

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**BIOMARKER KUTATÁSOK ONKOLÓGIAI,
IMMUNPATOMECHANIZMUSÚ ÉS CSONTANYAGCSERE
KÓRKÉPEKBEN**

DR. ANTAL-SZALMÁS PÉTER



**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET**

Debrecen, 2015

Előszó

Pontosan 20 évvel ezelőtt 1995. májusában fogadták el az *Annals of Hematology* folyóiratban az első, elsőszerzős tudományos publikációm, majd 1997-ben szereztem PhD fokozatot, így ez a Disszertáció az elmúlt közel 20 év tudományos munkásságát foglalja össze. Egy ilyen értekezés elkészítésekor viszonylag egyszerű helyzetben van az, aki fókuszáltan egy kutatási terület - egy molekula, egy folyamat, egy betegség - vizsgálatát végezte hosszabb időn keresztül. Nekem jóval nehezebben sikerült ezt az összefoglaló munkát elkészítenem, mert részben munkahelyi váltásaim, részben "csapongó" érdeklődésem miatt sokféle területen végeztem kutatómunkát, és publikáltam tudományos eredményeket. Hozzájárult ehhez a sokszínűséghez a választott szakmám is. A klinikumot kiszolgáló laboratóriumi szakember a diagnosztikus munka során óhatatlanul találkozik izgalmas klinikai problémákkal, és gyakran keresik meg kutatási ötleteikkel klinikus kollégái a legkülönbözőbb területekről. Nem meglepő, tehát, hogy az elkészült Disszertációban nyolc különböző betegcsoporton végzett kutatás eredményeit mutatom be, három eltérő területen: onkológiai kórképek, csontanyagcsere eltérések és immunpatomechanizmusú betegségek (autoimmun, atópiás-allergiás betegségek, és cirrhosishoz társuló infekciók és immunológiai eltérések vizsgálata). A közös ezekben a munkákban az, hogy bár különböző területeken, de minden alkalommal vagy új biomarkerek beállítását és analitikai tesztelését végeztük el, majd különböző betegcsoportokon vizsgáltuk őket, vagy ismert markerek új klinikai applikációit értékeltük. Ennek megfelelően az értekezés Bevezetés fejezetében - a konkrétan vizsgált paraméterek mellett - bemutatásra kerülnek általában a biomarkerek felfedezésével és mérésük standardizációjával kapcsolatos ismeretek is. A bemutatott munkák között van olyan vizsgálat, ahol eredetileg az alapkérdés egy adott betegség patomechanizmusának jobb megértése volt, itt a betegek és a kontrollok mintáiban tesztelt markerek diagnosztikus hatékonyságát utólag, az értekezés írása során értékeltük. Szerepel továbbá olyan eredmény is a Disszertációban, amely még nem került publikálásra jelezve, hogy ez a mű, bár összefoglaló, de csak pillanatfelvétel, és a kutató munka remélhetőleg még hosszú évekig tovább folytatódik.

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1. A biomarker definíciója, típusai, legfontosabb alkalmazási lehetőségek.....	7
2.1.1. Mi is az a „biomarker”?	7
2.2. Új biomarkerek felfedezése és fejlesztése	8
2.3. Biomarker tesztek analitikai és funkcionális validálása	9
2.3.1. A validálás fő lépései	9
2.3.2. A módszervalidálás során az adott assay teljesítményét jellemző paraméterek	13
2.3.3. Az új biomarkerek hivatalos engedélyeztetéséhez szükséges vizsgálatok.....	16
2.4. A disszertációban vizsgált biomarkerek jellemzői	18
2.4.1. A CD14 molekula	18
2.4.2. Akut fázis fehérjék.....	21
2.4.3. Anti neutrophil citoplazmatikus antitestek	24
2.4.4. Tumormarkerek	27
2.4.4.1. A szérum tumormarkerek definíciója és csoportosítása	27
2.4.4.2. Enzimek.....	27
2.4.4.3. Hormonok	29
2.4.4.4. Onkofetális antigének	29
2.4.4.5. Mucinszerű glikoproteinek és vércsoport antigének	29
2.4.4.6. Citokeratinok	30
2.4.4.7. Egy újabb tumormarker - human epididymis protein 4 (HE4).....	31
2.4.4.8. A szérum tumormarkerek gyakorlati alkalmazásai, nemzetközi guideline-ok.....	32
2.4.5. A csontanyagcsere markerei.....	35
2.4.5.1. A csontfelépülés markerei.....	36
2.4.5.2. A csontlebontás markerei	37
2.4.5.3. A csontanyagcsere újabb markerei.....	38
2.4.5.4. A D-vitamin	39
2.4.5.5. A csontanyagcsere markerek mérésének gyakorlati problémái	41
2.4.5.6. A csontanyagcsere markerek és a csonttörés kockázata	42
2.4.5.7. A csontanyagcsere markerek és az osteoporosis terápia monitorozása.....	42
2.4.6. Multiplex markerek („kompozit score”-ok) készítése egyedi szérum paraméterekből.....	42
2.4.7. Az FLT3 és mutációi	44
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	47
4. BETEGEK	48
4.1. Atópiás dermatitis (AD)	48
4.2. Szisztémás lupus erythematosus (SLE).....	48
4.3. Polymyositis/dermatomyositis (PM/DM)	49
4.4. Cirrhosis	50
4.5. Akut myeloid leukémia (AML).....	51
4.6. Rheumathoid arthritis (RA).....	51
4.7. Tüdőtumoros betegek - NKTH mAB-CHIC study	51
4.8. Ötven évnél idősebb férfiak csontstátuszának vizsgálata.....	52
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	53
5.1. A sejtfelszíni receptorok jelölése, kvantitálása.....	53
5.2. A CD14 mediálta LPS kötés vizsgálata.....	53
5.3. Az LPS indukálta sejtaktiváció mérése – a szekretált TNF α fehérje mennyiségének meghatározása	54
5.4. A szolubilis CD14 mérésére alkalmas áramlási citometriás módszer kifejlesztése	54

5.5. Laboratóriumi vizsgálatok.....	57
5.5.1. Rutin diagnosztikus laboratóriumi tesztek.....	57
5.5.2. Szérum tumormarker mérések	57
5.5.3. Csontanyagcsere vizsgálata	58
5.5.4. Akut fázis fehérjék koncentrációjának mérése.....	58
5.5.5. Anti-mikrobiális antitestek mérése	59
5.5.6. Az Anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata	59
5.5.6.1. Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens technikával	59
5.5.6.2. Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhotikus betegekben.....	59
5.5.6.3. Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával.....	61
5.6. A QP300 array analitikai vizsgálata és tesztelése tüdőtumoros betegek mintáin.....	61
5.7. Molekuláris genetikai vizsgálatok	63
5.7.1. DNS izolálás	63
5.7.2. Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása PCR és agaróz-, illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével.....	63
5.7.3. Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása fragmentanalízissel....	64
5.7.4. Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása szekvenálással	64
5.8. Statisztikai módszerek	65
6. EREDMÉNYEK.....	67
6.1. SEJTASSZOCIÁLT BIOMARKEREK.....	67
6.1.1. A CD14-expresszió változásai immunpatomechanizmusú kórképekben	67
6.1.1.1. Atópiás dermatitis	67
6.1.1.2. Poly- és dermatomyositis.....	69
6.1.1.3. A CD14-expresszió és funkció változásai SLE-s betegek monocytáin glükokortikoszteroid terápia hatására	71
6.2. SZOLUBILIS BIOMARKEREK.....	75
6.2.1. A szérum sCD14 koncentrációjának mérése különböző immunpatomechanizmusú kórképekben	75
6.2.1.1. Atópiás dermatitis	76
6.2.1.2. Poly- és dermatomyositis.....	77
6.2.1.3. Szisztémás lupus erythematosus	78
6.2.2. Akut fázis fehérjék a májcirrhotishoz társuló fertőzések diagnosztikájában	79
6.2.2.1. Az akut fázis fehérje szintek a fertőzéses és fertőzés nélküli betegek csoportjában	80
6.2.2.2. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrhotishoz társuló fertőzések kimutatásában.....	80
6.2.2.3. A CRP hatékonyságának vizsgálata különböző súlyosságú cirrhosis esetében	81
6.2.2.4. Az AFF-k koncentrációjának vizsgálata különböző súlyosságú cirrhosis esetében	82
6.2.2.5. Az AFF-k koncentrációja és az első klinikailag szignifikáns bakteriális infekció kialakulásáig eltelt idő közötti összefüggés vizsgálata	82
6.2.3. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrhotikus betegek mintáiban és ennek társulása a betegséget kísérő infekciókhoz	83
6.2.3.1. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrhosisban	83
6.2.3.2. Az IgA típusú ANCA további karakterizálása	84
6.2.3.3. Az ANCA és a klinikai paraméterek összefüggése.....	85
6.2.3.4. Az ANCA és a bakteriális infekciók összefüggése	86
6.2.4. Tumormarkerek vizsgálata tüdőtumoros betegek szérummintáiban	88

6.2.4.1. HE4 - a tüdőtumor diagnosztika lehetséges új markere	88
6.2.5. Tumormarkerek vizsgálata rheumatoid arthritisben (RA)	93
6.2.6. A csontanyagcsere markereinek vizsgálata egészséges férfiakban	95
6.2.6.1. A sclerostin szint vizsgálata egészséges férfiak szérummintáiban	95
6.2.7. A plazma proteom jellemzésére használható új mAb-alapú array (QP300 kit) analitikai és funkcionális tesztelése tüdő tumoros betegek mintáin	97
6.2.7.1. A QP300 array analitikai tesztelése - az RLUMax vizsgálata	98
6.2.7.1.1. Az RLUMax értékek megoszlása	98
6.2.7.1.2. Az RLUMax értékek intra-assay analízise	98
6.2.7.1.3. Az RLUMax értékek inter-assay analízise	98
6.2.7.1.4. Az RLUMax értékek lot-ok közötti variabilitása	99
6.2.7.2. A QP300 array analitikai tesztelése - kontrollok mintáiból készült pool analízise	100
6.2.7.2.1. Az RLU/RLUMax% értékek megoszlása	100
6.2.7.2.2. Az RLU/RLUMax% értékek intra-assay analízise	101
6.2.7.2.3. Az RLU/RLUMax% értékek inter-assay analízise	101
6.2.7.3. Tüdő tumoros betegek és kontrolljaik egyedi mintáinak összevetése a QP300 kittel	102
6.3. GENETIKAI MARKEREK	104
6.3.1. Az FLT3-ITD tesztelésére alkalmas módszer beállítása és validálása	104
6.3.1.1. Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban három különböző elektroforetikus módszerrel	104
6.3.1.2. Az elektroforetikus rendszerek reprodukálhatóságának vizsgálata	105
6.3.1.3. Az elektroforetikus rendszerek érzékenységének vizsgálata	107
6.3.1.4. Az elektroforetikus rendszerek felbontásának vizsgálata	108
6.3.1.5. A kapilláris elektroforézissel, illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása	110
7. MEGBESZÉLÉS	111
7.1. A tesztelt biomarkerek alkalmazásával nyert lényeges tapasztalatok, a biomarkerek felhasználásának legfontosabb szempontjai	111
7.1.1. Immunológia mechanizmusú betegségek	111
7.1.2. Tüdő tumor	114
7.1.3. Cirrhosis	117
7.1.4. Csontanyagcsere betegségek	120
7.2. Biomarker tesztek analitikai validálása	121
7.3. Preanalitikai faktorok és a biológiai variabilitás jelentősége a biomarker vizsgálatok értékelése során	123
7.4. A biomarker kutatás és a biomarkerek diagnosztikus alkalmazásának jövője	125
7.4.1. Multiplex biomarker array-k és azok potenciális lehetőségei	125
7.4.2. További jelentős technológiai fejlesztések	128
7.4.3. Marker kombinációk használata a laboratóriumi diagnosztikában	129
7.4.4. Biomarkerek és személyre szabott orvoslás	130
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	133
9. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE	135
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	136
11. JEGYZÉKEK	137
11.1. IRODALOMJEGYZÉK	137
11.2. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	159
11.3. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	161
11.4. SCIENTOMETRIAI ADATOK	167

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD: atópiás dermatitis	mCD14: membrán expresszált CD14
AFF: akut fázis fehérje	Ms: molekulásúly marker
AFP: α -fetoprotein	MS: tömegspektrometria
AFR: akut fázis reakció	NPÉ: negatív prediktív érték
AGE: agaróz gélelektroforézis	HbA1c: glikált hemoglobin A1c
AML: akut myeloid leukémia	ITD: belső tandem duplikáció
ANCA: anti-neutrophil citoplazmatikus antitest	NSE: neuron specifikus enoláz
aPDM: aktív PDM	NHS: normál humán szérum
AUC: görbe alatti terület	NIH: National Institutes of Health
bp: bázispár	OSC: oszteokalcin
BMD: bone mineral density - csont denzitás	PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis
cANCA: citoplazmatikus ANCA	pANCA: perinukleáris ANCA
CE: kapilláris elektroforézis	PCR: polimeráz láncreakció
CEA: carcinoembrionális antigén	PCT: prokalcitonin
CRP: C-reaktív protein	PDM: PM és DM együtt
CV%: variációs koefficiens	PHI: prostate health index
DM: dermatomyositis	PM: polymyositis
EKG: elektrokardiográfia	PMN: neutrophil granulocytá
EEG: elektroencefalográfia	PPÉ: pozitív prediktív érték
FLT3: Fms-szerű tirozinkináz 3	QP300: Quanti Plasma 300 kit
FRAX: a 10 éven belül várható nagyobb csont töréskockázatát megadó index	RE%: relatív eltérés
Fvs: fehérvérsejt	ROC: receiver operating characteristic görbe
GFR: glomerulus filtrációs ráta	ROMA: Risk of Ovarian Malignancy Algorithm
eGFR: számított GFR	sCD14: szolubilis CD14
iPDM: inaktív PDM	SIRS: szisztémás gyulladásos válaszreakció
IL: interleukin	SLE: szisztémás lupus erythematosus
JM: juxtamembrán	SOP: standard operating procedure
LBP: LPS kötő fehérje	TK: timidin kináz
LDCT: alacsony dózisu CT vizsgálat	TK: tirozinkináz
LPS: lipopoliszacharid	TKD: tirozinkináz domén
mAb: monoklonális ellenanyag	TNF α : tumor nekrosis faktor α

2. BEVEZETÉS

2.1. A biomarker definíciója, típusai, legfontosabb alkalmazási lehetőségek

Az orvosbiológiai kutatások gyors fejlődésének következtében az elmúlt 10-15 évben olyan új technológiák vonultak be az egészségügyi ellátásba, mint pl. az áramlási citometria, tömegspektrometria, molekuláris biológiai módszerek, különböző nagyáteresztőképességű array rendszerek, az újgenerációs DNS szekvenálás vagy a legkülönbözőbb modern képalkotó eszközök. Ezek az eljárások olyan teszteredményeket biztosítanak a betegeket kezelő orvosok számára, ami jelentősen fokozza a betegségek szűrésének, diagnosztizálásának, karakterizálásának, követésének és prognózisbecslésének hatékonyságát. Az új és régi technológiák keveredése az orvosi eljárások és a nomenklatúra átalakulását vonta maga után és egy új fogalom a „biológia marker” vagy egyszerűbben „biomarker” megszületését eredményezte [1].

2.1.1. Mi is az a „biomarker”?

A National Institute of Health (NIH) „Biomarker Definition Working Group”-ja 2001-ben fogalmazta meg a biomarkerek első definícióját: „Biológiai marker (biomarker): egy olyan tulajdonság, melyet objektíven lehet mérni, és amely indikátora lehet a normális biológiai folyamatoknak, patológiás folyamatoknak vagy egy terápiára adott farmakológiai válasznak” [2]. A megfogalmazás meglehetősen tág, hiszen magában foglalja a legkülönbözőbb vizsgálati területeket (laboratóriumi diagnosztika, patológia, képalkotó eljárások, EKG-EEG, stb.), és egymástól rendkívül eltérő technológiákat sorol egy kalap alá [1].

A definíció részben megfogalmazza a biomarkerek alkalmazásának legfontosabb területeit is. Az első a betegségre való hajlam vagy a betegség jelenlétének, illetve súlyosságának a kimutatása, mely segítheti a betegek szűrését és a diagnózis felállítását. A prognosztikai markerek megjósolják a betegség lefolyását, lehetséges kimenetelét és befolyásolhatják a potenciálisan effektív terápia kiválasztását. A prediktív markerek egy terápiacsoport vagy egy konkrét gyógyszer potenciális hatásosságára vagy hatástalanságára utalnak, illetve megjósolják a várható mellékhatások kialakulását. A farmakodinamikai biomarkerek egy adott terápia során változtatják szintjüket, és az alkalmazott kezelés farmakodinamikai tulajdonságairól adhatnak információkat, míg a farmakológiai markerek alkalmazása szélesebb körű: lehetővé teszik egy gyógyszer hatásának valósídejű monitorozását, a terápia hatékonyságának, illetve a kezelés toxicitásának megítélését. Végül a legértékesebb biomarkerek klinikai végpontokat is reprezentálhatnak, esetleg helyettesíthetnek is, mivel jól korrelálnak a terápiás kimenettel; ennek legismertebb példája

a stroke, illetve annak kialakulási valószínűsége, mely a magas vérnyomással mutat szoros összefüggést [1,3,4] vagy a diabeteses retinopathia és neuropathia helyettesítő végpontja lehet a HbA1c mérés [4].

2.2. Új biomarkerek felfedezése és fejlesztése

Az új biomarkerek azonosítására különböző típusú megközelítések léteznek és használatosak a mindennapi gyakorlatban. Historikusan a biomarker felfedezések első időszakát alapvetően a természettudományos vizsgálómódszerek fejlődése határozta meg. Az onkológiai diagnosztikában pl. az első daganatspecifikus biomarker leírása 1847-re tehető, amikor a savanyított vizeletben főzés hatására kicsapódó Bence-Jones fehérjék és a myeloma multiplex kapcsolatát sikerült azonosítani [5,6]. Később a különböző enzimek és izoenzimek, illetve hormonok kerültek a vizsgálatok középpontjába az enzimológia és a radioimmunoassay-k fejlődésével [5,7], majd a monoklonális ellenanyag előállítás technológiájának kidolgozása után jónéhány új marker került felismerésre, és ezt követően a klinikai gyakorlatba [5].

A XX. század második felében jelent meg a biomarker azonosítás második formája, azzal párhuzamosan, ahogy a különböző betegségek kialakulásával és patobiokémiai eseményeivel kapcsolatos ismeretek számottevően gyarapodtak, és a metodikai repertoár jelentősen kiszélesedett. Ebben az esetben az új markerek felismerését mindig hosszas (alap)kutatási periódus előzi meg, amelynek során egy adott betegség patológiás történéseit vizsgálva olyan molekulák kerülnek a figyelem középpontjába, melyek mennyiségi/minőségi változásai összefüggést mutatnak a kórkép bizonyos klinikai paramétereivel. Ezek a markerek a betegség által érintett szövetekben vagy az ezekkel érintkező testnedvekben találhatók meg. A lehetséges molekulák azonosításában potenciálisan jelentős szerepet játszhatnak bizonyos állatmodellek vagy a betegséget reprezentáló sejtvonalak is. Itt tehát, alapvetően egy meghatározott hipotézis jelenti a biomarker azonosítás alapját [5]. Csak egy konkrét példa: nagyszámú kísérletes adat igazolta, hogy a p53 fehérje expressziójának és funkciójának változásai szerepet játszanak egyes daganatok kialakulásában; így a p53 fehérje expressziójának vizsgálata és a p53 gén mutációinak detektálása a daganat diagnosztika értékes módszerei lettek [8,9].

Teljesen új irányzatot képviselnek a XX. század végétől egyre dinamikusabban fejlődő, nagy áteresztőképességű genomikai és proteomikai technikák (DNS és fehérje microarray-k, újgenerációs szekvenálás). Itt hipotézis független biomarker azonosításról – „adathalászatról” – beszélünk. Ezekkel a módszerekkel több száz vagy ezer marker vizsgálható egyidejűleg, és függetlenül ezek funkciójától és az adott kórképpel való biológiai összefüggésétől tudunk olyan biomarkereket azonosítani, amelyek az adott

betegségben eltérést mutatnak a megfelelően kiválasztott kontroll csoporthoz képest. Ez a megközelítés akkor igazán hatékony, ha a profilírozás globális, azaz - lehetőség szerint - minden mérhető paramétert érint, és ha a mérés szenzitivitása eléri vagy nagyobb a minimális/várható változás méréséhez szükséges érzékenységnél. Ezeknél a módszereknél különösen nagy jelentősége van a bioinformatikának, aminek nemcsak az igen nagyszámú adat kezelésében és feldolgozásában van szerepe, hanem a több paramétert egyesítő kompozit score-ok megalkotásában is [10].

Az előző három bekezdésben a biomarkerek fejlesztésének első fázisáról beszéltünk, azaz, arról hogy milyen módon kerülhet egy új marker az érdeklődés középpontjába egy adott kórkép kapcsán. Ezt nevezzük a biomarker fejlesztés **felfedező fázisának** („**discovery phase**”). Ezt követően a biomarker fejlesztésnek további három fázisáról beszélhetünk még. A második szakasz a **kvalifikációs fázis** („**qualification phase**”), amikor már a diagnosztikus mintaként szolgáló testnedvben (leggyakrabban szérum vagy plazma) határozzuk meg a kandidáns biomarker szintjét és igazoljuk, hogy eltérő koncentrációk mérhetők az egyedi betegek és kontrolljaik mintáiban. A harmadik, **verifikációs fázisban** („**verification phase**”) populációs szintű vizsgálatok történnek egészséges kontrollokon, és a cél elsősorban a vizsgálat specificitásának igazolása. Végül az utolsó, **validációs fázisban** („**validation phase**”) történik meg a klinikai assay végső kifejlesztése és tesztelése, melynek során betegek és kontrolljaik mintáiban történik meg a vizsgálat, és a szenzitivitás/specificitás adatok mellett az új marker klinikai adatokkal való összefüggése és így potenciális klinikai applikációi (diagnosztika, predikció, terápiamonitorozás) is vizsgálatra kerülnek. [11,12]

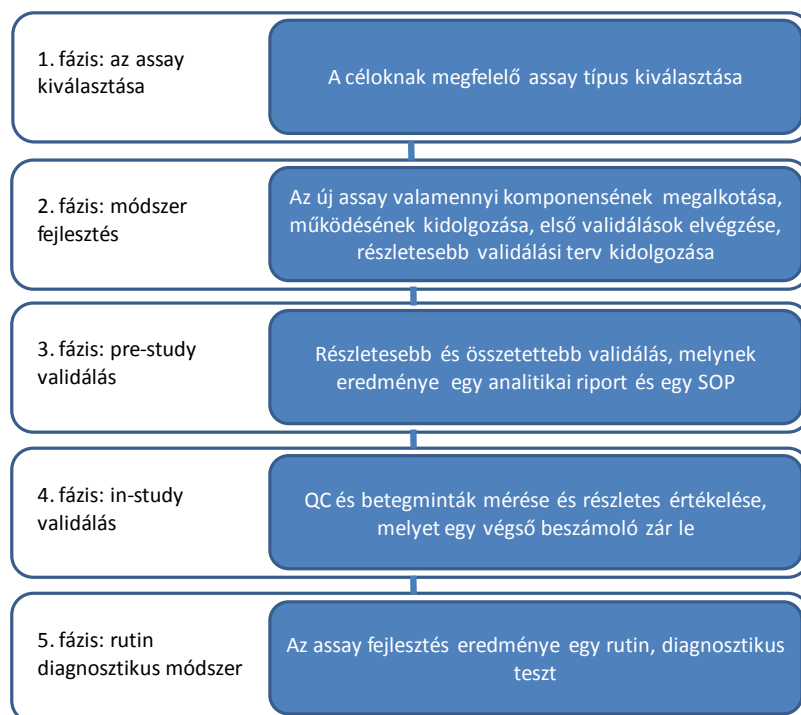
2.3. Biomarker tesztek analitikai és funkcionális validálása

2.3.1. A validálás fő lépései

Az új biomarkerek azonosítása után hasonlóan komoly kihívás lehet az ennek mérésére alkalmas assay-k megalkotása és validálása. Az *International Organization for Standardization* szervezet által megfogalmazott definíció szerint egy módszer validálása annak igazolása – kísérletes úton, objektív adatok bemutatás révén –, hogy egy bizonyos alkalmazással kapcsolatos különleges elvárásoknak az adott módszer megfelel [13,14]. A módszervalidálás lépései viszonylag jól definiáltak a kémiai analitikai laboratóriumokban és számos irányelv/guideline foglalkozik ezzel a rutin diagnosztikai célra alkalmazott tesztek esetében is [3,15]. Ugyanakkor a biomarker assay-k fejlesztésének különböző fázisaiban különböző szintű módszervalidálásra van szükség, ami az adott szint igényeinek

megfelel: „fit-for-purpose” analízis. Ilyenkor tehát, ugyanúgy kísérletes eredményekre és objektív adatokra van szükség, de ezek száma, illetve az ezekkel kapcsolatos elvárások szigorúsága nagyon különböző lehet a módszerfejlesztés szintjének megfelelően [3].

A módszervalidálás szempontjából 5 stádiumát különítjük el a biomarker assay-k fejlesztésének. Az **első fázisban** a klinikai és kísérletes céloknak megfelelő **assay elméleti kiválasztása** a fő cél. A **második, a módszerfejlesztés fázisában** az új assay valamennyi komponensét meg kell alkotni (reagensek, antitestek, hígító-, blokkoló oldat/mátrix, szilárd fázis/plate-ek és detektáló rendszer kiválasztása), ki kell dolgozni az assay működésének részleteit (minta előkészítés, plate formátum, replikátumok, inkubációs idők meghatározása, kalibrációs görbe illesztés modellének kiválasztása), el kell végezni az első validálásokat (a reagensek specificitásának és stabilitásának tesztelése, előzetes stabilitás és robosztusság vizsgálat), és egy további részletesebb validálási tervet kell kidolgozni. A **harmadik lépés a pre-study validáció**, amely már sokkal összetettebb (referencia anyagok létrehozása, kalibrációs görbe, torzítás és reprodukálhatóság, kvantitálás határai, specificitás és szelektivitás, stabilitás, linearitás, robosztusság, batch méret, és egy futtatás elfogadásának kritériumai), melynek eredménye egy analitikai riport és egy "standard operating procedure" (SOP), amely leírja a módszer működését részleteiben. A **negyedik lépés az in-study validálás**, amikor a QC minták részletes mérése mellett valódi betegminták mérése is történik. Ezt a fázist egy végső beszámoló zárja le, ami tartalmazza a standard görbe és a QC minták kumulatív statisztikai adatait, valamint a betegminták értékeit és a vizsgálat során észlelt eltéréseket, ismétléseket és ezek okait, magyarázatát. Mindezek teljesítése után válhat a teszt **rutin diagnosztikus módszerré (5. fázis)**, amikor már az ilyen módszereknek megfelelő folyamatos QC tesztelést kell végezni. Ezek a fázisok nem mindig választhatók el egymástól élesen, sőt ismert például olyan teszt is (Oncotype Dx), ahol a már piacon lévő termék adatait felhasználva folyamatosan javították az értékelő algoritmust. A folyamat során a fejlesztés alatt álló módszer állandóan javul, és ennek biztosítéka a „fit-for purpose” analízis filozófiájának megfelelő folyamatos és egyre szigorúbbá váló minőségellenőrzés [12,16-19]. Egyes források a biomarker assay fejlesztés 1. és 2. fázisát összevonják, és ezt nevezik a „módszerfejlesztés” szakaszának, ezt követi a korábbiakhoz hasonlóan a „pre-study validálás” majd az „in-study validálás”, ami végül egy rutin diagnosztikus tesztet eredményezhet [19]. Az 1. ábra és az 1. táblázat a validálás különböző fázisaiban végrehajtandó legfontosabb feladatokat mutatja be.



1. ábra Az új biomarker tesztek bevezetésének és validálásának főbb fázisai.

A biomarkereket mérő assay típusától függően is különbözőek lehetnek az elvárások a módszervalidálás mélységét illetően. A definitív kvantitatív módszerek – pl. immunoassay-k, tömegspektrometriás metódusok kisebb hányada – kalibrációs görbét alkalmazva határozzák meg az analit pontos koncentrációját, ahol a kalibrátor anyag – és az azt hordozó mátrix – tökéletesen karakterizált és reprezentálja a biomarkert. Ebben az esetben a legfontosabb cél az adott analit koncentrációjának a meghatározása a mintában olyan pontosan, ahogy csak lehetséges. Ennek megfelelően itt kulcsfontosságú az analitikai pontosság és meglehetősen komplex a módszer validálás folyamata. A relatív kvantitatív assay-k esetében a kalibrációs görbe megalkotásához használt standardok nem reprezentálják tökéletesen a mérendő anyagot (pl. rekombináns fehérje negatív kontroll szérumban hígítva). Ide az immunoassay-k nagyobb része tartozik, ahol a mérendő analit valamilyen endogén anyag, amely natív formában nem áll rendelkezésre; a módszervalidálás mélysége a definitív kvantitatív módszerekéhez hasonló. A kvázi kvantitatív assay-k nem használnak kalibrációs standardokat, de a teszt eredmény folyamatos numerikus érték. A kvalitatív módszerek pedig pozitív/negatív eredményt adnak, esetleg 3-4 fokozatú skálán fejezik ki a végeredményt (pl. immunhisztokémiai metodikák). Értelemszerűen ezekben az utóbbi assay-kben a validálás során legnagyobb jelentősége a pozitív és negatív tesztminták mérésének és értékelésének van [3,18,20-22].

Teljesítmény paraméterek	Módszer fejlesztés fázisa	Pre-study validálás fázisa	In-study validálás fázisa
Reagensok (kiválasztása/stabilitása/teszt formátum/batch méret	Kiválasztani; Az elfogadhatóság határait meghatározni	A szabályokat és az azoknak való megfelelést megerősíteni	Monitorozni; Lot váltásnál ellenőrizni kell a működést
Specifititás és Érzékenység	Az elfogadhatóság határait meghatározni	A szabályokat és az azoknak való megfelelést megerősíteni	A szabályokat és az azoknak való megfelelést megerősíteni betegek mintáin
Mátrix kiválasztása/Minta előkészítés/Minimálisan szükséges mintahígítás	Az elfogadhatóság határait meghatározni	A szabályokat és az azoknak való megfelelést megerősíteni; Új/módosított mátrixok esetén a QC mintákat ebben kell elkészíteni	Monitorozni: a mátrix lot változása esetén, az összehasonlíthatóságot igazolni kell
Standardok/kalibrátorok és Standard görbe	Modell kiválasztása	A szabályokat és az azoknak való megfelelést megerősíteni	Monitorozni a szabályoknak való megfelelést
Reprodukálhatóság és Valódiság	Reprodukálhatóságot és torzítást értékelni	Reprodukálhatóság és torzítás elfogadhatóságának határait meghatározni	Teljes hiba értékelése (4-6-30 szabály alapján)
Mérési tartomány	Értékelni	Az elfogadhatóság határait meghatározni	Alkalmazni
Minta stabilitás	Értékelni	Az elfogadhatóság határait meghatározni	Folyamatos értékelés és kiterjesztés
Hígítási linearitás	Értékelni	Az elfogadhatóság határait meghatározni	A Prestudy validálás során nem vizsgált hígítások tesztelése
Párhuzamosság	-----	Megvizsgálni ha lehet	Az elfogadhatóság határait meghatározni a tesztelt minták segítségével
Robosztusság	Értékelni	Az elfogadhatóság határait meghatározni	Monitorozni a szabályoknak való megfelelést
Részleges validálás/ Módszer átvétel/ Kereszt validálás	-----	-----	Értelemszerűen alkalmazni
Mérés (futás) elfogadásának kritériumai	-----	A futás elfogadásának alapjai a Standard görbe elfogadhatóságának kritériumai	A futás elfogadásának alapjai a standard görbe és a QC minták elfogadhatóságá- nak kritériumai (4-6-30 szabály alapján)

1. táblázat Az új biomarker assay-k fejlesztésének különböző fázisaiban végrehajtandó validálási feladatok [19]. 4-6-30 szabály: a tesztelt 6 kontroll mintából minimum 4 a nominális értékétől <30%-ban tér el.

2.3.2. *A módszervalidálás során az adott assay teljesítményét jellemző paraméterek*

[3,19,23-25]

Analit specificitás és szelektivitás: Ez azt jelenti, hogy egy adott assay csak egy adott analitot mér és az ahhoz kémiai/fizikai hasonló variánsokat nem – nincs keresztreaktivitás –, illetve az adott alkalmazott mátrixban nincsenek jelen olyan anyagok, amelyek a célanalit mérését zavarnák. A specificitás akkor tesztelhető, ha a vizsgált analithoz fizikokémiai hasonló molekulák – amelyek a tesztelni kívánt mintákban fiziológiás vagy patológias körülmények között jelentős mennyiségben jelen lehetnek – rendelkezésre állnak. Ezeket az alkalmazott assay mátrixba bemérve tesztelhető az assay specificitása. A szelektivitás ellenőrzésére a vizsgált analitot mérjük be különböző koncentrációban legalább 6 különböző személytől származó mátrixba (pl. szérumba) és vizsgáljuk, hogy zavarja-e valami az analit koncentrációjának pontos meghatározását. Legalább a tesztelt mátrixok 80%-ában elfogadható visszamérést (<30% eltérés; CV%<25%) kell kapnunk. A mátrixban (szérumban, plazmában) lévő interferáló anyagok közül leggyakrabban a lipidek, hemoglobin, bilirubin és a reumafaktor zavaró hatását szokták vizsgálni.

Standard görbe értékelése: A standard görbe felvételéhez szükséges minták készülhetnek valódi kontroll/beteg minták poolozásával/keverésével, amelyekben a vizsgált analit koncentrációját egy másik – referencia – módszer segítségével meghatároztuk. A másik lehetőség ismert mennyiségű referencia anyag (pl. tisztított vagy rekombináns fehérje) adása a megfelelő pufferhez vagy mátrixhoz. A standard görbének minimum 6 pontból kell állnia (a módszerfejlesztés során ez akár 10 pont is lehet), és a standardoknak egyenletesen kell megoszlania a mérési tartományban (logaritmus skálán). A standardokat minimum duplikátumban kell mérni és legalább 3 független futtatás alapján kell értékelni (a pre-study értékelés során minimum 6 futtatás). A görbe illesztés lehet lineáris és nemlineáris. Az immunoassay-k esetében leginkább javasolt a 4- vagy 5-paraméteres logisztikus illesztés. A standard görbe elfogadásának feltétele: legalább a standard pontok 75%-ánál a standard minták reprodukálhatósága CV%<20% kell legyen, míg a görbe alapján visszaszámolt standard koncentráció nem térhet el a nominális értéktől több, mint 20-25%-kal.

Analitikai reprodukálhatóság és torzítás: Ugyanazon homogén minta ismételt mérése során meghatározható a mérés reprodukálhatósága (mennyire „szórnak” az ismételt mérések) és a torzítása (mennyire tér el a mérések átlaga egy korábban megállapított nominális célértéktől). Az assay fejlesztés valamennyi fázisában nagy jelentősége van ennek a vizsgálatnak és spike-olt QC minták vagy valódi kontroll/beteg minták is

használhatók ehhez a teszteléshez. A meghatározás történhet egy kísérleten (futtatáson) belül vagy a kísérletek (futtatások) között (intra- és inter-assay vagy intra- és inter-run variabilitás). A reprodukálhatóság megadása CV%-ban (variációs koefficiens %-ban) történik (mért értékek szórása osztva a minta nominális értékével vagy a mért értékek átlagával). A torzítás esetében relatív hiba százalékot (RE%) kalkulálunk (mért értékek átlaga osztva a minta nominális értékével). A módszerfejlesztés időszakában minimum 8 (a pre-study validálás során minimum 5, az in-study értékelés során minimum 3) mintát kell vizsgálni duplikátumban, és legalább 6 független futtatást kell végrehajtani az inter-assay variabilitás értékelése során. Az intra-assay reprodukálhatóság és torzítás során 2-5 a replikátumok javasolt száma. Ebben – a replikátumok számában – nagy különbség lehet a különböző típusú analitok között. Az immunoassay-k esetében elegendő lehet a minimális esetszám is, de egy kémia teszt esetében akár $n=20$ is lehet az intra- és inter-assay CV% és RE% kalkulálásához szükséges mérések száma. Az elfogadható CV% és RE% 20-25%.

Funkcionális szenzitivitás: Az a legkisebb analitkoncentráció, ami még elfogadható reprodukálhatósággal és torzítással mérhető (CV%<20-25%, RE%<20-25%).

Mérési tartomány: Az a legkisebb és legnagyobb analitkoncentráció által meghatározott tartomány, ami még elfogadható reprodukálhatósággal és torzítással mérhető (CV%<20-25%, RE%<20-25%).

Hígítási linearitás: Miután a biomarker assay-k egy részénél a kvantitálás tartománya meglehetősen szűk feltétlenül szükséges annak igazolása, hogy a kvantitálás felső határát meghaladó koncentrációjú minták hígítással az assay valid tartományába hígíthatóak. Ez a meghatározás teszi lehetővé a prozone vagy a nagy dózisz „hook” effektus kimutatását is. A hígítási linearitás meghatározása minimum 3 különböző QC mintával (spike-olt matrix) történik (szemben a párhuzamosság meghatározásával, ahol valós beteg/kontroll minta hígítását végezzük el). A legmagasabb tesztelt koncentrációnak legalább 100-szor vagy 1000-szer nagyobbnak kell lenni, mint a kvantitálás felső határa, és egyenletes hígítási sort kell képezni, úgy, hogy több hígítási pont is az assay mérési tartományába essen. A hígítás alapján visszszámolt analit koncentrációk eltérése a nominális értéktől kisebb, mint 20-25% kell legyen (CV%<25%) a 3-ból legalább 2 QC minta esetében.

Párhuzamosság („parallelism”): Intakt (nem spike-olt) minta egyedi vagy sorozat hígításával vizsgálhatjuk a mérés párhuzamosságát. Legalább 6 különböző minta vizsgálata szükséges, amelyből legalább 5-nek meg kell felelnie az elvárásoknak. Az értékelés történhet lineáris regresszióval: a mért koncentrációt ábrázoljuk a $\log_{10}(1/\text{hígítás})$ függvényében. Az egyenes meredeksége nem térhet el szignifikánsan 1-től. A másik lehetőség, hogy a hígítás alapján visszszámoljuk az analit koncentrációját minden egyes hígítás esetében, és ezek eltérése a nominális értéktől nem lehet nagyobb, mint 30% (és

CV%<25%). A párhuzamosság vizsgálata alkalmas lehet a minimális még/már elfogadható torzítással és reprodukálhatósággal járó mintahígítás meghatározására is.

Minimális szükséges hígítás: A minták mérése során az optimális torzítást és pontosságot eredményező legkisebb hígítás. Egy ismert koncentrációjú standard anyag és az alkalmazott mátrix segítségével, sorozathígítás alkalmazásával meghatározható paraméter.

Robosztusság: Egy assay robusztusságát az adja meg, hogy a mindennapi gyakorlat körülményei és változásai között, mennyire működik megbízhatóan. A legfontosabb tesztelendő paraméterek egy immunoassay esetében: az inkubálások hossza, hőmérséklete, a reagens+minta elegy rázása, fény hatása, a reagens batch/lot változásai, minta térfogat, műszerváltás (pipetta, mosó, reader), operátor személyének változása. Meghatározandó, hogy mely paraméterek változásai befolyásolják számottevően az assay teljesítményét, és ezeket a paramétereket optimalizálni, majd ezt követően szigorúan rögzíteni kell. A robusztusság vizsgálata különösen a módszerfejlesztés fázisában nagy fontosságú.

Mintastabilitás: Ennek a vizsgálatnak leginkább a pre-study validáció során kell megtörténnie. A mintastabilitás tesztelése során azokat a helyzeteket kell leginkább modelleznünk, amelyek a mindennapi gyakorlatban a minta preanalitikai útja során előfordulhatnak. Az alkalmazandó minta betegektől/kontrolloktól származó vagy spike-olt teljes vér vagy a megfelelő mátrix plusz a vizsgált analit. Vizsgálni kell a szobahőmérsékleten történő tárolás során bekövetkező változásokat, és a rövid és hosszú távú tárolás és az ismételt olvasztás-fagyasztás hatását a mért analit koncentrációjára. Szobahőmérsékleten minimum 2 órás, 2-8°C között minimum 24 órás tárolási időt kell tesztelni. Vizsgálni kell azt, ha a vérminta áll hosszabb ideig szobahőmérsékleten vagy hűtőben és a tárolás után történik meg a szérum/plazma szeparációja, és tesztelni kell az azonnal (vagy 2 órán belül) szeparált szérum/plazma eltarthatóságát is (szobahőn és hűtőben). Az olvasztás/fagyasztás tesztelése során legalább 3-5 ilyen ciklust kell végrehajtani, és a kiolvasztások között nem telhet el kevesebb idő, mint 12-24 óra. A rövid távú tárolás esetén 1 hónap elteltével kell lemérni a -20°C-on vagy -80°C-on tárolt minták analit koncentrációját, míg a hosszú távú tárolás tesztelése esetében 3, 6, 12 és 24 hónap után. Legalább 2 mintát kell vizsgálni triplikátumban. A reprodukálhatóságnak és a nominális értéktől való eltérésnek 25%-nál kisebbnek kell lennie.

Reagens stabilitás: Tesztelhető a módszerfejlesztés stádiumában, amikor az egyes assay komponenseket szobahőn, 2-8°C-on vagy -20°C-on tároljuk, és friss kalibrátorok és QC minták alkalmazásával teszteljük a reagensek életidejét. Vizsgálható az in-study validálás során is, hiszen itt folyamatosan történik többszintű QC mérés, aminek az eltérései jelezhetik a reagens stabilitás csökkenését is.

2.3.3. Az új biomarkerek hivatalos engedélyeztetéséhez szükséges vizsgálatok

Bár a biomarkerekkel kapcsolatos publikációk száma rendkívül nagy - egy aktuális, egyszerű keresés a "biomarker" szóra a PubMed adatbázisban több mint 700.000 találatot ad -, de nagyon kevés azoknak a teszteknek a száma, amelyek a rutin diagnosztikus laboratóriumok repertoárjába bekerülnek. Az elmúlt 15 évben évente átlagosan csak kb. 1,5 új fehérje vált a rutin diagnosztikus algoritmusok részévé [26]. Ahhoz, hogy egy új marker sikeres legyen, több fontos dolgot kell figyelembe venni már a biomarker assay fejlesztése, és még inkább az analitikai és klinikai validálása során [26,27]. Az új tesztnek az alábbi kritériumoknak kell megfelelnie:

- 1., analitikai teljesítményének meg kell felelnie jól definiált, nemzetközileg elfogadott laboratóriumi elvárásoknak, standardoknak,
- 2., meg kell találni az egyértelmű helyét az aktuálisan érvényben lévő klinikai döntési algoritmusokban, továbbá olyan információt kell nyújtania, amely kiegészíti vagy kiváltja a már meglévő tesztek eredményeit, és hozzájárul a betegek állapotának javulásához,
- 3., költséghatékonynak kell lennie,
- 4., illeszkednie kell a rutin diagnosztikus laboratóriumok működési rendjébe,
- 5., analitikai és klinikai teljesítményének (1. és 2. pont) evidencia alapúnak kell lennie,
- 6., meg kell felelnie a laboratóriumi működést szabályzó hatóságok előírásainak (Food and Drug Administration - FDA - szabályzata, CE jelzés feltételrendszere).

