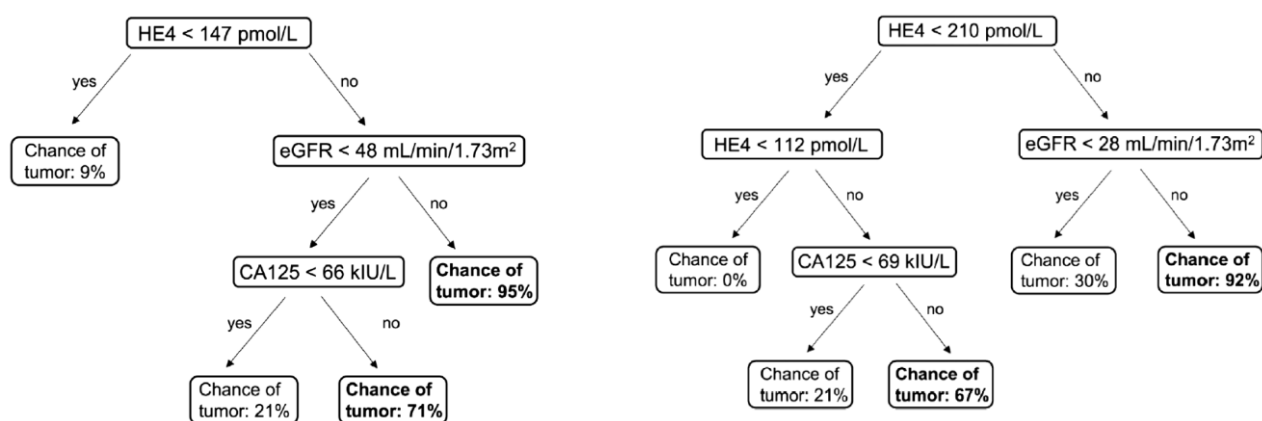
Azt, hogy az első lépésben a magas specifitású vagy a magas szenzitivitású tesztet használjuk függ a vizsgálat céljától. Ha pl. a betegeket szeretnénk minél nagyobb számban azonosítani, akkor a magas szenzitivitású teszt kerül az első helyre, amit egy nagyobb specifitású, második biomarker vizsgálat követhet. Ebben az esetben viszont - az alacsony specifitás miatt - az első lépésben magas lesz a fals pozitív esetek száma, így a második tesztet nagy számban kell elvégeznünk, ami növeli a költségeket. Másrészt, bármennyire is jó

az első teszt szenzitivitása, a második alacsonyabb szenzitivitású teszt lerontja annak hatékonyságát, és sok beteg ad a második teszttel fals negatív eredményt. (Egy ilyen szekvenciális vizsgálat esetén a két teszt eredő szenzitivitása egyenlő az 1. teszt szenzitivitása szorozva a 2. teszt szenzitivitásával.)

Ha a magas specificitású teszt kerül az 1. helyre jelentősen javul az algoritmus költséghatékonysága, mert a 2. teszttel jóval kevesebb mintát kell megvizsgálnunk, mivel alacsony lesz a fals pozitív egészségesek száma. Ennek az ára azonban a fals negatív betegek számának növekedése, azaz nagyszámú beteg nem kerül azonosításra.

Ami a tüdőrák komplex diagnosztikus algoritmusát illeti gondoltunk olyan megoldásra, ami ezen logika mentén működik. A tüdőrák szűrésében a jelenleg legelterjedtebben alkalmazott szűrő modalitás - amit az USA-ban, bizonyos rizikó csoportokban már az állami egészségügyi ellátó rendszer is finanszíroz - az alacsony dózisu mellkas CT. Ennek jelenleg egyik problémája az alacsony specificitás: gyakran kerül olyan kis méretű kerek árnyék azonosításra, aminek további vizsgálata és követése nagyon költséges, és végül nem bizonyulnak tüdőráknak. Reményeink szerint ezen a ponton léphet be az általunk kifejlesztetni kívánt biomarker teszt, amelyet nagy specificitásra "hangolva" csökkentheti a fals pozitív esetek arányát, legalább az egészségesek egy részében.