Különösen fontos lehet a teszt sikere szempontjából a 6. pontban említett FDA elismertetés vagy az európai CE jelzés megszerzése. Ennek megfelelően a teszt-fejlesztés és -validálás során célszerű az említett hatóságok elvárásait fokozottan szem előtt tartani.

Bármilyen típusú assay esetében a teszt alkalmazásának pontos definiálása az első fontos lépés. Ez helyezi a vizsgálatot egy jól definiált klinikai kontextusba, ez fogja meghatározni pl. az FDA esetében a teszt besorolását (I., II., III. osztály), és ennek megfelelően az engedélyezési eljárás menetét is [egyszerű bejelentés; "510(k)" eljárás; piacra való bevezetés előtti engedélyezés ("premarket approval" - PMA)]. A III-as osztályú tesztek eredménye jelentősen befolyásolja a beteg ellátásának menetét (pl. diagnózis definiálása, invazív beavatkozás - biopszia - indikációja, terápia megkezdése vagy kihagyása). A fals pozitív vagy negatív eredmények hatása a beteg életkilátására igen komoly lehet, ezért ezek a tesztek nagy kockázatú beavatkozásnak minősülnek. Ebben az esetben a legszigorúbb ellenőrzés, a "premarket approval" elvégzésére van szükség. A II-es osztályú tesztek kockázata kisebb (pl. prognózis becslése), és itt az egyszerűbb "510(k)" eljárás lefolytatása az elvárás. Ebben az esetben az új teszt és egy már meglévő, FDA engedéllyel bíró assay egyenértékűségét kell bemutatni. Ha nincsen még ilyen assay akkor

egy "de novo" kérvényezésre van szükség az "510(k)" eljárás keretében. Az I-es osztályú tesztek esetében egyszerű bejelentésre van csak szükség [26-29].

A II-es és III-as osztályú assay-k esetében az analitikai validálás fő elemei [26-29]:

- intra-assay, inter-assay, mérőhely- és batch-függő reprodukálhatóság
- mintavétellel kapcsolatos reprodukálhatóság (mintavétel módja, eszközei; biológiai variabilitás; cirkadián változások)
- torzítás (ha megfelelő QC minta elérhető)
- linearitás, detektálási határ, assay cut-off
- átszennyezés ("carry-over")
- várható értékek, visszavezethetőség (kontrollok, kalibrátorok)
- analitikai specificitás, interferencia (hasonló molekulák; hemoglobin, lipidek, bilirubin, reumafaktor)
- műszer/reagens és mintastabilitás.

A kérelem benyújtásakor a klinikai validálást illető legfontosabb kérdések:

- a vizsgálat célpopulációja
- az assay levizsgálása egy kipróbálási- ("training"), egy teszt- és egy validálási-beteg/minta populáción
- az assay teljesítménye - önmagában vagy más tesztekkel kombinálva - a kipróbálási-, teszt- és validálási beteg/minta populáción (klinikai szenzitivitás, specificitás, pozitív prediktív érték, negatív prediktív érték, esély hányados, túlélési adatok)
- klinikai cut-off, referencia tartomány, várható értékek.

A kérelemnek tartalmaznia kell a módszer technikai leírását, az alkalmazott műszereket és szoftvereket, valamint a hasonló módszerekkel való összehasonlítás eredményeit [26-29]. Az eljárás sikeres lefolyását nagyban elősegítheti egy beadás előtti pályázat elkészítése és benyújtása véleményezésre az FDA-hez. Ez tartalmazza az új teszt tervezett felhasználási területeit, az alkalmazott technológiát, valamint a tervezett analitikai és klinikai vizsgálatokat. A kommunikáció során az FDA és a gyártó közösen alakíthatja ki az assay pontos besorolását és meghatározhatják a validálás részletes menetét [27,28].

Az FDA engedélyezés elvárásaihoz hasonló az európai reguláció kritérium rendszere, melyet az Európai Parlament és Tanács 98/79/EK irányelve szabályoz, de ez dominálónan az analitikai megfelelésre fókuszál. A teszt típusától függően a hatóság vagy egyszerűen csak a gyártó által benyújtott technikai adatok alapján dönt a megfelelésről, vagy bizonyos tesztek esetében az értékelés során ún. szakértői testület ("notified body") munkáját is igénybe veheti [26,30].

2.4. A disszertációban vizsgált biomarkerek jellemzői

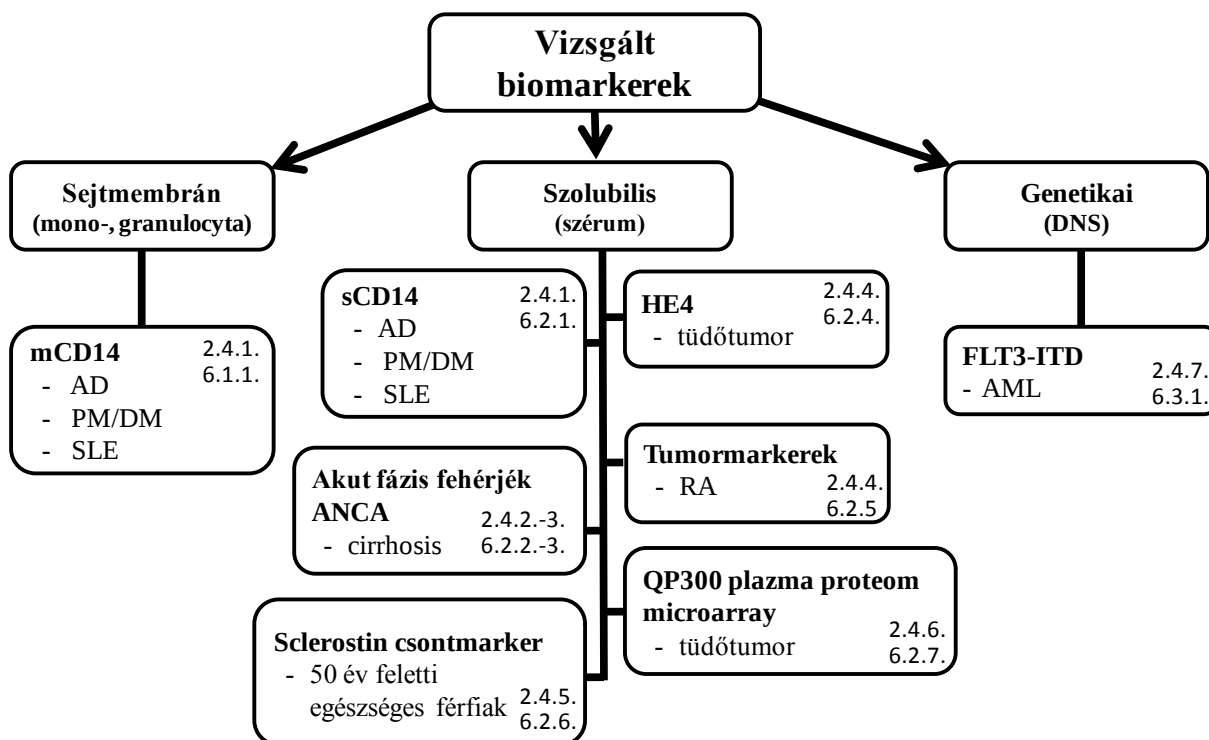
A disszertációban bemutatott eredmények több, különböző betegségcsoport köré rendezhetők: immunpatomechanizmusú betegségek, daganatos kórképek, a csontanyagcsere betegségei és végül májbetegségek. Elmondható, ugyanakkor, hogy bár különböző területeken, de minden alkalommal vagy új biomarkerek beállítását és analitikai tesztelését végeztük el, majd különböző betegcsoportokon vizsgáltuk őket, vagy ismert markerek új klinikai applikációit teszteltük. Vizsgáltuk azt, hogy mennyire képesek ezek azonosítani a betegeket megfelelően illesztett kontroll csoportokhoz képest, illetve, hogy képesek-e a betegség aktivitását vagy társuló infekciókat kimutatni vagy előrejelezni. Megvizsgáltuk, hogy bizonyos terápiás eljárások módosítják-e a szintjüket. Több esetben azonosítottunk olyan preanalitikai faktorokat vagy társuló betegségeket is, amelyek számottevően befolyásolták a mért eredményeket. Végül sikerült több markert is magában foglaló új kompozit paramétereket is definiálnunk.

A kutatómunka során vizsgált betegségek és tesztek tehát, meglehetősen sokfélék és sokszínűek voltak, ezért didaktikus bemutatásuk nem tűnt könnyűnek. Végül egyszerű logikát választottunk; a biomarkerek szervezeten belüli előfordulása alapján "kategorizáltuk" az egyes vizsgálatokat: sejtmembránban lévő, szolubilis (szérumban található) és végül genetikai (DNS) markerek. Ennek megfelelően követik egymást a vizsgálatok a Bevezetés és az Eredmények részekben. Az új eredményeket hozó markereket és a vizsgált betegségcsoportokat a 2. ábra foglalja össze.

2.4.1. A CD14 molekula

A természetes immunrendszer egyik fontos mintázatfelismerő receptora és az egyik legjelentősebb LPS kötő fehérje a CD14 molekula. Ez egy 356 aminosavból plusz egy 19 tagú N-terminális leader peptidből álló membrán glikoprotein, melynek C-terminális végére a transzláció után egy foszfolipid (glikozil-foszfatidil-inozitol - GPI) farok kerül, ami nagy laterális mobilitást biztosít a receptor molekulának a sejtmembránban [31-33]. A CD14-nek a membrán-expresszált formán (mCD14) kívül szolubilis formája (sCD14) is létezik: egy 56 kDa-os és egy 48 kDa-os izoforma. A 48 kDa-os különböző stimulusokra a membrán-expresszált CD14 molekulák sejtekről való lehasadása során keletkezik, az 56 kDa-os izoforma direkt módon szekretálódik, megtartja C-terminális végét és elkerüli a GPI-farok kötődését (3. ábra) [32,34-36]. A molekula szerkezete - a "leucin-gazdag repeat"-eket tartalmazó fehérjékhez hasonlóan kissé hajlott szolenoidhoz hasonlít. A fehérjét 3 diszulfid híd stabilizálja, 5 α hélixet és 11 β -redőt tartalmaz. A molekula N

terminális végén található egy hidrofób zseb vagy bemélyedés, ami az LPS, illetve egyéb acetilált CD14-ligandok lipid részének a kötéseért felelős (3. ábra) [37].

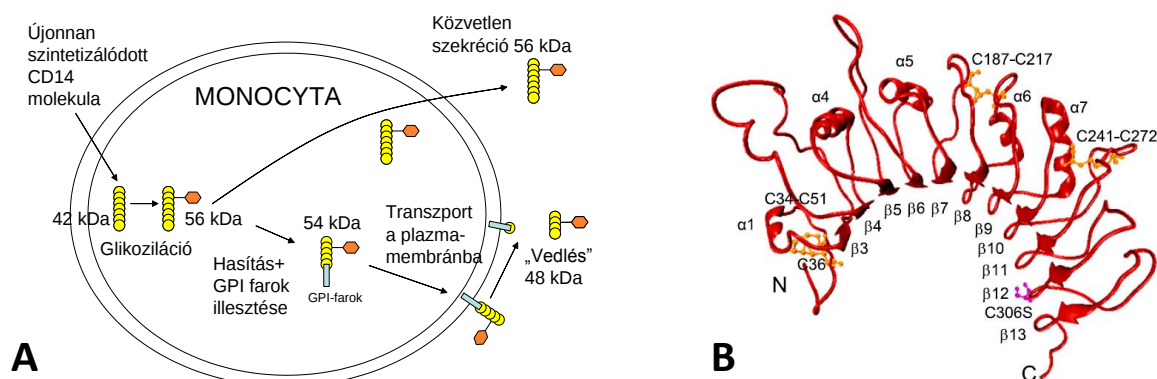


2. ábra Az értekezésben vizsgált biomarkerek és betegségek. A boxokban lévő számok a "Bevezetés" és az "Eredmények" rész megfelelő fejezeteire utalnak (AD: atópiás dermatitis, PM: polymyositis, DM: dermatomyositis, SLE: szisztémás lupus erythematosus, RA: rheumatoid arthritis, AML: akut myeloid leukemia).

A mCD14 myeloid differenciálódási marker, elsősorban érett myeloid sejtek expresszálják. A monocytákon megközelítőleg 110.000 molekula, míg a granulocytákon 3.000-5.000 molekula található sejtenként; a macrophagokon szöveti lokalizációjuktól függően változik a sejtenkénti CD14-szám [32,33,38].

A CD14, mint leucin gazdag repeateket (LRR) tartalmazó mintázatfelismerő receptor jelentős szerepet tölt be a kórokozókkal szembeni védekezésben, ugyanis az LPS-en kívül számos egyéb, Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokból, valamint gombákból származó konzervatív struktúrát képes felismerni (peptidoglikán, lipoteikolsav, lipoarabinomannán, poliuronsav) [32]. A CD14 legfőbb sajátága, hogy a Gram-negatív baktériumokból származó endotoxin (LPS) nagy affinitású kötéseére képes. A mCD14

önmagában is meg tudja kötni az LPS-t, de az LPS kötő fehérje (LBP) jelenléte az interakció érzékenységét 100-1000-szeresére fokozza. Mivel a CD14-nek nincs intracelluláris doménje, nem indíthat el önmagában jelátviteli folyamatokat, ehhez az MD2-TLR4 komplexre van szükség [32,39-42].



3. ábra A CD14 molekula szintézise monocytákban (A) és röntgendiffrakcióval meghatározott háromdimenziós szerkezete (B). Az A ábrán a membrán-expresszált és a kétféle sCD14 keletkezése követhető nyomon [31]. A B részen a CD14 molekula szerkezete látható, az α -hélixek ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) és β -redők ($\beta 3$ - $\beta 13$) kerültek feltüntetésre, a narancssárga rész a diszulfid hidakat jelöli [37].

A szolubilis CD14 az egészséges emberi szérumban 1-5 mg/L koncentrációban található, de akut gyulladás esetén 3-4-szeresére emelkedik a szintje [32,43-46]. A sCD14 molekula LBP jelenlétében alacsony koncentrációjú LPS kötésére is képes, ami a CD14 molekulát nem expresszáló sejtek (pl. endothel-, epithel-, simaizom sejtek) membránjához tud kötődni, és képes ezeket aktiválni [32,47,48]. Másrészt a sCD14 nagy koncentrációban az LPS biológiai hatásának neutralizálásában is szerepet játszhat [32]. A CD14 molekula képes a keringő apoptotikus testek kötésére és ezek celluláris felvételének elősegítésére anélkül, hogy eközben gyulladásos folyamatokat indukálna [32].

Több olyan fertőzőses (aktív tuberculosis, malária, hepatitis B, C és HIV-1 fertőzés, bakteriális meningitis, szepszis, septicus sokk, ARDS), krónikus gyulladással járó és/vagy autoimmun (szisztémás lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, scleroderma, psoriasis, Behcet kór, Kawasaki betegség) és atópiás-allergiás (extrinsic allergiás alveolitis, atópiás dermatitis) betegség is ismeretes, ami a mCD14 és a szérumban található sCD14 szintek megváltozásával jár [32,43,44,49-55]. Saját adataink szerint a gyulladásos bélbetegségek (Crohn-betegség, colitis ulcerosa) esetében az akut klinikai állapot kimutatásában és előrejelzésében jól használható diagnosztikus és prognosztikus marker lehet a sCD14 mérése [56].

2.4.2. Akut fázis fehérjék

Az akut fázis reakció (AFR) a szervezet különböző külső vagy belső stressz hatásra adott szisztémás, nem specifikus válasza. Célja a szerveket/szöveteket károsító hatás eliminálása, és a normális működés helyreállítása. Egy komplexen regulált folyamatról van szó, amit hormonális és metabolikus változások egész sora is kísér. Az AFR indukálásban a külső és belső noxa – fertőzés, gyulladásos megbetegedés, szövetnekrózis, malignus megbetegedés – hatására termelődő biológiai mediátoroknak, elsősorban az interleukin 1 (IL-1), IL-6 és tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) citokineknek van meghatározó szerepe. A folyamat jellegzetes élettani változásokkal jár, amelyek egyben az AFR diagnosztikáját is elősegítik. Ide sorolható a láz, a fehérvérsejtszám emelkedése, fokozott vörösvértest süllyedés, ACTH és kortizol szint emelkedése és az akut fázis fehérjék (AFF) szintézise [57-59].

Az akut fázis proteinek a májban termelődnek. Az AFR során a máj fehérje termelése átprogramozódik, és bizonyos fehérjék szintézise jelentősen (akár 1000-szeresen is) fokozódik, míg másoké csökken. Az első csoportba a pozitív AFF-k tartoznak, míg a másodikba a negatívak. A fehérje termelés fokozódásának mértéke jelentősen különböző lehet, ami összefüggést mutat azzal, hogy a fehérjét kódoló gén promóter régiójában a JUN/AP1 útvonal aktiválódását érzékelő elemek jelen vannak-e vagy sem. A cöruoplazmin 1,5-2-szeres, az α 1-antitripszin, haptoglobin, fibrinogén 2-4-szeres a C1-inhibitor 6-8-szoros, a C-reaktív protein (CRP) és a szérum amyloid A (SAA) szérum szintje 100-1000-szeres növekedést mutat. A negatív AFF-k (albumin, transzferrin, fibronektin) szintje általában 40-60%-kal csökken [57-59].

Az AFR monitorozására legszélesebb körben alkalmazott marker a C-reaktív protein (CRP). Nevét onnan kapta, hogy a *Streptococcus pneumoniae* C poliszacharidjával reagál. Génje az 1. kromoszómán található, a CRP monomer 224 aminosavból épül fel és 25 kDa a tömege. A pentraxinok családjába tartozó molekula pentamer, 5 monomer alkot egy funkcionális egységet (4. ábra) [57,58,60,61]. Az AFR során jelentős szerepe van a különböző mikrobákkal szembeni védekezésben és a gyulladásos sejttermék eltakarításában. Negatív töltésű foszfolipidekhez, polianionokhoz, galaktánokhoz kötődik, és miután ezek a baktériumok, gombák falában, illetve az elpusztult sejtek törmelékében megtalálhatók, ezeket opszonizálja és elősegíti a fagocitózisukat. Képes a komplement rendszer aktiválására, és így a mikrobák lizálására is [60-62]. A CRP szérum szintje jelentősen megemelkedhet az AFR során, különösen különböző infekciók hatására fokozódik a termelődése nagymértékben, de szövetnekrózis (égés vagy trauma), műtéti beavatkozások, autoimmun betegségek és daganatos kórképek is emelhetik a szintjét. A

CRP szérumszintje már enyhe fertőzés hatására is jelentősen emelkedik, és nem korrelál a szervezet válaszütemének súlyosságával, nem alkalmas a túlélés előrejelzésére sepszisben és még több napig emelkedett maradhat a fertőzőes gócs eltávolítása után is [62]. Ez a szérums CRP változás jellegzetes kinetikusával magyarázható: szintje az AFR kezdete után 6-12 órával kezd emelkedni, 48-72 óra múlva éri el a csúcsponitját és akár 1 hétig is emelkedett maradhat [62,63].

A bakteriális fertőzések, különösen a súlyos, komplikációval járó, szisztémás fertőzések (szisztémás gyulladásos válaszütem - SIRS, sepszis, sokszervi elégtelenség) esetében a CRP-nél diagnosztikus szempontból sokkal hatékonyabb AFR a procalcitonin (PCT) [59,62,63]. Ez a molekula a hormonhatású calcitonin fehérje előalakja, amely a pajzsmirigy follikuláris C sejtjeiben termelődik, és a szérums kalcium szint enyhe átmeneti csökkenését okozza. A CALC-I gén a 11. kromoszómán helyezkedik el, egy 116 aminosavból álló pre-PCT-t kódol, ami nagyon gyorsan átalakul a 114 aminosavas PCT-vé (13 kDa), majd proteázok hatására tovább hasad amino-PCT-vé, éretlen (majd érett) calcitoninná és katalcinná (CCP-I) (4. ábra). Érdekes módon az AFR során az extrém mértékű PCT szint emelkedés nem jár a calcitonin koncentráció hasonló mértékű emelkedésével. Ennek az a magyarázata, hogy a súlyos bakteriális fertőzések során a kórokozók által termelt, illetve ezekből felszabaduló biológiaiag aktív anyagok (pl. endotoxin, peptidoglikán, stb.) és az ezek hatására termelődő proinflammátorikus citokinek a különböző parenchymas szervek (máj, pancreas, vese, tüdő, izom, zsírszövet) epithelialis sejtjeiben indukálják a CALC-I gén expresszióját. Ráadásul ezekben a sejtjeiben klasszikus szekréciós vezikulumok híján a PCT ürítés folyamatosan történik és elmarad ennek enzimáikus átalakítása calcitoninná [62,64,65]. Kinetikusát tekintve a PCT szint a CRP-hez képest hamarabb emelkedik (2-4 óra), korábban (12-24 óra múlva) éri el a csúcskoncentrációját, és a féléletideje is rövidebb a szérumban (kb. 24 óra) [62,64,65].

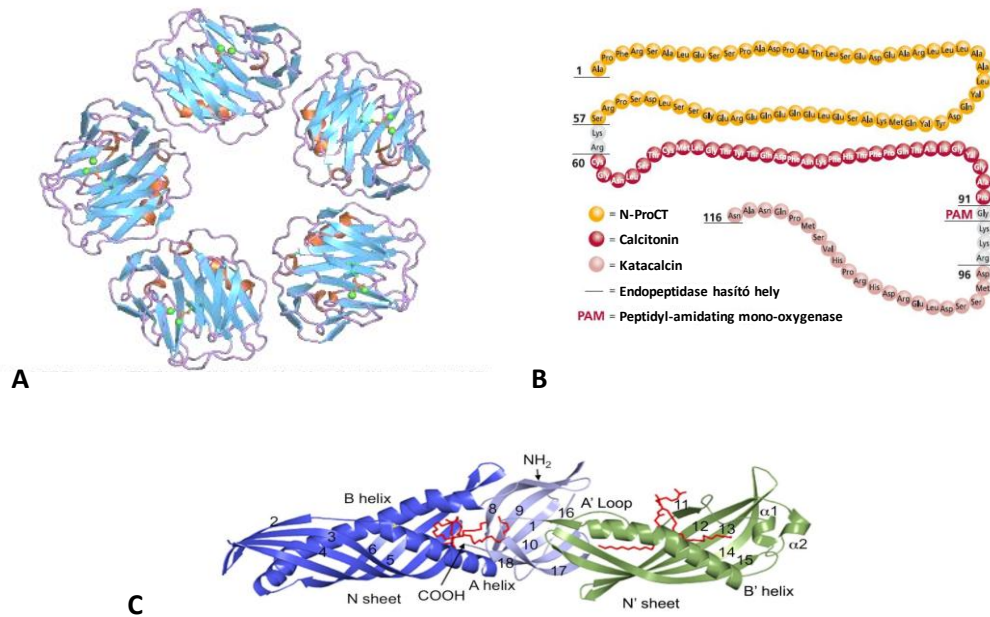
A PCT mérés klinikai szempontból a súlyos, bakteriális fertőzések diagnosztikusában a legjelentősebb. Egészséges felnőttekben a szérums PCT szint $<0,1 \mu\text{g/L}$ és enyhe, lokalizált fertőzések esetében általában nem észlelhető ebben változás. Ha a PCT koncentráció $<0,5 \mu\text{g/L}$ súlyos bakteriális fertőzés és/vagy sepszis kizárható, $2 \mu\text{g/L}$ felett azonban ezen állapotok jelenlétének vagy kialakulásának a valószínűsége nagy. Amennyiben a PCT szint $10 \mu\text{g/L}$ feletti általában már súlyos sepszis és sokszervi elégtelenség van jelen [62]. A PCT szint emelkedése egyértelműen bakteriális fertőzések esetében fokozódik legmarkánsabban, míg vírusos fertőzés esetében csak minimális a változás. (Ez utóbbi esetben az fertőzés hatására fokozódó interferon termelés gátolja a CALC-I gén expresszióját és a PCT termelés mértékét.) Enyhébb emelkedés megfigyelhető még súlyos

trauma vagy égési sérülés esetén különösen akkor, ha ahhoz súlyos keringési elégtelenség is társul [62,64-68].

Az akut fázis fehérjék közé sorolható a korábban részletesen bemutatott sCD14 molekula és az ennek kapcsán említett LPS-kötő fehérje (LBP) is. Az LBP egy 60 kDa-os glükoprotein; génje a 20. kromoszómán található (20q11.23), 15 kódoló exonból épül fel. A fehérje 452 aminosavat tartalmaz, amihez egy 25 reziduumból álló szignál szekvencia csatlakozik (4. ábra) [40,69,70]. Az LBP az ún. PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) fehérje családba tartozik, mely elsősorban lipid transzfer fehérjéket foglal magában (pl. koleszterin-észter transzfer protein és foszfolipid transzfer protein) [69,71-73]. Ennek megfelelően az LBP jellegzetes bumeráng formát mutató molekulájának N-terminális része a Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó LPS kötésére képes. A C-terminális rész pedig a CD14 molekulával történő interakciót mediálja a korábbiakban leírtaknak megfelelően (4. ábra) [70,73-75]. Mindezek alapján az LBP legfontosabb funkciója a vizes közegben aggregált formában lévő LPS molekulák monomerizálása és prezentálása a CD14/TLR4 rendszer felé. Ily módon az LPS mediálta biológiai hatások akár 100-1000-szeresen is felerősödnek; LBP jelenlétében 100-1000-szer kisebb koncentrációban jelenlévő LPS képes ugyanolyan citokin választ indukálni, mint ha LBP nincs jelen [69,76]. Az LBP ugyanakkor mintázat felismerő receptornak is tekinthető, hiszen az LPS mellett egyéb patogén-asszociált molekuláris mintázat felismerésére is képes: lipoproteinek, lipopeptidek, lipoteicholsav, peptidoglikán és glikolipidek [71,77-79]. A rendszer komplexitását jelzi, hogy az LBP magas koncentrációban LPS neutralizáló ágensként is képes működni. Egyrészt az LPS molekulákat az LDL és HDL részecskékbe transzportálja, ahol azok neutralizálódnak, másrészt képes az LPS aggregátumokhoz kötődve elősegíteni azok CD14-mediálta felvételét, ami az endotoxin intracelluláris eliminálását eredményezi. Végül képes alapfunkciójának megfordítására is: a mCD14 vagy sCD14 kötött LPS eltávolítását végzi, ami csökkentheti a sejtaktiváció mértékét [80-82].

Az LBP elsősorban a májban termelődik, és innen kerül be a szisztémás keringésbe; jellegzetes akut fázis fehérje, melynek termelődését az IL-2, IL-6 fokozza, míg a TGF- β csökkenti. Az LBP szérum koncentrációja egészségesekben 5-15 mg/L, de az akut fázis reakció során szintje viszonylag lassan (2-3 nap), de akár 30-50-szeresére is növekedhet [71,83]. Számos olyan kóros klinikai állapot ismert, amelyek jellegzetesen markáns és diagnosztikai szempontból is hasznosítható LBP szint emelkedéssel járnak. Különböző infekciók (meningitis, pneumonia, endocarditis) és különösen azok generalizált formái (SIRS, szepszis) tartoznak ide, és bár az adatok ellentmondóak vannak olyan publikációk, amelyek szerint az LBP emelkedés mértéke a szepszis súlyosságával és a kimenetelével is összefüggést mutat [84-87]. Saját adataink szerint a gyulladásos bélbetegségek (Crohn-

betegség, colitis ulcerosa) esetében az akut klinikai állapot kimutatásában és előrejelzésében is jól használható diagnosztikus és prognosztikus marker lehet az LBP mérése [56]. Újabb adatok szerint az LBP extrahepatikus szövetekben (intestinalis, légutak és a gingiva epithel sejtjei) is termelődhet szignifikáns mennyiségben [88], ami azt jelzi, hogy a folyamatosan mikrobiális stimulusnak kitett helyeken az LBP szerepe jelentős a kórokozókkal szembeni védekezésben és a normális szöveti homeostasis fenntartásában.



4. ábra A vizsgált akut fázis fehérjék szerkezete. Az A ábra mutatja az 5 alegységből álló CRP pentamer felépítését. A B rész a procalcitonin aminosav szekvenciáját és szerkezeti egységeit tünteti fel (sárga: N-terminális PCT, piros: calcitonin, rózsaszín: katalalcin), míg a C ábra az LBP térbeli szerkezetét teszi láthatóvá [70,89,90].

2.4.3. Anti neutrophil citoplazmatikus antitestek

Az anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek (ANCA) az autoantitestek meglehetősen heterogén csoportját jelentik. Normál perifériás granulocytaikat használva szubsztrátként, indirekt immunfluoreszcens módszerek segítségével alapvetően két fajta klasszikus mintázatot különíthetünk el: a citoplazmatikus cANCA-t és a perinukleáris pANCA-t. A cANCA esetében az etanollal fixált granulocytaikon diffúz, granulált citoplazmatikus jelölődést látunk, a sejtmag lebenyei között fokozott pozitivitással, míg a pANCA-k a sejtmag körül mutatnak intenzív pozitivitást, az esetek egy részében enyhe nukleáris festődéssel kombinálva. Ez utóbbi mintázat - érdekes módon - technikai artefactum, mert az alkoholos permeabilizálás során mobilissá váló, erősen pozitív töltésű citoplazmatikus

lokalizációjú molekulák a negatív töltésű sejtmagmembrán közelébe diffundálnak és ahhoz kötődnek. Formalin+acetonos fixálást/permeabilizálást alkalmazva a keresztkötött fehérjék a helyükön maradnak, és ilyenkor citoplazmatikus lokalizációjú pozitivitást látunk a pANCA esetében is, a cANCA-hoz hasonlóan. Jól ismert ennek a két fajta antitestnek az antigénspecifitása is; a kísér vasculitises betegeknél a cANCA esetében a proteinase-3 a pANCA esetében a mieloperoxidáz a leggyakrabban felismert antigén, melyek egyedi ELISA-k segítségével is mérhetőek. További ritkább antigének is ismertek, melyek erősen pozitív töltésű neutrophil citoplazmatikus proteinek: katepszin G, elasztáz, baktericid permeabilitást fokozó fehérje (BPI), laktoferrin, stb. [91-98].

Klinikai szempontból ezek a klasszikus ANCA-k a kisereket érintő vasculitisek diagnosztikájában és monitorozásában jelentősek. Ebbe a csoportba a granulomatosis polyangiitis (GPA; Wegener-granulomatosis), a mikroszkópikus polyangiitis (MP) és az eosinophilias granulomatosis polyangiitis (EGPA; Churg-Strauss szindróma) tartozik, illetve ezek egy-egy szervre (vese, tüdő) lokalizálódó limitált variánsai. Bár a cANCA elsősorban GPA-ban fordul elő, míg a pANCA inkább az MPA-t és EGPA-t jellemzi, de alapvetően az ANCA mintázatok és antigén-specifitása nem segíti a felsorolt 3 forma közötti differenciálást. Ugyanakkor az indirekt immunfluoreszcens detektálás és az MPO+PR3 ELISA-k kombinált alkalmazása közel 99% specificitás mellett kb. 85%-os szenzitivitással képes ezeknek a kórképeknek az azonosítására, a hasonló klinikai tünetekkel járó, de nem vasculitis alapú betegségekkel összevetve [92,93,97-101].

A vasculitiseken kívül számos egyéb klinikailag kóros állapotban (pl. gyulladásos bélbetegségek, rheumatoid arthritis, krónikus autoimmun májbetegség és különböző fertőzések) is megjelennek ilyen antitestek. Az ANCA-pozitivitás gyakorisága 50-90% colitis ulcerosaban, 10-30% Crohn betegségben, 40-95% I-es típusú autoimmun hepatitisben, 25-90% primer sclerosáló cholangitisben, 0-25% primer biliaris cirrhosisban, kb. 30% rheumatoid arthritisben és 10-20% SLE-ben. Ezekben az esetekben azonban a festődési mintázat és az antigén-specifitása jelentősen eltér a klasszikus c- és pANCA-tól. Ezt az ANCA csoportot atípusos pANCA-nak nevezzük, bár az irodalomban többféle elnevezésük is ismert (pl. x-ANCA, pANNA vagy DNA-ANCA). Ezen autoantitestek többféle, kevésbé ismert antigénhez kötődnek, amelyek sejtmag eredetűek vagy sejtmag-asszociált citoplazmatikus proteinek. Az esetek egy részében az etanol fixált granulocytákon perinucleáris mintázat látható, elvélve erősebb nukleáris foltokkal is, ami formalin fixált sejteken is változatlan marad, jelezve az autoantigén valós nukleáris/perinukleáris lokalizációját. Más betegeknél kombinált citoplazmatikus/perinukleáris mintázat látható, ami többféle autoantigént felismerő ANCA-k egyidejű jelenlétére utal. Az atípusos pANCA-k esetében különösen jelentős az

anti-nukleáris antitestek jelenlétének egyidejű vizsgálata (pl. HEp2 sejteken), ami álpozitív ANCA reakciót adhat indirekt immunfluoreszcens technika alkalmazása mellett. Az atípusos ANCA-k klinikai jelentősége még kevésbé ismert, de hasonlóan a vasculitises esetekhez, az antitest jelenléte súlyosabb betegség lefolyással társulhat [93-98,102-106].

Az ANCA-k keletkezésével kapcsolatban többféle teória is létezik. Jól ismert, hogy a fertőzések, gyulladásos reakció során létrejöhetnek ilyen antitestek. A lokális gyulladást kísérő neutrophil granulocytá degradáció olyan mértékű lehet, hogy a sejttermelékeltávolító funkció kapacitását meghaladja. Ilyen esetben a szövetekben hosszasan jelenlévő citoplazmatikus, granulocytá-eredetű fehérjék autoimmun reakciót indukálhatnak, ami az egészségesekben is megtalálható természetes ANCA-k mellett nagy koncentrációjú, nagy affinitású, megváltozott epitópspecifitású és funkcionálisan is aktív patológiás ANCA-k megjelenését eredményezi. Ezt a folyamatot segítheti elő a neutrophil extracelluláris "csapdák" (neutrophil extracellular trap, NET) keletkezése is. Az extracelluláris mátrixhoz kötődő hálózatos struktúráról van szó, ami a neutrophilek degradációja során jön létre, nagy mennyiségben tartalmaz kromatin elemeket, hiszton komponenseket és citoplazmatikus fehérjéket, így PR3-at és MPO-t is. Ezek a struktúrák elősegítik a neutrophil eredetű autoantigének bemutatását az immunrendszernek [107-112]. Egy másik lehetséges mechanizmus az infekciót okozó kórokozók és a szervezet saját fehérjéi közötti keresztreakció. A tartós infekció tehát, molekuláris mimikri révén is indukálhatja az ANCA-k keletkezését; a LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2)-specifikus ANCA pl. keresztreakál bizonyos baktériumok adhézíós fimbrium fehérjéjével a FimH-val. Ennek megfelelően egérkísérletekben a FimH-val való immunizáció hatására az állatokban anti-LAMP2 ANCA képződik [113-115]. Ennek a jelenségnek a változata lehet olyan bakteriális fehérjék felszabadulása, amelyek az MPO-hoz vagy a PR3-hoz képesek kötődni, ezen fehérjék komplementer epitópjaival rendelkeznek, és így képesek ezeket neutralizálni. Ugyanakkor az ezen bakteriális epitópok ellen termelődött protektív antitestek anti-idiotípus antitestjei már az MPO és PR3 felismerésére képes ANCA-k lehetnek [105,108,113,116-118]. Az ANCA-pozitivitással járó gastrointestinális kórképekben egy további lehetőség, hogy az ANCA keletkezése nem egy manifest infekció, hanem a béltraktusban normálisan is jelenlévő mikroorganizmusok elleni kóros immunreakció következménye [119-121]. A bélbaktériumok és az ANCA kapcsolatát állatmodellek is alátámasztják; nem mutathatók ki ANCA-k csíramentes környezetben tartott állatokban [122]. Az ANCA termelő B-sejtek aktiválásában a toll-like receptorok fokozott expressziójának is szerepe lehet. Ezek a különböző kórokozók speciális virulencia faktorait ismerik fel és celluláris aktivációt, illetve fokozott citokin termelést indukálnak a TLR pozitív macrophag/dendritikus sejtekben, ami szerepet játszhat a B-sejt aktiváció

folyamatában [123,124]. Az ANCA termelését immunregulatórikus folyamatok is szabályozhatják: a szupresszor funkciójú T_{reg} , illetve $CD5^{++}$ IL-10-termelő B sejtek aránya csökkent az ANCA mediálta kórkép aktív fázisában [125,126].

A májbetegségek végstádiumát jelentő cirrhosis esetében is jól ismert a baktérium ellenes antitestek megjelenése elsősorban előrehaladott cirrhosisban és portális hipertensio esetében [127]. A cirrhosis betegek immunreaktivitása jelentősen csökken a betegség előrehaladásával, ráadásul a betegséghez társuló fokozott bélfal permeabilitás elősegíti a bélbaktériumok lokális és szisztémás transzlokációját is. Ez a folyamat, a bakteriális transzlokáció, jelentősen befolyásolja a betegség klinikai lefolyását és emellett alapja lehet a különböző baktériumok ellen kialakult antitestek keletkezésének [128-131]. Feltételezve a korábban említett bakteriális mimikri mechanizmusát valószínűsíthető az ANCA-k megjelenése a cirrhosis betegek esetében is.

2.4.4. Tumormarkerek

2.4.4.1. A szérum tumormarkerek definíciója és csoportosítása

A tumormarkerek a tumor által vagy a tumorra válaszul a szervezet által termelt anyagok. Tágabb értelemben véve olyan molekulák, melyek mennyiségi és/vagy minőségi változásai összefüggésbe hozhatók daganatmegelőző állapotokkal vagy a már kifejlődött tumoros megbetegedéssel. Legfontosabb típusaik: enzimek/izoenzimek, hormonok, onkofötális antigének, mucinszerű glikoproteinek, vércsoport antigének, cytokeratinok. Kimutatásuk történhet kvalitatív/kvantitatív kémiai, immunológiai, molekuláris biológiai és proteomikai módszerekkel [5,132].

2.4.4.2. Enzimek

A rutin diagnosztikában alkalmazott enzimek egy része (laktát dehidrogenáz, alkalikus foszfataáz, kreatin kináz), pontosabban ezek bizonyos izoenzimjei és izoformái tumormarkerként szolgálhatnak, és összefüggést mutathatnak bizonyos daganatos állapotokkal [5,133-136]. Sokkal specifikusabb és szenzitívebb ugyanakkor ezeknél a neuron specifikus enoláz (NSE) és a prostata specifikus antigén (PSA) mérése.

Az NSE egy glikolízisben résztvevő enzim (foszfopiruvát hidroláz) γ alegysége. Dominálón az idegrendszer szöveteiben, illetve a neuroendokrin rendszer sejteiben található meg. A szérumba vagy a liquorba ezen sejtek sérülése vagy pusztulása során kerülhet be. Az NSE - szöveti lokalizációjának megfelelően - az idegrendszer, illetve a neuroendokrin szövetek daganataival (kissejtes tüdőrák, neuroblastoma,

pheochromocytoma, carcinoid tumor, pajzsmirigy medulláris carcinomája, melanoma, pancreas endokrin tumorai) mutat összefüggést. A kissejtes tüdőrák esetében a klinikai szenzitivitás kb. 80%, míg a specificitás 80-90% között van. Ebben a kórképben az NSE szérumszintje összefüggést mutat a daganat stádiumával, és prognosztikai markerként is használható. Alkalmas lehet a terápia monitorozására is. Gyermekkori neuroblastoma esetében az esetek akár 90%-ában is mérhetünk emelkedett NSE értéket, és ez egyben prognosztikai marker is [5,136,137].

A PSA alkalmazása talán még szélesebb körben elterjedt. Ez egy 33-36 kDa-os, 237 aminosavból álló glikoprotein. Alapvetően egy szerin proteáz, melyet a prostata acinus és ductalis epitheliális sejtei termelnek és választanak ki az ondóba. Biokémiai funkciója: az ondó elfolyósodását segíti elő, annak alvadását követően (hasítja az ondóhólyag által termelt gélképző fehérjéket – szemenogelin I-II, fibronectin). Normálisan rendkívül kis mennyiségben található meg a szérumban (0-4 µg/L, felezési ideje 1-4 nap), részben szabad (10-30%), részben α1-antikimotripsinnel (65-85%) ill. α2-makroglobulinnal (5%) alkotott komplex formájában. Szérumszintje fiziológiás variabilitást mutat: életkorral nő, az afroamerikaiakban magasabb, és tavasszal is emelkedettebb az értéke. Emelkedett szérumszint koncentráció észlelhető prostatitisben, benignus prostata hyperplasiában (BPH-ban), prostata infarctusban és prostata carcinomában. Alapvetően tehát, szövetspecifikus, de nem betegségspecifikus marker [138-143].

A totál PSA mérést - a klinikai szenzitivitás és specificitás fokozása végett - kiegészíthetjük további meghatározásokkal. A tPSA/prostata térfogat arány kalkulálása vagy a sorozat tPSA mérések értékelése nem terjedt el széles körben, viszont az életkor specifikus referencia tartomány használata igen. A másik hasznos kiegészítő megoldás a szabad/totál PSA arány meghatározása különösen a 4-10 µg/L tPSA értékek közötti „szürke zóna”-ban. A prostata carcinomája esetében a szabad PSA aránya csökkent. Egy még újabb marker a PSA fehérje részleges hasítása során keletkező p2PSA molekula. Ezeket a teszteket olvasztja egybe egy új paraméter a „Prostate health index” (PHI), ami a totál (tPSA), a szabad (fPSA) és a p2PSA szérumszintjét alkalmazza, és elősegíti a prostata tumoros, benignus prostata hyperplasias vagy krónikus prostatitis betegek megkülönböztetését, különösen az említett, diagnosztikailag nem egyértelmű "szürke zóna"-ban. Az eddigi klinikai adatok alapján a PHI alkalmazása csökkentheti a fölösleges prostata biopsziák számát, de klinikai alkalmazhatóságának pontos megítélése további vizsgálatokat igényel [144-151].

2.4.4.3. *Hormonok*

Az endokrin szervek tumorai és az egyéb szervekben lévő neuroendokrin szöveteiből kiinduló daganatok jellegzetes hormontermelése is segítheti a tumor diagnosztikát. Az ektópiásan termelt hormonok közül leggyakrabban az ACTH, ADH, βHCG és Calcitonin termelése fordul elő [5,132,152,153].

2.4.4.4. *Onkofetális antigének*

Ezek a molekulák a magzati korban termelődnek nagy mennyiségben és a születés után szérumban koncentrációjuk rendkívüli módon lecsökken. Különböző daganatok esetében azonban újra magas koncentrációban jelennek meg a keringésben.

Az alfa-fetoprotein (AFP) egy 70 kDa-os glikoprotein, mely a terhességet kivéve minimális koncentrációban van jelen a felnőttek szérumban. Emelkedett AFP mérhető hepatocelluláris carcinomában, de kisebb mértékű emelkedés a máj benignus megbetegedéseiben is előfordul. Ez a marker alkalmazható az erre a daganatra fokozott kockázatot mutató egyének szűrésére, prognosztikai értéke is van, sőt a betegek követésére is használható. A másik klinikai alkalmazás a - βHCG-vel együtt - a csírasejtes tumorok szubklasszifikációja, illetve a betegség követése [5,154-158].

A carcinoembrionális antigén (CEA) 150-300 kDa-os glikoprotein, mely az immunglobulin szupercsalád tagja. Összesen 7 immunglobulin domén építi fel: az N terminális IgV-szerű, míg a 6 C-terminális IgC2-szerű domén. Ez utóbbiak alternálónan A és B típusúak. A fehérjének van egy 34 aminosavból álló leader szekvenciája is, és a citoplazma membránba egy GPI farok segítségével rögzül (5. ábra). A CEA szérumban koncentrációja számos daganatos betegség esetén emelkedik. A colorectalis tumorok 70%-ában, a gyomor tumorok 50%-ában, a tüdőtumorkok 45%-ában, az emlő tumorok 40%-ában, a pancreas daganatainak 55%-ában, ovárium tumorok esetén 25%-ban, míg a méh daganatainak 40%-ában lehet pozitív. A tumorok szűrésére nem, de betegség követésére, stádium becslésre használható és egyben prognosztikai marker is lehet [5,132,159-163].

2.4.4.5. *Mucinszerű glikoproteinek és vércsoport antigének*

Ezek a molekulák a tumorsejtek felszínéről válnak le vagy a tumor aktívan szekretálja őket. Azonosításuk újonnan fejlesztett monoklonális ellenanyagok segítségével történt, és tumor-specifikusabbnak tűnnek, mint a klasszikus tumormarkerek (enzimek és hormonok). Kémiai tulajdonságaikat illetően alapvetően nagy molekulatömegű mucinok vagy vércsoport antigének [5].

A CA 15-3 egy nagyméretű mucin, mely az emlőtumoros betegek vérében emelkedik meg jelentősen, ugyanakkor a tüdő, pancreas, vastagbél, ovárium és máj - elsősorban mucinózus - daganataiban is számottevő pozitivitás észlelhető. Elsősorban az emlőtumoros betegek követésére és a terápia hatékonyságának megítélésére alkalmazzuk [5,164,165].

A CA 125 egy nagyméretű glikoprotein, melynek N-terminális része erősen glikozilált. A C és N terminális rész között egy kb. 60 ismétlődő egységből álló "tandem repeat" domén található. Minden doménban 2 cisztein helyezkedik el, amelyik intramolekuláris és intermolekuláris kötések kialakítására képes. Míg az előbbiek a fehérjén belüli hurkok kialakítását segítik elő, addig az utóbbiak az extracelluláris mátrix felépítésében lehetnek jelentősek. A C-terminális domén rövidebb, ebben található a transzmembrán és az intracelluláris rész, valamint a SEA domének között egy potenciális hasítóhely (5. ábra) [166]. A CA 125-öt elsősorban a petefészek carcinoma diagnosztikájában használjuk. Alkalmas lehet fokozott kockázatú rizikó csoportok szűrésére - képalkotó technikákkal együtt -, emellett összefüggést mutat a betegség előrehaladottságával és a petefészek tumor követésében is használható. Emelkedett CA 125 mérhető még endometrium carcinomában és különböző típusú tüdőtumorkokban is (nem kissejtes tüdőrák) [5,167-172].

A CA 19-9 a Lewis vércsoport antigénjei közé tartozik, egy specifikusan szialilált glikolipid, melyet normálisan a pancreas és az epeutak sejtei, valamint a gyomor, a belek, az endometrium és a nyálmirigyek epithel sejtei szintetizálnak. Leginkább a pancreas daganatok diagnosztikáját szolgálja, de emelkedett szérumszint mérhető hepatobiliaris, hepatocellularis, colorectalis, gyomor és emlő tumorok esetében is. A pancreas daganatai esetében összefüggés mutatható ki a tumor kiterjedtségével, és a betegség követésére is alkalmas [5,173,174, 162,163].

A CA 72-4 a gastrointestinális traktus és a petefészek daganatainak jól használható markere. Emellett a tüdőtumorkok egy részében is emelkedett lehet. Alkalmas a betegség követésére a terápia során [5,163,175].

2.4.4.6. Citokeratinok

A citokeratinok az epithelialis sejtekben lévő cytoskeleton felépítésében résztvevő intermediér filamentumok fő komponensei. Ennek a családnak összesen kb. 20 fehérje a tagja, melyek nemcsak daganatos sejtekből, hanem a normális epithel sejtek turn-overe során is felszabadulhatnak [5,176,177].

A klinikai gyakorlatban is használt egyik marker a szöveti polipeptid antigén (TPA), melynek detektálására alkalmazott antitestek a 8, 18 és 19-es citokeratin molekulákat ismerik fel. Alapvetően ez nem tumorspecifikus paraméter, hanem egy proliferációs

marker, mely szinte bármely daganat esetében használható, de fokozott proliferációval járó benignus állapotokban is emelkedett lehet [176-179].

A Cyfra 21-1 markert detektáló antitestek a 19-es citokeratint ismerik fel. Tüdőtumor esetében jelentősen emelkedik a szérum koncentrációja, különösen a nem kissejtes daganatok esetében. Szintje a betegség előrehaladottságával is összefüggést mutat, és alkalmas a daganat lefolyásának monitorozására is [176,177,180,181].

2.4.4.7. Egy újabb tumormarker - human epididymis protein 4 (HE4)

A HE4 egy 20-25 kDa-os glikozilált fehérje, amely a "whey acidic protein" (WAP) család tagja. Nagyon jellegzetes szerkezeti eleme ezeknek a molekuláknak a 4 db konzervatív diszulfid hidat tartalmazó "whey four disulphide core" (WFDC) domén. A HE4 vagy másképpen WFDC2, két ilyen elemet tartalmaz, és emellett szignál peptiddel is bír (5. ábra). Funkciójukat tekintve a WAP fehérjéknek antiinflammatorikus hatása van, egyrészt proteáz inhibitor tulajdonságuk, másrészt antibakteriális-antifungális hatásuk révén [182].

A HE4-et fiziológias körülmények között, kis mennyiségben a disztális epididymis, valamint a tüdő epithelialis sejtjei termelik, ugyanakkor különböző mértékben emelkedett HE4-szérumszintek mérhetők a petefészek carcinoma I-IV. stádiumaiban. Emellett más tumorokban is emelkedett lehet a szintje (emlő, endometrium, gastrointestinalis traktus, tüdő daganatai, illetve egyéb benignus betegségek). A klinikai vizsgálatok szerint jelenleg a HE4 tekinthető a legszenzitívebb petefészekrák biomarkernek. A betegség esetleges relapszusát is sokkal hamarabb jelzi, valamint a nem tumoros betegségekben is szignifikánsan alacsonyabb mértékben mutat fals pozitivitást, mint a CA 125. Ugyanakkor ez a tumormarker sem alkalmas a betegség előzetes - populáció szintű - szűrésére [5,183-185].

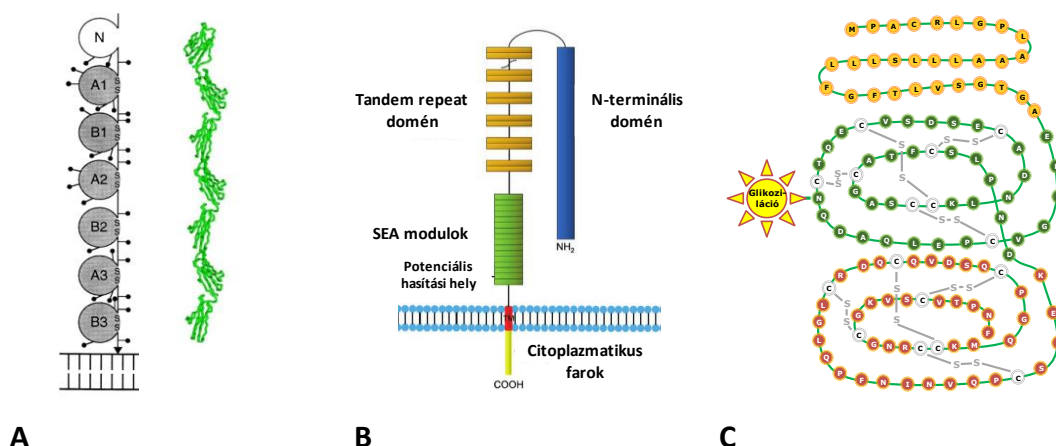
A CA 125 és HE4 együttes alkalmazása tovább fokozhatja, az amúgy önállóan is értékes markerek diszkriminatív erejét. A CA 125 és a HE4 szérumszintjeinek együttes meghatározása után az ún. ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) score kalkulálása történik meg. A score értékét az alábbi képlet segítségével határozzuk meg, ahol a PI (predictive index) premenopausában:

$$PI = -12,0 + 2,38 \times \ln[HE4] + 0,0626 \times \ln[CA\ 125] \quad (\ln = \text{természetes logaritmus})$$

valamint postmenopausában:

$$PI = -8,09 + 1,04 \times \ln[HE4] + 0,732 \times \ln[CA\ 125]$$

A nemzetközi irodalom szerint a ROMA score a petefészek carcinoma kialakulásának kockázatát nagy szenzitivitással képes jelezni pre- és postmenopausában is [185].



5. ábra A legfontosabb vizsgált tumormarkerek szerkezete. Az ábra A része a CEA doménszerkezetét és háromdimenziós struktúráját tünteti fel. A CA 125 térbeli szerkezete rendkívül nagy mérete miatt pontosan nem ismert, ezért ennek főbb szerkezeti egységei láthatóak sematikusán a B ábrán. Az ábra C részén a HE4 sematikus rajza látható a 2 WFDC domént létrehozó 4-4 diszulfid hídgal és egy glikozilációs hellyel. [166,186-188]

2.4.4.8. A szérum tumormarkerek gyakorlati alkalmazásai, nemzetközi guideline-ok

A különböző szérum tumormarkerek alkalmazásával foglalkozó publikációk több évtizede fellelhetők a nemzetközi irodalomban, és nagyon sok vizsgálat foglalkozott ezeknek a teszteknek a diagnosztikus jelentőségével. A nagyszámú közlemény tanulságait a különböző nemzetközi társaságok guideline-jai foglalják össze. A laboratóriumi medicina területén az egyik legjelentősebb guideline gyűjteménnyel az American Association of Clinical Chemistry társaság National Academy of Clinical Biochemistry szervezete rendelkezik, és több tumor esetében is fogalmaztak meg ajánlásokat a tumormarkerek használatával kapcsolatban. Ezekben az anyagokban is jól látható, hogy sajnálatos módon, az irodalmi adatok egy jó része nem kellően evidencia alapú, és emiatt nem használható fel a különböző irányelvek készítésekor. Bár az NACB aktuális anyagai minden tumortípusban számos klasszikus és új biomarkert sorolnak fel, azonban a tumormarkerek szigorú, evidencia alapú értékelése esetén a valóban használható szérum markerek és ezek megalapozott klinikai alkalmazásainak száma meglehetősen limitált. Az NACB anyagok nagy előnye, hogy számos hasonló irányelv javaslatával vetik össze saját értékelésüket [189,190]. Az egyes tudományos társaságok által készített irányelvek nagy hátránya, ugyanakkor, hogy a javaslatok elkészítése majd megvitatása és a végső álláspont megfogalmazása hosszú időt (nemritkán éveket) vehet igénybe. Ebből a szempontból kivételes a National Comprehensive Cancer Network (NCCN), amelyik évente akár két-

három alkalommal is frissíti javaslatait. Emiatt az NCCN aktuális guideline-jait tekintettük át részletesebben, és az abban megfogalmazott legfontosabb ajánlásokat foglaltuk össze.

A vizsgált 34 dokumentumból 13 esetében még említésre sem kerülnek szérumszűrő tumormarkerek (emlő, tüdő és vastagbél tumor szűrése; gyomor-, méhnyak-, vese-, fejnyak-, penis-, anus-, húgyhólyag-, bőr laphám- és nem kissejtes tüdő tumor, valamint a lágyszöveti sarcomák).

Az emlő tumor követése során - különösen a metasztatikus esetekben - felmerül a szérumszűrő CEA és a CA 15-3 alkalmazása, de az ajánlás nem egyértelmű, illetve inkább negatív [191]. Az ovárium epithelialis daganatai esetében a CA 125 szérumszűrő marker használatát javasolja a guideline. Amennyiben a daganat diagnosztizálásakor emelkedett a CA 125 érték, ennek mérése a beteg követése során célszerű. Ismeretlen kismetastasis terime esetében a klinikai kép függvényében jelentősége lehet a szérumszűrő tumormarker méréseknek (CA 125, AFP, inhibin, β HCG) bizonyos ritkább ovárium daganatok azonosításában (pl. csírasejtes tumorok). Ugyanakkor a szakértői csoport nem javasolta a CA 125 és HE4 mérést, illetve a ROMA score meghatározását a kismetastasis terime malignitásának megállapítására [192]. Az emlő és ovárium tumor kialakulására fokozott kockázattal bíró - hajlamosító mutációt hordozó - személyek esetében is felmerül a szérumszűrő CA 125 mérés, mint a korai daganatkialakulás szűrőtesztje. Az NCCN guideline nem javasolja ennek rutinszerű alkalmazását, illetve az adott egyén kezelőorvosára bízva a döntést [193]. Az uterus daganatai esetében is lehet jelentősége a CA 125 mérésének, különösen ha kismetastasis extracervicis manifesztáció (is) felmerül. Mind az endometrium carcinoma, mind a szerózus vagy világossejtes adenocarcinoma és a carcinosarcoma esetében javasolt a szérumszűrő CA 125 mérése a klinikai válasz monitorozása során [194].

A vastagbél daganatai esetében egyértelmű a helyzet. A szérumszűrő CEA szint mérése javasolt a diagnózis megállapításakor - kiindulási érték -, majd a CEA meghatározás használandó a betegek követése során [195]. A nyelöcső és a nyelöcső-gyomor átmenet daganatai esetében említésre kerül a CEA, de az alkalmazásának lehetőségei bizonytalanok [196]. Ezzel szemben a rectum tumorok esetében a CEA alkalmazása megegyezik a colon daganatainál leírtakkal (kiindulási szérumszűrő érték mérése diagnóziskor majd monitorozás) [197]. A máj hepatocelluláris carcinomája esetében az AFP - az NCCN szakértői bizottságának véleménye alapján - hasznos lehet a hasi ultrahang kiegészítéseként a fokozott rizikója csoportok (különböző etiológiájú cirrhosis betegek, illetve hepatitis B pozitív egyének cirrhosis nélkül is) szűrésére. Emellett az AFP használatát a betegség követése során javasolják. Az epehólyag- és a cholangio-carcinoma esetében a CEA és a CA 19-9 mérése mérlegelhető a kivizsgálás elején [198]. A pancreas adenocarcinomájának esetében az ajánlás a CA 19-9 mérést javasolja a terápia megkezdése előtt (alapérték) és

aztán rendszeresen a beteg követése során. A kiindulási CA 19-9 értéknek prediktív és prognosztikai jelentősége is lehet [199].

A központi idegrendszer daganatai közül a primer lymphomák esetében a liquor mintából igazolt immunglobulin monoklonalitás (fehérje vagy génátrendeződés szinten) segítheti a diagnózis kimondását, egyéb CNS daganatok esetében azonban a klasszikus szérumban tumormarkerek alkalmazásának nincs jelentősége [200]. A neuroendokrin tumorok esetében a daganat által termelt specifikus anyag (inzulin, gastrin, stb.) kimutatása elősegíti a diagnózis megállapítását és alkalmas lehet a betegség követésére is. Egy általánosabb marker, a chromogranin A is felhasználható a betegség lefolyásának monitorozása során, illetve prognosztikai jelentősége is lehet [201].

A bőr melanoma esetében - érdekes módon - egy régi ismerős, a laktát dehidrogenáz (LDH) szerepel a guideline-ban. A IV. stádiumú tumor esetében a szérumban LDH mérésének prognosztikai jelentősége van, és a stádium beosztás megállapításakor is figyelembe veszik, az "M" (metastasis) alkategóriák definiálása során [202]. A szérumban LDH és alkalikus foszfatáz mérésének jelentősége lehet az osteosarcoma esetében is, melyek prognosztikai faktorként szolgálnak, illetve alkalmazhatóak a betegség követése során [203]. A harmadik daganat, ahol a szérumban LDH mérésének jelentősége van a kissejtes tüdőrák, és ebben az esetben is prognosztikai faktorként szolgál. Ebben a tumorban egyéb szérumban tumormarker alkalmazása nem merül fel [204].

A pajzsmirigy medulláris carcinomája esetében a szérumban calcitonin és CEA mérésének van jelentősége. A diagnózis megállapításakor majd a beteg követése során is javasolt ezek sorozatos mérése, és a tesztek eredménye jelentősen befolyásolja a beteg ellátásának menetét. Ezenkívül ezeknek a markereknek prognosztikai jelentősége is van. A familiáris esetekben a RET mutációt hordozó, de profilaktikus thyreoidectomiára nem kerülő, egészséges családtagok esetében az ismétlődő calcitonin mérések alkalmasak lehetnek a betegség kialakulásának korai jelzésére. A papilláris, follicularis és Hürtle sejtes carcinoma esetében a szérumban tireoglobulin koncentráció mérése javasolt - TSH stimulálással vagy anélkül - a beteg követése során, és az anti-tireoglobulin antitestek kimutatása, ami zavarhatja a tireoglobulin meghatározást [205].

A prostata tumor esetében laboratóriumi szűrőtesztek is rendelkezésünkre állnak. A guideline a klinikai panaszok és tünetek, életkor, rassz és a családi anamnézis ismeretében az átlagos rizikójú férfiak esetében 45 és 75 év között javasolja a szűrés végzését, totál PSA és digitális rektális vizsgálat alkalmazásával. Amennyiben a tPSA <1 µg/L akkor 2-4 évente, 1-3 µg/L között 1-2 évente javasolt a vizsgálat ismétlése. Ha a tPSA nagyobb, mint 3 µg/L javasolt a prostata biopszia végzése. Bizonytalan esetekben kiegészítésként a szabad/totál PSA arány, a Prostate Health Index (PHI) vagy a PCA3 meghatározás

segítheti a döntést. Amennyiben az ismételt biopszia sem igazol egyértelműen prostata carcinomát javasolt az egyének követése 6-12 havonta végzett tPSA mérés és DRV segítségével. 75 éves kor felett csak klinikailag indokolt esetben javasolt a tPSA szűrés, akiknél a várható életkilátás meghaladja a minimum 5 évet [206]. A szűrés mellett a tPSA mérésnek szerepe van a prostata tumor diagnózisának megállapításában és a rizikó csoportokba való besorolásban. A betegek követése során is javasolt a tPSA mérése az alkalmazott terápia és a kiújulás valószínűségének függvényében 3, 6 vagy 12 havonta [207].

A here csírasejtes tumorainak diagnosztikájában meghatározó szerepe van a szérum tumormarkerek közül az AFP, β HCG és LDH mérésének. Már a diagnózis megállapításakor fontos ezek mérése, majd a hereeltávolítást követően ismételt meghatározást kell végezni, ugyanis a tumor stádiumának megállapításához ez utóbbi értékeket használjuk fel. A szérum tumormarkereknek prognosztikai jelentősége is van a csírasejtes tumorok esetében, és a betegség követése során is javasolt mérésük a stádiumtól és a követési idő hosszától függően 2, 3, 6 vagy 12 havonta. A három marker közül az AFP-nek differenciál diagnosztikai jelentősége is van, mert a nem-seminoma típusú tumorok esetében szinte mindig emelkedett a szérumszintje, míg a seminomák esetében, pedig szinte sohasem [208]

Az ismeretlen eredetű, szekunder daganatok esetében a feltételezett primer lokalizációnak megfelelően néhány szérum tumormarker mérése is része lehet a kivizsgálásnak. A korábbiak alapján a csírasejtes tumor gyanúja esetén AFP és β HCG, a prostata carcinoma esetében PSA, kismencedei nőgyógyászati tumorok esetében CA 125, a pancreas és epeutak tumorainak esetében CA 19-9, és a máj daganat gyanújakor AFP meghatározása javasolt. Amennyiben neuroendokrin tumor jelenléte merült fel a megfelelő hormon mérés végezhető el a primer tumor lokalizációjának megállapítására [209].

2.4.5. A csontanyagcsere markerei

A csontanyagcsere változásainak követésében és a csontbetegségek diagnosztikájában számos laboratóriumi paraméter használható. Ezek közé sorolhatók a szérum kalcium (totál és ionizált), foszfát, totál alkalikus foszfatáz, albumin, totál protein, immunglobulinok, kreatinin és glomerulus filtrációs ráta (GFR; vesefunkció) mérése, valamint a pajzsmirigy (TSH, fT3, fT4) a gonádok (tesztoszteron, ösztrogén) és a mellékvesekéreg (glükokortikoszteroidok) funkciójának vizsgálata [210]. A kalcium háztartást és csontanyagcserét meghatározó két hormonhatású anyag – a parathormon és a D-vitamin – mérése esszenciális. Végül egyre bővül azoknak a markereknek is a köre,

amelyeket szérumból vagy vizeletből tudunk kimutatni, és a csont felépülést vagy lebontást kísérő biokémiai folyamatok során termelődnek, így ezeknek jól használható markerei lehetnek [210,211].

2.4.5.1. A csontfelépülés markerei

Az alkalikus foszfatáz enzimnek 4 különböző izoenzimje található meg a vérben (intestinalis, placentalis, csírasejtes és a nem-specifikus forma). Ezen utóbbi gén kódolja az enzim szövetspecifikus izoformáit, és ez található meg az osteoblastokban is, ami a csontspecifikus alkalikus foszfatáz (BALP) szintéziséért felelős. Ezen izoforma szintje a gyermekkorban, illetve pubertás alatt jelentősen emelkedett értéket mutat. A BALP termelődése egyértelműen korrelál a csont felépülés mértékével. Kimutatása a szérumban lévő izoenzim és izoformák jelenléte miatt nem egyszerű, és ez különösen májbetegségek esetében lehet zavaró [211-213].

Az osteocalcin (OSC) a kollagén után az egyik legnagyobb arányban jelen lévő fehérje a csontban. Ez egy kisméretű molekula, melynek a D-vitamin fokozza a szintézisét, és jellegzetes poszttranszlációs módosításon esik át. K-vitamin függő módon a molekula 3 szabad glutaminsav reziduuma gamma-karboxi glutamáttá alakul át, és ez teszi lehetővé az OSC kötődését a hidroxapatithoz, ami a csontmátrix mineralizációját segíti elő. Az OSC félélettideje nagyon rövid a keringésben, gyorsan degradálódik, így az intakt forma mellett a vérben egy nagyobb (N-terminalis+középső régió) és egy kisebb (C-terminális rész) OSC fragmens is található. Az OSC és metabolitjai a máj és a vese közvetítésével eliminálódnak a keringésből, így a vesefunkció beszűkülése OSC emelkedést eredményez. Az OSC mérését számos preanalitikai faktor is befolyásolja. A molekula rendkívül instabil, ezért a levett mintát azonnal jégbe kell tenni, és minél hamarabb szeparálni kell a sejtes elemektől, majd -20°C-on vagy -70°C-on kell tárolni. Ráadásul analitikai szempontból is problémás az OSC mérés, hiszen többféle degradációs termék is keletkezik a bomlása során, és a különböző assay-k ezeket különböző mértékben mérik. Mindezek alapján, bár az OSC egy értékes markere a csontformációnak a felsorolt preanalitikai és analitikai problémák miatt alkalmazása a klinikai gyakorlatban meglehetősen nehézkes [214-216].

Az N-terminális prokollagén propeptidnek (PINP) négy formája található meg a vérben: az intakt vagy trimer molekula, a dimer és a monomer variáns, valamint ezek degradációs termékei. A nagyobb méretű PINP molekulák a RES közvetítésével hagyják el a keringést, míg a monomer variáns és a degradációs termékek a vesén keresztül, így ezek szintjét befolyásolja a vese funkció beszűkülése. A PINP mérése preanalitikai szempontból

előnyös: minimális a diurnális és intra-individuális variabilitás és a PINP szobahőmérsékleten is stabil 5 napig [210,217-220].

A C-terminális prokollagén propeptid (PICP) egyetlen formában van jelen a keringésben. Mannóz gazdag oldalláncokat tartalmaz, és ezek közvetítésével, mannóz receptorokhoz kötődve kerül ki a keringésből a májban [217-220].

2.4.5.2. *A csontlebontás markerei*

A tartarát rezisztens savi foszfatáz (TRACP) a lizoszomális enzimek csoportjába tartozik, a keringésben 2 formája található meg, melyek közül a TRAP5b származik az osteoclastokból. Ez az enzim reaktív oxigén intermedierek keletkezését katalizálja, ami elősegíti a csont degradációs termékek további emésztését a csont állományában. A keringésben a TRAP5b enzim is fragmentálódik, a májban metabolizálódik és a vesével választódik ki [221-222]. Ezt a markert a klinikai gyakorlatban már nem használjuk.

A kollagént keresztkötő molekulák – pyridinoline (PYD) és deoxypyridinoline (DPD) – mechanikailag stabilizálják a kollagént, keresztbe kötve az egyedi kollagén szálakat. A csontlebontás során a kollagén degradálódik, és közben szabadulnak fel a keresztkötő molekulák. A PYD a porcokban, csontban, ízületi szalagokban és az erek falában is megtalálható, míg a DPD szinte kizárólag a csontokban és a fogak dentinjében fordul elő. Ezek a molekulák szérumból és vizeletből is kimutathatóak, meglehetősen stabilak, de a vizeletben UV-fény hatására számottevően bomlanak [223-224].

Az N- és C-terminális keresztkötött kollagén telopeptidek (CTX és NTX) a legtöbbet vizsgált markerei a csontreszorpciónak. Ezek is a kollagén degradációja során szabadulnak fel és a keresztkötő PYD és DPD mellett 8-10 aminosavból álló kollagén peptid fragmenseket tartalmaznak. A CTX további poszttranszlációs módosuláson is átesik, racemizálódik és izomer változáson is keresztülmegy. A CTX és NTX a vizelettel ürül, így mérésük történhet 24-órás gyűjtött vizeletből, reggeli első vizeletből és szérumból is. A CTX szérum szintjét befolyásolja a vese funkció, jellegzetes napi ingadozást mutat (reggel a legmagasabb délután a legalacsonyabb) és étkezés után is csökken a szintje. Legstabilabb az EDTA-val alvadásgátolt mintákban [210, 225-228].

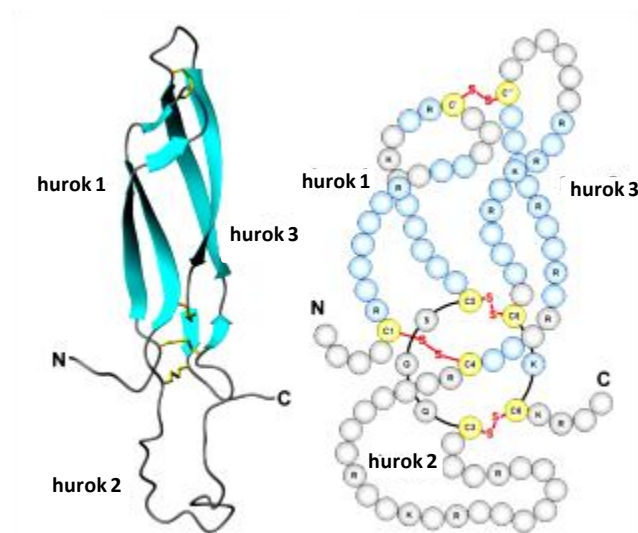
A hidroxiprolin és a hidroxilizin-glikozidok a csontlebontás ma már kevésbé vizsgált markerei. A kollagén poszttranszlációs módosítása során keletkeznek, a prolin esetében hidroxiláció, a lizin esetében hidroxiláció és glikoziláció is lezajlik. A hidroxiprolin nagy mennyiségben keletkezik a csonton kívüli szövetekben is, míg a galaktozil-hidroxi-lizin sokkal csontspecifikusabb. Ezek az aminosavak a kollagén degradációja során szabadulnak fel, és a vizelettel ürülnek, abból mutathatók ki [229-231].

2.4.5.3. A csontanyagcsere újabb markerei

Az elmúlt években egyre több adat gyűlt össze a csontmetabolizmus molekuláris és regulatórikus mechanizmusaival kapcsolatban és számos olyan új marker került a figyelem középpontjába, amelyek diagnosztikus szempontból is jelentősek, sőt egyes esetekben terápiás megoldások kiinduló pontjai is lehetnek. Ezek közé tartozik a csont szialoprotein (BSP) [231], a katepszin K [232], a Receptor activator for nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), az osteoprotegerin (OPG) [233,234], a periostin [235], a Dickkopf-1 (Dkk-1) és a sclerostin fehérje [236,237]. Ezek közül az értekezésben csak a sclerostin mérésével kapcsolatban prezentálunk adatokat, ezért csak ennek bemutatása szerepel itt részletesebben.

A sclerostin az osteocyták által termelt molekula, amely a wnt szignalizációs útvonal potenciális inhibitora. Egy 23 aminosav nagyságú szignál peptidet tartalmazó, 190 aminosavból álló kb. 25 kDa-os protein, mely egy "cisztin-csomó" (cisztin-knot) motívumot tartalmaz, és a DAN/Cerberus fehérje család tagja. A "cisztin-csomó"-t 2 diszulfid híd hozza létre, melyet 4 konzervatív cisztein alkot, és a fehérje szerkezetét további két diszulfid híd stabilizálja. A molekula gerincét 2 pár, ellentétes irányú β -redő adja, ami egy kinyújtott ujjhoz hasonló formát kölcsönöz a proteinnek. A fehérje dimereket alkot, és egy heparin kötő rész lehet felelős a molekuláris interakciókért (6. ábra) [238]. Genetikai okokra visszavezethető hiánya progresszív generalizált osteosclerosissal jár (van Buchem betegség) [239]. *In vitro* és *in vivo* (állatmodell) adatok alapján a sclerostinnak negatív hatása van a csontfelépülésre, ráadásul újabb eredmények azt mutatják, hogy képes autokrin módon stimulálni az osteocyták RANKL szekrécióját és az osteoclastok aktivitását [240,241]. Hatásai alapján a sclerostin molekula terápiás targetet is jelent az osteoporosis kezelésében. Sclerostin ellenes monoklonális antitestek képesek voltak növelni a csontformációs markerek vérszintjét és a BMD-t, míg csökkentették a csontreszorpciós paraméterek értékeit. A sclerostin mérése esetén hasonló problémákkal szembesülünk, mint általában a csontmetabolizmus markereinek meghatározása során. Egyrészt jelentős biológiai variabilitás figyelhető meg a nemnek, életkornak, BMI-nek és a vesefunkciónak megfelelően [242-244]. Másrészt a sclerostin szint mérésére alkalmas módszerek eredményei bár jól korrelálnak, de jelentős variabilitást mutatnak, amit részben a sclerostin variánsok, illetve degradációs fragmensek jelenléte, részben technikai okok magyarázhatnak [245-247]. Mindezekkel együtt is a sclerostin mérés a csontmetabolizmus igen ígéretes markere. Számos klinikai adat utal arra, hogy az emelkedett sclerostin szint fokozott törési kockázattal társul [248,249], és fordítva is, a csökkent sclerostin szint jelenlétében fokozódott a csonttörés valószínűsége idősebb férfiak esetében [250]. Diabeteses (2-es típusú) betegek esetében is hasonló összefüggés volt megfigyelhető

[251,252]. A csontanyagcserét befolyásoló terápiák közül az östrogén, raloxifen és a PTH analógok hatására csökken a sclerostin szintje, míg a bisphosphonatokra adott válasz ellentmondásos [253-256].



6. ábra A sclerostin csontmarker szerkezete. Az ábrán a sclerostin háromdimenziós struktúrája és sematikus ábrázolása látszik (a molekulában lévő diszulfid hidakkal, 3 hurokkal és a β redőt alkotó aminosavakkal (kék körök) [238].

2.4.5.4. A D-vitamin

A D-vitamin egy olyan táplálék komponens, melyre kis mennyiségben van szükség a mindennapok során, de esszenciális a csontháztartás egyensúlyban tartásához és - a legújabb klinikai és kísérletes adatok alapján - számos egyéb életműködéshez is. A D-vitamin két fő formája a D2 (ergocalciferol) és D3 (cholecalciferol) vitamin, melyek megtalálhatóak különböző ételekben, a D2 elsősorban növényi a D3 pedig állati eredetű élelmiszerekben [257,258]. Ugyanakkor a D3-vitamin endogén módon is termelődhet a szervezetben. A bőrben található előanyaga - 7-dehydrocholesterol - alakul át UV-B sugárzás (290-315 nm) hatására cholecalciferollá, majd a májban 25-OH-cholecalciferol végül a vesében 1,25-dihidroxi D3-vitamin, a biológiailag aktív hormon, keletkezik. A táplálékkal felvett D2-vitamin hasonló hidroxilációs lépéseken keresztül alakul át aktív D2-vitamin molekulává. Biológiai hatását tekintve a D3-vitamin hatása domináns [257,259-261]. Nyáron a napsugárzás hatására elegendő mennyiségben keletkezhet D3-vitamin a bőrben, ha valaki elegendő időt tölt a szabadban kellően fedetlen bőrfelületekkel (fedetlen kezek és lábak, 5-30 perc időtartam, 10:00-15:00 között, kétszer egy héten) [262]. Ha a napexpozíció nem elégséges, ami különösen igaz a mérsékelt égöv alatt télen, akkor a táplálékkal kell a szükséges mennyiségű D3-vitamint bevinni. Ez az igény erősen változik

a napsütéses órák számával, és az évek során a különböző ajánlások egyre nagyobb mennyiségű bevittet javasolnak. A Német Táplálkozástudományi Társaság 2012-es guideline-ja pl. napi 800 IU D-vitamin bevittet írja elő az átlagpopulációban; az idősebbek és veszélyeztetettebb személyek esetén pedig akár 1000 IU-t is. Az élelmiszerek közül leginkább a halféleségek, különösen a halmáj, illetve a különböző halolaj készítmények, a tojás - illetve a D-vitaminnal mesterségesen dúsított ételek - tartalmazzak nagyobb mennyiségű D-vitamint [258].

A szervezet D-vitamin-ellátottságának jelenleg legjobbnak tartott biomarkere a szérumban 25-OH-D-vitamin szint meghatározása. Bár az aktív forma az 1,25-dihidroxid, ennek féléletideje a vérben nagyon rövid és meghatározása ezért is nehézkes, ugyanakkor a 25-OH forma szérumban koncentrációja jó korrelációt mutat az aktív hormon szintjével. Ezek alapján a jelenleg érvényes ajánlások szerint az ideális D-vitamin-ellátottság alsó határa 75 nmol/L 25-OH-D-vitamin szint a szérumban. A Nemzetközi Osteoporózis Szövetség és partnerei elkészítették a világ D-vitamin-ellátottság térképét [263,264]. Ez alapján a világ lakosságának 6,7%-a súlyosan D-vitamin-hiányos (<25 nmol/L), 37,3%-a jellemezhető hipovitaminózással (<50 nmol/L) és 88,1%-ának nem kielégítő a D-vitamin-ellátottsága (<75 nmol/L). A magyar adatok a női lakosság körében ismertek: átlagos D-vitamin szint 48,4 nmol/L, a D-hipovitaminózis aránya 56,7%. A D-vitamin biológiai hatásai közül legismertebb a kalcium és csontanyagcserére gyakorolt hatás. Ez a molekula fokozza a bélben és vesében a kalcium felvételét és hiányában a csontok elégtelen mineralizációja következik be; gyermekkorban rachitis, felnőttkorban osteomalacia alakul ki. Az újabb klinikai adatok alapján összefüggés mutatható ki a D-vitamin-ellátottság és a csonttöréshez vezető elesés gyakorisága között is [258,265,266].

Úgy tűnik, hogy a D-vitamin élettani hatásai azonban ennél sokkal többet érnek. A megfelelő D-vitamin-ellátottság mellett javul a légzésfunkció, csökken a tuberculosis és a felső légúti infekciók incidenciája, csökken az autoimmun betegségek - pl. sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus vagy I-es típusú diabetes - kialakulásának esélye. Ugyanakkor, a D-vitamin-hiány fokozhatja bizonyos daganatok (vastagbél, tüdő, prostata, emlő), kardiovasculáris megbetegedések (magasvérnyomás, infarktus, stroke), II-es típusú diabetes, obesitas, valamint neurológiai megbetegedések (Alzheimer, Parkinson), gyulladásos bélbetegségek és krónikus vesebetegségek előfordulásának gyakoriságát [258,267-284].

A D-vitamin meglehetősen diverz hatásait nagy valószínűséggel az magyarázza, hogy a D-vitamin receptora - ligandjának kötése után - több mint 1000 gén aktivitását képes befolyásolni [285]. Nagyszámú olyan gén is van ezek között, amelyek expressziójának változása az immunrendszer működését befolyásolja jelentősen, és így a fent említett

betegségek jó részében a D-vitamin immunmoduláns hatása magyarázhatja a D-vitaminhiány és a kóros állapot kialakulása közötti összefüggést. Ez a molekula jelentősen befolyásolja számos szignalizációs útvonal aktivitását az immunrendszer meghatározó sejtjeiben, ami csökkent proinflammatorikus citokin szekréciót eredményez a monocyták/macrophagok esetében. Jelentősen csökken a dendritikus sejtek MHC-II és kostimulátorikus molekula (CD80, CD86, CD40) expressziója, valamint IFN γ , IL-12, IL-17, IL-21 és IL-23 termelése, míg fokozódik ezen sejtek IL-10 és a CC20 szekréciója. Mindezek a változások elősegítik a regulátorikus T sejtek keletkezését és egy tolerogén állapot kialakulását. Th2 irányú polarizáció alakul ki a Th sejtek szintjén, amihez a Th1 mellett a Th17 sejtek arányának csökkenése is hozzájárul [279,286-299].

2.4.5.5. A csontanyagcsere markerek mérésének gyakorlati problémái

Az eddigiekből is jól látszik, hogy a csontmarkerek klinikai alkalmazásában mennyi potenciál rejlik, ennek ellenére az elmúlt évtized során még sem váltak igazán a rutin diagnosztika részévé. Ez elsősorban a mérések nagyfokú preanalitikai, analitikai és postanalitikai variabilitásával függ össze. A preanalitikai fázisban technikai okok és biológiai faktorok is befolyásolhatják a markerek szérum/plazma szintjét. A technikai okok között szerepel a mintavétel, egyes alvadásgátlószerek interferáló hatása, illetve egyes markerek instabilitása, ami megfelelő szállítási és tárolási kondíciókat igényel. A biológiai faktorok között megemlíthetjük az életkor, nem, rassz, diéta, menstruáció, terhesség és szoptatás hatását a cirkadián ritmust és az évszak-függő változásokat, valamint jelentősen befolyásolhatja egyes markerek szintjét egy korábbi csonttörés vagy a fizikai aktivitás/immobilitás is. Hasonlóan problémás lehet az analitikai fázis is, mert a markereket mérő különböző immunoassay-k különböző antitesteket alkalmaznak, amelyek az esetleges degradált analit formákat különböző mértékben ismerik fel. Nem áll rendelkezésre nemzetközileg elfogadott standard és kontroll anyag sem a módszerek kalibrálásához és validálásához [211,300]. Ezek miatt 2011/2012-ben a Nemzetközi Osteoporosis Szövetség (IOF), az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) csontmarker munkacsoportja és a National Bone Health Alliance az Egyesült Államokban egy nemzetközi standardizációs folyamatot indított el, melynek célja a csontmarkerek klinikai alkalmazásának elősegítése és népszerűsítése, melyet a vizsgálatok megbízhatóságának növelése és jobb standardizálása révén szeretnének elérni [211,300-302].

2.4.5.6. *A csontanyagcsere markerek és a csonttörés kockázata*

A csontbetegségek és különösen az osteoporosis legfőbb szövődménye a különböző lokalizációkban megjelenő (csigolyák, femurnyak, stb.) csonttörések. Ezek egyik legfontosabb előrejelzője a radiológiai módszerrel mért csontsűrűség (bone mineral density, BMD) csökkenése. A fiatal (20-29 éves) nők átlagos BMD-jéhez viszonyított 2,5 SD csökkenés egyértelműen osteoporosist és fokozott töréshajlamot jelez [303]. Számos olyan faktor van azonban, ami jelentősen befolyásolhatja egy-egy egyén csonttöréskockázatát (pl. életkor, nem, BMI, korábbi törések, sekunder osteoporosishoz vezető betegségek, mint pl. a rheumatoid arthritis, szteroid terápia, dohányzás, alkoholfogyasztás). Ezeket a tényezőket olvasztja egybe az ún. FRAX index, ami a 10 éven belül várható nagyobb törés, illetve combnyak törés kockázatát adja meg, és kiválasztja azokat az egyéneket, ahol terápia alkalmazása szükséges. Ezek a képletek ország és populáció specifikusak, és különböző internetes portálokon elérhetőek. Már a magyar lakosságra specifikus FRAX kérdőív is kitölthető a <https://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=27> linken.

2.4.5.7. *A csontanyagcsere markerek és az osteoporosis terápia monitorozása*

A csontanyagcsere markerei jellegzetes változásokat mutatnak a különböző terápiás beavatkozások (glükokortikoszteroid, bisphosphonatok, ösztrogén, raloxifene, denosumab parathormon analógok, anabolikus szerek és stroncium származékok) során is. A csont biokémiai markereinek potenciálisan ez lehet a legfontosabb klinikai alkalmazási területe, mert míg a BMD változása a különböző terápiás eljárások során 12-18 hónapot igényel és a változások mértéke kicsi, addig a csontanyagcsere paraméterei már 3-6 hónap után jelentősen változnak, ráadásul a markerek szignifikáns változása jelentősen csökkenti a törések kockázatát is a kezelt betegekben [210,211,304].

2.4.6. *Multiplex markerek („kompozit score”-ok) készítése egyedi szérum paramétereiből*

Az egyes biomarkerek önmagukban is hatékonyan alkalmazhatók bizonyos diagnosztikus célokra, ugyanakkor már egyszerű kombinálásuk is jelentősen fokozhatja hatékonyságukat és értékes klinikai információkat adhat. Egyszerű példán bemutatva, például a szérum alkalikus foszfatáz szintjének emelkedése a csont és a máj különböző betegségeire utalhat, de akár bizonyos daganatokhoz is társulhat, azonban ha ezt a γ -glutamil transzferáz emelkedése kíséri, akkor ez igen nagy valószínűséggel az epeutak obstrukciójára utal [305].

Még hatékonyabban tudunk az egyedi markerek segítségével egyes klinikai kérdéseket megválaszolni, ha meghatározott formulák/képletek alapján kompozit score-okat képzünk belőlük. A klinikai gyakorlatban régóta ismertek ilyenek, mint pl. a cirrhosis súlyosságát/prognózisát jellemző Child-Pugh vagy újabban a MELD (Model for end-stage liver disease) score. Az előző a szérumbilirubin, albumin és a prothrombin idő (INR) mellett az ascites és a hepatikus encephalopathia jelenlétét veszi figyelembe, az utóbbi pedig a szérumbilirubin, kreatinin és a prothrombin idő (INR) mellett a dialízis igényt. A Child-Pugh rendszer egyenként pontozza az 5 komponenst, és ebből számol egy score-t, a MELD értékelés esetében egy matematikai formula köti össze a változókat. Az eredmény az 1, illetve 2 éves (Child-Pugh), valamint a 3 hónapos (MELD) túlélés valószínűségét adja meg [306,307]. Hasonlóan működnek az autoimmun kórképek aktivitási indexei is (pl. SLE-DAI, DAS28, SDAI, PASI, stb.), melyek elsősorban klinikai adatokat, bizonyos gyulladásos markereket (CRP, vvt süllyedés) és hematológiai paramétereket vesznek figyelembe (fvs, thr szám) [308-311]. Többféle score rendszert alkalmaznak az intenzív osztályokon is a súlyos állapotú betegek prognózisának, életkilátásainak megítélésére (APACHE, SOFA, SAPS) [312,313].