A biomarkerek szintjén egy a javasolthoz hasonló szekvenciális analízist a HE4, CA-125 és az ovárium tumorok esetében dolgoztunk ki, (Kappelmayer J. et al, Clin Chim Acta, 2015, 438:35-42.; ez a munka végül nem került be az MTA disszertáció anyagába). Ebben az esetben azt is figyelembe vettük, hogy a HE4 szérumszintje jelentős mértékben függ a vesefunkció intaktságától, amit a kalkulált eGFR formájában vettünk figyelembe az algoritmus kialakítása során. A HE4, CA-125 és az eGFR értékeket ovárium tumoros betegek és egészséges kontrollok esetében határoztuk meg, és véletlenszerű döntési fákat létrehozva és hatékonyságukat analizálva (random forest analízis) alakítottuk ki a végső - legjobban teljesítő - döntési algoritmust. Itt még egy preanalitikai faktort is figyelembe vettünk. A HE4 érték változást (emelkedést) mutat a menopausa után, ezért önálló algoritmust dolgoztunk ki a teljes cohors, illetve a postmenopausában lévő egyénekre (1. ábra).



1. ábra Kappelmayer J., Antal-Szalmás P., Nagy B. jr.: Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. Clin Chim Acta, 2015, 438:35-42. (Figure 3., 4.)(bal oldali ábra: teljes cohors, jobb oldali ábra: postmenopausában lévő egyének)

10. A multiplex array nagyon sok analit egyidejű mérésére ad lehetőséget. A multiplex arrayjel kapcsolatos módszertani kérdések jelentős részére a jelölt és munkacsoportja választ talált. A kérdés számomra az, hogy ennek a klinikai validálására milyen tervet dolgoztak ki. A vizsgált analitok nagy száma miatt a hagyományos poweranalízis enormis számú beteg bevonását feltételezi; a klinikai értékelés céljára a realisan ehhez jóval kevesebb beteg áll rendelkezésre. Ennek a problémának a megoldására milyen megoldást javasol?

Válasz: A vázolt probléma megoldására többféle lehetőség is kínálkozik. A munkáink értékelésében résztvevő statisztikusok által alkalmazott egyszerű szabály azt mondja, hogy kb. 10 adatra (klinikai vizsgálatba bevont beteg és kontroll) kell egy változónak (biomarker) esni (P. Peduzzi et al., *Journal of Clinical Epidemiology*, 1996, 49:1372-1379); azaz egy 100-100 beteget és kontrollt magában foglaló klinikai vizsgálatban maximum $(100+100)/10=20$ darab biomarker hatékonysága tesztelhető le. Az általunk végzett vizsgálatok során kb. 150-350 marker mérése történt meg minden egyes beteg és kontroll plazma mintájában, de az egy vizsgálatba bevont betegek és kontrollok száma nem haladta meg a 100 kontroll és 100 beteg küszöböt. Ahhoz, hogy a fent említett szabálynak megfeleljünk először redukálni és rangsorolni kellett a biomarkereket és csak az - önmagában - leghatékonyabban működő 10-15 paraméter került be a végső analízisbe (bináris logisztikus regresszió). A folyamat végeredménye egy képlet, amely egyetlen numerikus paramétert ad meg, és amely hatékonyabban különbözteti meg a betegeket/kontrollokat az egyedi markerekhez viszonyítva.

Az első lépés tehát valamilyen **marker redukciós technika** alkalmazása. Erre sokféle lehetőség van (https://www.knime.org/files/knime_seventechniquesdatadimreduction.pdf; <http://computation.llnl.gov/casc/sapphire/pubs/148494.pdf>), melyek közül az első lehet azon változók törlése az adatbázisból, amelyek - valamilyen sajnálatos ok miatt - túl sok beteg és kontroll esetében nem kerültek lemérésre vagy nem adtak értékelhető eredményt ("removing data columns with too many missing values"). Lehetőség van arra is, hogy az összes (kontroll+beteg) adaton megvizsgáljuk minden egyes marker variabilitását. Ha ez egy bizonyos előre definiált érték alatt van, akkor az adott marker nagy valószínűséggel nem fog különbséget tenni a betegek és a kontrollok között ezért kiejthető az analízisből ("low variance filter"). Össze lehet vetni páronként az egyes biomarkerek numerikus eredményeit és ha ez egy bizonyos szintnél nagyobb korrelációt mutat a két paraméter közül az egyik kiejthető ("reducing highly correlated columns"). Hasonló, de multidimenzionális korreláció vizsgálatára alkalmas a főkomponens analízis ("principal component analysis - PCA"), amikor is a hasonló módon viselkedő ("egy irányba mutató") paraméterek összevonásra kerülnek egy új paraméterbe, és ezzel csökkenthető a változók száma. A marker redukciót követheti a **vizsgált paraméterek rangsorolása**. Ez történhet egyrészt a klasszikus statisztikai analízisek (*t-próba*, *Mann-Whitney U-teszt*) segítségével. Egyesével megvizsgálhatjuk valamennyi markert, hogy mennyire jól különítik el egymástól a betegeket és kontrollokat, és az 5-15 legjobban teljesítő paraméterrel dolgozunk aztán tovább. Egy másik lehetőség a markerek közötti sorrend felállítására a "random forest analízis" (nagy számú véletlen döntési fa generálása és értékelése), amely a diszkriminatív hatékonyságot egy score segítségével jeleníti meg minden marker esetében, és itt is a legjobb score-ú paraméterek kerülnek a végső analízisbe. Hasonlóan alkalmazható a "support vector machine - SVM" módszer is a legjobban teljesítő markerek szelektálására.

Mind az adatredukcióra, mind az adatok csoportosítására, rangsorolására több további módszer is használható ("*factor analysis*", "*multidimensional scaling*", "*linear discriminant analysis*", "*isomap*", "*canonical correlations analysis*", "*maximum autocorrelation factors*", "*independent component analysis*", "*maximum variance unfolding*", "*diffusion maps*", "*locally linear embedding*", "*laplacian eigenmaps*"), de ezek még bonyolultabb matematikai algoritmusokon alapulnak.

(<http://jmlr.org/papers/volume16/cunningham15a/cunningham15a.pdf>;

<http://airccse.org/journal/mlaij/papers/1114mlaij06.pdf>

<http://www.ec.unipg.it/DEFS/uploads/quaderno23.pdf>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2998530/pdf/1471-2105-11-567.pdf>)

Az eddig elvégzett klinikai vizsgálatok során a legjobban teljesítő markerek szelektálására Mann-Whitney U teszt/t-tesztet és random forest analízist használtunk, a legjobb 5-15 markerből pedig bináris logisztikus regressziós analízissel alkottunk modelleket/képleteket a betegek-kontrollok megkülönböztetésére. A QP69 kitet 69 tüdőrákos és 64 kontroll mintáján teszteltük, és a Mann-Whitney U teszt/t-teszt alapján kiválasztott legjobb 7 QP69 markert vittük a logisztikus regressziós analízisbe, ahol végül 3 markerre volt szükség a legjobb modell megalkotásához. A random forest analízis alapján 8 marker került kiválasztásra, és ezek közül 3 került be a végső képletbe. A vastagbél rákos betegek közül 90 beteg és 51 kontroll mintáját vizsgáltuk meg a QP69 kit segítségével. A Mann-Whitney U teszt/t-teszt alapján 8, míg a random forest analízissel 11 marker került kiválasztásra, és ezek közül 2-2 került be a logisztikus regressziós analízissel létrehozott képletbe. Végül az emlő rákos csoportból 81 beteget teszteltünk 51 kontrollal együtt. A klasszikus statisztikai analízissel 4, míg random forest analízissel 10 QP69 markert választottunk ki, melyek közül 3, illetve 2 marker került be a végső képletbe. A QP300 kitet csak tüdőrákos betegek egyedi mintáin teszteltük (46 beteg és 46 kontroll). A Mann-Whitney U teszt/t-teszt alapján 8, míg a random forest analízissel 8 marker került kiválasztásra, és ezek közül 4, illetve 2 került be a logisztikus regressziós analízissel létrehozott képletbe.

A tüdőrákos betegek esetében további vizsgálatok is történtek. A QP69 és QP300 tesztekkel leghatékonyabbnak talált 21 antitest került fel egy új chipre, létrehozva ezzel a QPLC21 assay-t. Ennek vizsgálata 600 tüdőrákos és 600 kontroll mintáin történt meg.

A QP kitek szabadalmaztatása már majdnem lezárult, ennek befejezése után - reményeink szerint - több nivós publikáció formájában mutatjuk majd be ezeket az eredményeket.

Még egyszer szeretném megköszönni professzor úr részletes értékelését és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.

Dr. Antal-Szalmás Péter

Dr. Antal-Szalmás Péter
egyetemi docens

Debrecen, 2017. február 15.