Az onkológiai diagnosztika területén is számos ilyen score ismert. Az egyik első, a prostata carcinoma azonosítását elősegítő próbálkozás, a ProstASURE index volt; egy neurális háló által megalkotott nemlineáris algoritmus, ami a szérumbilirubin mellett az életkort, a prostata specifikus savanyú foszfátáz és a kreatinkináz izoenzimek szérumbilirubin koncentrációját vette figyelembe; ez azonban nem vált a mindennapi klinikai gyakorlat részévé [314]. Egy hasonló céllal készült új paraméter a „Prostate health index” (PHI), ami a totál (tPSA), a szabad (fPSA) és a p2PSA szérumbilirubin koncentrációját alkalmazza ($p2PSA / fPSA \times \sqrt{tPSA}$), és elősegíti a prostata tumoros és benignus prostata hyperplasias vagy krónikus prostatitiszes betegek megkülönböztetését különösen a $4 \mu\text{g/L} < tPSA < 10 \mu\text{g/L}$ szürke zónában. Az eddigi klinikai adatok alapján a PHI alkalmazása csökkentheti a felesleges prostata biopsziák számát, de klinikai alkalmazhatóságának pontos megítélése további vizsgálatokat igényel [149,150]. A petefészek tumorok esetében is több ilyen score rendszer ismeretes. A ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) score, a petefészek carcinoma kialakulásának kockázatát nagy szenzitivitással képes jelezni pre- és postmenopausában, két tumormarker (CA 125, HE4) koncentrációjának felhasználásával [171]. Az OVA1 teszt a CA 125 mellett további 4 biomarkert ($\beta 2$ -mikroglobulin, apolipoprotein A1, prealbumin és transferrin) használ, és egy nem publikus algoritmus (OvaCalc[®]) segítségével kalkulál egy 1-10 közé eső számot. Premenopausában 5,0 menopausában 4,4 feletti érték malignus daganatot valószínűsít a petefészekben [315]. A tüdő malignus daganatainak esetében is számos publikáció foglalkozik hasonló score

rendszerek definiálásával, változó számú (2-6) laboratóriumi paramétert (tumormarkerek, akut fázis fehérjék, gyulladásos mediátorok) kombinálva, de ezek klinikai evaluálása még várat magára [316-320]. Jónéhány olyan génexpresszió változást meghatározó teszt (Oncotype DX, MammaPrint, Tissue of Origin teszt) ismert ugyanakkor, amelyek a klinikai gyakorlatban is alkalmazásra kerültek különböző típusú tumorok esetében [321-324].

A disszertációban egy ilyen kompozit score-t generáló rendszerre mutatunk be példát, egy újonnan kifejlesztett speciális protein array formájában. A QP300 kit a plazma proteom profilírozására használható új eszköz, ami 290 monoklonális ellenanyagot alkalmaz, melyek a plazmában található fehérjék különböző epitópjait ismerik fel, és az azonosított protein (epitóp) mennyiségi meghatározását teszik lehetővé. Az új rendszer analitikai és funkcionális validálása kerül bemutatásra a disszertációban.

2.4.7. Az *FLT3* és mutációi

Az FLT3 fehérjét 1991-ben azonosították egér embriók májsejtjeiben, majd 1993-ban humán sejtekben is kimutatták. Több elnevezés után végül az fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) név terjedt el [325-328]. A humán FLT3 gén a 13. kromoszómán helyezkedik el (13q12), 24 exonból áll, mérete kb. 100 kb, míg az általa kódolt fehérje 993 aminosavat tartalmaz. Szerkezetére jellemző egy 5 immunglobulinszerű doménból felépülő extracelluláris rész (3-12. exon), melynek a ligandkötésben van szerepe. A gén 13. exonja kódolja a rövid transzmembrán (TM) domént, a 14. exon a juxtamembrán (JM, membrán közeli), míg a 15-22. exonok egy specifikus tirozinkináz részt, végül a 23-24. exonokról a C-terminális domén kerül átírásra. A kináz rész a kináz inzert domén (KI) által két részre (TK1 és TK2) osztott (7. ábra) [325,326,329-333]. Az FLT3 az emberi szervezetben elsősorban a hemopoetikus progenitor sejtekben, a thymusban, a nyirokcsomóban található meg, de kimutatható még a májban, a placentában, a gonádokban, az agyban és a retinában is [325,333-336].

Az FLT3 molekula a receptor tirozinkinázok III. alcsoportjába tartozik. Ezek transzmembrán fehérjék, amelyek ligandjukat megkötve megváltoztatják konformációjukat, aktiválódnak és különböző sejten belüli jelátviteli utak alkotóelemeit foszforilálják [325, 332,333,337,338]. Az FLT3 ligandja egy transzmembrán protein, ami számos sejt és szövet felszínén expresszálódik, melyek közül a legfontosabbak a csontvelői strómális fibroblastok. A ligand kötődése (parakrin vagy autokrin módon) a receptor dimerképződéséhez és autofoszforilációjához vezet, ami a sejten belüli jelátviteli mechanizmusok aktiválása révén - további növekedési faktorokkal és citokinekkal együtt -

a hemopoetikus őssejtek proliferációját indukálja és apoptózisának gátlását eredményezi [325,326,332,333,339].

Az FLT3 génben leírt mutációk alapvetően 3 csoportba sorolhatóak. Az első típus a juxtamembrán domént kódoló 14. és 15. exonokat érinti és az ebben a régióban kialakult belső tandem duplikációkat (internal tandem duplication - ITD) és ehhez társuló kis inzerciókat jelenti. Az ITD hossza 3 és 400 bázispár között, míg a pluszban beépült nukleotidok száma 3 és 36 bázispár között mozog. Mivel a leolvasás az olvasási kereten belül marad, a képződő fehérje megőrzi kináz funkcióját, csak éppen a tandem duplikáció méretétől függően hosszabb JM doménnel rendelkezik. A megváltozott szerkezetű JM domén TK régióra kifejtett gátlóhatása lecsökken, és ennek következtében alakul ki a receptor ligand-független dimerizációja és aktivációja, mely proliferációt, illetve a myeloid sejtek differenciációjának és apoptózisának a gátlását eredményezi (7. ábra) [325,332,333,339-343].

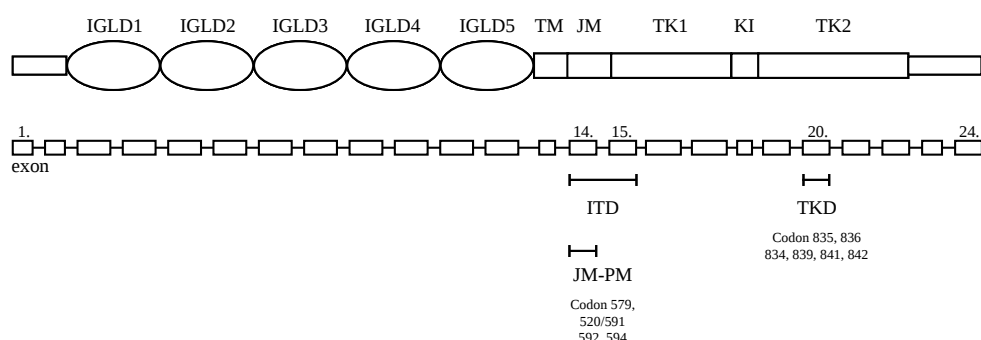
A mutációk második csoportja a tirozinkináz domén (TKD) aktivációs hurkát érinti. Normális esetben ez az elem az enzim aktív zsebéhez kötődve megakadályozza az ATP és a szubsztrát kötődését a kinázhoz, míg ligandkötődés esetén foszforilálódik (az Y842-es pozícióban) és gátló hatása megszűnik. Az itt kialakuló mutáció szintén állandó kináz-aktivációt okoz. Az esetek 85-90%-ban aminosav cserét eredményező (missense) mutáció fordul elő a 835. kodonban, kisebb arányban a 834., a 836-837. és a 839-841. kodonokban is lehet eltérés (7. ábra) [325,332,333,341,342,344-347].

A mutációk harmadik típusa ritka, a JM domén egy 16 aminosavból álló szakaszát érinti. Ebben az esetben azonban nem duplikációkról hanem az 579., 590./591., 592. és 594. kodonokat érintő pontmutációkról van szó (7. ábra). Ennek hatása nagyon hasonló az FLT3-ITD mutációhoz - a JM domén TK régióra kifejtett gátló hatása lecsökken, ami spontán szignalizációt eredményez -, csak ahhoz képest valamelyest "gyengébb". Ezt vélhetően az magyarázza, hogy az FLT3-ITD esetében sokkal jelentősebb a JM domén konformáció változása, mint amit az egyedi pontmutációk okozni képesek [325,332,348,349].

Ezen mutációk tehát, a tirozinkináz spontán és állandó aktivációját, végső soron az AML-sejtek proliferációját és megnövekedett túlélését idézik elő. Ezenkívül aberráns jelátviteli utak is aktiválódnak, amelyek normál esetben nem vesznek részt az FLT3 mediálta szignalizációban. Ilyen például a STAT5 aktivációja, ami az apoptózis blokkolásához vezet, vagy az RGS2 gén (és következményesen két myeloid transzkripciós faktor) gátlása, ami a progenitor sejtek myeloid differenciálódását blokkolja [325,332,350-353].

Klinikai szempontból legnagyobb jelentősége az FLT3-ITD eltérésnek van. Ennek jelenléte rosszabb prognózissal társul az AML-es betegek esetében, és bár az adatok ellentmondóak, de az inzerciót hordozó allél aránya, az inzerció mérete és pozíciója, valamint a multiplex inzerciók jelenléte mind befolyásolhatják a prognózist [325,332,333,341-343,354-360].

Az FLT3-ITD eltérés kimutatása történhet a kóros sejtekből izolált DNS-en elvégzett egyszerű PCR-t követő agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. Ezekben az esetekben az ITD megléte esetén a vad típusú allélról felszaporodott PCR termék mellett egy nagyobb méretű termék is látható az elektroforézis során. Az ITD mérete és a mutáns allél aránya pontosan meghatározható, ha kapilláris elektroforézist alkalmazunk. A mutáció mérete és pontos lokalizációja DNS szekvenálással azonosítható, ha a mutáns allél kellően nagy mennyiségben (minimum 10-20%) van jelen a mintában [325,332,343,348,349,361].



7. ábra Az FLT3 molekula szerkezetének sematikus rajza, és a mutációinak lokalizációja. (IGLD: immunglobulin szerű domén, TM: transzmembrán domén, JM: juxtamembrán domén, TK: tirozinkináz domén, KI: kináz inzert domén, ITD: belső tandem duplikáció, TKD: tirozinkináz domén mutációi, JM-PM: pont mutációk a juxtamembrán doménben) [325].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Alapvető célunk az volt, hogy ismert és új biomarkerek tesztelését végezzük el különböző onkológiai, csontanyagcsere vagy immunmediált betegségekben. Ennek kapcsán be kívántuk mutatni a biomarkerek alkalmazásával kapcsolatos lehetőségeket és problémákat, valamint a biomarker validálás lépéseit illusztráltuk különböző típusú markerek és tesztek esetében.

3.1. Sejtasszociált markerek vizsgálata

- Monocyta membrán CD14-expresszió mérése atópiás dermatitises (AD), myositises (PDM) és szisztémás lupus erythematosusos (SLE) betegek mintáin. Összefüggés a betegség aktivitásával.
- Kortikoszteroid terápia hatásának vizsgálata az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expressziójára és a CD14-mediálta LPS-kötésre és sejtaktivációra.

3.2. Szolubilis markerek vizsgálata

- sCD14 koncentráció mérése AD-s, SLE-s és PDM-es betegek szérum mintáiban. Összefüggés a betegség aktivitásával.
- Akut fázis fehérjék (CRP, PCT, sCD14, LBP) és ANCA antitestek mérésének alkalmazása a cirrhotához társuló fertőzések kimutatására, illetve predikciójára. Az IgA-típusú ANCA antitest keletkezés potenciális mechanizmusának vizsgálata.
- Tumormarkerek tesztelése rheumatoid arthritises betegek szérum mintáiban.
- A HE4 marker egy új alkalmazásának vizsgálata tüdőtumoros betegek mintáiban. Potenciális preanalitikai faktorok értékelése. Új kompozit paraméterek alkotása a betegek és kontrollok jobb megkülönböztetésére.
- A sclerostin csontmarker vizsgálata 50 év feletti egészséges férfiak szérumában. Potenciális preanalitikai faktorok értékelése.
- A plazma proteom jellemzésére használható új mAb-alapú array (QP300) analitikai vizsgálata és tesztelése tüdőtumoros betegek mintáin. Új kompozit paraméterek alkotása a betegek és kontrollok jobb megkülönböztetésére.

3.3. Genetikai markerek vizsgálata

- Az FLT3-ITD kimutatására használt különböző elektroforetikus technikák és DNS szekvenálás analitikai vizsgálata akut myeloid leukemias betegek DNS mintáinak felhasználásával.

4. BETEGEK

4.1. Atópiás dermatitis (AD)

Munkánk során a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikájának allergológiai szakrendelésén gondozott 30 atópiás dermatitisben szenvedő beteg (12 nő, 18 férfi, átlagéletkoruk $19,7 \pm 9,3$ év), valamint 56 korban és nemből illesztett egészséges személy mintáit vizsgáltuk. A diagnózist Hanifin és Rajka kritériumrendszere alapján állítottuk fel [362]. Az intrinsic AD csoportjába azt a 10 beteget soroltuk, akiknek bőrpróbája, allergén specifikus IgE tesztje negatív, a szérumban összes IgE koncentrációja 120 kU/L alatti, átlagban $45,6 \pm 36,6 \text{ kU/L}$ volt. A további 20 beteg – akiknek össz IgE koncentrációja átlagosan $2.788,2 \pm 3.512,6 \text{ kU/L}$ volt – alkotta az extrinsic AD csoportját. A betegség súlyosságát a SCORAD (SCORe Atopic Dermatitis) index alapján határoztuk meg, ennek átlagértéke az összes AD-s betegre vonatkoztatva $39,8 \pm 16,7$ volt. Az intrinsic AD-s csoportra ($36,4 \pm 15,1$) és az extrinsic AD-s csoportra ($41,5 \pm 17,6$) kalkulált SCORAD index nem tért el szignifikánsan egymástól. A betegek a vérvételt megelőzően legalább négy hétig nem kaptak szisztémás immunmoduláló gyógyszereket és UV-fény terápiában sem részesültek. Az egészséges kontrollok allergiás betegségektől mentesek voltak, szérumban IgE koncentrációik a normál tartományba estek.

A betegek gondozását a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján Dr. Szegedi Andrea professzornő és munkatársai végezték.

4.2. Szisztémás lupus erythematosus (SLE)

A DEOEC Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológia Tanszékének járóbeteg szakrendelésén gondozott betegek közül 18 SLE-ben szenvedő beteget (16 nő, 2 férfi, átlagéletkoruk $38,8 \pm 11,7$ év) vontunk be a glükokortikoszteroid terápiának a monocyták CD14-expressziójára, valamint CD14-függő aktiválhatóságára gyakorolt hatását vizsgáló munkánkba. A betegek az Amerikai Reumatológusok Kollégiuma által összeállított SLE-re vonatkozó diagnosztikus kritériumrendszer legalább négy kritériumának megfeleltek [363]. A vizsgálat ideje alatt 10 beteg (10 nő, átlagéletkoruk $40,6 \pm 14,3$) volt inaktív stádiumban (SLEDAI: $0,90 \pm 1,29$), ők a mintavételkor már legalább három hónapja nem kaptak semmiféle szisztémás kezelést. A betegség fennállásának átlagos ideje $8,6 \pm 6,8$ év volt ebben a csoportban, és minden betegnek volt ízületi és bőrérzékenysége, hematológiai abnormalitása és szerológiai eltérése a betegség fennállása során. Négy betegnek veseérzékenysége, 3 betegnek fényérzékenysége, és 1-1 betegnek májérzékenysége, illetve szemészeti problémái is voltak. A korábban alkalmazott terápia ebben a csoportban

dominálón alacsony dózisú szteroid volt, de 2-2 beteg chloroquint, illetve cyclophosphamidot, míg 1-1 beteg methotrexat-ot, illetve azathioprint is kapott. Ezek a személyek alkották a „szteroidmentes” csoportot.

A másik csoportba 8 olyan beteg (6 nő, 2 férfi, átlagéletkoruk $36,5 \pm 7,5$, betegségük átlagos időtartama $9,2 \pm 5,5$ év, SLEDAI: $8,5 \pm 1,93$) tartozott, akik fenntartó terápiaként kis dózisú kortikoszteroidot (4-16 mg methylprednisolon/nap) kaptak rendszeresen. A vizsgálat ideje alatt betegségük súlyos fellángolása miatt mindegyikük egy rövid pulzus (lökés) szteroid kezelésén (1 g/nap, három napig) esett át. A pulzus szteroid kezelés előtt történt először mintavétel, és ez szolgáltatta a „kis dózisú szteroid” csoport adatait. A pulzusterápia utolsó adagjának beadása után 24 órával vettünk újra vérmintát, és az ebből mért paraméterek adták a „pulzus szteroid” csoport adatait. A kontroll csoportot 11 korban és nemből hasonló egészséges személy képezte (9 nő, 2 férfi, életkor: $34,4 \pm 9,2$ év).

A szérumból sCD14 mérését ebben a betegcsoportban egy független vizsgálat során végeztük el, amiben 23 SLE-s beteg (1 férfi, 22 nő, életkor: $40,9 \pm 12,4$) és 53 kontroll személy (29 férfi, 24 nő, életkor: $40,4 \pm 15,1$) vett részt. A betegek megfeleltek az SLE ARA kritériumainak, de a betegség időtartamától, aktivitásától és az alkalmazott terápiától függetlenül választottuk ki őket.

A betegek gondozását a DEOEC Belgyógyászati Intézet Klinikai Immunológiai Tanszékén Dr. Kiss Emese tanárnő, Dr. Tarr Tünde adjunktusnő és munkatársaik végezték.

4.3. Polymyositis/dermatomyositis (PM/DM)

Vizsgálatainkba a DEOEC Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológia Tanszékének járóbeteg szakrendelésén gondozott 76 polymyositises (60 nő és 16 férfi, átlagéletkoruk $54,0 \pm 12,1$ év), valamint 34 dermatomyositises beteget (27 nő, 7 férfi, átlagéletkoruk $53,1 \pm 13,9$ év) válogattunk be. Diagnózisuk egyértelmű volt, mindannyian megfeleltek a Bohan és Peter által felállított kritériumrendszernek [364,365]. A PM-ben szenvedő betegek közül 23 volt aktív, 53 pedig inaktív stádiumban, míg 14 DM-es beteg volt aktív, 20 pedig inaktív stádiumú a vizsgálat idején. A betegség aktivitását a klinikai tünetek, leginkább az MMT (Manual Muscle Testing) segítségével jellemzett izomgyengeség, valamint az izomból felszabaduló enzimek (kreatin kináz, laktát dehidrogenáz) emelkedett szérumból koncentrációja alapján határoztuk meg. Aktív bőrtünetek és extramuscularis tünetek esetén a betegeket szintén az aktív csoportba soroltuk. Az inaktív stádiumban a betegek már remisszióba kerültek, amit az izomerő stabil javulása, az izomból felszabaduló enzimek szérumból koncentrációjának normalizálódása, a bőrtünetek eltűnése és az extramuscularis tünetek javulása jelzett. A vizsgálat idején 71 beteget kortikoszteroiddal, 27 beteget másodvonalbeli immunoszuppresszív szerekkel kezeltek és tizenketten

semmilyen szisztémás terápiában nem részesültek. A vizsgálatban kontrollként 35 egészséges személy vett részt.

A betegek gondozását a DEOEC Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológia Tanszékén Dr. Dankó Katalin professzornő és munkatársai végezték.

4.4. Cirrhosis

Az akutfázis fehérjék vizsgálata során 368 jól karakterizált, követés alatt álló cirrhotikus beteget (204 férfi 164 nő; kor: $56,4 \pm 10,8$ év; betegség időtartama: $3,9 \pm 4,2$ év) választottunk be a DEOEC Belgyógyászati Intézetének Gastroenterológiai Tanszékéről. Az ANCA és a fertőzések összefüggését 385 beteg bevonásával elemeztük (férfi/nő: 206/179, életkor: $56,6 \pm 11,0$ év; betegség időtartama: $3,9 \pm 4,2$ év).

A cirrhosis diagnózisát klinikai, biokémiai, ultrahangos és amennyiben lehetséges volt, hisztológiai vizsgálatok alapján állították fel [366]. A betegek beválasztásakor vérvétel, valamint a klinikai adatok (Child és MELD score-ok, ascites és encephalopathia jelenléte/súlyossága) rögzítése történt meg. A további klinikai adatok (életkor a betegség kezdetekor, etiológia, varix jelenléte, varix vérzések, hepatikus encephalopathia, spontán bakteriális peritonitis, alkalmazott gyógyszerek és egyéb kísérő betegségek) a betegek dokumentációjának utólagos áttekintése során kerültek kigyűjtésre. A cirrhosis kiváltó oka a két tanulmányban alkoholizmus (67% és 64%), hepatitis fertőzés (28% és 30%), illetve egyéb ok (5% és 6%) volt. A beválasztásnál különös figyelmet fordítottunk az akut bakteriális fertőzések jelenlétére is. A fertőzés diagnózisát a klinikai tünetek, lázas állapot, laboreredmények, mikrobiológiai tenyésztés (amennyiben lehetséges volt), képalkotó vizsgálatok, illetve az antibiotikum kezelésre adott válasz alapján a betegek gondozását és követését végző Dr. Papp Mária tanárnő és Dr. Vitális Zsuzsanna adjunktusnő (DEOEC, Belgyógyászati Intézet, Gastroenterológiai Tanszék) állapították meg.

A vizsgálatok második részében 205 és 345 cirrhotikus beteget egy prospektív követéses vizsgálatba vontunk be. A követés során a betegek átlagosan 3 havonta jelentkeztek kontrollra, illetve állapot rosszabbodás esetén akár havonta is vissza lettek rendelve. A vizsgálat végpontja a betegek halála, illetve klinikailag szignifikáns fertőzés megjelenése volt. A követési idő 24 hónap, illetve az említett végpontok elérése volt. A túlélési adatokat 3, 12 és 24 hónap követési idő után is értékeltük.

Az ANCA vizsgálatba bevont egészséges kontrollok száma 100 volt (45 férfi, 55 nő; életkor: $50,5 \pm 16,7$ év).

4.5. Akut myeloid leukémia (AML)

Az FLT3-ITD meghatározására alkalmas módszer validálásához 73 felnőtt akut myeloid leukémiás beteg (37 nő, 36 férfi; életkor: $51,7 \pm 18,5$ év) 95 db DNS mintáját használtuk fel. Az AML diagnózisát a WHO kritériumai alapján állították fel [367]. Ezeket a betegeket a DEOEC Belgyógyászati Intézetének Hematológiai Tanszékén dolgozó Dr. Batár Péter adjunktus úr és Dr. Udvardy Miklós professzor úr, illetve a Nyíregyházi Jósa András Kórház Hematológiai Osztályán dolgozó Dr. Szerafin László főorvos úr gondozta.

4.6. Rheumathoid arthritis (RA)

Összesen 75 RA-s beteg vett rész a reumatológiai betegségekhez társuló tumormarker eltéréseket analizáló vizsgálatunkban (62 nő és 13 férfi; életkor $50,1 \pm 13,8$ év). A betegség fennállásának átlagos ideje $10,9 \pm 8,6$ év volt. Kontrollként 50 korban és nemben illesztett egészséges donor szolgált (41 nő és 9 férfi; életkor: $54,5 \pm 9,3$ év). Sem a betegek, sem a kontrollok esetében nem fordult elő malignus megbetegedés. A betegség aktivitásának jellemzésére a betegség aktivitási score (DAS28) kalkulálása történt meg [311]. A betegek gondozását a DEOEC Belgyógyászati Intézet Rheumatológia Tanszékén Dr. Szekanecz Zoltán professzor úr és munkatársai végezték.

4.7. Tüdőtumoros betegek - NKTH mAB-CHIC study

Egy 2009-ben indult projekt során 5 különböző daganatos betegségben (tüdő, vastagbél, emlő, ovárium és prostata tumor) szenvedő betegektől gyűjtöttünk szérum és plazma mintákat a diagnózis felállítása után, de a terápia megkezdése előtt. Összesen 544 daganatos beteget és 521 kontrollt vontunk be a vizsgálatba. A daganatos betegek közül 153 volt tüdőtümos (99 férfi, 54 nő; átlagéletkora $62,1 \pm 8,9$ év). A vizsgálatba a DEOEC Tüdőgyógyászati Klinikáján változó légúti panaszokkal megjelent betegek kerültek beválasztásra, akiknél a részletes klinikai, radiológiai és laboratóriumi vizsgálat tüdőtumort igazolt.

A szérum HE4 szint és a tüdőtumor összefüggését vizsgáló eset-kontroll, keresztmetszeti tanulmányban 98 újonnan diagnosztizált tüdőtümos férfibeteg és 98 korban és nemben illesztett egészséges kontroll adatait vontuk be. Az életkor mindkét csoportban 62 (40-80) év volt, és a daganatos betegek 50%-a, míg a kontrollok 12%-a ($n=12$) volt dohányzó a vizsgálat idején. A hisztopatológiai vizsgálatok alapján 69 betegnek volt NSCLC-je (33: laphámrák; 31: adenocarcinoma; 5: nagysejtes carcinoma), 15 betegnél SCLC igazolódott, míg hisztológiai adat nem volt elérhető 14 esetben. Ez utóbbi betegeknél a tüdő daganat diagnózisának megállapítása a CT/MRI eredménye alapján történt. A betegek közül 13 I., 8 II., 38 III. és 39 IV. stádiumú volt a diagnózis

felállításakor. Az egészséges kontrollok véradók és a Laboratóriumi Medicina Intézet dolgozói voltak.

A plazma proteom profilírozására alkalmas QP300 chip tesztelése során 46 korban és nemben illesztett tüdő tumoros és kontroll személy mintáit vizsgáltuk (kontrollok: 20 férfi, 26 nő, átlagéletkor: $55,2 \pm 9,3$; jelenleg dohányzó: 17, korábban dohányzott, de most már nem: 19, soha nem dohányzott: 10; betegek: 19 férfi, 27 nő, átlagéletkor: $55,1 \pm 8,7$; jelenleg dohányzó: 19, korábban dohányzott, de most már nem: 18, soha nem dohányzott: 9). A tüdő tumoros betegek gondozását a DEOEC Tüdőgyógyászati Klinikáján Dr. Szilasi Mária professzornő és munkatársai végezték.

4.8. Ötven évnél idősebb férfiak csontstátuszának vizsgálata

Ennek a vizsgálatnak az alapvető célja az volt, hogy véletlenszerűen kiválasztott nagyszámú egészséges magyar férfi esetében jellemezzük ezek csontstátuszát, csontdenzitás méréssel, a csontképződés és lebomlás biokémiai markereinek a meghatározásával, illetve a táplálkozási szokások felméréssel. 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 vizsgálatba bevont személyek összlétszáma 229 volt, akik közül végül 23 került kizárára, mert nem feleltek meg a feltételeknek. Részletes anamnézis-felvétel mellett, az index és a napi kalcium bevitel meghatározására validált kérdőíveket kellett a betegeknek kitöltenie. A résztvevők életkora $60,2$ (51-81) év volt. A kontrollok beválasztását, mintáik és adatainak összegyűjtését Dr. Bhattoa Harjit Pal, adjunktus úr végezte.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A sejtfelszíni receptorok jelölése, kvantitálása

A sejtfelszíni receptorok mennyiségi meghatározásához direkt és indirekt módon jelölt monoklonális ellenanyagokat, valamint ezek izotípus kontrolljait használtuk fel. A következő antitesteket alkalmaztuk: anti-humán CD14 mAb LeuM3-PE (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA), anti-humán CD14 mAb MY4-PE (Coulter, Hialeah, FL, USA) anti-humán CD14 mAb 26ic és 60bca (Dr. Jos A.G. van Strijp és Dr. Kok P.M. van Kessel bocsátotta rendelkezésünkre – Eijkman-Winkler Institute, Utrecht University, Utrecht, Hollandia). A jelöletlen antitestek kimutatásához használt „2.” antitestek: anti-egér IgG-FITC és anti-egér IgG-PE (DAKO, Glostrup, Denmark). Izotípus kontroll antitestek: egér IgG2b-PE mAb (Becton-Dickinson), valamint jelöletlen egér IgG1 és IgG2b mAb (Serotec, Raleigh, NC, USA).

A 100 µL alvadásgátolt teljes vérmintát 10 µg/mL monoklonális antitesttel inkubáltuk 30 percig jégen. Indirekt jelölés esetében, a mosási lépések után egy „2.” antitesttel is inkubáltuk a mintákat. A vörösvértestek ammónium-kloridos lizálása után a fehérvérsejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták fluoreszcencia intenzitását Coulter EPICS XL, (Beckman Coulter), illetve FACSCalibur (Becton-Dickinson) áramlási citométerrel mértük le. Legalább 5000 monocyta, 20000 lymphocyta és 50000 granulocyta adatait gyűjtöttük be. A monocytákat, lymphocytákat és granulocytákat fényszórási paramétereik (FSC - SSC) alapján választottuk el egymástól. Egyes vizsgálatok során a receptorok abszolút számát is meghatároztuk, monoklonális antitesttel fedett standard bead-ek (QIFIKIT; DAKO) segítségével. A bead-ek egy-egy csoportja ismert mennyiségű anti-humán CD5 monoklonális ellenanyagot hordozott a felszínén. Ugyanannyi ideig és ugyanolyan koncentrációjú „2.” antitesttel inkubáltuk a bead-eket, mint a sejteket. Egy mosási lépés után 50.000 bead fluoreszcencia intenzitását mértük meg a sejteknél is alkalmazott protokollt használva. A bead-ek átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) az egy bead-en található antitestek számának függvényében ábrázolva (log/log skálán) egy standard görbét készítettünk, és ennek segítségével határoztuk meg az egy sejt felszínén expresszált receptorok számát.

5.2. A CD14 mediálta LPS kötés vizsgálata

A monocyták és granulocyták CD14 mediálta LPS kötésének vizsgálatához a betegek és a kontrollok heparinnal alvadásgátolt, mosott teljes vérét, illetve izolált mononukleáris sejteit használtuk fel. A mononukleáris sejtek izolálása ficoll sűrűséggradiens segítségével történt. Első lépésben 3×10^5 mononukleáris sejtet, illetve 80 µL, 5×10^6 /mL leukocytát

tartalmazó mosott vért 10 µg/mL blokkoló anti-CD14 monoklonális antitest (60bca) jelenlétében vagy anélkül inkubáltunk 30 percig +4°C-on. Ezután a mintákat 10, vagy 1000 ng/mL FITC-LPS (FITC-cel jelölt *Salmonella minnesota* Re 595; Dr. Jos A.G. van Strijp ajándéka) és 4% normál humán szérum (NHS) jelenlétében inkubáltuk tovább 30 percig 37°C-on. Ezt követően a teljes vér mintákban lizáltuk a vörösvértesteket, végül a fehérvérsejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták mérése Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométerrel, a monocyták és a granulocyták azonosítása fényszórási paramétereik (FSC-SSC) alapján történt. A jelöletlen sejtek fluoreszcencia intenzitását, mint háttér, minden minta MFI értékéből levontuk. A CD14-függő LPS kötődés mértékének a meghatározásához az anti-CD14 antitest nélkül inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitásából (ami az össz LPS kötés mértékét mutatja) levontuk a blokkoló antitest jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitását (CD14-független kötődés).

5.3. Az LPS indukálta sejtaktiváció mérése – a szekretált TNFα fehérje mennyiségének meghatározása

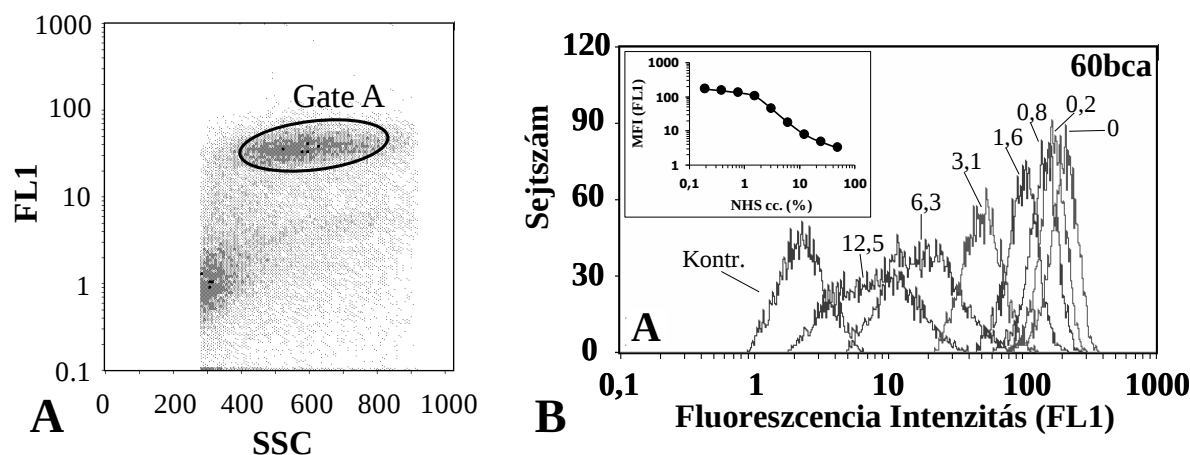
Mononukleáris sejteket izoláltunk ficoll sűrűséggradiens segítségével steril körülmények között. Ezt követően 96 lyukú steril mikrotiter lemez vályúiba 5×10^5 sejtet mértünk és 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban inkubáltuk őket 60 percig 37°C-on. A le nem tapadt sejteket mosással eltávolítottuk. A letapadt sejtek >94%-a monocyta volt May-Grünwald-Giemsa festés alapján. Ezután a monocytákat anti-CD14 monoklonális antitesttel (10 µg/mL 60bca) vagy anélkül 60 percig inkubáltuk majd 10, vagy 1000 ng/mL LPS-t (*S.minnesota* Re595) és 4% NHS-t mértünk duplikátumban a megfelelő lyukakba. A mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk, majd a felülúszókat leszívtuk és -70°C-on tároltuk. A felülúszók TNFα koncentrációját az OptEIA ELISA kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó útmutatásai alapján. Az LPS és NHS nélkül inkubált sejtek TNFα termelését, mint háttér, levontuk minden egyes mintához tartozó TNFα értékből. A sejtek CD14-függő aktiválódását úgy kalkuláltuk, hogy a blokkoló anti-CD14 antitest hiányában mért TNFα mennyiségéből (ami az össz aktiváció mértékét jelzi) kivontuk a gátló antitest jelenlétében mért TNFα mennyiségét (ez a CD14-független aktiváció mértékére utal).

5.4. A szolubilis CD14 mérésére alkalmas áramlási citometriás módszer kifejlesztése

A humán szérum sCD14 koncentrációjának mérésére egy egyszerű, áramlási citometriás módszert dolgoztunk ki. A teszt alapvetően egy kompetitív immunoassay, amelyben a szérum sCD14 és az izolált mononukleáris sejtek monocytáin kifejeződő membrán CD14 (mCD14) verseng egy CD14 ellenes monoklonális antitesthez való kötődéséért. A

sejtekhez kötődött - direkt vagy indirekt módon jelölt - antitest mennyiségét áramlási citométerrel határoztuk meg. A fluoreszcens szignál nagysága fordítottnan arányos a szérumban lévő sCD14 mennyiségével. A minták sCD14 tartalmát kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. Ismert sCD14 koncentrációjú standard szérumból hígítási sort készítettünk, majd az ezekből kapott fluoreszcencia intenzitásokat (MFI) ábrázoltuk a sCD14 koncentráció (illetve szérum hígítás) függvényében log-log skálán (8. ábra). Az áramlási citometriás módszerrel kapott eredményeket összevetettük egy kereskedelmi forgalomban kapható ELISA (Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) eredményeivel.

A módszer beállításánál kétféle CD14 ellenes antitestet (60bca és 26ic), többféle antitestkoncentrációt (0,01-100 $\mu\text{g/mL}$), szérumkoncentrációt (0,1-50%) és monocyta sejtkoncentrációt (1x, 2x, 6x, 18x és $32 \times 10^5/\text{mL}$) teszteltünk. A két anti-CD14 antitest (60bca, 26ic) közül a 60bca-val kapott eredmények mutattak nagyobb hasonlóságot az ELISA-val kapott eredményekhez, és ráadásul hatékonyabban különböztették meg az SLE-s betegeket a kontrolloktól, ezért ezt használtuk a későbbi mérések során. Inhibíciós assay-ról lévén szó, az anti-CD14 mAb szuboptimális koncentrációját kellett alkalmaznunk. A 60bca antitest koncentráció görbét felvéve az 3-10 $\mu\text{g/mL}$ között mutatott telítést a monocytákhoz való kötődésben, ezért a mérésekhez az 1 $\mu\text{g/mL}$ mAb koncentrációt választottuk. A tesztelt 5 különböző monocyta sejtszám mellett kapott sCD14 eredmények nem különböztek számottevően egymástól, ezért az áramlási citometriás kísérletekben általában használt, (megfelelő flow rate-et adó) $5 \times 10^6/\text{mL}$ mononukleáris sejt koncentrációt alkalmaztuk. Végül a standard görbe lineáris tartományát határoztuk meg a standard minta hígításainak segítségével. A 60bca antitest esetében ez 1,5%-12,5% NHS (29,5-246,2 $\mu\text{g/L}$ sCD14) volt. Ennek megfelelően az áramlási citometriás módszerrel még megbízhatóan kimutatható sCD14 koncentrációja 30 $\mu\text{g/L}$ volt. A mérendő szérum minták optimális hígítását is teszteltük. A 16x, 32x és 64x-es véghígításokat próbáltuk ki, és az ELISA eredménnyel legjobban a 64x-es véghígítás eredményei egyeztek, ezért ezt használtuk a későbbiekben.



8. ábra A sCD14 meghatározásához használt kalibrációs görbe elkészítése. A mononukleáris sejteket 6,4 mg/mL humán IgG jelenlétében inkubáltuk jégen 15 percig, majd egy ismert sCD14 tartalmú poolozott szérum különböző hígításaival (0,2-12,5%). Ezt követően az anti-CD14 mAb 60bca-t mértük be 1 μ g/mL koncentrációban, és 30 perces inkubáció következett. A sejtekhez kötődött mAb mennyiségét egy kecske anti-egér IgG-FITC konjugátum segítségével határoztuk meg. A monocyták azonosítása a fényszórási paramétereik és a CD14 pozitivitás alapján történt (A, Gate A). Minden mintában meghatároztuk a sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI), és ezt ábráztuk a szérum hígítás (sCD14 koncentráció) függvényében (kis ábra). A nagyobb ábra az egyes standard minták fluoreszcens histogramjait mutatja. A fluoreszcens histogrammok felett látható számok a standard szérum koncentrációit (%) jelzik (hígítatlan szérum: 100%).

A fent leírtak alapján az optimalizált protokoll a következő volt. A kompetícióhoz szükséges mononukleáris sejteket egészséges donorok heparinnal alvadásgátolt véréből ficoll-sűrűséggradiens (Histopaque-1077, Sigma) segítségével izoláltuk, majd a sejtszámot 5×10^6 /mL-re állítottuk be. A meghatározás további lépései alatt a mintákat jégen tartottuk, valamint Na-azid tartalmú oldatokat használtunk, hogy meggátoljuk a CD14 membrán turnover-t a monocytákon. $2,5 \times 10^5$ mononukleáris sejtet (50 μ L) 6,4 mg/mL humán IgG-vel (Human, Gödöllő, Magyarország) inkubáltunk 30 percig, hogy blokkoljuk a monocytákon lévő Fc-receptorokat. Ezt követően 50 μ L 32-szeresére hígított szérumot mértünk a sejtekhez. A standard görbét egy ismert sCD14 koncentrációjú (1969,3 μ g/L) kevert szérum 64-, 32-, 16- és 8-szoros véghígításai adták. A mintákat 15 percig inkubáltuk, majd 1 μ g/mL anti-CD14 mAb 60bca hozzáadása után újabb 30 perces inkubálás következett. Kétszeri mosás után a sejteket 30 percig 100 μ L 1:20 arányban hígított FITC-jelölt, kecske anti-egér IgG-vel inkubáltuk, majd 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mintákat Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométeren mértük és analizáltuk. A monocyták elkülönítése a FSC/FL1 dotploton történt (8A. ábra), mintánként 5.000 monocyta átlagos fluoreszcencia intenzitását mértük meg, és a kalibrációs görbe alapján kiszámoltuk a minták (53 egészséges kontroll személy és 23 SLS-s beteg) sCD14 koncentrációját.

A módszer optimalizálása során meghatároztuk a mérés intra- és inter-assay variációs koefficiensét (CV%) egy kontroll és egy SLE-s minta esetében. Egy kísérletben hétszer

határoztuk meg a sCD14 koncentrációt és a kontroll minta esetében 3,2%, míg az SLE-s betegek esetében 3,4% volt az intra-assay variabilitás. Az inter-assay CV% a kontrollnál 13,3%, az SLE-s betegnél 11,5% volt 5 mérési nap eredményei alapján.

Ismert sCD14 koncentrációjú (1.660,1 µg/L) minta visszamérhetőségét úgy vizsgáltuk, hogy összemértük az 1:32 arányban hígított kontroll szérum mintát és 80 µg/L koncentrációjú rekombináns sCD14-et (rsCD14, az ELISA kit komponense) 1:2 és 2:1 arányban. Mind a különálló komponensek, mind a keverékek esetében a visszanyerés 100-115% között volt.

Az áramlási citometriás módszer egyszerűsítése és gyorsítása végett a későbbiekben a közvetlen, phycoerythrinrel jelölt CD14 ellenes antitest, az anti-CD14 mAb MY4-PE használatát vezettük be, a kétlépéses indirekt jelölés helyett.

5.5. Laboratóriumi vizsgálatok

5.5.1. Rutin diagnosztikus laboratóriumi tesztek

A monocyták abszolút sejtszámát a Sysmex SF3000 hematológiai automatán (Sysmex Corporation, Kobe, Japán) mértük le, a szérum laktát-dehidrogenáz aktivitását Integra 700 kémiai automatával (Roche, Basel, Svájc) határoztuk meg. A szérum össz IgE koncentrációjának meghatározása a Modular E170 automata (Roche), míg az allergén-specifikus IgE koncentrációjának mérése a MAST CLA1 analízátor (Mountain View, CA, USA) segítségével történt. A szérum IgM reumafaktor (RF) meghatározása nefelometriával történt (reagensek: Dialab, Budapest, Magyarország; készülék: Cobas Mira Plus, Roche). Az RF értékeket >50 kU/L felett tekintettük pozitívnak. Az anti-CCP autoantitest szintek meghatározásához Immunoscan-RA CCP2 ELISA tesztet (Eurodiagnostica, Arnhem, Hollandia) használtunk és a 25 kU/L feletti értékeket tekintettük pozitívnak. A vesefunkció megítélése a szérum urea, kreatinin (Cobas Integra-800, Roche), és cisztatin C (BN-II nephelometer, Siemens, Marburg, Németország) meghatározások alapján történt. Az eGFR (mL/min/1,73 m²) értékeket a 4v-MDRD formula alapján kalkuláltuk.

5.5.2. Szérum tumormarker mérések

A tumormarkerek (CEA, CA 19-9, CA 15-3, CA 125, CA 72-4, NSE, Cyfra 21-1) meghatározását electrochemiluminescens immunoassay segítségével végeztük (Modular E170, Roche). A HE4 mérése egy kemilumineszcens mikropartikula-erősített immunoassay segítségével történt (Architect, ABBOTT, Wiesbaden, Germany). A TPA és

TK meghatározását egy chemiluminescens immunoassay (Liason, DiaSorin, Saluggia, Olaszország) segítségével végeztük. A referencia tartomány felső határa ezekben az esetekben a következő volt: CEA 3,4 µg/L, CA 19-9 34 kU/L, CA 15-3 25 kU/L, CA 125 35 kU/L, CA 72-4 6,9 kU/L, NSE 16,3 µg/L, TPA 75 U/L, TK 26,3 U/L, HE4 premenopausában 70 pmol/L, posztmenopausában 140 pmol/L. Ezen értékek alapján döntöttük el, hogy egy minta pozitív vagy negatív egy tumormarkerre, és ebből kalkuláltuk az adott markerre pozitív betegek és kontrollok arányát.

5.5.3. Csontanyagcsere vizsgálata

A plazma 25-OH-D-vitamin szintjét egy Jasco nagynyomású folyadékkromatográfiás készülék (HPLC) segítségével mértük (Jasco, Tokyo, Japan) Bio-Rad reagens kitéket alkalmazva (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A szérumban parathormon (PTH), osteocalcin (OC), keresztkötött I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTX-I) és I. típusú prokollagén N-terminális propeptid (PINP) értékeit electrochemiluminescens immunoassay segítségével határoztuk meg (Modular E170, Roche). A szérumban sclerostin szint meghatározása ELISA (Biomedica GmbH, Wien, Austria) segítségével történt. A 25-OH-D-vitamin esetében a 75 nmol/L alatti értékeket tekintettük csökkentnek (D-hipovitaminózis).

A csontdenzitás (bone mineral density; BMD) mérését LUNAR Prodigy (GE-Lunar Corp., Madison, WI, USA) denzitométer segítségével végeztük. A BMD meghatározása az L1–L4 lumbális csigolyákon (LS) és a femur nyakon (FN) történt és az eredményt T-score-ban adtuk meg. Ennek kiszámolásához a legmagasabb csonttömeggel bíró fiatal férfiak csontdenzitásából átlagot és standard deviációt kalkulálnak és egy adott személy esetében mért BMD-t az alapján határozzuk meg, hogy hány SD-vel tér el ettől az átlagtól. (A populációs átlag és szórás értékét a gyártó adta meg.) Az osteopenia és osteoporosis definiálása az aktuális WHO klasszifikáció alapján történt [303].

5.5.4. Akut fázis fehérjék koncentrációjának mérése

Az analíziseket fagyasztva tárolt szérummintákon (-70°C) végeztük. A CRP szinteket egy Integra 700 automatával (Roche) mértük. A PCT meghatározás „two-site” immunoluminometriás esszével történt Liaison analízátorral (DiaSorin). Az LBP és sCD14 koncentrációját egy-egy ELISA segítségével határoztuk meg (Hycult Biotechnology, Uden, Hollandia és Quantikine, R&D Systems). A mintákat ugyanazon a lemezen, duplikátumban vizsgáltuk és átlagot számoltunk. Az alsó szenzitivitási határ az egyes

analitok esetében a következő volt: 0,1 mg/L – CRP, 0,1 µg/L – PCT és LBP, és 0,125 µg/L – sCD14.

5.5.5. Anti-mikrobiális antitestek mérése

Az ASCA IgG, IgA és az anti-OMP Plus IgA antitestek mérése gyári ELISA kiték segítségével történt (QUANTA Lite; INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) a gyártó útmutatásainak megfelelően. Az eredményt mesterséges egység (unit) formájában adtuk meg és a pozitivitási küszöb 25 U/mL volt.

5.5.6. Az Anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata

5.5.6.1. Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens technikával

Az antitestek szemikvantitatív meghatározása az EUROIMMUN cég (Lübeck, Németország) etanol, illetve formalin fixált granulocytákat tartalmazó biochipjeinek segítségével történt. A lemezen lévő granulocytákat a betegek szérumával (1:10 hígítás PBS-sel) inkubáltuk együtt, majd a megkötött ANCA detektálása FITC-cel jelzett anti-humán IgG, illetve IgA másodlagos antitest segítségével történt. A lemezek értékelését egy EUROStar II Plus mikroszkóppal (EUROIMMUN) végeztük 400x-os nagyítást alkalmazva. Az immunfluoreszcens eredmény értékelése az etanol- és formalin-fixált granulocytákon kapott mintázatok alapján történt [96,368]: c-ANCA, p-ANCA, atípusos p-ANCA. Az 1:10 hígításban kapott pozitív szignál esetén tekintettük a mintát pozitívnak, és az ANCA-titer meghatározása ezekben a mintákban sorozat hígítással (hígítási faktor 3,2x) történt.

5.5.6.2. Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhosisos betegekben

Az IIF technikával pozitívnak talált minták esetében meghatároztuk az IgA₁ és IgA₂ alosztályú ANCA arányát, illetve a szekretoros komponenst hordozó IgA ANCA mennyiségét. A vizsgálathoz az EUROIMMUN etanollal fixált granulocytákat tartalmazó lemezeit használtuk. A sejteket az IgA ANCA-t tartalmazó minták 1:10-es hígításával inkubáltuk, majd az IgA alosztályok, illetve szekretoros komponens detektálása 3 specifikus antitesttel (anti-humán IgA₁ NI69-11; anti-humán IgA₂ NI512 és anti-humán sIgA NI194-4; Acris Antibodies, Herford, Németország), egymástól függetlenül történt. A fluoreszcens detektáláshoz FITC-cel jelölt anti-egér IgG másodlagos antitestet használtunk (1:100 hígítás; DAKO). Az IgA₁ és IgA₂ ANCA antitestek mennyiségének meghatározása

egy image analízis alapú kvantitálási technika segítségével történt, egyetlen mintahígítást tesztelve.

A lemezeket egy MicroOptix MX 300 TF (West Medica, Perchtoldsdorf, Ausztria) mikroszkóp segítségével 400x-os nagyítást használva értékeltük ki. A fluoreszcens képeket 32-bites ".bmp" formátumban egy MicroOptix/Vision CAM V330 kamera segítségével rögzítettük az SB Video&Audio AV Grabber (West Medica) program segítségével. Egy zöld háttér lemezt is exponáltunk minden mérési napon a megvilágítási erősség és inhomogenitás korrigálására. A képeket az "ImageJ 1.46r" szoftver segítségével értékeltük [369], és a zöld csatornán mért fluoreszcencia intenzitást mesterséges egységekben (AU) fejeztük ki. Minden mezőben 20 db egyedi granulocita fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg, és ezekből átlag $\pm$ SD értéket számoltunk. Minden tesztelt szérum esetében 3 átlag AU értéket határoztunk meg az IgA₁, IgA₂ és a sIgA paramétereknek megfelelően.

Az anti-IgA₁ és anti-IgA₂ antitestekkel kapott szignálok összehasonlíthatósága végett Quantum Simply Cellular beadek (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA) segítségével standardizáltuk a mikroszkópos kvantitálás technikáját. Ezek a beadek ismert számú kecske anti-egér antitestet tartalmaznak a felszínükön, és megfelelő telítő koncentráció esetén ennyi antitest megkötésére képesek. A vizsgálat során az indirekt immunfluoreszcens jelölésnek megfelelően anti-IgA₁ és IgA₂ antitesteket majd a GaM-FITC konjugátumot adtuk a beadekhez. Ezután a tárgylemezre cseppentve a fentiekben leírtaknak megfelelően értékeltük a beadek fluoreszcencia intenzitását. A 172.200 kötőhelyet tartalmazó beadek esetében a fluoreszcencia intenzitás $44,6 \pm 8,2$ volt az IgA₁ és $48,4 \pm 10,4$ az IgA₂ antitestek jelenlétében, míg 490.500 kötőhelyet tartalmazó beadek esetén $100,0 \pm 12,2$ (IgA₁) és $103,2 \pm 9,7$ (IgA₂) volt a szignál. Ezek a különbségek az IgA₁ és IgA₂ antitestek között nem voltak szignifikánsak. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy rendszerünkben az IgA₁ és IgA₂ típusú ANCA egyenlő mennyiségben egyforma fluoreszcens szignált ad, így a kapott szignál intenzitások hányadosa közvetlenül megadja az IgA₁/IgA₂ antitestek arányát a mintáinkban.

A módszer reprodukálhatóságát (intra- és inter-assay variabilitás) 5-5 mérés alapján teszteltük. Az intra-assay CV% 8,0%, 5,6% és 10,2%, míg az inter-assay CV% 10,4%, 14,9% és 13,2% volt az IgA₁, IgA₂ és a szekretoros IgA komponens esetében.

A szekretoros komponens pozitívításának megítélésére egy fluoreszcencia küszöbértéket határoztunk meg 40 kontroll minta mérése alapján: az átlag +3 SD ebben a csoportban 23,4 AU fluoreszcencia intenzitás volt.

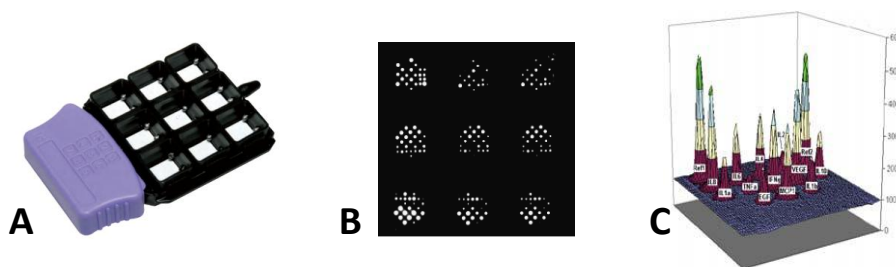
5.5.6.3. Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával

Az anti-MPO IgA és anti-Proteinase 3 IgA antitestek mennyiségét az indirekt immunfluoreszcens technikával IgA pozitívnak bizonyult mintákban határoztuk meg kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-k (QUANTA Lite; INOVA Diagnostics) segítségével. Az eredményeket OD-ban adtuk meg. Az anti-MPO és anti-PR3 pozitivitás küszöb OD értéke 0,159 és 0,140 volt, amit 92 egészséges kontroll mintáiban mért átlag+3SD kalkulálás alapján határoztunk meg.

5.6. A QP300 array analitikai vizsgálata és tesztelése tüdő tumoros betegek mintáin

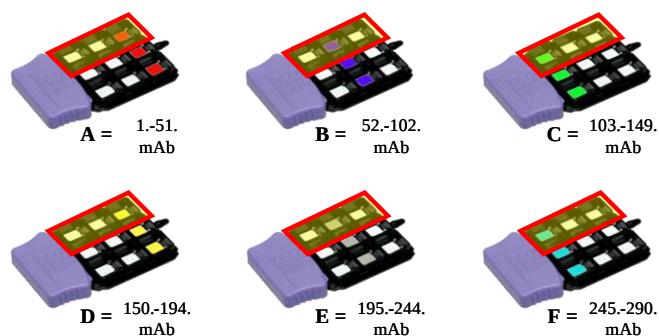
A QP300 kit, egy monoklonális antitest (mAb) alapú fehérje microarray, ami 290, különböző plazmafehérjén található, immunogén epitóp egyidejű felismerésére és kvantitálására képes. Az array alapvetően egy kompetitív immunoassay. A mAb-ok (290 db) 9x9 mm-es kerámia chipkezekhez kötöttek (9A. ábra), melyből 3x3 helyezkedik el 1 rackben. A meghatározás során egy biotinnal jelölt plazma fehérje „tracer” verseng a mintában lévő fehérjékkel a mAb-okhoz való kötődésért. A bekötődött „tracer” mennyiségét egy streptavidin-peroxidáz konjugátum és kemilumineszcens szubsztrát segítségével határozzuk meg. Minél nagyobb az adott plazma protein epitóp mennyisége a vizsgált plazmában annál kisebb jelintenzitást kapunk.

Az inkubálási protokoll végén, a szubsztrát hozzáadása után az Evidence Investigator (Randox, Crumlin, Írország) készülékben lévő CCD kamera segítségével készítünk képeket minden egyes rackről (9 db chip)(9B. ábra), és egy analízáló szoftver segítségével történik meg az image-ek denzitálása és a fényintenzitás meghatározása (9C. ábra). A csak a plazma tracer jelenlétében („tracer only”) – kontroll vagy beteg plazma nincsen jelen – mért lumineszcencia adja a maximális jelintenzitást (RLU_{max}). A vizsgált plazmák jelenlétében mért fényintenzitást (RLU) az RLU_{max} értékhez hasonlítjuk minden egyes mAb esetében és RLU/RLU_{max}% értéket számolunk.



9. ábra A QP300 array működésének technikai részletei. Az antitestek 9x9 mm-es kerámia chipkezekhez kötöttek, melyből 3x3 helyezkedik el 1 rackben (A). A mérés végén CCD kamera készít felvételt minden egyes chipről, amelyen látszanak az egyes antitesteknek megfelelő "foltok" (B). Az analízáló szoftver ezek denzitását határozza meg (C) [370].

A QP300 kit 290 mAb-ot tartalmaz, melyek 18 chipen kerülnek kiosztásra, így egy 54 chipet tartalmazó QP300 kit 3 minta mérésére alkalmas, amelyből 1 a „tracer only” minta, az RLUMax meghatározásához (10. ábra)



10. ábra A QP300 kit antitest kiosztása. 1 minta összesen 18 chipet foglal el (piros keretben lévő chip), így egy kittel 3 minta (1 "tracer only" + 2 beteg/kontroll plazma) mérhető.

Vizsgálataink során első lépésben a QP300 array analitikai teljesítményét jellemeztük. A maximális jelintenzitás (RLUMax; csak a tracer van jelen, minta nem) megoszlását, inter-assay és lotok közötti variabilitását vizsgáltuk meg. Az inter-assay reprodukálhatóság esetén 56 független kísérletben mért RLUMax értéket vettünk figyelembe, és ebből számoltunk átlagot, szórást és CV%. A lot-to-lot variabilitás tesztelése során az 5068-as lot kitjeit 56 független kísérletben teszteltük, míg az 5263-es lot esetében 13 mérési nap kísérleteit analizáltuk. Minden kísérletben a „tracer only” minta egyszer lett lemerve és az 56, illetve 13 napi RLUMax értékekből átlagot, SD-t és CV%-ot számoltunk, és az átlagokat vetettük össze antitestenként.

A klinikai vizsgálatok során 46 tüdő tumoros beteg és 46 korban és nemből illesztett kontroll egyedi plazma mintáit mértük le egy plazmahígítást alkalmazva (300x). Az analízis során minden minta esetében meghatároztuk az RLU/RLUMax% értékét és ezt hasonlítottuk össze a betegek és a kontrollok között. A statisztikai analízis során a nagyszámú BSI marker (290 marker) miatt első lépésben arra törekedtünk, hogy ezek közül kiválasszuk a legjobbkat (5-10 marker) és a további analízisekbe csak ezeket vigyük. Erre a célra 2 technikát alkalmaztunk: i) Az adatok normalitásától függően párosítatlan t-próbát vagy Mann-Whitney U-tesztet használtunk, és $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett választottunk ki egy-egy antitestet a későbbi analízishez; ii) Random Forests analízis - ez 1000 db döntési fa generálásával és értékelésével rendezte sorba a BSI antitesteket. A leginformatívabb 5-10 marker került kiválasztásra. Ezt követően a legjobb BSI markerek RLU/RLUMax% értékeit, illetve a hagyományos rutin tumormarkerek,

valamint a CRP, albumin és totál protein értékeket vittük be egy bináris regressziós modellbe. A modell eredménye egyetlen paraméter, („ P ”), ami megadja, hogy mi a valószínűsége annak, hogy egy adott vizsgált egyén egészséges ($P < 0,5$) vagy daganatos ($P > 0,5$). Az analízis 3 féleképpen történt:

- 1., Csak a legjobb 5-10 BSI markert vittük be a modellbe.
- 2., A BSI markerek mellett a rutin tumormarkerek is belekerültek a modellbe.
- 3., A BSI markerek mellett a rutin tumormarkerek és a CRP, albumin és totál protein is belekerültek a modellbe.

Azt, hogy az egyes modellek mennyire helyesen sorolták be a betegeket és a kontrollokat a kapott „ P ” paraméter ROC analízisével határoztuk meg.

5.7. Molekuláris genetikai vizsgálatok

5.7.1. DNS izolálás

Az AML-es betegek esetében az FLT3 gén mutációinak vizsgálatához teljes vérből, végeztük el a DNS izolálást a „QIAmp DNA Blood mini kit” izoláló kit (QIAGEN) segítségével. A DNS minták koncentrációját és tisztaságát fotométerrel (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Amersham Biosciences California, USA vagy NanoDrop Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) határoztuk meg.

5.7.2. Az *FLT3* internal tandem duplication (ITD) kimutatása PCR és agaróz-, illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével

A FLT3 gén 14-15. exonját és a közöttük lévő intront amplifikáltuk. A PCR-hez használt primerek: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' és 5'-CTTTCAGCATTTTGACG-GCAACC-3' (BioScience kft., Budapest, Magyarország). A PCR mix (25 μ l) összetétele: 0,4 mM dNTP (Roche), 2,5 μ l AmliTaq Gold puffer (10x-es), 2 mM $MgCl_2$, 20 nM sense és antisense primer, 250 ng DNS és 1 U AmpliTaq Gold polymerase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). A PCR-t Veriti Thermal Cyclor (Applied Biosystems - LifeTechnologies) készülékkel végeztük: kezdeti hosszabb denaturáció: 94°C-on 12 perc - 1 ciklus; amplifikálás: denaturáció 94°C-on 30 másodperc majd primer annealing 56°C-on 1 perc majd lánchosszabítás 72°C-on 2 perc - 35 ciklus; végül terminális lánchosszabbítás 72°C-on 10 perc - 1 ciklus.

A PCR terméket 3%-os TBE-agaróz (Tris-Bórsav-EDTA; Lonza, Basel, Svájc), illetve 6%-os poliakrilamid gélen (BioRad, Hemel Hempstead, Egyesült Királyság) futtattuk meg. A gélre 10 μ l PCR terméket vittünk fel, melyhez 1 μ l 10x-es loading festéket adtunk. A

futtatás körülményei: 90 V, 1,5 óra. A PCR termékeket ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű sáv is látható az elektroforetogrammon.

5.7.3. Az *FLT3* internal tandem duplication (ITD) kimutatása fragmentanalízissel

A fragmentanalízis vizsgálatához lényegében az 5.7.2. pontban leírt PCR-t végeztük el kisebb módosításokkal. Az alkalmazott primerek közül a forward primer az 5' végén 6-FAM (VBC-Biotech, Bécs, Ausztria) fluoreszcens jelölést kapott. A PCR mixbe 10 mM MgCl₂ került, az alkalmazott DNS mennyiségét 100 ng-ra csökkentettük. A PCR protokollban a terminális lánchosszabbítás idejét növeltük 30 percre.

A PCR termék fragmentanalízise kapilláris elektroforézissel történt. Az analízishez szükséges 15 µl-es mixbe 1,0 µl PCR termék (8x-ra hígítva desztillált vízzel), 0,5 µl ROX-500 méret standard (2x-re hígítva desztillált vízzel, Life Technologies) és 13,5 µl formamid (Life Technologies) került. A formamidba felvett mintákat 2 percig 95°C-on inkubáltuk, majd jég között tartottuk legkevesebb 5 percig. Analízisig -20°C-on tároltuk a mixet.

A denaturált mixek analízise az ABI310 kapilláris elektroforézis készülékkel (Life Technologies) történt. A mérést/adatgyűjtést a GeneScan (Life Technologies), az analízist a GeneScan, illetve a PeakScanner szoftverek (Life Technologies) segítségével végeztük el. Az elektroforézis technikai paraméterei: kapilláris hossz: 47 cm, POP6 polimer (Performance Optimized Polymer 6; Applied Biosystems); futtatás 60°C-on, 15 kV-os feszültséggel; injektálás: 10 másodperc 2 kV; adatgyűjtés: 60 perc. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű csúcs is látható az elektroforetogrammon.

5.7.4. Az *FLT3* internal tandem duplication (ITD) kimutatása szekvenálással

Az 5.7.2. pontban leírt PCR termékének pontos bázissorrendjét bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg.

A PCR termék tisztítása Microcon ultrafiltrációs oszloppal (Amicon® Ultra – 0,5 ml, 30K; Millipore, Carrigtownhill, Írország) történt. A tisztítás után kb. 5-7 µL tisztított PCR termék állt rendelkezésünkre, melyhez 25 µL sterilizált desztillált vizet adtunk.

A tisztított PCR terméket egy szekvenáló PCR segítségével vizsgáltuk tovább a Life Technologies cég BigDye Terminator (v.3.1) kitjét alkalmazva. A szekvenáló PCR összeállítása a következőképpen történt: 8,0 µL tisztított PCR termék, 4,0 µL TRR, 4,0 µL TRR puffer (5x) és 4,0 µL forward vagy reverz primer (külön reakciókban). A PCR-t egy

Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems - Life Technologies) készüléssel végeztük: denaturáció 96°C-on, 30 másodperc; primer annealing 50°C-on, 15 másodperc; lánchosszabítás 60°C-on, 4 perc; - 25 ciklus.

A szekvenáló PCR során be nem épült dezoxi- és didezoxi-nukleotidok eltávolítására a QIAGEN DyEx Spin Kit-jét használtuk (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). A megtisztított terméket vákuumcentrifugában (Savant SpeedVac SC100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) teljesen beszárítottuk majd 15 µl formamidot (Life Technologies) mértünk a beszáradt mintákra, és szekvenálásig ebben a formában -20°C-on tároltuk azokat. A formamidban lévő mintákat közvetlenül szekvenálás előtt 3 percig 95°C-on inkubáltuk, majd azonnal jég közé raktuk és minimum 5 percig jégben tartottuk.

A szekvenálás ABI Prism 310 Genetic Analyzer készülékkel történt. A mérés során POP6 gélt használtunk. A szekvenálás technikai paraméterei: kapilláris hossz: 47 cm (50 µm átmérőjű); injektálás: 10 másodperc; futtatás, detektálás: 15,0 kV-os feszültség, 36 perc. Az adatgyűjtés és analízis a „ABI Prism™ Collection and Sequencing Analysis” 3.4.1 szoftver (Applied Biosystems - Life technologies) segítségével történt.

5.8. Statisztikai módszerek

A vizsgált numerikus paraméterek adatainak normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov vagy Shapiro-Wilk teszt segítségével ellenőriztük. A folytonos változókat átlag [SD] vagy medián [interkvartilis tartomány (IQR)] formában összesítettük a homogenitásuknak megfelelően. Normális eloszlást mutató folytonos változók esetében a kontroll és a különböző betegcsoportok adatait Student-féle két mintás t-próbával hasonlítottuk össze, míg a nem-normális eloszlású csoportok esetében Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. Párosított minták esetében (pl. pulzus-szteroid terápia előtt és után ugyanazon SLE-s beteg esetében) a meghatározott paraméterek közötti eltérést a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével analizáltuk. A kategórikus változókat Chi-négyzet teszttel vizsgáltuk, ahol szükséges volt, ott Yates korrekcióval. A folytonos változók egymással való kapcsoltságát Pearson vagy Spearman SRO teszttel ellenőriztük. Az egyes markerek határértékének és pontosságának vizsgálatát ROC görbével (szenszitivitás vs. 1-specificitás) analizáltuk.

A betegek infekciómentes, illetve teljes túlélését Kaplan–Meier túlélési görbék és LogRank, illetve Breslow teszt segítségével analizáltuk. Cox-regressziós analízist alkalmaztunk a kategórikus klinikai, illetve laboratóriumi paraméterek és a szignifikáns klinikai infekciók megjelenéséig eltelt idő közötti összefüggés feltárásához. Az asszociációkat "odds ratio" (OR), "likelihood ratio" (LR) vagy "hazard ratio" (HR) és ennek 95%-os konfidencia intervallumainak (CI) formájában adtuk meg.

A QP300 markerek, illetve a hagyományos tumormarkerek kompozit score-okká való összevonása során logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk. Kiszámú kiindulási paraméter esetén valamennyi markert belevittük a regressziós analízisbe, máshol Mann-Whiney U teszttel, t-teszttel vagy Random forests analízissel válogattuk ki a leghatékonyabb markereket és ezeket vittük a logisztikus regresszióba. A logisztikus regressziós analízist is kétféleképpen végeztük el: valamennyi analízisbe vitt marker beépült a végső képletbe ("enter" módszer) vagy csak azok a markerek, amelyek szignifikánsan javították egymás hatékonyságát ("forward" módszer).

A statisztikai számításokat Statistica for Windows, GraphPadPrism 5 (San Diego, CA, USA), SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) és az R (The R Foundation) szoftverekkel végeztük. A különbségeket $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

6. EREDMÉNYEK

6.1. SEJTASSZOCIÁLT BIOMARKEREK

A potenciális biomarkerek egy nagy csoportját alkotják a perifériás vérben lévő sejtek felszínén található molekulák. Ezek szélesebb körben elterjedt rutin alkalmazása a hematológiai malignómák sejtvonal elkötelezettségének, illetve érettségének jellemzése, de számos új lehetőség is felmerül ezzel kapcsolatban.

Az érett myeloid sejtek felszínén megtalálható CD14 fehérje – mint egy fajta mintázatfelismerő molekula – a legfontosabb LPS-koreceptor, mely jelentős szerepet játszik a monocyták, neutrophil granulocyták aktivációjában, és így potenciálisan szerepe lehet bizonyos immunmediálta kórképek kialakulásában, illetve aktivitásának változásában. Ennek tesztelésére munkánk során több betegcsoport esetében vizsgáltuk a CD14-expresszió és a klinikai kép közötti összefüggéseket, illetve a CD14-expresszió és a perifériás monocyták aktivitásának a változását ezekben a kórképekben.

6.1.1. A CD14-expresszió változásai immunpatomechanizmusú kórképekben

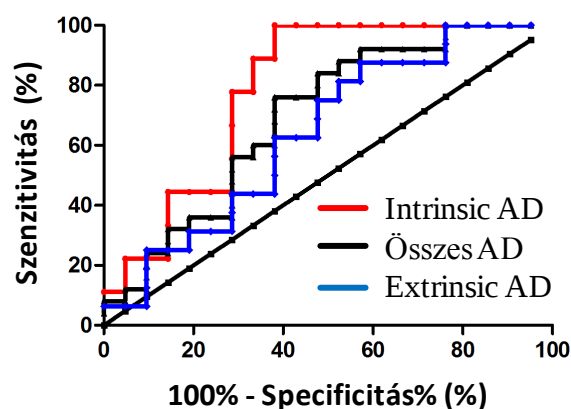
6.1.1.1. Atópiás dermatitis

Az atópiás dermatitis (AD) multifaktoriális, visszatérő vagy krónikus lefolyású, erős viszketéssel járó, immunmediált, gyulladásos bőrbetegség. Gyakorisága emelkedő tendenciát mutat, az iparilag fejlett országokban prevalenciája a gyerekek körében 10-20% [371-374]. Az atópiás dermatitisnek két fő variánsa ismert. A betegek 70-80%-ánál fordul elő az extrinsic AD, melyet a környezeti és/vagy ételallergénnel szembeni fokozott specifikus IgE-termelés, pozitív prick- és intrakután teszt jellemez. A betegek 20-30%-át érintő intrinsic variáns esetében a szérum totál és specifikus IgE koncentrációja nem emelkedett [31,371,373-375].

Az atópiára való hajlam öröklődik, az AD gyakran más atópiás betegségekkel (allergiás rhinitis, asthma) jár együtt. Az atópiás dermatitis pontos oka nem ismert, genetikai faktorok, az egyén immunrendszerének állapota, a bőr barrier funkciójának változása, fertőzések, valamint környezeti tényezők együttes hatása vezet a betegség létrejöttéhez. A bőr meggyengült védekezőképességére utal, hogy az AD-ban szenvedő betegek bőre különösen fogékony bizonyos típusú infekciókra. A *Staphylococcus aureus* például a betegek több mint 90%-ának bőrén detektálható. A természetes immunrendszer receptorainak mennyiségi és funkcionális változásai is fontos elemei lehetnek a védekezőképesség csökkenésének [31,373,374,376-380], így a CD14-molekula esetleges változásai is lényegesek lehetnek az AD-hez társuló infekciók létrejöttében.

Munkánk során a sejtfelszíni CD14-molekulák pontos számát határoztuk meg atópiás betegek monocytáin és granulocytáin egy áramlási citometriás módszer és kvantitálásra alkalmas beadek segítségével. Nem találtunk szignifikáns különbséget a betegcsoportok és kontrollok monocytáin kifejeződő CD14 molekulák számában, ugyanakkor a granulocyták CD14-expressziója valamennyi betegcsoport esetében magasabb volt, mint a kontroll csoportban, azonban ez a különbség csak az intrinsic AD-s és az összes AD-s beteg esetében volt szignifikáns (összes AD: 4.051 ± 1.127 , $p < 0,03$; intrinsic AD: 4.518 ± 783 , $p < 0,02$; extrinsic AD: 3.788 ± 1.225 , $p < 0,152$; kontrollok: 3.150 ± 1.318 molekula/sejt).

Bár az AD-s betegek bizonyos csoportjai és a kontrollok között szignifikáns különbség volt a granulocyták CD14-expressziójában kíváncsiak voltunk, hogy mennyire lehet alkalmas ez a marker a kontrollok és betegek elkülönítésére. Az elvégzett ROC analízis alapján a granulocyta CD14-expresszió mérsékelt hatékonysággal különítette el az összes AD-s beteget a kontrolloktól (ROC-AUC: 0,693, optimális szenzitivitás: 76,0% és specificitás: 61,9%), míg az intrinsic AD vs. kontroll összevetés már nagyobb effektivitást mutatott (ROC-AUC: 0,788, optimális szenzitivitás: 77,8% és specificitás: 71,4%) (11. ábra)



11. ábra A granulocyta CD14-expresszió hatékonysága az AD-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - Összes AD: 0,693 (95%CI: 0,536-0,851), $p=0,025$; Intrinsic AD: 0,788 (95%CI: 0,628-0,948), $p=0,014$; Extrinsic AD: 0,640 (95%CI: 0,461-0,819), $p=0,150$. AD: atópiás dermatitis.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a granulocyták fokozott CD14-expressziója jellemző az AD-s betegekre, ez azonban csak mérsékelt hatékonysággal tesz különbséget a betegek és kontrollok között.

6.1.1.2. Poly- és dermatomyositis

A polymyositis (PM) és a dermatomyositis (DM), az ismeretlen eredetű gyulladásos izombetegségek közé tartozó szisztémás autoimmun kórképek, melyek közös jellemzője a proximális végtagizmok immunmediált krónikus gyulladása, amely progresszív, szimmetrikus izomgyengeséghez vezet. A dermatomyositises betegeken típusos, gyulladásos bőrelváltozások is megfigyelhetők [371,381,382]. Bár a két betegség patomechanizmusa eltérő, a kóros immunfolyamatok mindkét esetben az izmok krónikus gyulladásához, az izomrostok pusztulásához, fibrózishoz vezetnek.

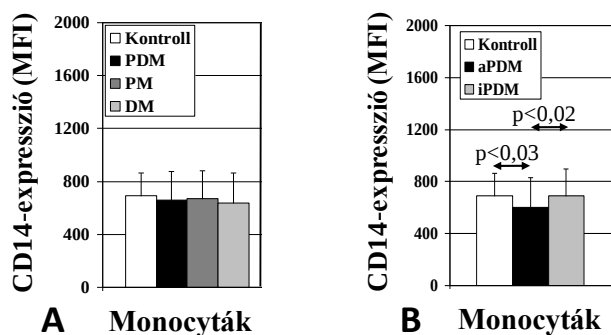
A PM/DM etiológiája még ma sem teljesen ismert. A betegség autoimmun eredetére utal az izomszövetet infiltráló mononukleáris gyulladásos sejtek jelenléte, különböző autoantitestek megjelenése, a myositis asszociációja más autoimmun betegségekkel, és az immunszuppresszív terápiára adott pozitív válasz is [381-383]. Valószínűleg genetikailag fogékony egyéneknél különböző külső környezeti és belső hatások kóros immunológiai folyamatok aktiválódását eredményezik, ami myositis kialakulásához vezet [381,383,384]. PM-ben a celluláris immunitás játssza a fő szerepet a gyulladás fenntartásában: a CD8-pozitív T sejtek, macrophagok és myeloid dendritikus sejtek infiltrálják az endomysiumot, és az aberránsan MHC-I-et expresszáló izomrostokat perforin közvetítésével károsítják. Dermatomyositisben is jellemző a CD4⁺ T sejtek, macrophagok, B és plazma sejtek jelenléte a perivascularis és perimisealis területeken, de a kóros, főként humorális immunfolyamatok az intramuscularis microvasculatura endotheliuma ellen irányulnak (komplement mediálta sejtkárosodás). A krónikus gyulladás kialakulásában és fenntartásában a citokin hálózat átrendeződése is fontos szerepet játszik; a B sejt aktiváló faktor (BAFF), TNF α , IFN- β , IFN- γ , IL1- β , IL-6, IL-17 és IL-22 szignifikáns változásait írták le a különböző myositises kórképekben [384,385].

A CD14 és a TLR-ek fontos szerepet játszanak a perifériás leukocyták és antigén bemutató sejtek aktiválásában, a gyulladásos folyamatok és az antigénspecifikus immunválasz beindításában [32,41,42,384-388]. Különböző autoimmun kórképekben megváltozott mCD14-expressziót, sCD14 koncentrációt és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megváltozott genotípus eloszlását figyelték meg, ami arra utal, hogy az autoimmun betegségek kialakulásában, lefolyásában is szerepet játszhatnak ezek a receptorok [43,50,53]. Munkánk során arra kerestünk választ, hogy a CD14 molekulát érintő változások befolyásolhatják-e a poly- és dermatomyositis kialakulását és a betegség lefolyását.

A PM-es és DM-es betegek monocytáinak CD14-expresszióját áramlási citométerrel és indirekt jelöléssel vizsgáltuk, és nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és kontrollok sejtfelszíni CD14 számában. Mivel a vizsgált paraméterben nem találtunk

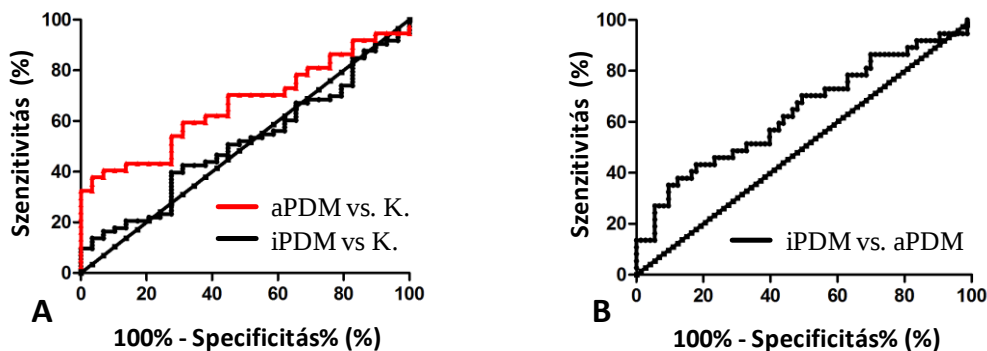
szignifikáns eltérést a polymyositisben és dermatomyositisben szenvedő betegek között sem (12A. ábra), ezért az összes myositises beteget egy homogén – PDM elnevezésű - betegcsoportba tartozóként kezeltük.

A betegeket ezután a betegségük aktivitása alapján osztottuk két csoportra, melyet a klinikai tünetek és a laboratóriumi paraméterek figyelembevételével határoztunk meg. A monocyták CD14-expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az aktív betegekben az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva (aPDM-MFI: $601,6 \pm 227,0$; iPDM-MFI: $690,7 \pm 204,1$, $p < 0,02$; Kontroll-MFI: $693,3 \pm 172,0$, $p < 0,03$) (12B. ábra). Ezek alapján tehát, a CD14-expresszió csökkenése a myositis aktivitási markerének is tekinthető; és valóban a monocyták CD14-expressziója és – a betegség aktivitásának egyik markere – a szérumban a laktát-dehidrogenáz aktivitás között szignifikáns negatív korrelációt tudunk kimutatni ($R = -0,295$, $p < 0,002$).



12. ábra A monocyták CD14-expressziójának összevetése polymyositis és dermatomyositis betegek, valamint egészséges kontrollok mintáiban (A). A monocyták CD14-expressziójának összefüggése a betegség aktivitásával poly/dermatomyositisben (B). A CD14-expressziót áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg perifériás teljes vérmintát használva, a sejt felszíni receptorszámot átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékben fejeztük ki. PM: polymyositis, DM: dermatomyositis, PDM: PM és DM együtt, aPDM: aktív PDM, iPDM: inaktív PDM.

A CD14-expresszió diagnosztikus hatékonyságát is megvizsgáltuk ROC analízis segítségével. Az aktív PDM csoportot a kontrollokhoz viszonyítva magasabb ROC-AUC értéket (AUC: 0,665) kaptunk, mint az inaktív myositises betegek vs. kontrollok összevetésben (AUC: 0,512) (13A. ábra). Hasonló volt az aktív és inaktív PDM-es betegek megkülönböztetésének hatékonysága is (AUC: 0,638) (13B. ábra).



13. ábra A monocyta CD14-expresszió hatékonysága az aktív és inaktív PDM-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - aPDM vs. Kontroll: 0,665 (95%CI: 0,535-0,796), $p=0,023$; iPDM vs. Kontroll: 0,512 (95%CI: 0,392-0,631), $p=0,86$; iPDM vs. aPDM: 0,638 (95%CI: 0,524-0,752), $p=0,018$. PDM: polymyositis és dermatomyositis csoportok együtt. aPDM: aktív PDM, iPDM: inaktív PDM.

Megállapíthatjuk, hogy a monocyták CD14-expressziójának csökkenése összefüggést mutat a betegség aktivitásával poly- és dermatomyositisben, így mérsékelt hatékonyságú aktivitási markerként szolgálhat.

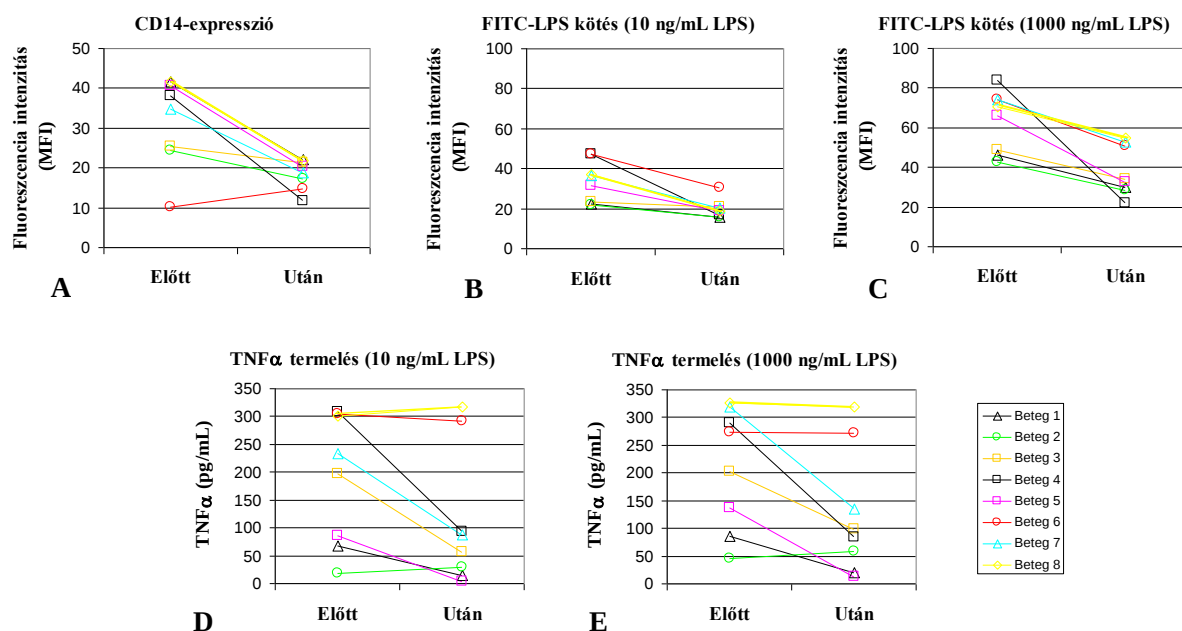
6.1.1.3. A CD14-expresszió és funkció változásai SLE-s betegek monocytáin glükokortikoszteroid terápia hatására

Az SLE ismeretlen eredetű, több szervet érintő, változatos tüneteket okozó, szisztémás, gyulladásos autoimmun betegség. SLE-ben az immunrendszer regulációjának komplex zavara alakul ki; mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszer komponensei érintettek. A patomechanizmus lényeges elemei a saját antigénnel szembeni tolerancia áttörése, patogén autoantigének megjelenése, a sejt- és szövet-törmelékek eltakarításának zavara, melyek autoreaktív T-sejtek képződéséhez, majd T-sejt dependens, illetve independens módon poliklonális B-sejt aktivációhoz és az autoantitestek széles spektrumának termeléséhez vezetnek. Az SLE-re karakterisztikus a sejtmag alkotórészek ellen irányuló autoantitestek termelődése. Az autoantitestek egy része direkt módon is károsíthatja a sejteket, szöveteket, de a patogenezis szempontjából fontos mechanizmus az antigén-antitest komplexek képződése és lerakódása is, és ezek által az érintett szövetek és szervek destruálása. Emellett a szövetekben lévő T és B sejtek, valamint myeloid elemek aktiválódása is fontos komponense lehet a szervkárosodásnak. Jellemző az SLE-re a citokin hálózat átrendeződése is: a BAFF, $TNF\alpha$, $IFN-\alpha$, $IL1-\beta$, $IL1RA$, $IL-2$, $IL-6$, $IL-10$, $IL-17$, $IL-22$ és $IL-37$ szignifikáns változásait írták le ebben a kórképekben [31,371,389-392].

Az SLE terápiájának célja az autoimmun reakciók visszaszorítása, az inaktív stádium elérése és fenntartása, a szervkárosodások lehetőség szerinti megelőzése és mérséklése. A kezelés intenzitását a betegség aktivitása és a szervi tünetek súlyossága határozza meg. Enyhe tünetek esetén elegendő lehet nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID), bőrtünetek esetén helyi kezelés és fényvédők használata. Aktív stádiumban intenzívebb kortikoszteroid terápia javasolt, ami az aktivitás csökkenése után mérsékelhető, illetve elhagyható. Súlyos esetekben, illetve a terápia refrakter betegeknél lökés szteroid terápia használható. Citosztatikumokkal (pl.: bolus cyclophosphamid, methotrexat) való kezelés súlyos vese-, illetve idegrendszeri érintettség esetén javasolt. További terápiás lehetőséget jelenthetnek egyéb immunszuppresszáns szerek: chloroquine származékok, intavénás immunglobulin készítmények, calcineurin inhibitorok, mycophenolate mofetil és az újabb biológiai terápiák (pl. rituximab, belimumab, epratuzumab) [31,392,393].

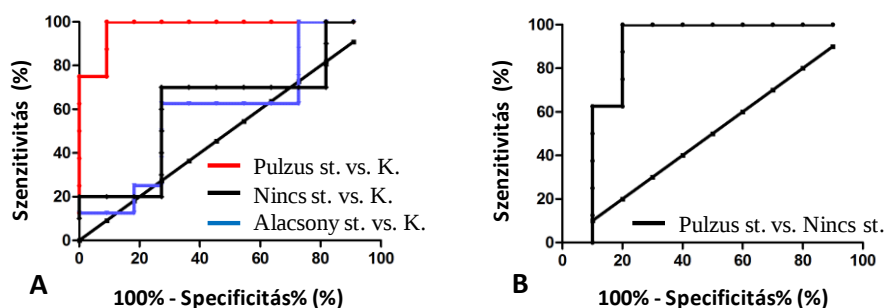
Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy a CD14-expresszió mérése lehet-e markere az SLE aktivitásának, illetve, hogy a leggyakrabban alkalmazott kortikoszteroid terápia hatása követhető-e a CD14-expresszió meghatározásával.

A különböző koncentrációjú kortikoszteroidokkal *in vivo* kezelt SLE-s betegek monocytáinak CD14-expresszióját közvetlenül jelölt CD14 ellenes monoklonális ellenanyag (LeuM3-PE) és áramlási citométer segítségével határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy az SLE-s betegek esetében minimális - nem szignifikáns - CD14-expresszió csökkenés volt megfigyelhető a kontrollokhoz képest, ami a betegség aktivitásának fokozódásával sem változott számottevően. A sejtfelszíni CD14 molekulák számában szignifikáns különbség csak a pulzus terápiában részesült betegek (MFI=18,4±3,8) és a többi csoport adatai között észleltünk (szteroidmentes, inaktív SLE: MFI=33,1±12,4, $p<0,01$; kis dózisú szteroid, aktív SLE: MFI=32,1±11,2, $p<0,02$; kontroll: MFI=39,1±13,4, $p<0,001$). Ha a pulzus szteroid terápia előtti és utáni értékpárokat Wilcoxon-féle párosított teszttel hasonlítottuk össze szintén szignifikáns ($p<0,03$) CD14-expresszió csökkenést tudtunk kimutatni (14A. ábra).



14. ábra Az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expressziója (A), CD14-függő FITC-LPS kötése (B,C) és CD14-függő LPS-stimulálta TNF α szekréciója (D,E) a pulzus szteroid terápia előtt és után. A CD14-expresszió mérése áramlási citometria és direkt sejtfelszíni jelölés segítségével történt. A FITC-LPS (10 és 1000 ng/mL) kötődését 4% humán szérum jelenlétében vizsgáltuk, áramlási citometria segítségével. A CD14-expresszió és FITC-LPS kötés mértékét átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékben fejeztük ki. Az izolált monocytákat 10 és 1000 ng/mL LPS és 4% szérum jelenlétében inkubáltuk 16 órán keresztül, majd a sejtek felülszójában a TNF α mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg. A sejtek egy részét 10 μ g/mL gátló anti-CD14 mAb (60bca) jelenlétében inkubáltuk, ez adta a CD14-független LPS kötés és TNF α termelés mennyiségét. Ezt levonva a totál LPS kötés és TNF α szekréció (nincs gátló antitest) mértékéből adja meg a CD14-függő paramétereket. Az ábrán ez utóbbiakat mutatjuk be.

ROC analízissel összevetve a kontrollok és SLE-s betegcsoportok értékeit a CD14-expresszió diszkriminatív hatékonysága minimális volt az inaktív SLE (ROC-AUC: 0,618) és az aktív, alacsony dózisú szteroid terápiaiban részesülő SLE (ROC-AUC: 0,602) csoportok esetében. Ugyanakkor magas ROC-AUC értéket kaptunk a pulzus szteroid kezelt betegek és az egyéb csoportok összevetése során (ROC-AUC: 0,863-0,977) (15. ábra).

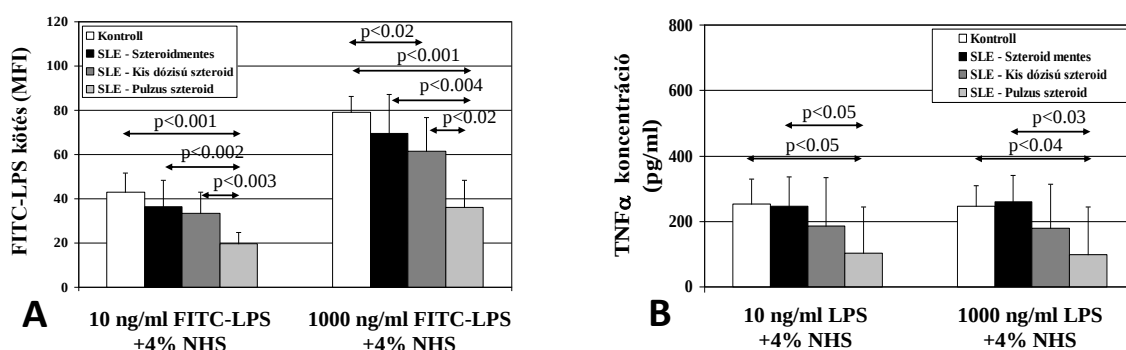


15. ábra A monocyta CD14-expresszió hatékonysága a szteroid terápiaiban részesülő SLE-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - Nincs szteroid vs. Kontroll: 0,618 (95%CI: 0,363-0,873), $p=0,36$; Alacsony dózisú szteroid vs. Kontroll: 0,602 (95%CI: 0,335-0,869), $p=0,46$; Pulzus szteroid vs. Kontroll: 0,977 (95%CI: 0,921-1,034), $p=0,0005$ (A). Pulzus szteroid vs. Nincs szteroid: 0,863 (95%CI: 0,666-1,059), $p=0,01$ (B). st: szteroid, K: kontroll.

A CD14-expresszió változásai a perifériás monocytákon és granulocytákon tehát, jellemzőek lehetnek bizonyos kóros állapotokra. Ugyanakkor érdekes kérdés az, hogy ennek a változásnak van-e hatása ezen sejtek különböző funkcióira. Ennek megválaszolására a szteroid terápia hatására csökkent CD14-expressziót mutató monocyták LPS-kötését és LPS-indukálta aktivációját vizsgáltuk meg.

A sejtfelszíni CD14 ligandkötését SLE-s betegek monocytáin FITC-cel jelölt LPS és áramlási citométer alkalmazásával vizsgáltuk. A CD14-függő és független LPS kötést egy olyan CD14 ellenes monoklonális antitest (60bca) segítségével határoztuk meg, amely gátolja az LPS CD14-hez való kötődését. Az antitest jelenlétében a CD14-független kötődés, míg hiányában a totál kötés mérhető, és a kettő különbsége adja meg a CD14-mediálta LPS-asszociációt. Akár 10, akár 1000 ng/mL FITC-LPS-t használtunk a jelöléshez az SLE-s betegek monocytáinak CD14-függő LPS kötése csökkent az *in vivo* alkalmazott szteroid dózis emelkedésével. A változás szignifikáns volt a kontrollok és a pulzus, illetve a kis dózisu szteroid terápiában részesült betegek adatai között, ugyanakkor nem találtunk eltérést, ha a kontrollok és a szteroid terápiában nem részesült SLE-s betegek eredményeit vetettük össze. Pulzus szteroid terápia után a betegek monocytáinak CD14-függő LPS-kötése szignifikánsan alacsonyabb volt, mint kis dózisu terápia esetén, illetve terápia nélkül (16A. ábra).

Szignifikáns különbségeket észleltünk a CD14-függő LPS kötést illetően, amikor Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével a pulzus szteroid kezelésben részesült SLE-s betegek terápia előtti és utáni értékpárjait hasonlítottuk össze a (10 ng/mL LPS: $p < 0,02$; 1000 ng/mL LPS: $p < 0,02$) (14B,C. ábra).



16. ábra Az SLE-s monocyták CD14-mediálta LPS-kötése és TNFα szekréciója a szteroid dózis függvényében. A FITC-LPS (10 és 1000 ng/mL) kötődését 4% humán szérum jelenlétében vizsgáltuk, áramlási citometria segítségével, a kötődés mértékét átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékben fejeztük ki (A). Az izolált monocytákat 10 és 1000 ng/mL LPS és 4% szérum jelenlétében inkubáltuk 16 órán keresztül, majd a sejtek felülúszójában a TNFα mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg (B). A sejtek egy részét 10 μg/mL gátló anti-CD14 mAb (60bca) jelenlétében inkubáltuk, ez adta a CD14-független LPS kötés és TNFα termelés mennyiségét. Ezt levonva a totál LPS kötés és TNFα szekréció (nincs gátló antitest) mértékéből adja meg - az itt bemutatott - CD14-függő paramétereket (A,B).

A kontrollok és az SLE-s betegek monocytáinak CD14-függő aktivációját az LPS kötéshez hasonló módon határoztuk meg a sejtek által termelt TNF α mérésével. A kontroll csoporthoz viszonyítva a pulzus, illetve a kis dózisú szteroid kezelésben részesült betegek LPS-indukálta TNF α termelése alacsonyabb volt, de ez az eltérés csak a pulzus terápiában részesültek esetén volt szignifikáns. A pulzus terápiás betegekben mért értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kezeletlen betegekéhez képest is (16B. ábra).

Amennyiben a terápia előtti és utáni értékpárokat Wilcoxon-féle párosított tesztel hasonlítottuk össze, szignifikáns különbséget tapasztaltunk a monocyták pulzus terápia előtti és utáni CD14-függő TNF α szekréciójában (10 ng/mL LPS: $p < 0,05$; 1000 ng/mL LPS: $p < 0,04$) (14D,E. ábra).

A CD14-expresszió csökkenése nem tűnik aktivitási markernek SLE-ben, de jól követi a nagy dózisú kortikoszteroid terápia hatását, és potenciálisan alkalmas lehet ennek a monitorozására. A pulzus szteroid kezelés hatására bekövetkező CD14 receptor szám csökkenést az SLE-s monocytákon csökkent LPS-indukálta sejttaktiváció kíséri.

6.2. SZOLUBILIS BIOMARKEREK

A biomarkerek rutin diagnosztikai alkalmazásának legjelentősebb területe a vérben-plazmában-szérumban keringő, illetve egyéb testnedvekben lévő molekulák jelenlétének kimutatása vagy mennyiségének meghatározása. Ezeknek a szolubilis markereknek a száma igen nagy, és a plazmában nagy, közepes és kis koncentrációban előforduló molekulák is ebbe a csoportba sorolhatóak. Vizsgálataink során ismert és újabb molekulák, akut fázis fehérjék (CRP, PCT, LBP, sCD14), specifikus antitestek (ANCA), tumormarkerek (HE4, CA 125, TPA, CEA, Cyfra 21.1, TK, NSE) és csontanyagcsere markerek (D-vitamin, sclerostin) diagnosztikai jelentőségét tanulmányoztuk különböző kóros állapotokban. Ezen szérum paraméterek egy részénél nagy szerepe lehet bizonyos preanalitikai megfontolásoknak is. Erre mutatunk példát a HE4 tumormarker és a sclerostin csontmarker esetében.

6.2.1. A szérum sCD14 koncentrációjának mérése különböző immunpatomechanizmusú kórképekben

A korábban tárgyalt membrán-expresszált forma mellett a CD14 molekulának szolubilis formája (sCD14) is létezik, melynek koncentrációja az egészséges emberi szérumban 1-5 mg/L, de akut gyulladás esetén 3-4-szeresére emelkedik a szintje [32,43-46], pozitív akut

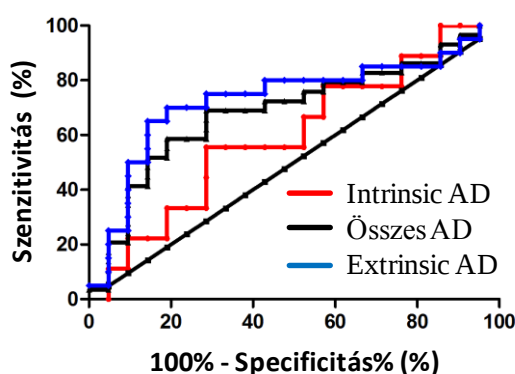
fázis fehérjének tekinthető. Több olyan fertőzőes, krónikus gyulladással járó, autoimmun és atópiás-allergiás betegség is ismeretes, ami a mCD14 és a szérumban található sCD14 szintek megváltozásával jár [32,43-46,49-54].

Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy bizonyos immunpatomechanizmusú kórképekben mutat-e változást a szérumban sCD14 szintje.

6.2.1.1. Atópiás dermatitis

A 6.1.1.1. alatt vizsgált kontroll és betegcsoport esetében a sejtfelszíni CD14-expresszió mellett megvizsgáltuk a szérumban sCD14 koncentrációját is az általunk kidolgozott, kompetíción alapuló, áramlási citométeres módszer segítségével. Valamennyi betegcsoportban alacsonyabb sCD14 szintet mértünk a kontrollokhoz képest, azonban a különbség csak az összes AD-s beteget egyesítő csoportban, valamint az extrinsic AD-s betegek csoportjában volt szignifikáns (összes AD: $1.119,9 \pm 372,5$ $\mu\text{g/L}$, $p < 0,03$; extrinsic AD: $1.084,2 \pm 407,9$ $\mu\text{g/L}$, $p < 0,02$; intrinsic AD: $1.199,2 \pm 283,0$ $\mu\text{g/L}$, $p = 0,36$; kontrollok: $1.334,4 \pm 385,7$ $\mu\text{g/L}$).

Itt is megvizsgáltuk, hogy a sCD14 szint mennyire lehetne hatékony biomarker az AD-s betegek azonosítására. A ROC analízis azt mutatta, hogy a szérumban sCD14 koncentráció mérsékelt hatékonysággal különítette el az összes AD-s beteget a kontrolloktól (ROC-AUC: 0,690, optimális szenzitivitás: 69,0% és specifitás: 71,4%), míg az extrinsic AD vs. kontroll összevetés valamivel nagyobb effektivitást mutatott (ROC-AUC: 0,731, optimális szenzitivitás: 70,0% és specifitás: 81,0%) (17. ábra)



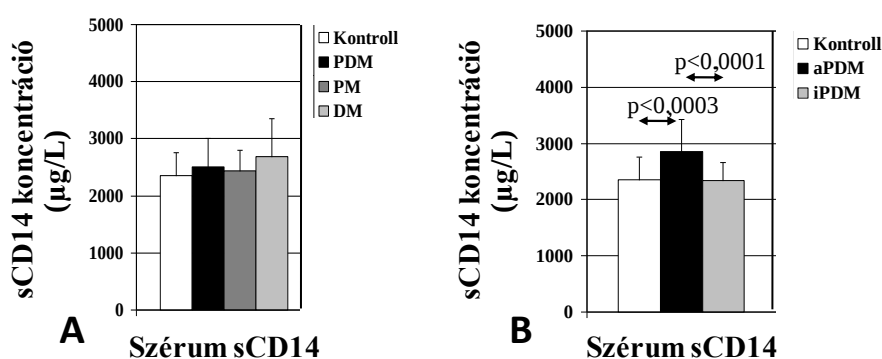
17. ábra A szérumban sCD14 hatékonysága az AD-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - Összes AD: 0,690 (95%CI: 0,540-0,840), $p = 0,023$; Intrinsic AD: 0,598 (95%CI: 0,376-0,820), $p = 0,403$; Extrinsic AD: 0,731 (95%CI: 0,566-0,896), $p = 0,011$. AD: atópiás dermatitis.

A csökkent szérumban sCD14 szint jellemző az AD-s betegekre, ez azonban csak mérsékelt hatékonysággal tesz különbséget a betegek és kontrollok között.

6.2.1.2. Poly- és dermatomyositis

A 6.1.1.2. alatt jellemzett kontroll és myositises betegcsoporton a sejtexpresszált CD14 mellett megvizsgáltuk a szérumban sCD14 szint változásait is. Első lépésként a PM-es és a DM-es betegcsoportokat hasonlítottuk össze; a szérumban sCD14 koncentrációját a kompetíciós alapú áramlási citometriás módszerrel mértük meg. Nem találtunk szignifikáns különbséget a két betegcsoport és a kontrollok szérumban sCD14 koncentrációiban, ezért a későbbiekben az összes myositises beteget egy homogén – PDM elnevezésű - betegcsoportba vontuk össze (18A. ábra).

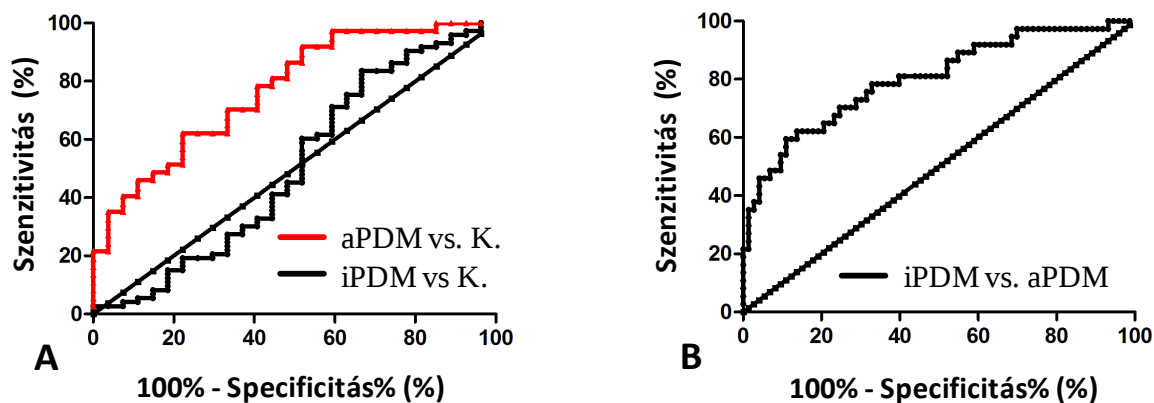
Ezt követően a betegeket két csoportra osztottuk betegségük aktivitása alapján, melyet a klinikai tünetek és a laboratóriumi paraméterek figyelembe vételével határoztunk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a sCD14 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az aktív betegeknél (aPDM) mint az inaktív betegeknél (iPDM) vagy a kontrollokban (aPDM: $2.850,8 \pm 577,4$ $\mu\text{g/L}$; iPDM: $2.337,6 \pm 325,2$ $\mu\text{g/L}$, $p < 0,0001$; Kontroll: $2.357,6 \pm 399,9$ $\mu\text{g/L}$, $p < 0,0003$) (18B. ábra). Mindezek alapján tehát, a szérumban sCD14 koncentráció emelkedése a myositis aktivitási markerének is tekinthető; és valóban a sCD14 koncentráció és – a betegség aktivitásának egyik markere – a szérumban laktát-dehidrogenáz aktivitás között szignifikáns korrelációt tudunk kimutatni ($R=0,273$, $p < 0,004$).



18. ábra A szérumban sCD14 koncentrációk összehasonlítása polymyositis, dermatomyositis betegek és egészséges kontrollok mintáiban (A). A szérumban sCD14 koncentráció összefüggése a betegség aktivitásával poly/dermatomyositisben (B). A sCD14 szintet az inhibíciós áramlási citometriás módszer segítségével határoztuk meg a betegek szérumban. PM: polymyositis, DM: dermatomyositis, PDM: PM és DM együtt, aPDM: aktív PDM, iPDM: inaktív PDM.

ROC analízis segítségével megvizsgáltuk, hogy a szérumban sCD14 koncentráció mennyire hatékonyan képes megkülönböztetni a különböző aktivitású betegcsoportokat a kontroll csoporttól. Az aktív PDM csoportot a kontrollokhoz viszonyítva magasabb ROC-AUC értéket (AUC: 0,771) kaptunk, míg az inaktív myositises betegek és a kontrollok között

lényegében nem tett a sCD14 különbséget (AUC: 0,505) (19. ábra). Ugyanakkor az aktív és inaktív PDM-es betegek megkülönböztetésében igen jó hatékonyságot mutatott (AUC: 0,802).



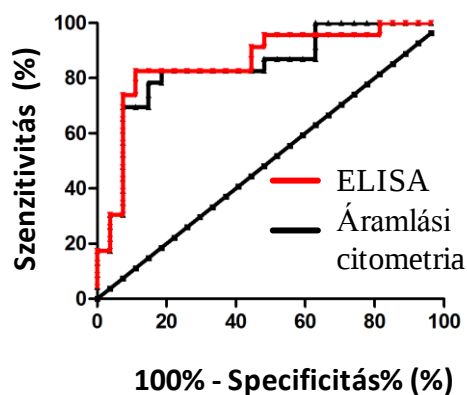
19. ábra A szérumban sCD14 hatékonysága az aktív és inaktív PDM-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - aPDM vs. Kontroll: 0,771 (95%CI: 0,656-0,886), $p < 0,0003$; iPDM vs. Kontroll: 0,505 (95%CI: 0,364-0,647), $p = 0,94$; iPDM vs. aPDM: 0,802 (95%CI: 0,712-0,892), $p < 0,0001$. PDM: polymyositis és dermatomyositis csoportok együtt. aPDM: aktív PDM, iPDM: inaktív PDM, K: kontroll.

A szérumban sCD14 koncentráció emelkedése összefüggést mutat a betegség aktivitásával poly- és dermatomyositisben, és jó hatékonyságú aktivitási markerként szolgálhat.

6.2.1.3. Szisztémás lupus erythematosus

A sCD14 mérésére alkalmas áramlási citometriás assay validálása során 53 egészséges kontroll és 23 SLE-s beteg sCD14 eredményét hasonlítottuk össze. Az összes egészséges kontroll eredményeit értékelve az átlagos szérumban sCD14 koncentráció 1.904 ± 411 $\mu\text{g/L}$ volt, és a férfiak (1.897 ± 336 $\mu\text{g/L}$, $n=29$) és nők (1.912 ± 495 $\mu\text{g/L}$, $n=24$) értékei nem mutattak szignifikáns ($p < 0,9$) különbséget. A kontroll és SLE-s betegek összevetése 27 kontroll és 23 beteg mintájának mérése alapján történt, mert a rendelkezésre álló 1 db kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével csak ennyi minta mérésére volt lehetőségünk. Az új, áramlási citometriás módszerrel kapott eredmények alapján a betegek sCD14 koncentrációja (2.625 ± 704 $\mu\text{g/L}$) szignifikánsan magasabb volt a kontrollokénál (1.907 ± 467 $\mu\text{g/L}$; $p < 0,0002$). Az ELISA-val nagyon hasonló sCD14 szinteket mértünk (SLE: 2.721 ± 700 $\mu\text{g/L}$, kontroll: 1.978 ± 427 $\mu\text{g/L}$, $p < 0,0001$), és Pearson regresszióval összevetve a két módszer jól korrelált egymással ($r=0,92$). Annak ellenére, hogy a vizsgálati csoportok mintaszáma meglehetősen alacsony az elvégzett ROC analízis alapján

a szérumban sCD14 mérés diagnosztikus ereje meglehetősen nagy volt (áramlási citometriás módszer: AUC=0,838; ELISA: AUC=0,854) (20. ábra). Az optimális cut-off (2.100 µg/L) mellett az áramlási citometriás teszt szenzitivitása 78%, specificitása 81% volt.



20. ábra A szérumban sCD14 hatékonysága az SLE-s betegek és egészséges kontrollok elkülönítésében. ROC-AUC - ELISA módszer: 0,854 (95%CI: 0,744-0,964), $p < 0,0001$; Áramlási citometriás módszer: 0,838 (95%CI: 0,725-0,952), $p < 0,0001$.

A szérumban sCD14 mérése hatékonyan tesz különbséget az SLE-s betegek és az egészséges kontrollok között, és ha nem is betegség-specifikus, de relatíve érzékeny markere lehet az SLE-nek.

6.2.2. Akut fázis fehérjék a májcirrhosishoz társuló fertőzések diagnosztikájában

A cirrhosishoz társuló fertőzések jelentősen fokozzák a cirrhosis mortalitását, amit a fertőzés által indukált súlyos szövődmények (dekompensáció, varix vérzés és egyéb vérzéses szövődmények, veseelégtelenség, hepatikus encephalopathia) kialakulása magyarázhat. Az infekciók diagnosztizálása ugyanakkor nehézségekbe ütközik ebben a betegcsoportban. A klinikai tünetek igen gyakran nem jellegzetesek, és a diagnosztikus laboratóriumi paraméterek jó része akut fázis fehérje (AFF), amelyek a májban termelődnek és előrehaladott cirrhosisban szintjük kevésbé emelkedik [394-396]. Vizsgálatunk során rutinszerűen használt és kevésbé frekvenciát mutató akut fázis fehérjék diagnosztikus hatékonyságát vizsgáltuk meg a cirrhosishoz társuló infekciók kimutatásában.

6.2.2.1. Az akut fázis fehérje szintek a fertőzések és fertőzés nélküli betegek csoportjában

A vizsgálatba bevont 368 cirrhotikus beteg közül 139-nek volt bakteriális infekciója, míg 229 betegnél nem volt fertőzés a mintavétel idején. A klinikai paramétereket illetően nem volt különbség a nemben, a kísérő betegségek és a hepatocellularis carcinoma gyakoriságában a két csoport között. Ugyanakkor a fertőzések betegek idősebbek voltak, súlyosabb volt a betegségük (magasabb átlagos Child- és MELD score), és gyakrabban fordultak elő klinikai szövődmények (ascites, varix vérzés).

A fertőzések és fertőzés nélküli betegek összehasonlítása során egyértelmű volt, hogy a fertőzések jelenlétében szignifikánsan magasabbak a CRP, PCT és LBP szintek. Ugyanakkor a két csoport sCD14 szintje között nem volt szignifikáns különbség (2. táblázat). Az egyes markerek közötti összefüggést megvizsgálva pozitív korrelációt találtunk a PCT ($r=0,61$, $p<0,0001$), LBP ($r=0,62$, $p<0,0001$), sCD14 ($r=0,23$, $p=0,004$), fehérvérsejt (Fvs) szám ($r=0,23$, $p=0,0038$), abszolút neutrophil granulocytá (PMN) szám ($r=0,26$, $p=0,0025$) és a CRP szintek között a fertőzött betegcsoportban.

	Nem fertőzések n= 229	Fertőzések n = 139	p-value
CRP (mg/L)	2,7 [1,1-6,3]	28,5 [14,9-53,1]	< 0,0001
PCT (µg/L)	0,10 [0,01-0,11]	0,32 [0,13-0,88]	= 0,019
LBP (µg/L)	19.081 [15.137-27.302]	29.289 [18.426-44.308]	< 0,0001
sCD14 (µg/L)	2.336 [1.792-3.147]	2.613 [1.929-4.043]	N.S.
Fvs szám (G/L)	5,3 [4,0-7,0]	7,3 [5,7-11,3]	< 0,0001
PMN sejtszám (G/L)	3,2 [2,4-4,6]	5,3 [3,7-8,9]	< 0,0001

2. táblázat A tesztelt markerek koncentrációja a nem fertőzött és a fertőzött betegcsoportokban. Az adatok a medián és az interkvartilis tartomány határértékeit mutatják. Fvs: fehérvérsejt; PMN: neutrophil granulocytá.

6.2.2.2. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrhotishoz társuló fertőzések kimutatásában

ROC analízissel is megvizsgáltuk, hogy a tesztelt AFF markerek képesek-e a nem fertőzött és fertőzött betegcsoport között differenciálni, és esetlegesen lehet-e ilyen esetekben diagnosztikai értékük. A ROC görbe alatti terület a CRP esetében volt a legnagyobb [AUC, (95%CI): 0,93 (0,90–0,95)], ez a PCT esetében [AUC, (95%CI): 0,84 (0,79–0,88)] már valamivel alacsonyabb értéket mutatott, míg a többi AFF és paraméter esetében a tesztek diszkriminatív ereje jóval gyengébb volt [LBP – AUC, (95%CI): 0,67 (0,61–0,73); sCD14 – AUC, (95%CI): 0,57 (0,51–0,63); fehérvérsejtszám – AUC,

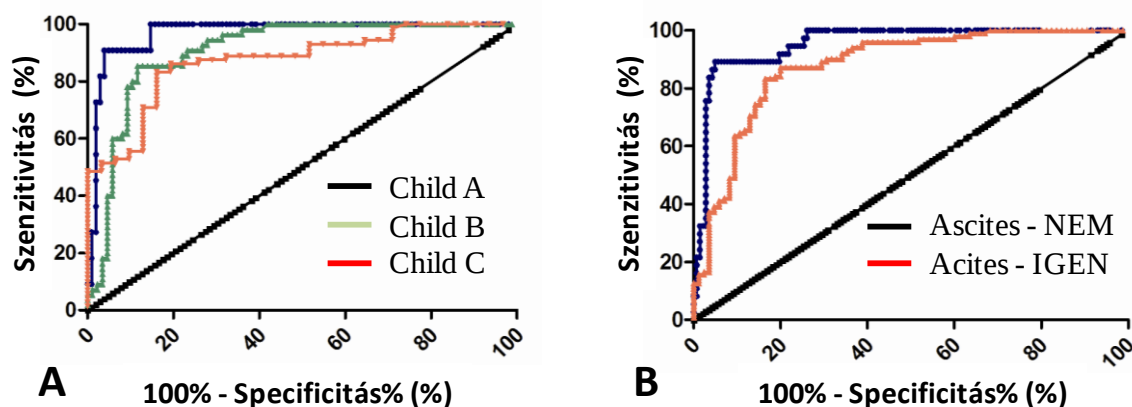
(95%CI): 0,73 (0,67–0,78); abszolút PMN szám – AUC, (95%CI): 0,77 (0,72–0,82)]. A 3. táblázat mutatja az egyes markerek analitikai paramétereit a ROC görbe segítségével meghatározott optimális cut-off értékek alapján (egyeseivel, illetve a CRP esetében a PCT-vel kombinálva is). Az eredmények alapján a szérumban sCD14 mérés alacsony szenzitivitás/specifitása, valamint pozitív/negatív prediktív értékkel rendelkezik, így nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására cirrhotikus betegekben. A CRP viszont az eredmények alapján érzékeny markernek tűnik, és különösen a PCT szint meghatározásával kombinálva a bakteriális infekciók detektálásának érzékeny markere lehet.

	Szenzitivitás (%)	Specifitás (%)	PPÉ (%)	NPÉ (%)
Fertőzéses vs. fertőzés nélküli				
CRP (5 mg/L)	96	69	65	96
CRP (10 mg/L)	84	91	84	91
PCT (0,15 µg/L)	72	84	72	84
PCT (0,5 µg/L)	36	98	90	72
LBP (25.467 µg/L)	59	71	55	75
sCD14 (2.804 µg/L)	50	67	45	68
CRP és PCT pozitív^a	62	98	94	81
Legalább egy marker pozitív^a	94	77	70	96

3. táblázat. Akut fázis fehérjék hatékonysága a fertőzött és nem fertőzött betegek megkülönböztetésében. ^aCRP 10 mg/L és PCT 0,15 µg/L. PPÉ: pozitív prediktív érték, NPÉ: negatív prediktív érték.

6.2.2.3. A CRP hatékonyságának vizsgálata különböző súlyosságú cirrhosis esetében

A CRP tehát, a bakteriális infekciók detektálásának egy hatékony markere, ugyanakkor pozitív akut fázis fehérje, melynek teljesítményét befolyásolhatja a májbetegség súlyossága, a máj parenchyma állapota. Ennek tesztelésére külön ROC analízist végeztünk - a fertőzéses és fertőzésmentes betegek mintáit összevetve - a Child A, B és C stádiumú betegcsoportokon, illetve az ascitessel bíró és attól mentes csoportokban. A ROC görbe alatti terület alacsonyabb volt a Child B és C csoportban a Child A csoport eredményéhez képest, és az ascites jelenléte is rontotta a CRP hatékonyságát (21. ábra).



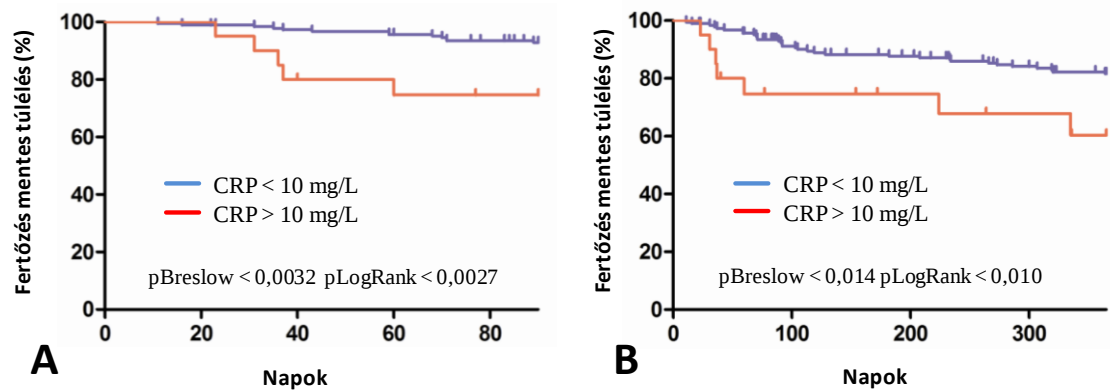
21. ábra A CRP hatékonyságának változása a cirrhosis súlyosságával (A) és ascites jelenlétében/hiányában (B). ROC analízis (fertőzéses vs. fertőzés nélküli betegek). ROC-AUC - Child A: 0,97 (95%CI: 0,94-1,00); Child B: 0,91 (95%CI: 0,86-0,94); Child C: 0,87 (95%CI: 0,80-0,94); Ascites NEM: 0,95 (95%CI: 0,92-0,99); Ascites IGEN: 0,88 (95%CI: 0,83-0,93).

6.2.2.4. Az AFF-k koncentrációjának vizsgálata különböző súlyosságú cirrhosis esetében

A CRP és PCT szintje szignifikánsan magasabb volt az előrehaladott cirrhosisban és ascites jelenléte esetén is (median értékek; Child C vs. A, CRP: 7,0 vs. 1,5 mg/L, $p=0,008$; PCT: 0,44 vs. 0,10 $\mu\text{g/L}$, $p<0,0001$; ascites van vs. ascites nincs, CRP: 4,5 vs. 1,9 mg/L, $p=0,011$). Ugyanakkor sem az LBP, sem a sCD14 koncentrációjában nem volt szignifikáns különbség az egyes Child csoportok között és az ascites-pozitív és -negatív betegek esetében. A szérum CRP, PCT, LBP és sCD14 szint nem különbözött az ASCA IgA, IgG vagy anti-OMP IgA antitest-pozitív és -negatív cirrhosis egyének között sem.

6.2.2.5. Az AFF-k koncentrációja és az első klinikailag szignifikáns bakteriális infekció kialakulásáig eltelt idő közötti összefüggés vizsgálata

Kaplan-Meier analízis alapján 10 mg/L-nél kisebb CRP koncentráció esetén mind a 3, mind a 12 hónapon belüli infekció kialakulásának valószínűsége kisebb volt a magasabb CRP-vel bíró esetekhez képest (22. ábra). A Cox regressziós analízis azt mutatta, hogy a laboratóriumi paraméterek közül csak a CRP független rizikó faktora a 3-hónapon belül kialakuló bakteriális infekcióknak (HR: 3,29 95%CI: 1,09-9,95, $p=0,035$).



22. ábra A CRP szint és a bakteriális fertőzések kialakulása közötti összefüggés (Kaplan-Meier analízis). A fertőzésmentes túlélés azon betegek arányát mutatja, akiknél 3 (A), illetve 12 hónap (B) alatt nem alakult ki klinikailag jelentős infekció. A betegeket a CRP=10 mg/L küszöbérték alapján osztottuk 2 csoportba, és ezek infekciómentes túlélését vetettük össze.

A vizsgált akut fázis fehérjék közül a CRP a legérzékenyebb teszt a cirrrosisához társuló fertőzések kimutatására, bár előrehaladott betegség esetén hatékonysága csökken. Jól használható még emellett a szignifikáns bakteriális fertőzések előrejelzésére is az aktuálisan infekciómentes betegek esetében.

6.2.3. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrrosisos betegek mintáiban és ennek társulása a betegséget kísérő infekciókhoz

Az ANCA-k keletkezésével kapcsolatban több különböző elmélet is ismert és valószínűsíthető, hogy bizonyos bakteriális komponensekkel való keresztreakció is szerepet játszhat ezek kialakulásában. Miután a cirrrosisos betegek esetében az átlagosnál jóval gyakrabban alakulnak ki ilyen fertőzések, gyakran minimális klinikai tünetekkel (pl. bakteriális transzlokáció), ezért valószínűnek tűnt, hogy ezek az antitestek cirrrosisos betegek vérében is jelen vannak. Ezt vizsgáltuk meg részletesebben, és közben teszteltük azt is, hogy ezek az antitestek mennyire lehetnek alkalmasak a cirrrosisához társuló fertőzések kimutatására, illetve előrejelzésére.

6.2.3.1. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrrosisban

Az ANCA kimutatása indirekt immunfluoreszcens módszerrel történt, és szignifikánsan nagyobb volt az IgG és IgA típusú ANCA pozitivitás a betegek között az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A várakozásainknak megfelelően az IgA típusú ANCA antitestek aránya magasabb volt az IgG típusú antitestekhez viszonyítva (4. táblázat).

A fluoreszcens festődési mintázat különböző volt az IgA és IgG típusú ANCA-k esetében. Az IgA antitestek esetében a c-ANCA dominált (46,3%), míg a p-ANCA (31,3%) és az atípusos p-ANCA (22,4%) aránya alacsonyabb volt. Az IgG antitesteknél az atípusos p-ANCA volt a leggyakoribb (51,1%), míg a c-ANCA és p-ANCA előfordulása jóval ritkább (21,6% és 27,3%).

	Kontrollok	Cirrhosis
N	100	385
Összes ANCA pozitív*	4 (4,0%)	281 (73,0%)
Összes ANCA IgA pozitív*	0 (0,0%)	201 (52,2%)
Összes ANCA IgG pozitív	4 (4,0%)	140 (36,4%)
ANCA IgA pozitív (IgG-negatív)*	0 (0,0%)	141 (36,6%)
ANCA IgG pozitív (IgA-negatív)*	4 (4,0%)	80 (20,8%)
ANCA IgA és IgG pozitív*	0 (0,0%)	60 (15,6%)

4. táblázat Az ANCA IgA és IgG pozitivitás előfordulása cirrhosisban. Indirekt immunfluoreszcens módszer segítségével meghatároztuk az IgA és IgG ANCA pozitivitás arányát egészséges kontrollok és cirrhosisos betegek mintájában. Az ANCA pozitivitás szignifikánsan magasabb volt a betegekben. * $p < 0,001$.

6.2.3.2. Az IgA típusú ANCA további karakterizálása

A cirrhosisos betegekben tovább vizsgáltuk az IgA típusú ANCA jellemzőit. Egy kvantitatív indirekt immunfluoreszcens módszert használva meghatároztuk az IgA₁ és IgA₂ típusú ANCA-k arányát, és az IgA₂ típusú antitestek gyakorisága jelentősen emelkedett volt ($46,2 \pm 8,5\%$), csak minimálisan tért el az IgA₁ ANCA arányához képest. (Az egészséges egyének szérumban mért összes IgA₂ aránya a totál IgA mennyiségéhez viszonyítva kb. 10%, és az össz IgA₁ antitest arány kb. 90%). Az IgA₂ ANCA-k aránya minden típusú fluoreszcens mintázat esetében hasonló volt. A szekretoros komponens pozitív ANCA a cirrhosisos betegek 86,8%-ban volt kimutatható. Ez megint sokkal magasabb, mint az egészséges egyének vérében, ahol a totál IgA kb. 1%-a tartalmaz szekretoros komponenset.

Anti-MPO és anti-PR3 ELISA-k segítségével megvizsgáltuk az IgA típusú ANCA-k antigén specificitását, azonban csak a p-ANCA pozitív minták 4,9%-a és a c-ANCA minták 16,5%-a mutatott anti-MPO, illetve anti-PR3 pozitivitást. Ez azt jelzi, hogy a cirrhosisos betegekben detektált IgA típusú ANCA-k eltérő antigén specificitást mutatnak a klasszikus ANCA mintázatokhoz viszonyítva.

6.2.3.3. Az ANCA és a klinikai paraméterek összefüggése

Az IgA ANCA pozitívítás folyamatos emelkedést mutatott a betegség előrehaladtával a Child stádiumoknak megfelelően, és magasabb volt a pozitívítás aránya ascites jelenlétében is (5. és 6. táblázat). Ez a változás nemcsak az ANCA pozitívítás szintjén volt megfigyelhető, hanem az IgA ANCA titer is hasonló irányú változást mutatott: nőtt az antitest mennyisége a betegség súlyosbodásával (23. ábra). Ezzel ellentétes irányú változást mutatott az IgG típusú ANCA aránya: az előrehaladottabb Child stádiumokban és ascites esetén a szintje csökkent (5. és 6. táblázat).

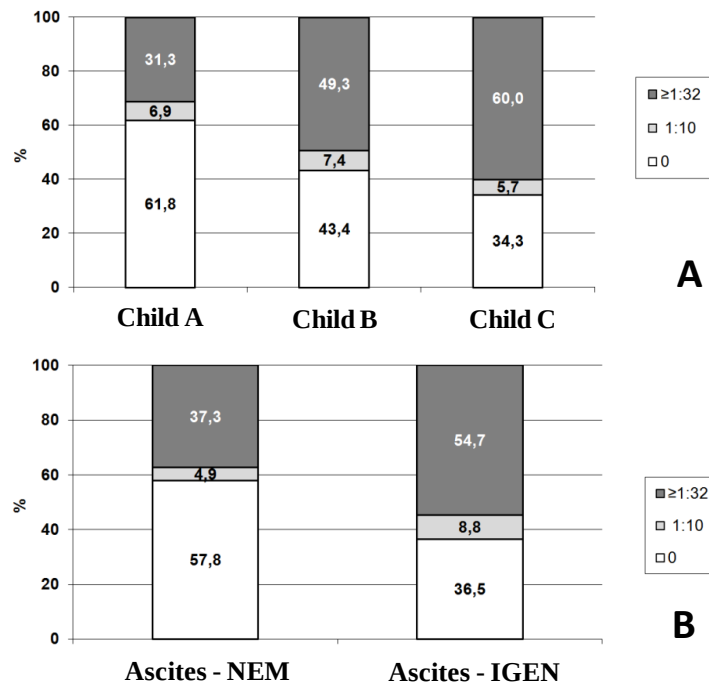
Az egyéb baktérium ellenes IgA-típusú antitestek jelenléte összefüggést mutatott az IgA ANCA pozitívítással. Az ASCA IgA és az anti-OMP IgA gyakrabban fordult elő IgA ANCA pozitív betegekben (ASCA: 59,0% vs. 23,5%, $p < 0,001$ és anti-OMP: 75,5% vs. 50,5%, $p < 0,001$).

	Child-Pugh stádium		
	A (n = 144)	B (n = 136)	C (n = 105)
ANCA IgA és/vagy IgG pozitív	100 (69,4%)	100 (73,5%)	81 (77,1%)
ANCA IgA pozitív	55 (38,2%)	78 (57,4%)	68 (64,8%)*
ANCA IgG pozitív (magában)	45 (31,2%)	22 (16,2%)	13 (12,4%)*

5. táblázat: Az ANCA IgA és IgG pozitívítás aránya a cirrhosis súlyosságának függvényében. Az IgA ANCA pozitívítás gyakorisága nő, míg az IgG ANCA-é csökken Child A-tól Child C-ig. ANCA IgA pozitív = IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ esetek. ANCA IgG pozitív (magában) = IgA-/IgG+ esetek. * $p < 0,001$.

	Betegek ascitessel	Betegek ascites nélkül
	(n = 204)	(n = 181)
ANCA IgA és/vagy IgG pozitív	141 (69,1%)	140 (77,3%)
ANCA IgA pozitív	86 (42,2%)	115 (63,5%)*
ANCA IgG pozitív (magában)	55 (27,0%)	25 (13,8%)*

6. táblázat: Az ANCA IgA és IgG pozitívítás aránya a cirrhosis súlyosságának függvényében. Az IgA ANCA pozitívítás gyakorisága nagyobb, míg az IgG ANCA-é kisebb ascites jelenléte esetén. ANCA IgA pozitív = IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ esetek. ANCA IgG pozitív (magában) = IgA-/IgG+ esetek. * $p < 0,001$.



23. ábra Az ANCA IgA titerek változása a cirrhosis súlyosságának függvényében. A magasabb titerű IgA ANCA pozitivitás aránya növekszik Child A-tól C-ig (A), és nagyobb ascites jelenléte esetén is (B).

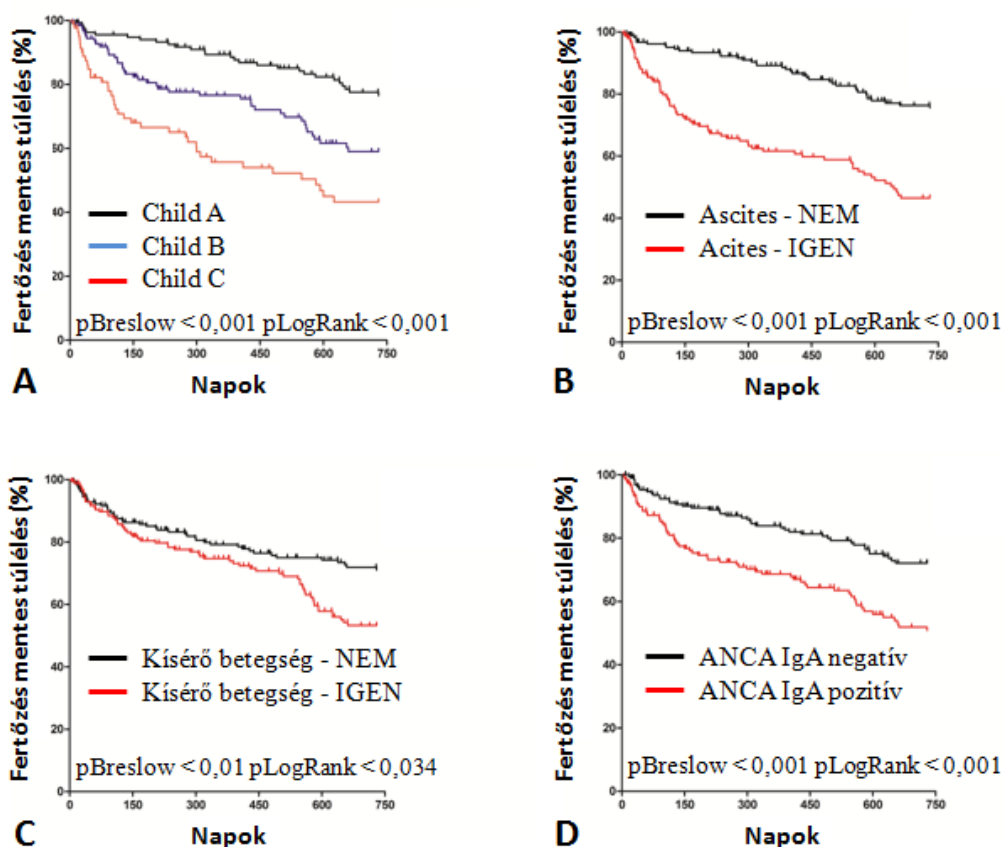
6.2.3.4. Az ANCA és a bakteriális infekciók összefüggése

A vizsgálat ideje alatt 110 beteg (31,9%) esetében összesen 187 klinikailag szignifikáns fertőzőes epizód zajlott le, 39,4%-uknál egynél több eset is. A fertőzések lokalizációja a következőképpen alakult: spontán bakteriális peritonitis 27,5%, pneumonia 17,5%, húgyúti infekció 12,5%, bőr és lágyrész infekció 8,9%, egyéb 16,5%. A fertőzőes esetek 17,1%-ában az infekció eredetét nem lehetett azonosítani. A fertőzést okozó baktériumok 60,9%-ban Gram-negatívak, 39,1%-ban Gram-pozitívak voltak. A fertőzésekkel összefüggésbe hozható legfontosabb klinikai paraméterek a cirrhosis előrehaladottsága (Child C, ascites jelenléte), hepatikus encephalopathia és a kísérő betegségek jelenléte.

Az IgA ANCA pozitív esetek között szignifikánsan magasabb volt az infekciós események száma az IgA ANCA negatív csoporthoz viszonyítva (38,9% vs. 24,1%, $p < 0,01$). A fertőzések gyakrabban fordultak elő a magasabb IgA ANCA titerrel bíró betegek között (negatív - 24,1%, titer 1:10 - 18,2%, titer 1:32 - 42,9%, titer $>1:100$ - 54,7%, $p > 0,001$). Az ANCA mintázatok közül a c-ANCA jelentette a legnagyobb kockázatot a klinikailag szignifikáns infekció kialakulására (OR: 2,71; 95%CI: 1,54-4,75, $p < 0,001$).

Az első klinikailag szignifikáns infekció kialakulásáig eltelt időt meghatározó klinikai paraméterek a Child stádium, ascites, illetve kísérő betegségek jelenléte voltak (Kaplan-Meier analízis, 24A,B,C. ábra). Az IgA ANCA pozitivitásnak is hasonló hatása volt a két

éves követési periódus során (24D. ábra). Az IgA ANCA és az infekciók kialakulásának összefüggését Cox regressziós modell alapján is analizáltuk, és az IgA antitestek jelenléte független prediktora volt a fertőzőes állapotok megjelenésének (a nem, Child score és kísérő betegségekre való korrekció után is)($p=0,006$, 7. táblázat).



24. ábra A fertőzés mentes túlélés arányának változása az idő függvényében. Az adatok értékelése Kaplan-Meier analízis segítségével történt. A klinikailag jelentős fertőzések kialakulásának valószínűségét szignifikánsan fokozta az előrehaladottabb májkárosodás (Child B és C)(A), az ascites (B) és kísérő betegségek (C) jelenléte, valamint az IgA ANCA pozitivitás (D).

	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% CI
Nem	0,299	1,22	0,83-1,77
Kísérő betegségek	0,008	1,68	1,14-2,47
Child-Pugh stádium	<0,001		
Child A	viszonyítási alap		
Child B	0,016	1,81	1,12-2,95
Child C	<0,001	3,42	2,07-5,64
ANCA IgA pozitivitás ≥1:32 titer	0,006	1,74	1,18-2,56

7. táblázat Az első klinikailag jelentős infekcióig eltelt időt befolyásoló paraméterek. Az értékelés Cox regressziós modell alapján történt. A Child stádiumoknál a Child A stádium volt a viszonyítási alap. *p* érték: szignifikancia szint; 95% CI: 95% konfidencia intervallum.

Megállapíthatjuk, hogy az IgA típusú ANCA antitestek pozitivitása kifejezetten gyakori cirrhosisban, és magas titerben mutathatók ki ezek az antitestek. Összefüggést mutatnak a bakteriális infekciók jelenlétével és egyben független prediktorai is ezek kialakulásának. Az ANCA IgA₂ alosztály emelkedett aránya és a magas szekretoros komponens pozitívítás felveti a béltraktusban lévő immunsejtek és a cirrhosisra jellemző fokozott bakteriális transzlokáció szerepét ezen antitestek kialakulásában.

6.2.4. Tumormarkerek vizsgálata tüdő tumoros betegek szérummintáiban

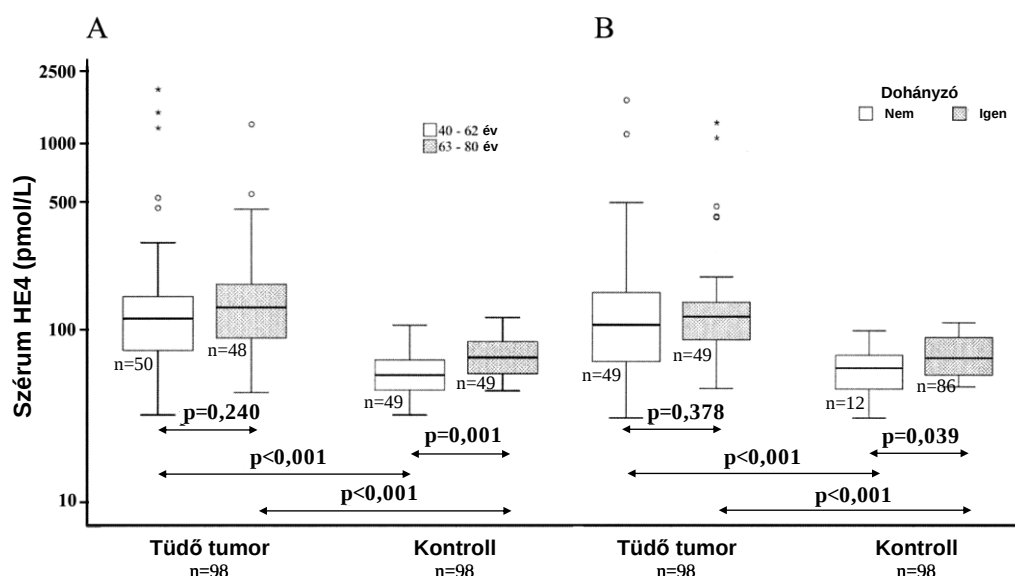
6.2.4.1. HE4 - a tüdő tumor diagnosztika lehetséges új markere

A tüdő tumor a világon a második/harmadik legnagyobb incidenciájú rosszindulatú daganat, ami az összes daganatos megbetegedés 16,5%-át jelenti. Még jelentősebb az, hogy a daganatos halálozások között első helyen áll. Epidemiológiai adatok alapján az 5-éves túlélés ebben a betegségben csak kb. 17%. Ennek a rossz prognózisnak egyik fő oka a betegség késői felismerése. A jelenleg használható radiológiai eljárások és laboratóriumi markerek nem eléggé érzékenyek és specifikusak a betegség kimutatására a kórkép korai stádiumában [397-401]. Ezért új, jobb diagnosztikus hatékonyságú paraméterek azonosítása feltétlenül kívánatos. Az egyik ilyen lehetséges új alternatíva a Human epididymis protein 4 (HE4), amely a petefészek tumor diagnosztikájának viszonylag új eleme, és szórványos adatok szólnak arról is, hogy ez a tumormarker tüdő tumorban is emelkedett lehet. Ebben a keresztmetszeti, eset-kontroll vizsgálatban 98 újonnan diagnosztizált, még terápiában nem részesült tüdő tumoros beteg mintájában határoztuk meg a HE4 és egyéb tumormarkerek koncentrációját. A vizsgálatba csak férfiakat vontunk be, hogy a petefészek betegségeiből származó, illetve a menstruációs ciklussal járó hormonális változások zavaró hatását kiküszöböljük.

Első lépésben a különböző preanalitikai faktorok hatását vizsgáltuk meg a kontrollok és a tüdő tumoros betegek szérumában mért HE4 szintekre. Statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció volt a HE4 szint és az életkor között az egészséges kontrollok esetében (Spearman's $\rho=0,374$, $p<0,001$). Ha a medián életkor (62 év) alapján 2 csoportra osztottuk a kontrollokat akkor az idősebb csoportban szignifikánsan magasabb volt a HE4 szint a fiatalabbakhoz hasonlítva (67,2 [54,6-82,5] pmol/L vs. 53,7 [43,3-65,3] pmol/L; $p=0,001$) (25A. ábra). A HE4 negatív korrelációt mutatott a vesefunkciót jelző eGFR-rel is (Spearman's $\rho = -0,278$, $p=0,005$) a kontrollokban, jelezve hogy a veseműködés hatékonyságának csökkenése emeli a HE4 szérum koncentrációját. Szignifikánsan emelkedett volt a HE4 koncentráció a jelenleg dohányzó kontrollok szérumában (70,7

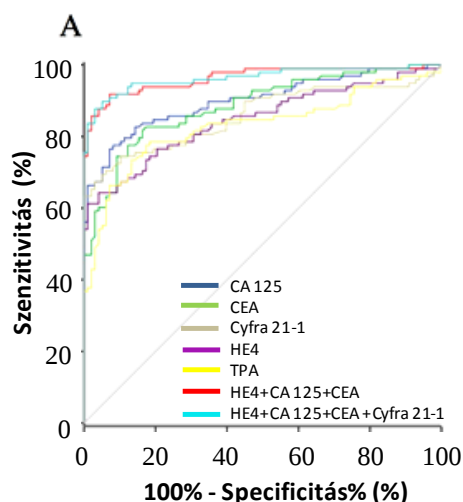
[55,6-93,3] pmol/L vs. 61,7 [46,9-73,1] pmol/L; $p=0,039$) (25B. ábra). Ezek a hatások nem befolyásolták a HE4 koncentrációt a tüdőtumoros betegek esetében (25. ábra).

A tüdőtumoros betegek és a megfelelően (életkor 25A., dohányzás 25B. ábra) illesztett kontrollok adatait összevetve szignifikánsan ($p<0,001$) emelkedett HE4 értékeket tudunk a betegek szérumában kimutatni. Az analízist elvégezve az összes zavaró tényezőre való korrekciókkal szintén szignifikáns ($p=0,001$) különbség volt a 2 csoport szérum HE4 koncentrációjában.

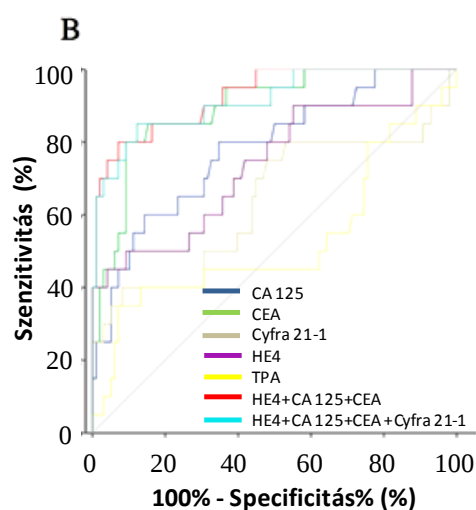


25. ábra Az életkor és a dohányzás hatása a HE4 koncentráció alakulására. A HE4 szintet egy kemilumineszcens mikropartikula-erősített immunoassay segítségével határoztuk meg a kontrollok és a betegek mintáiban. Ha a medián életkor (62 év) alapján 2 csoportra osztottuk a kontrollokat akkor az idősebb csoportban szignifikánsan magasabb volt a HE4 szint a fiatalabbakhoz hasonlítva (A). Szignifikánsan emelkedett volt a HE4 koncentráció a dohányzó kontrollok szérumában is (B). Ezek a hatások nem befolyásolták a HE4 koncentrációt a tüdőtumoros betegek esetében (A,B). A tüdőtumoros betegek és a megfelelően illesztett kontrollok adatait összevetve szignifikánsan ($p<0,001$) emelkedett HE4 értékeket tudunk a betegek szérumában kimutatni.

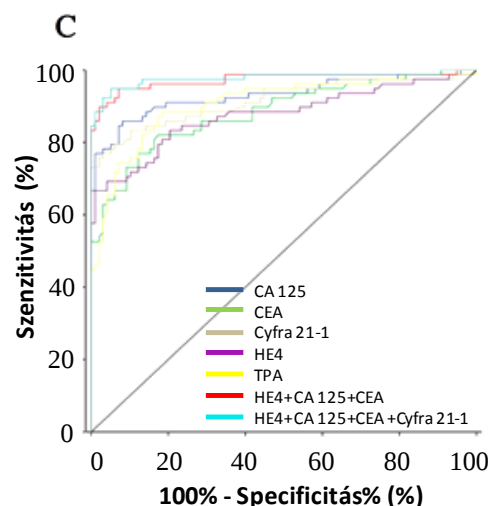
A HE4 diszkriminatív erejének (összes tumoros beteg vs. egészséges kontrollok) jellemzésére ROC analízist végeztünk. A HE4-hez tartozó ROC görbe alatti terület 0,848 (95% CI: 0,792-0,904) volt; a legjobb cut-off érték (97,6 pmol/L) mellett a szenzitivitás 64,3%, a specificitás 95,9%-nak adódott (26. ábra, 8. táblázat). A CEA, TPA és Cyfra 21-1 szenzitivitása hasonló vagy jobb volt, mint a HE4-é, a specificitásban nem volt lényeges különbség a HE4 és a többi marker között (26. ábra). A HE4 értékek az NSE kivételével valamennyi tumormarkerrel szignifikáns korrelációt mutattak (Spearman's $\rho=0,232-0,384$; $p=0,020-0,001$).



Összes tüdő tu.-s beteg	Szenzitivitás	Specifitás
CA 125 (35 kIU/L)	54,1%	100,0%
CEA (3,4 µg/L)	72,4%	90,8%
Cyfra 21-1 (3,3 µg/L)	63,3%	97,9%
HE4 (100 pmol/L)	61,2%	96,9%
TPA (75 U/L)	72,4%	86,7%
HE4 + CA 125 + CEA	91,8%	92,8%
HE4 + CA 125 + CEA + Cyfra 21-1	89,8%	94,9%



Tüdő tu. I-II. stádium	Szenzitivitás	Specifitás
CA 125 (35 kIU/L)	15,0%	99,0%
CEA (3,4 µg/L)	75,0%	90,8%
Cyfra 21-1 (3,3 µg/L)	25,0%	98,0%
HE4 (100 pmol/L)	40,0%	96,9%
TPA (75 U/L)	40,0%	86,7%
HE4 + CA 125 + CEA	80,0%	92,9%
HE4 + CA 125 + CEA + Cyfra 21-1	70,0%	93,9%



Tüdő tu. III-IV. stádium	Szenzitivitás	Specifitás
CA 125 (35 kIU/L)	64,1%	100,0%
CEA (3,4 µg/L)	71,8%	90,8%
Cyfra 21-1 (3,3 µg/L)	73,1%	98,0%
HE4 (100 pmol/L)	66,7%	96,9%
TPA (75 U/L)	82,0%	86,7%
HE4 + CA 125 + CEA	94,9%	92,9%
HE4 + CA 125 + CEA + Cyfra 21-1	94,9%	94,8%

26. ábra A HE4 és a rutinszerűen alkalmazott tumormarkerek diszkriminatív ereje a tüdő tumoros betegek és kontrolljaik összevetése során. Az összes (A), az I-II. stádiumú (B) és a III-IV. stádiumú (C) csoportok esetében végeztük el az egyes tumormarkerek és kombinációik hatékonyságának vizsgálatát ROC analízis segítségével. Az ábra bal oldalán a ROC görbék láthatóak, míg a táblázatok mutatják az egyes markereknél alkalmazott küszöbértékeket és az ezekhez tartozó szenzitivitás és specifitás értékeket. A HE4, CA 125, CEA és Cyfra 21-1 markerekből logisztikus regresszióval ("enter" módszerrel) képeztünk két kompozit score-t és ezek hatékonysága, szenzitivitás és specifitás értékei is láthatóak az ábrán.

	Összes tüdő tu.-s beteg	Tüdő tu. I-II. stádium	Tüdő tu. III-IV. stádium
HE4	0,848 (95% CI 0,792-0,904)	0,741 (95% CI 0,609-0,873)	0,875 (95% CI 0,819-0,932)
CA 125	0,900 (95% CI 0,855-0,945)	0,781 (95% CI 0,666-0,895)	0,930 (95% CI 0,888-0,973)
CEA	0,886 (95% CI 0,893-0,932)	0,894 (95% CI 0,821-0,967)	0,883 (95% CI 0,832-0,935)
Cyfra 21-1	0,858 (95% CI 0,802-0,914)	0,635 (95% CI 0,478-0,792)	0,915 (95% CI 0,868-0,962)
TPA	0,830 (95% CI 0,770-0,891)	0,529 (95% CI 0,364-0,694)	0,907 (95% CI 0,861-0,954)
CEA-CA 125	0,943 (95% CI 0,912-0,975)	0,894 (95% CI 0,811-0,977)	0,956 (95% CI 0,925-0,987)
CEA-CA 125-Cyfra 21-1	0,955 (95% CI 0,928-0,981)	0,883 (95% CI 0,807-0,959)	0,973 (95% CI 0,949-0,997)
CEA-CA 125-TPA	0,950 (95% CI 0,922-0,978)	0,872 (95% CI 0,788-0,956)	0,970 (95% CI 0,947-0,993)
CEA-CA 125-Cyfra 21-1-TPA	0,955 (95% CI 0,928-0,982)	0,854 (95% CI 0,763-0,945)	0,973 (95% CI 0,948-0,997)
HE4-CA 125	0,933 (95% CI 0,896-0,970)	0,857 (95% CI 0,753-0,961)	0,953 (95% CI 0,917-0,988)
HE4-CEA	0,930 (95% CI 0,892-0,967)	0,908 (95% CI 0,840-0,976)	0,935 (95% CI 0,893-0,977)
HE4-Cyfra 21-1	0,899 (95% CI 0,850-0,949)	0,729 (95% CI 0,577-0,881)	0,943 (95% CI 0,900-0,986)
HE4-CA 125-CEA	0,963 (95% CI 0,937-0,990)	0,927 (95% CI 0,865-0,989)	0,973 (95% CI 0,945-1,000)
HE4-CA 125-CEA-Cyfra 21-1	0,964 (95% CI 0,938-0,991)	0,914 (95% CI 0,840-0,989)	0,977 (95% CI 0,952-1,000)

8. táblázat Az egyes tumormarkerek és ezek kombinációinak hatékonysága a tüdőtumoros betegek és kontrolljaik összehasonlítása során. Az összes, az I-II. stádiumú és a III-IV. stádiumú csoportok esetében végeztük el az egyes tumormarkerek és kombinációik hatékonyságának vizsgálatát ROC analízis segítségével (26. ábra). A táblázat a ROC görbék alatti terület (és a 95%-os konfidencia intervallum) nagyságát mutatja. A HE4, CA 125, CEA, Cyfra 21-1 és TPA markerekből logisztikus regresszióval ("enter" módszerrel) képeztünk kompozit score-okat és ezek hatékonysága látható a táblázatban (tu.: tumor).

A HE4 szint egyértelmű összefüggést mutatott a betegség kiterjedtségével, a szervezetben jelenlévő daganat méretével, illetve mennyiségével. Már az I-es stádiumú betegcsoportban is szignifikánsan emelkedett volt a HE4 érték (a CEA-hoz, CA 125-höz és a Cyfra 21-1-hez hasonlóan) a kontrollokhoz viszonyítva, és még magasabb értékeket mutatott a II., III. és IV. stádiumban (9. táblázat). A környező szöveteket (pleura, mellkas fal, nyelőcső, pericardium) infiltráló (139,8 [96,8-235,4] pmol/L vs. 109,9 [69,1-141,3] pmol/L, $p=0,009$) vagy távoli metasztázist adó tumorok (135,9 [97,8-192,9] pmol/L vs. 96,3 [63,5-141,8] pmol/L, $p=0,036$) esetében szignifikánsan magasabb volt a szérum HE4 érték a lokalizált esetekhez képest. Szignifikáns korreláció volt a tumor CT/MRI-vel meghatározott mérete (50,6 [13-130] mm) és a HE4 koncentráció között is (Spearman's $\rho=0,227$, $p=0,030$). Emelkedett HE4 érték volt mérhető azoknál a betegeknél is az egészséges kontrollokhoz képest, akiknél még klinikai tünetekkel nem járt a daganat jelenléte (113,5 [66,6-145,5] pmol/L vs. 62,2 [47,2-76,1] pmol/L, $p<0,001$). Két olyan I-es stádiumú betegünk is volt, ahol csak a HE4 mutatott emelkedést a többi tumormarker nem.

A szérum HE4 szint a tüdő daganat minden szövettani típusában szignifikánsan magasabb értéket mutatott az egészséges kontrollokhoz képest, de az egyes szövettani típusok között nem volt szignifikáns különbség, amit részben az alacsonyabb esetszám is magyarázhat egy-egy csoportban (9. táblázat).

	HE4 (pmol/L)	CA 125 (kIU/L)	CEA (µg/L)	Cyfra 21-1 (µg/L)	NSE (µg/L)	TPA (U/L)	TK (U/L)
Egészségesek	62,2 (47,2-76,1)	9,8 (6,8-12,9)	1,9 (1,4-2,5)	1,4 (1,2-2,1)	6,3 (4,0-9,6)	43,2 (31,8-63,3)	7,6 (5,9-10,8)
Összes tüdő tu-s beteg	118,2 (80,6-150,1) ^{\$}	40,5 (17,0-78,5) ^{\$}	5,3 (3,2-15,0) ^{\$}	4,5 (2,3-9,7) ^{\$}	16,5 (4,5-34,8) ^{\$}	114,0 (70,0-246,0) ^{\$}	10,1 (6,3-19,4) ^{\$}
I. stádium (n=13)	70,6 (60,5-114,4)*	15,6 (12,5-18,7) ^{\$}	3,4 (3,2-5,7) ^{\$}	1,6 (1,2-3,1)	4,6 (3,4-7,4)	35,3 (26,9-90,9)	4,5 (2,7-7,9)
II. stádium (n=8)	133,9 (65,2-141,5) ^{\$}	12,3 (7,3-51,4)*	4,8 (2,7-9,1) ^{\$}	2,5 (1,7-3,9)*	4,1 (2,9-8,1)	74,1 (32,5-98,6)	7,8 (5,5-12,5)*
III. stádium (n=38)	118,7 (79,9-153,1) [#]	49,9 (17,9-84,2) ^{\$}	5,4 (3,4-13,2) ^{\$}	6,1 (2,5-10,0) ^{\$}	6,6 (4,7-10,3)*	129,0 (75,1-246,3) ^{\$}	9,9 (6,3-17,2)*
IV. stádium (n=39)	135,9 (97,8-193,7) ^{\$}	62,1 (25,4-108,0) ^{\$}	14,6 (3,4-28,4) ^{\$}	6,2 (3,4-16,3) ^{\$}	7,3 (4,3-11,9)*	147,0 (90,5-393,0) ^{\$}	14,8 (7,5-42,4) ^{\$}
Laphám cc. (n=33)	120,5 (68,9-143,7) ^{\$}	48,5 (15,2-98,0) ^{\$}	4,0 (2,8-10,4) ^{\$}	5,3 (2,1-8,7) ^{\$}	5,1 (3,6-8,6)*	111,0 (61,2-174,5) ^{\$}	8,3 (5,9-15,2)
Adenocarcinoma (n=31)	97,8 (70,6-142,6) ^{\$}	18,4 (14,6-68,2) ^{\$}	7,8 (3,8-19,4) ^{\$}	3,8 (2,1-10,8) ^{\$}	6,4 (4,3-9,2) [#]	117,0 (59,2-263,0) ^{\$}	9,6 (7,0-17,0)*
Nagy sejtes cc. (n=5)	192,9 (128,8-408,4) ^{\$}	76,0 (51,3-148,0) ^{\$}	6,8 (4,2-18,1) ^{\$}	6,2 (2,2-19,0) [#]	4,7 (3,9-9,2)	115,0 (65,3-395,5) [#]	14,3 (6,7-28,4)*
SCLC (n=15)	120,7 (108,3-233,6) ^{\$}	35,2 (24,7-63,9) ^{\$}	6,9 (3,5-15,4) ^{\$}	3,7 (2,5-9,7) ^{\$}	27,4 (5,9-94,3) ^{\$}	128,0 (79,8-352,0) ^{\$}	56,2 (13,1-77,3) ^{\$}

9. táblázat A HE4 és a további tesztelt tumormarkerek koncentrációjának értékei az egészséges kontrollokból, az összes tüdő tumoros betegben, illetve a stádium és a szövettani típus alapján képzett alcsoportokban. Az eredményeket medián [interkvartilis tartomány (IQR)] formában tüntettük fel. (cc.: carcinoma, tu: tumor, SCLC: kissejtes tüdőrák) *p<0,05, #p<0,01, \$p<0,001 az egészséges kontrollokhoz viszonyítva.

A betegek túlélési adatait analizálva úgy tűnt, hogy a diagnóziskor mért emelkedett HE4 (>97,6 pmol/L) koncentrációnak nincsen prognosztikai jelentősége.

A laboratóriumi diagnosztika viszonylag új irányvonala több egyedi marker kombinálása és konvertálása egyetlen hatékonyabb paraméterre. Bináris logisztikus regressziót használva már két tumormarker kombinálása is javította a diagnosztikus hatékonyságot, de a legjobb szenzitivitást és specificitást a HE4+CEA+CA 125 kombinációja adta, különösen az I-II. stádiumú betegek esetében (AUC: 0,927, (95% CI: 0,865-0,989), szenzitivitás: 80,0%, specificitás: 92,9%). A HE4 jelentős szerepét ezekben a kombinációkban egyértelműen igazolja az, hogy az I-II. stádiumú betegek esetében 0,900-nál nagyobb AUC-vel jellemezhető ROC görbét csak akkor kaptunk, ha a HE4 is benne volt a modellben (8. táblázat, 26. ábra).

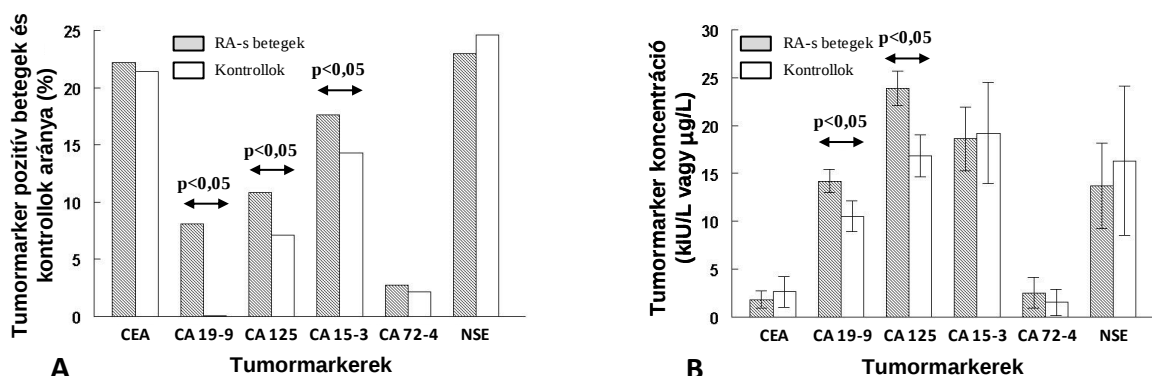
Eredményeink alapján a HE4 szérumszintjét számos preanalitikai faktor (életkor, dohányzás, vesefunkció) befolyásolhatja. A HE4 a petefészek tumor diagnosztizálásának elősegítése mellett a tüdőtumor hatékony markere is lehet, ráadásul magasabb értéket mutatott az előrehaladottabb tumoros állapotokban, és korrelált a tumor méretével és kiterjedtségével. A HE4, CEA és CA 125 kombinálása egy kompozit score-rá tovább fokozta a diagnosztikus hatékonyságot és akár a korai stádiumú tüdőráknak is érzékeny markere lehet.

6.2.5. Tumormarkerek vizsgálata rheumatoid arthritisben (RA)

A rutin laboratóriumi diagnosztikában használt tumormarkerek jól alkalmazhatóak a daganatos betegségek diagnosztikájában: segíthetik a diagnózis felállítását, lehet prognosztikai jelentőségük, de leginkább a betegek állapotának követése, a terápia hatékonyságának monitorozása során van jelentőségük. Jól ismert tény ugyanakkor, hogy számos benignus állapotban, elsősorban lokális vagy szisztémás gyulladásos reakciókban, is emelkedhet ezen analitok szérum koncentrációja. Ez talán nem is annyira meglepő, hiszen a tumormarkerek egy jó része adhéziós molekula, melyek a gyulladásos sejtek felszínén is megjelenhetnek, és ezekről leválva kimutathatóvá válnak a keringésben. A legismertebb ilyen szempontból a carcinoembrionális antigén (CEA, CD66a-e) család, melyek az immunglobulin szupercsaládba tartozó adhéziós molekulák, és ezek megtalálhatók a gyulladásos synoviumot infiltráló aktivált granulocyták és fibroblasztok felszínén [402-404]. A CEA mellett számos további tumormarker (CA 15-3, CA 125, CA 19-9) tartalmaz nagyméretű szénhidrát komponenst is, és funkcionálhat adhéziós molekulaként. Ráadásul több ilyen szérum tumormarker (CA 15-3, CA 125, CA 19-9, CA 72-4, NSE) is kimutatható volt különböző típusú autoimmun betegségekből [405-409].

Miután RA-s betegek mintáiban nem történt még ilyen jellegű vizsgálat munkánk célja az említett tumormarkerek pozitivitásának és koncentrációjának összehasonlítása volt RA-s betegek és egészséges kontrolljaik között.

A tumormarker koncentrációkat összevetve szignifikánsan ($p < 0,05$) több RA-s beteg rendelkezett a referencia tartomány felső határánál magasabb értékekkel a kontrollokhoz képest a CA 19-9 (8,1% vs. 0%), a CA 125 (10,8% vs. 7,1%) és a CA 15-3 (17,6% vs. 14,3%) esetében. Ugyanakkor, nem volt különbség a CEA (22,2% vs. 21,4%), CA 72-4 (2,7% vs. 2,1%) és NSE (23,0% vs. 24,6%) pozitivitásban (27A. ábra). A CA 19-9 ($14,2 \pm 1,2$ vs. $10,5 \pm 1,6$ kU/L) és CA 125 ($23,9 \pm 1,8$ vs. $16,8 \pm 2,2$ kU/L) szérumszintek a betegekben szignifikánsan magasabbak voltak a kontrollokhoz képest ($p < 0,05$), ugyanakkor nem volt különbség a CEA ($1,8 \pm 0,9$ vs. $2,6 \pm 1,6$ µg/L), CA 15-3 ($18,6 \pm 3,3$ vs. $19,2 \pm 5,3$ kU/L), CA 72-4 ($2,5 \pm 1,6$ vs. $1,5 \pm 1,4$ kU/L) és NSE ($13,7 \pm 4,5$ vs. $16,3 \pm 7,8$ µg/L) esetében (27B. ábra). Végül több korreláció is kimutatható volt az egyes tumormarkerek, illetve a tumormarkerek és az egyéb vizsgált laborparaméterek között. A CA 125 a CA 15-3-mal ($r = 0,377$, $p < 0,05$), a CEA a reumafaktorral (RF) ($r = 0,270$; $p < 0,05$), a RF az anti-CCP-vel ($r = 0,275$, $p < 0,05$) és a CRP-vel ($r = 0,473$, $p < 0,05$) függött össze szignifikánsan. Egyetlen tumormarker sem mutatott szignifikáns korrelációt a CRP-vel, anti-CCP antitesttel, DAS28-cal és a betegek életkorával vagy a betegség lefolyásának hosszával.



27. ábra A tumormarker pozitívítás aránya (A) és a tumormarker szérumszintek értékei (B) egészséges kontrollok és rheumatoid arthritises betegek mintáiban. A tumormarkerek szérumszintjeit rutin diagnosztikus immunoassay-k segítségével mértük meg. A referencia tartomány felső határa feletti értékeket tekintettük pozitív eredményeknek.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy az adhézión tulajdonsággal bíró tumormarkerek (CA 19-9, CA 125, CA 72-4) a daganatos betegségek mellett az autoimmun gyulladásos megbetegedések közül RA-ban is pozitívítást mutathatnak. Rutin tumormarkerként történő klinikai alkalmazásuk során ez a fontos tény mindenképpen figyelembe veendő.

6.2.6. A csontanyagcsere markereinek vizsgálata egészséges férfiakban

A 2010-ben indult vizsgálat célja az 50 év feletti magyar férfiak csontanyagcsere állapotának feltérképezése volt. A postmenopausában lévő nők csontstátusza több tanulmány tárgya volt már [410,411] azonban a férfiak helyzete Magyarországon alig ismert. Vizsgálataink során a csontanyagcsere rutinszerűen alkalmazott markerei mellett új paramétereket is teszteltünk, és ezek közül a sclerostin mérés eredményeit mutatjuk be itt.

6.2.6.1. A sclerostin szint vizsgálata egészséges férfiak szérummintáiban

A sclerostin egy jól ismert regulátora a csontformációnak. Az osteocyták termelik, és a Wnt szignalizációs útvonalat gátolva, visszafogja az osteoblast irányú differenciációt, csökkenti az osteoblastok élettartamát és a csontformációt. A sclerostin genetikai okra visszavezethető hiánya (van Buchem betegség) igen nagy sűrűségű csontszövet kialakulásához vezet, míg a sclerostin hatásának gátlása specifikus antitestek segítségével fokozhatja a csontdenzitást alacsony csontsűrűséggel járó állapotokban (pl. osteoporosis). Mindezek alapján a sclerostin mérése a csontanyagcsere jellemzésének ígéretes, új paramétere [239,412]. Vizsgálataink során arra kerestünk választ, milyen preanalitikai faktorok befolyásolják ennek a paraméternek a szintjét, illetve, hogy mutat-e összefüggést a szérum sclerostin szint egyéb biokémia markerekkel, illetve a csontdenzitással 194 egészséges férfi vizsgálata során.

Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a teljes populációt vizsgálva szignifikáns korreláció volt a sclerostin szint és az életkor ($r=0,211$; $p=0,003$), a cystatin C ($r=0,246$; $p=0,001$), a femur nyakon (FN BMD: $r=0,147$; $p=0,041$), illetve a lumbális csigolyákon (LS BMD: $r=0,169$; $p=0,019$) mért csontdenzitás, továbbá a szérum kreatinin koncentráció ($r=0,172$; $p=0,022$) és az eGFR között ($r=-0,162$; $p=0,033$). Multivariancia lineáris regressziós analízist végezve is hasonló eredményt kaptunk. A szérum sclerostin szint szignifikáns előrejelzői az életkor (standardizált regressziós koefficiens: $0,167$; $p=0,029$) és a cystatin C (standardizált regressziós koefficiens: $0,187$; $p=0,013$), illetve önmagában a cystatin C (standardizált regressziós koefficiens: $0,200$; $p=0,008$) voltak két regressziós modellben (melyekben az életkor, cystatin C és az FN BMD, illetve az életkor, cystatin C és az LS BMD voltak a független változók).

	Összes férfi (n=194)	Középkorú férfi (≤59 év, n=98)	Idősebb férfi (>59 év, n=96)
Életkor (év)	60,4 (51-81)	55,6 (51-59) ^a	65,4 (60-81) ^a
BMI, (kg/m ²)	29,2 (17,3-41,7)	28,9 (18-38,5)	29,5 (17,3-41,7)
Sclerostin (pmol/L)	65,6 (27,2-114,6)	63,5 (39,2-114,6) ^b	67,8 (27,2-110,2) ^b
PTH (pmol/L)	4,2 (1-10,2)	4,2 (1-10,2)	4,3 (1,6-8,3)
25-OH-D (nmol/L)	73,1 (11-185)	72,1 (11-137)	74,0 (14-185)
OC (μg/L)	14,6 (5-35)	15,2 (5-33)	14,0 (6-35)
CTX-I (μg/L)	0,22 (0,01-0,77)	0,24 (0,01-0,77)	0,20 (0,04-0,70)
PINP (μg/L)	38,3 (10,5-98,6)	39,2 (10,5-98,6)	37,3 (13,1-81,3)
Cystatin C (mg/L)	0,697 (0,381-1,150)	0,657 (0,381-1,060) ^c	0,736 (0,485-1,150) ^c
Kreatinin (μmol/L)	78 (46-109)	77 (46-109)	79 (52-105)
eGFR (mL/perc1,73 m ²)	91 (60-165)	94 (60-165) ^d	87 (62-140) ^d
LS BMD (gm/cm ² ; átlag ± SD)	1,172 ± 0,185	1,148 ± 0,167	1,197 ± 0,199
FN BMD (gm/cm ² ; átlag ± SD)	0,970 ± 0,137	0,980 ± 0,131	0,960 ± 0,142

10. táblázat. Az csontanyagcsere paraméterek és a vesefunkció változása az életkorral az egészséges férfiak mintáiban. A feltüntetett adatok: átlag (tartomány), kivéve a BMD értékek esetén. BMI: Testtömeg index, PTH: Parathormon, 25-OH-D: 25-OH-D-vitamin, OC: Osteocalcin, CTX-I: keresztkötött I. típusú kollagén C-terminális telopeptid, PINP: I. típusú prokollagén N-terminális propeptid, eGFR: számolt glomerulus filtrációs ráta, LS BMD: L1-L4 csigolyákon mért csontdenzitás, FN BMD: Femur nyakon mért csontdenzitás, ^{a,c}p<0,001, ^bp=0,047 és ^dp=0,017 a középkorú és idősebb férfiak között.

Az életkor befolyásoló hatását kiküszöbölendő a populáció medián életkora alapján 2 csoportot képeztünk: 59 évnél fiatalabb és idősebb férfiak. Az idősebb férfiak esetében szignifikánsan magasabb szérumsclerostin, cystatin C és alacsonyabb eGFR szintet mértünk (10. táblázat), és csak ebben a csoportban volt szignifikáns korreláció a szérumsclerostin és az életkor ($r=0,259$; $p=0,011$), illetve a cystatin C szint ($r=0,522$; $p<0,001$) között. Egy regressziós modellbe építve az életkor és a cystatin C hatását, csak a cystatin C volt a szérumsclerostin koncentráció egyetlen szignifikáns előrejelzője (standardizált regressziós koefficiens: 0,487; $p<0,001$). A középkorú férfiak csoportjában a sclerostin nem mutatott összefüggést egyetlen vizsgált paraméterrel sem.

A szérumsclerostin szint összefüggést mutatott a csontdenzitással is, de csak a lumbális csigolyán mért értékekkel. A normál LS-BMD-vel (T score > -1,0; n=125) rendelkező egyének szérumában szignifikánsan magasabb sclerostin szintet mértünk, a csökkent LS-BMD-jű (T score ≤ -1,0; n=69) csoporthoz képest ($67,5 \pm 16,3$ vs. $62,2 \pm 12,2$ pmol/L, $p=0,027$). Még kifejezettebb volt a különbség, ha a normál LS-BMD-jű csoporton belül az

idősebb és középkorú férfiakat hasonlítottuk össze ($70,4 \pm 17,0$ vs. $63,9 \pm 11,5$ pmol/L, $p=0,019$).

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált 50 év feletti férfi populációban a szérumban a sclerostin szint emelkedik az életkor előrehaladtával. A Cystatin C-vel, kreatininnal és az eGFR-rel való összefüggése egyértelműen jelzi, hogy a sclerostin koncentrációt befolyásolja a veseműködés hatékonysága. Az idősebb korra jellemző mérsékelt vesefunkció beszűkülés lehet részben magyarázata a sclerostin emelkedett szintjének az idősebb betegek mintáiban.

6.2.7. A plazma proteom jellemzésére használható új mAb-alapú array (QP300 kit) analitikai és funkcionális tesztelése tüdő tumoros betegek mintáin

A biomarker azonosítás újabb és nagyhatékonyságú lehetősége a különböző "omika" technológiák alkalmazása. Ezek segítségével - legtöbbször hipotézismentesen - vizsgálunk több száz/ezer/tízezer paramétert (génexpresszió, SNP-k, fehérjék, metabolitok, stb.) pl. két összehasonlítandó betegcsoport mintáin, és azokat választjuk ki, amelyek a leghatékonyabban tesznek különbséget a két vizsgált csoport között. A dolgozat ezen részében erre mutatunk be egy speciális példát.

A QP300 kit a plazma proteom profilizálására használható új eszköz, amely 290 monoklonális ellenanyagot tartalmazó fehérje array. Ezek az antitestek a plazmában található fehérjék különböző epitópjait ismerik fel, és az azonosított protein (epitóp) mennyiségi meghatározását teszik lehetővé. Alapvetően egy kompetitív immunoassay-ról van szó, ahol a kerámia chiphez kötött antitestek vetekszenek a mintában lévő jelöletlen és a mintákhoz adott biotinnal jelölt antigénekért. A detektálás streptavidin-PO konjugátum és lumineszcens szubsztrát segítségével történik. A chipről CCD kamerával felvétel készül, és az egyes foltok helye azonosítja az antitestet/antigént, míg a folt denzitása fordítottan korrelál a mintában lévő jelöletlen antigén mennyiségével. Ha csak a biotinált plazma tracer van jelen (és beteg/kontroll minta nem) akkor kapjuk a "maximális jelintenzitás"-t (RLU_{max}), ha beteg vagy kontroll minta is, akkor az RLU_{max}-nál kisebb "minta jelintenzitás"-t (RLU) mérjük. Az értékelés során minden minta esetében RLU/RLU_{max}%-ot számoltunk, és ezt a paramétert vetettük össze a betegek és kontrollok összehasonlítása során.

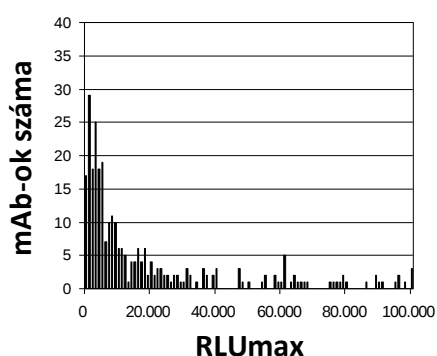
Miután - a BioSystems International kft. és a RANDOX cég által - újonnan kifejlesztett rendszerről van szó, a lehetőségekhez mérten, először a kit analitikai validálását végeztük el, amit a klinikai verifikálás követett tüdő tumoros betegek és egészséges kontrollok mintáin.

6.2.7.1. A QP300 array analitikai tesztelése - az RLUMax vizsgálata

Ezekben a kísérletekben a biotinnal jelölt plazmát („tracer”-t) inkubáltuk önmagában a chipen – sem kontroll, sem beteg plazma nem volt jelen a rendszerben. Az így kapott maximális jelintenzitás az RLUMax; ennek megoszlását, inter-assay és lot-to-lot variabilitását vizsgáltuk meg az analitikai értékelés során.

6.2.7.1.1. Az RLUMax értékek megoszlása

A kísérlet során a biotinnal jelölt plazmát („tracer”-t) inkubáltuk önmagában a QP300 kit 18 db összetartozó chipjén tíz független alkalommal. A 10 db napi RLUMax értékből számoltunk átlagot és szórást minden mAb esetében. Az átlagos RLUMax érték 1.000 alatt volt 17 mAb, 1.000-10.000 között volt 147 mAb, 10.000-20.000 között volt 44 mAb, 20.000-50.000 között volt 43 mAb, míg 50.000-nél nagyobb volt 39 mAb esetében (28. ábra)



28. ábra Az RLUMax értékek megoszlása a QP300 kit mAb-jai esetében. Tíz mérési nap RLUMax értékeiből számolt átlagot vettünk figyelembe minden mAb esetében.

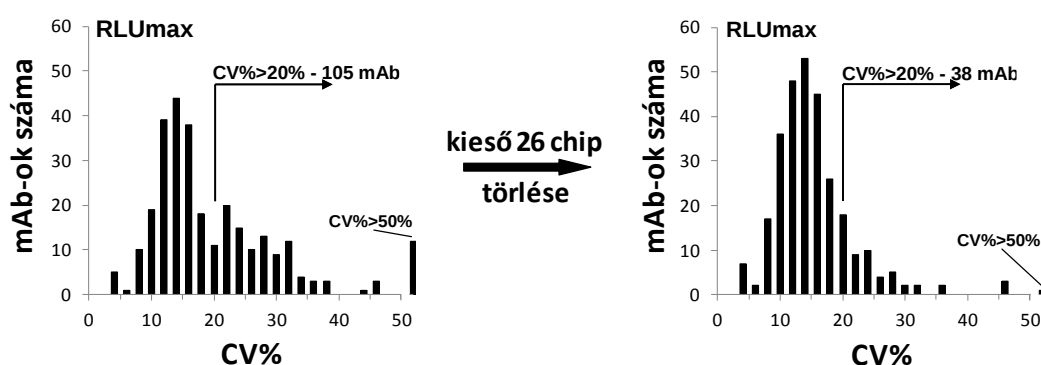
6.2.7.1.2. Az RLUMax értékek intra-assay analízise

Miután egy QP300 kit maximálisan 2 minta mérésére alkalmas, ezért analitikai szempontból kielégítő intra-assay analízis elvégzésére nem volt mód.

6.2.7.1.3. Az RLUMax értékek inter-assay analízise

Daganatos betegektől és egészséges kontrolloktól származó plazmamintákat vetettünk össze 56 db QP300 kittet felhasználva. Minden mérés során a tracer-t önmagában is lemértük, ugyanis ehhez hasonlítottuk a beteg/kontroll plazmaminták jelenlétében mért RLU értékeket. Az 56 kísérlet során mért egyedi RLUMax értékekből átlagot, SD-t és a CV%-ot számoltunk minden egyes mAb esetében.

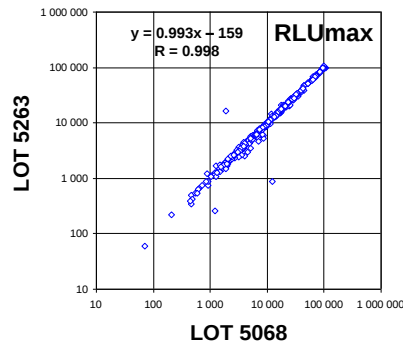
A CV% 105/290 mAb esetében volt 20%-nál nagyobb. Kritikus értékelésnek alávetve az eredményeket arra a megállapításra jutottunk, hogy bizonyos chipok egyes kísérletekben a chipen lévő szinte valamennyi mAb esetében kiugró eredményeket adtak az 56 mérés RLUMax átlagához viszonyítva. Az 56 QP300 kitben lévő 1008 chipból összesen 26 ilyen chipet azonosítottunk, ahol tehát, a vizsgált mAb-ok több mint egyharmadánál, a generált RLUMax érték több mint 50%-kal magasabb vagy alacsonyabb volt, mint az 56 egyedi RLUMax érték átlaga. Feltételezve, hogy ezek a chipok a gyártás során nem megfelelően lettek elkészítve, az ezek által generált valamennyi adatot kiejtettük az analízisből ("outlier"-ek). A reprodukálhatóság sokkal jobb lett a 26 chip adatainak elhagyása után; a CV% csak 38 mAb esetben haladta meg a 20%-ot. Ebből a 38 mAb-ból 5 esetben az RLUMax értéke kisebb volt, mint 500, míg további 7 esetben 500-1000 közötti értéket mértünk (29. ábra).



29. ábra: Az RLUMax értékek inter-assay CV% megoszlása a QP300 kit antitestjei között a szisztémás hibát mutató 26 chip törlése előtt és után. Az analízis során 56 mérési nap RLUMax értékeiből számoltunk átlagot, szórást és CV%-ot. A tesztelt 1008 chipből 26 esetben észleltünk extrém RLUMax értékeket a chipen lévő antitestek legalább egyharmadánál. Ezen 26 chip valamennyi adatát kihagyva újra kalkuláltuk a CV% értékeket és ezek megoszlása látszik a jobb oldali ábrán.

6.2.7.1.4. Az RLUMax értékek lot-ok közötti variabilitása

Annak érdekében, hogy értékeljük a QP300 kit sorozatok közötti reprodukálhatóságát a mért RLUMax értékeket vizsgáltuk két azonos időben (2013 októberében) készült, de eltérő sorozatszámú QP300 kit esetében. Az 5068-as lot kitjeit 56 független kísérletben teszteltük, míg az 5263-es lot esetében 13 mérési nap kísérleteit analizáltuk. Minden kísérletben a „tracer only” minta egyszer lett lemérve és az 56, illetve 13 napi RLUMax értékekből átlagot számoltunk. Az átlagos RLUMax értékek az 5068 és 5263 sorozatok között nagyon hasonlóak voltak, ($R = 0,998$) (30. ábra). Három antitest esetében volt kisebb eltérés a két lot között.



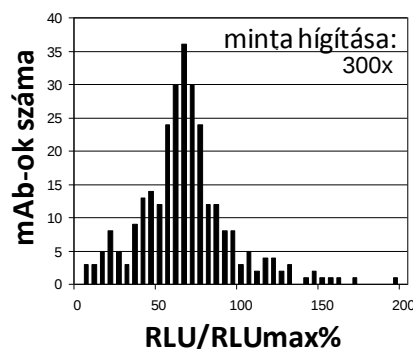
30. ábra A QP300 kittel mért átlagos RLUMax értékek lot-to-lot variabilitása. Az 5068-as lot esetében 56, míg az 5263-as lot esetében 13 mérési nap RLUMax értékeiből számolt átlagot tüntettük fel.

6.2.7.2. A QP300 array analitikai tesztelése - kontrollok mintáiból készült pool analízise

Egészséges kontrollok egyedi mintáit összemérve egy kontroll poolt készítettünk, majd ezt aliquotozva tároltuk -80°C-on. Ezeket az aliquotokat használtuk a későbbiek során a QP300 kit analitikai validálására. A poolozott kontroll plazmát egy hígításban (300x) vizsgáltuk. Minden kísérletben a 300x-os hígításhoz tartozó RLU értéket mértük meg, és ebből RLU/RLUMax%-ot számoltunk. Ennek a megoszlását és inter-assay variabilitását vizsgáltuk meg.

6.2.7.2.1. Az RLU/RLUMax% értékek megoszlása

Tíz független, egyedi kísérletben mértük le a poolozott kontroll plazma minta 10 aliquotját (300x-os hígításban), 10 db QP300 kittel. Az RLU/RLUMax% értékeket meghatároztuk mind a 10 mérési napon, és ebből a 10 értékből számoltunk átlagot minden mAb esetében. A 300x-os plazmahígítást tesztelve az átlagos RLU/RLUMax% 245 mAb esetében volt 10%-90% között, 6 mAb esetében volt 10% alatt és 39 mAb esetében számoltunk 90%-nál nagyobb értéket (31. ábra).



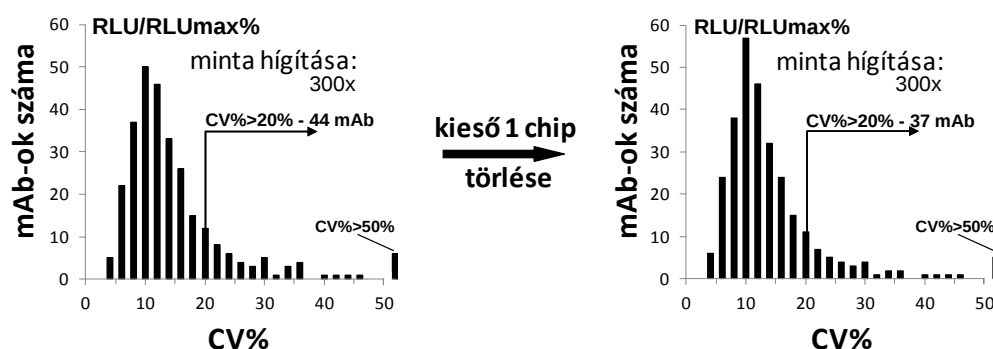
31. ábra Az RLU/RLUMax%-ok megoszlása a QP300kit mAb-jai esetében. Egy poolozott plazma minta aliquotjait mértük le tíz független kísérletben 10 nap során. Minden alkalommal meghatároztuk az RLU/RLUMax% értéket és az ezekből számolt átlagot vettük figyelembe minden mAb esetében.

6.2.7.2.2. Az RLU/RLUmax% értékek intra-assay analízise

Miután egy QP300 kit maximálisan 3 minta (1 db "tracer only" + 2 db beteg/kontroll minta) mérésére alkalmas, ezért analitikai szempontból kielégítő intra-assay analízis elvégzésére nem volt mód.

6.2.7.2.3. Az RLU/RLUmax% értékek inter-assay analízise

A poolozott normál plazma aliquotjainak egy hígítását (300x) vizsgáltuk 10 független kísérletben, tíz QP300 kittet használva. A tíz mérés során kapott RLU/RLUmax% értékek átlag, SD és CV% értékeit kiszámítottuk minden egyes mAb esetében. A CV% 44/290 mAb esetében volt 20% feletti érték. Kritikus értékelésnek alávetve az eredményeket arra a megállapításra jutottunk, hogy egyetlen chip egy kísérletben a chipen lévő szinte valamennyi mAb esetében kiugró eredményeket adott a 10 mérés RLU/RLUmax% átlagához viszonyítva (>50%-kal kisebb, mint az átlag). Feltételezve, hogy ez a chip a gyártás során nem megfelelően lett elkészítve, a chip által generált valamennyi adatot kiejtettük az analízisből. Ezt követően a CV% 37 mAb esetben haladta meg a 20%-ot. Ezek közül 16 esetben 1, míg 8 esetben 2 kiugró érték elhagyása lecsökkentette a CV%-ot 20% alattira, azonban a további 13 antitest mellett 2-nél több volt a kieső értékek száma (32. ábra).



32. ábra: Az RLU/RLUmax% értékek inter-assay CV% megoszlása a QP300 kit antitestjei között a szisztémás hibát mutató 1 chip törlése előtt és után. Egy poolozott plazma minta aliquotjait mértük le tíz független kísérletben 10 nap során. A 10 mérési nap RLU/RLUmax% értékeiből számoltunk átlagot, szórást és CV%-ot. A tesztelt 180 chipből 1 esetben észleltünk extrém RLU/RLUmax% értékeket a chipen lévő antitestek legalább egyharmadánál. Ezen 1 chip valamennyi adatát kihagyva újra kalkuláltuk a CV% értékeket és ezek megoszlása látszik a jobb oldali ábrán.

Az analitikai vizsgálat eredményét összefoglalva az 56 kísérlet során felhasznált 1188 chip-ből 27 esetben észleltünk szisztémás hibát, és ezek adatait kihagytuk az analízisből. Az RLUmax és RLU/RLUmax% értékek analitikai értékelése alapján valamennyi vizsgálatot (inter-assay, lot-to-lot variabilitás) figyelembe véve 252 mAb adott megbízhatóan reprodukálható adatot, míg 38 mAb esetében gyengébb reprodukálhatóságot találtunk.

6.2.7.3. Tüdőtumoros betegek és kontrolljaik egyedi mintáinak összevetése a QP300 kittel

Az analízis során azt vizsgáltuk meg, hogy a QP300 biomarkerek (290 db), a klasszikus tumormarkerek, valamint az albumin, totál protein és a CRP képesek-e önmagukban vagy egymással kombinálva a tüdő tumoros betegek és egészséges kontrollok megkülönböztetésére. A vizsgálatba bevont korban, nemben és lehetőség szerint dohányzási szokásokban illesztett betegek és kontrollok száma 46-46 volt.

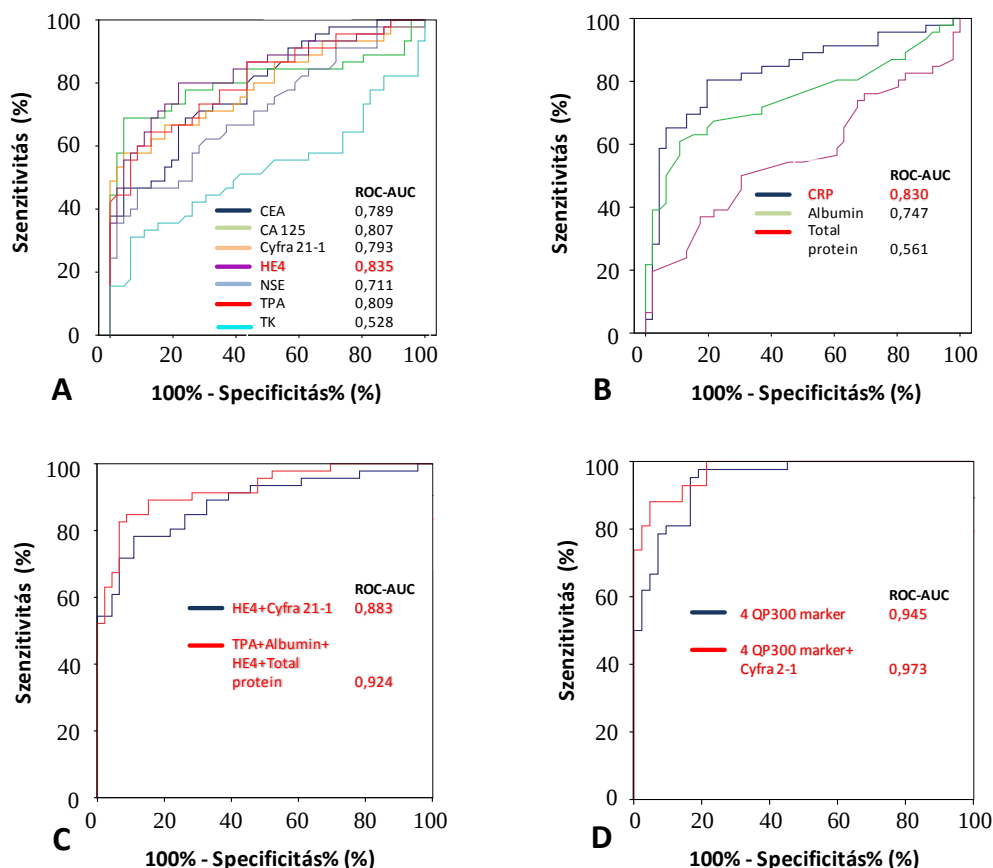
Az analízis első lépésében a tumormarkerek diszkriminatív erejét vizsgáltuk meg önmagukban. Az elvégzett ROC analízis alapján a HE4 (ROC-AUC: 0,835 [95%CI: 0,751-0,919, $p < 0,0001$]), TPA (ROC-AUC: 0,809 [95%CI: 0,720-0,898, $p < 0,0001$]) és CA 125 (ROC-AUC: 0,807 [95%CI: 0,708-0,906, $p < 0,0001$]) markerek ROC görbealatti területei voltak a legnagyobbak (33A. ábra). A CRP, albumin és totál protein diszkriminatív erejét megvizsgálva a CRP a HE4-hez hasonló eredményt adott (ROC-AUC: 0,830 [95%CI: 0,742-0,918, $p < 0,0001$]), a másik 2 marker ennél alacsonyabbat (33B. ábra).

Ezt követően a tesztelt 7 klasszikus tumormarkert, a CRP-t, albumint és totál proteint egy bináris logisztikus regressziós modellbe vittük forward módszerrel, és ennek során négy változó (albumin, totál protein, HE4 és TPA) beépítése eredményezett szignifikáns javulást a predikcióban, így ezt a 4 markert alkalmaztuk a létrehozott score-ban. Az új paraméter még hatékonyabban különítette el a kontrollokat a betegektől (ROC-AUC: 0,924 [95%CI: 0,870-0,978, $p < 0,0001$]): a betegek és kontrollok 89,0%-át azonosította helyesen (33C. ábra).

A következő lépésben a QP300 kit biomarkereit vizsgáltuk meg. A QP300-as kittek RLUMax értékeinek analitikai evaluálása során elvégzett korrekciók (6.2.7.1.3.) alapján módosított adatsort analizáltuk. Miután a vizsgálatban résztvevő személyek száma relatíve alacsony a vizsgált markerek számához képest először az önmagában legjobban teljesítő BSI markerek azonosítását végeztük el. Az eredmények normalitásától függően kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze a kontrollok és betegek RLU/RLUMax% értékeit, antitestenként. A 8 legjobban teljesítő markert vittük egy bináris logisztikus regressziós modellbe forward módszerrel és ennek eredményeként kapott új paraméter rendkívül hatékonynak bizonyult (ROC-AUC: 0,945 [95%CI: 0,901-0,989, $p < 0,0001$]): a vizsgálatban résztvevő személyek 83,8%-át azonosította helyesen (33D. ábra). A 4 BSI marker és a klasszikus tumormarkerek kombinálása még tovább javította a rendszer diszkriminatív erejét. A logisztikus regressziós modellbe a BSI markerek mellett a Cyfra 21-1 került még be. Ez a betegek és kontrollok 90,4%-át azonosította helyesen a ROC-AUC értéke pedig 0,973 [95%CI: 0,946-0,999, $p < 0,0001$] volt (33D. ábra).

A 290 BSI markerből az önmagában legjobban teljesítők kiválasztására a klasszikus statisztikai módszerek mellett egy másik módszert is kipróbáltunk. Random forests

analízissal állítottuk sorrendbe az egyes antitesteket. 1.000 döntési fa analízise után a 8 legjelentősebbet vittük be a logisztikus regressziós modellbe, melyek közül 2 került be a végső score-ba. Ez a betegek és kontrollok 85,5%-át azonosította helyesen, a ROC-AUC értéke pedig 0,887 [95%CI: 0,812-0,961, $p < 0,0001$] volt. A klasszikus tumormarkerek, a CRP, az albumin és a totál protein nem javították szignifikánsan ezt a regressziós modellt.



33. ábra: A QP300 kit markerei, a klasszikus tumormarkerek, a CRP, albumin, totál protein és az ezekből alkotott új paraméterek diszkriminatív ereje 46 kontroll és 46 tüdő tumoros beteg összehasonlítása során. Nemben, korban és dohányzási szokásokban illesztett betegek és kontrollok adatait vetettük össze ROC analízis segítségével. Az A ábra az egyedi tumormarkerek hatékonyságát, a B ábra a CRP, az albumin és a totál protein diszkriminatív erejét mutatja be. A C ábrán a tumormarkerek és kémiai paraméterekből készült kompozit score-ok ROC görbéi láthatóak, míg a D ábra 4 QP300 marker és a Cyfra 21-1 segítségével létrehozott új paraméterek ROC analízisét mutatja.

A plazma proteom profilizálására alkalmas QP300 kit segítségével lehetőség nyílik hatékonyan működő új biomarkerek azonosítására. Különböző matematikai algoritmusok segítségével ezek az új markerek, a klasszikus tumormarkerek, illetve egyéb rutin kémiai paraméterek kombinálhatók egymással egy kompozit score-rá, ami tovább fokozhatja diszkriminatív erejüket.

6.3. GENETIKAI MARKEREK

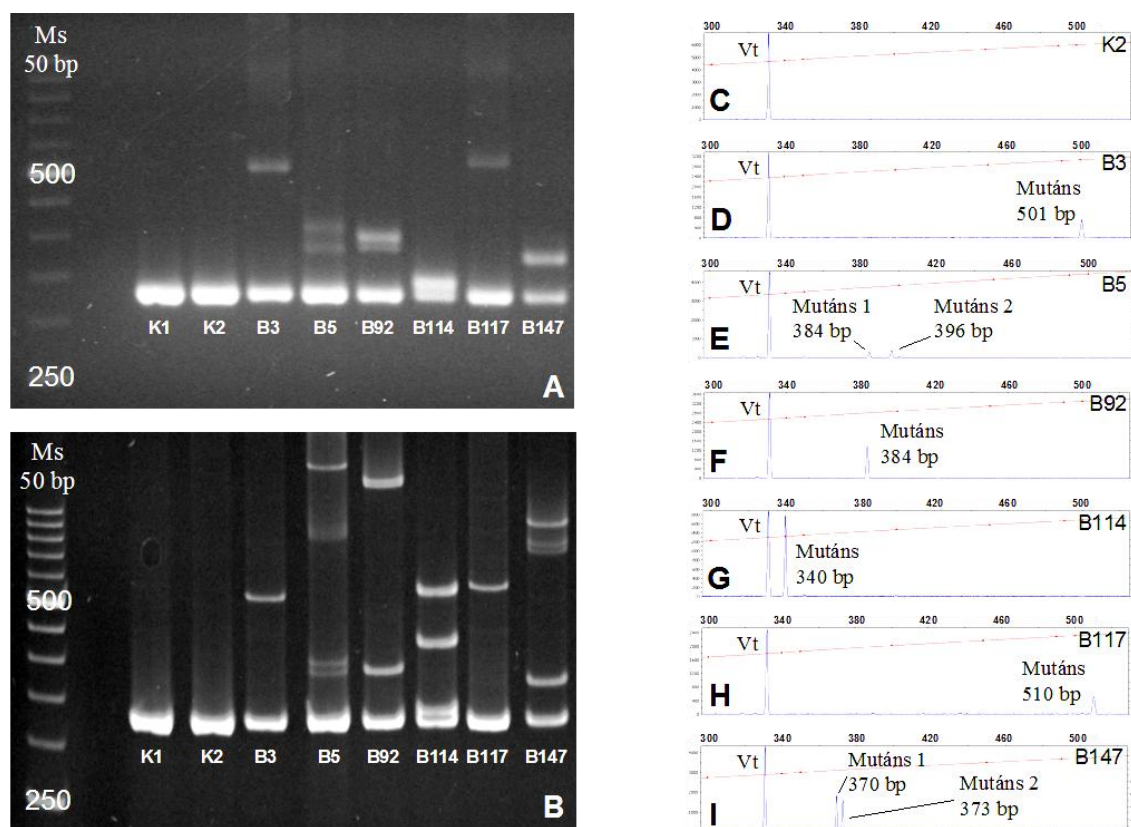
6.3.1. Az FLT3-ITD tesztelésére alkalmas módszer beállítása és validálása

Az FLT3 gén 14-15. exonját és a közöttük lévő intront érintő belső tandem duplikációk (ITD) viszonylag nagy gyakorisággal fordulnak elő az akut myeloid leukemias betegek mintáiban és - az NPM1 gén mutációival kölcsönhatásban - negatív prognosztikai markernek számítanak. Az FLT3-ITD kimutatására számos módszer áll rendelkezésre, de újabb adatok szerint az ITD mérete és a mutáns allél aránya is bírhat prognosztikai jelentőséggel, ezért nem elegendő csak az FLT3-ITD kimutatása, de a két említett numerikus paraméter meghatározása is esszenciális [325,332,353,357-360]. Ezeket a paramétereket szemikvantitatív AGE vagy PAGE, denaturáló HPLC, Agilent Bioanalyser, kapilláris elektroforézis (CE) vagy valósídejű kvantitatív PCR segítségével határozhatjuk meg. Miután a rutin hemato-onkológiai gyakorlatban dominálónan házi fejlesztésű módszereket használnak a laboratóriumok, az ilyen tesztek analitikai vizsgálata - különösen a kvantitatív assay-ké - esszenciális. Munkánk során az FLT3-ITD kimutatására a rutin gyakorlatban leginkább elterjedt három módszer - PCR-t követő agaróz vagy poliakrilamid vagy kapilláris elektroforézis - analitikai tulajdonságait és hatékonyságát vetettük össze.

6.3.1.1. Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban három különböző elektroforetikus módszerrel

Az FLT3-ITD kimutathatóságát 73 AML-es felnőtt beteg 95 darab DNS mintájában vizsgáltuk meg három különböző elektroforetikus módszer segítségével. Vizsgálataink során 18 beteg esetében kettő, 2 beteg esetében három független mintán végeztünk analízist. A három módszer diagnosztikus érzékenysége hasonlóan adódott, valamennyi segítségével sikerült 18 beteg 20 mintájában pozitivitást kimutatni.

A kapilláris elektroforézis alapján meghatározott ITD paraméterek a következőképpen alakultak: ITD méret 9-178 bázispár (medián 40 bp), a mutáns/vad allél aránya 0,006-3,714 (medián 0,144), a mutáns/összes allél aránya 0,48-77,8% (medián 12,5%). Kilenc beteg esetében egynél több mutáns allél is kimutatható volt (többszörös ITD). A kapilláris elektroforézis során két mutációra utaló csúcsot 7, három csúcsot 2 minta mutatott. Alapvetően mindhárom módszer képes volt az FLT3-ITD pozitivitás azonosítására, azonban különbség volt az eredményekben a mutáns allélek számát, méretét és intenzitását illetően (34. ábra).



34. ábra Az FLT3-ITD pozitív és negatív DNS minták vizsgálata PCR + három különböző elektroforetikus módszer segítségével. A mintákból izolált genomi DNS-t PCR segítségével amplifikáltuk. Ennek termékét (10 μ l) 3% agaróz (A) és 6% poliakrilamid gél (B) segítségével analizáltuk. A kapilláris elektroforézishez külön PCR-t használtunk fluoreszcensen jelölt forward primerrel. A mintákat ABI310 készülékkel vizsgáltuk, a PCR-termékek méretét PeakScanner szoftver és ROX-500 méret-standard segítségével határoztuk meg (C, D, E, F, G, H, I). A vad-típusú allélról amplifikálódott termék mérete 331 bp, az ennél nagyobb méretű sávok ITD jelenlétére utalnak. (K: kontroll, B: beteg, Vt: vad típus, Ms: molekulásúly marker).

6.3.1.2. Az elektroforetikus rendszerek reprodukálhatóságának vizsgálata

Két ITD-pozitív mintát használtunk a vizsgálathoz. A 35-ös sorszámú AML-es beteg (B35) mintájára egy nagy és egy alig látható kisebb mutáns csúcs volt jellemző 387 és 339 bp-nál, míg a 80-as sorszámú AML-es beteg (B80) mintája esetében egy nagy és egy nagyon kis intenzitású mutáns csúcsot láttunk 355 és 398 bp-nál CE segítségével.

Az intra-assay variabilitást kétféleképpen vizsgáltuk. Egyrészt, a két mintát (B35 és B80) tízszer amplifikáltuk ugyanolyan körülmények között, ugyanazon a napon, majd mindegyik PCR terméket kapilláris elektroforézissel értékeltük (11A. táblázat, „10 cső”). Másrészt, a tíz PCR termék egyikét tízszer injektáltuk a kapillárisba (11A. táblázat, „1 cső”). A PCR termékek méretéből kalkulált intra- és inter-assay CV% rendkívül alacsony volt (<0,2%). Az ITD (mutáns allél mínusz a vad allél) mérete szintén jó reprodukálhatóságot mutatott (intra- és inter-assay CV% <1%, ill. <2%), ha az ITD nagysága nagyobb volt, mint 24 bp. A B35 minta ITD1 esetében kisebb, 9 bázispárnnyi

inzericiót észleltünk, relatíve nagyobb intra- és inter-assay CV%-kal (7 és 11%) (11A. táblázat).

A - FLT3-ITD-méret	ITD 1 ^b	ITD 2 ^b
B35 minta^a		
Intra-assay variáció (1 cső)^c	8,3±0,6 (7,2%)	56,1±0,3 (0,5%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	7,7±0,5 (6,5%)	55,7±0,1 (0,2%)
Inter-assay variáció^d	9,1±1,0 (11,0%)	56,5±0,6 (1,1%)
B80 minta^a		
Intra-assay variáció (1 cső)^c	24,4±0,2 (0,8%)	67,6±0,3 (0,4%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	24,1±0,2 (0,8%)	67,1±0,4 (0,6%)
Inter-assay variáció^d	24,8±0,4 (1,6%)	68,1±0,7 (1,0%)

B - FLT3-ITD-arány	Mutáns 1/Totál (%) ^{a,b}	Mutáns 2/Totál (%) ^{a,b}
B35 minta^a		
Intra-assay variáció (1 cső)^c	0,39±0,20 (51,3%) ^e	63,9±0,5 (0,8%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	0,43±0,34 (79,1%)	65,3±1,6 (2,5%)
Inter-assay variáció^d	0,63±0,36 (57,1%)	65,7±2,4 (3,7%)
B80 minta^a		
Intra-assay variáció (1 cső)^c	11,9±0,1 (0,8%) ^e	1,5±0,1 (6,7%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	12,6±0,2 (1,6%)	1,2±0,1 (8,3%)
Inter-assay variáció^d	12,5±0,5 (4,0%)	1,3±0,3 (23,1%)

11. táblázat A kapilláris elektroforézissel végzett FLT3-ITD-méret és -arány meghatározás analitikai jellemzői. ^aKét FLT3-ITD pozitív, két-két mutáns allélt hordozó mintát (B35 és B80) vizsgáltunk. ^bA vad típusú és mutáns allélok méretét és a vad típusú és mutáns allélok görbe alatti területeit (AUC) CE-vel határoztuk meg. Az ITD méreteket a mutáns és vad-típusú allélokról amplifikálódott PCR termékek méretkülönbségéből számoltuk ki. A mutáns allélok arányát az $AUC_{\text{mutáns allél}} / AUC_{\text{mutáns+vad típusú allélok}}$ képlet segítségével számoltuk ki. ^cAz intra-assay variabilitás meghatározása: i, a két pozitív mintával tízszer végeztünk PCR-t ugyanolyan körülmények között ugyanazon a napon, majd mindegyik PCR-terméket egymástól függetlenül vizsgáltuk CE-vel ("10 cső"); ii, a 10 PCR-termékből egyet kiválasztva, egymás után tízszer vizsgáltuk az analízátorral ("1 cső"). ^dA mintákat 10 egymást követő napon napi egy alkalommal amplifikáltuk és analizáltuk. ^eA feltüntetett számadatok: átlag±SD (CV%).

A mutáns/összes allél hányados reprodukálhatósága már változatosabb képet mutatott (11B. táblázat). A B35 minta ITD2 és a B80 minta ITD1 esetében a mutáns/összes allél hányados 65% és 12%, az intra- és inter-assay CV%, pedig 5% alatt volt. A B80 minta

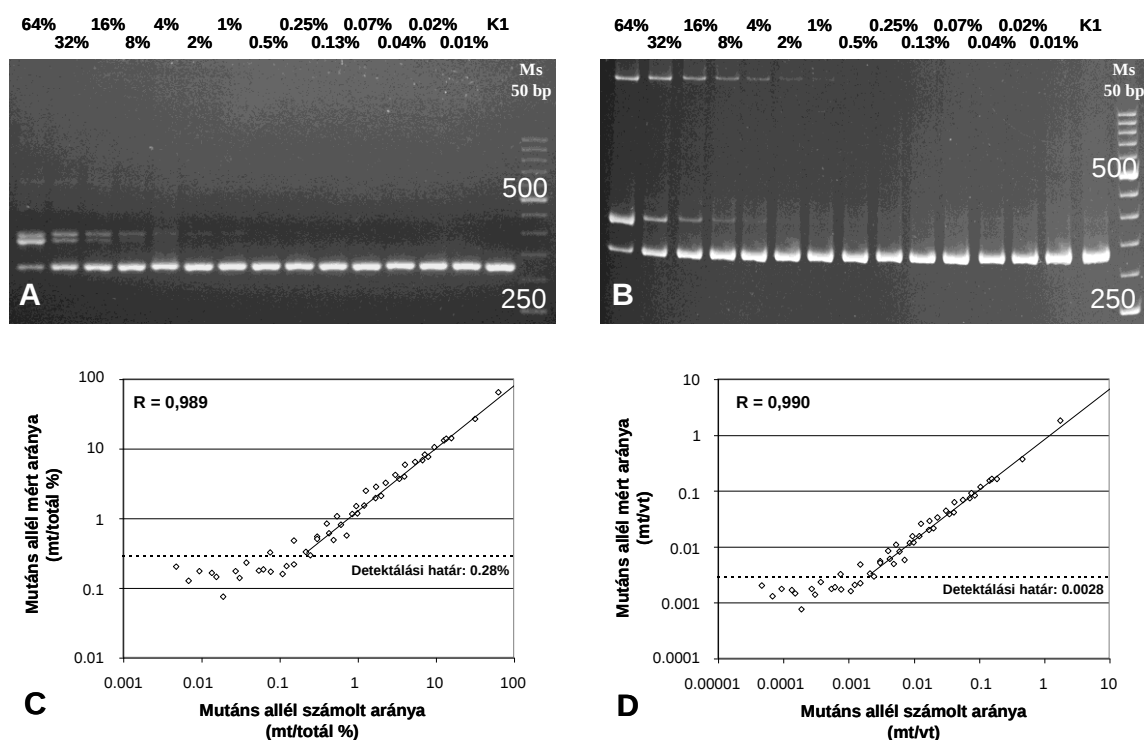
ITD2 esetében, ahol a mutáns/összes allél arány 1,2-1,5% volt, az intra-assay CV% 7-10%-nak, míg az inter-assay CV% 25%-nak adódott. 1% alatti mutáns/összes allél hányadosnál (B35 minta ITD1) a CV% 50% felett volt.

A reprodukálhatósági tesztek elvégeztük az AGE és a PAGE esetében is mindkét pozitív mintával. A nagyobb mennyiségben jelenlévő mutáns allérról amplifikálódó PCR termék jól látható volt minden nap és minden futtatásnál, és az intenzitása sem változott észlelhetően. Ugyanakkor, a kisebb intenzitású mutáns sáv nem volt detektálható egyik minta esetében sem.

6.3.1.3. Az elektroforetikus rendszerek érzékenységének vizsgálata

Az elektroforetikus módszerek érzékenységének összehasonlítása során a B35 minta DNS-éből egy ITD-negatív DNS-sel sorozathígítást készítettünk. A DNS koncentráció az FLT3 pozitív és negatív mintában egyenlő volt. A mutáns/összes allél arányt a B35 mintában CE és PeakScanner analízis segítségével határoztuk meg, a hígított DNS mintákban pedig a hígítási faktor alapján számoltuk ki (35A. és 35B. ábra). A DNS mixeket az FLT3 PCR-rel amplifikáltuk, majd 10 µl terméket vizsgáltunk agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. A domináns mutáns allél kimutatható volt 1-2%-os hígításnál mindkét módszerrel (35A. és 35B. ábra), de a minor mutáns allél nem volt detektálható.

A hígított DNS-eket fluoreszcensen jelzett forward és jelöletlen reverse primerrel is amplifikáltuk, majd CE-vel analizáltuk. A mutáns/vad típus (35D. ábra), illetve mutáns/összes allél hányadost (35C. ábra) PeakScanner analízissel állapítottuk meg. A hígítási görbe lineáris részének alsó határát úgy határoztuk meg, hogy egy változó cutoff értéket teszteltünk, ami a kalkulált mutáns/összes allél arány esetén 0,1-0,5% között (35C. ábra), míg a kalkulált mutáns/vad típusú allél arány esetében 0,001-0,005 között mozgott (35D. ábra). Egy lineáris regressziós vonalat húztunk az aktuális cutoff feletti pontokon keresztül, és a két vizsgált hányados esetében a 0,2% és 0,002 cutoffhoz tartozott a legjobb regressziós koefficiens ($R=0,989$ és $R=0,990$). Az assay analitikai érzékenységét a legalacsonyabb mutáns allél hányadossal rendelkező 10 adatpontot figyelembe véve állapítottuk meg. Ezek átlag+3SD-je 0,28% és 0,0028 volt, amely megadta a két hányados detektálási limitjét (35C. és 35D. ábra).



35. ábra A három elektroforetikus rendszer érzékenysége az FLT3-ITD kimutatása során. Egy ITD-pozitív DNS mintából (B35) sorozathígítást készítettünk egy ugyanolyan koncentrációjú ITD-negatív mintát felhasználva. A mixeket amplifikáltuk, majd 10 μ l PCR-terméket agaróz (3%, A), illetve poliakrilamid (6%, B) gélen analizáltunk. A sávok feletti számok a kalkulált mutáns/totál allél arányt mutatják. Az FLT3 vad típusú allél PCR termékének mérete 331 bp, a mutánsé 387 bp. A kapilláris elektroforézishez fluoreszcensen jelölt forward primerrel amplifikáltuk a DNS mixeket. A vad típusú és mutáns csúcsok alatti területeket a PeakScanner szoftverrel határoztuk meg, és a mért AUC arányokat (C: mutáns/totál, D: mutáns/vad típus) a számolt arányokkal vetettük össze. Az ábra C és D részén a regressziós egyenesek a 0,2% mutáns/totál és a 0,002 mutáns/vad típus arány feletti pontokra illeszkednek, míg a detektálási cut-off értékeit (szaggatott vonal) a legalacsonyabb 10 pont arányaiból számoltuk ki (átlag+3SD). Az ábra A és B része egy reprezentatív kísérletet mutat háromból, míg a C és D része három független meghatározás adatait összegezve jeleníti meg. (mt: mutáns, vt: vad típusú, K: FLT3-ITD negatív kontroll, Ms: molekulásúly marker).

6.3.1.4. Az elektroforetikus rendszerek felbontásának vizsgálata

Megvizsgáltuk a három elektroforézis rendszer maximális felbontását is. A 144-es sorszámú AML-es beteg (B114) mintájában a vad és mutáns allél PCR termékének 9 bázispárnyi különbségét mindhárom módszer ki tudta mutatni (34A., 34B., és 34G. ábra). Ugyanakkor a 147-es sorszámú beteg (B147) mintája esetében a 370 bp és 373 bp mutáns allélok ugyan jól detektálhatóak kapilláris elektroforézissel, de ez a három bázispárnyi különbség agaróz vagy poliakrilamid gél elektroforézis segítségével már nem volt feloldható (34A., 34B. és 34I. ábra).

Minta ^a	DNS szekvenálás ^a	PeakScanner ^b	GeneScan ^b
B13	c.1773_1793dup21 ^a	19,2±0,3 bp ^c	19,7±0,4 bp
B16	c.1742_1777dup36	32,7±0,2 bp	33,4±0,9 bp
B35	c.1776_1833dup58 + c.1833_1834insCC	56,5±0,6 bp	56,9±0,5 bp
B55	c.1773_1793dup21	19,1±0,2 bp	18,9±0,2 bp
B58	c.1772_1833dup62 + c.1833_1834insGAGA	61,5±0,2 bp	60,9±1,4 bp
B80	c.1734G>A + c.1734_1735insCAACCAACCAACCATGCGAGGGCCTCC	24,8±0,4 bp	25,0±0,7 bp
B92	c.1790_1835dup46 + c.1835_1836insCCTCCCCACGG	52,5±0,3 bp	52,5±0,3 bp
B113	c.1762_1827dup66	61,3±1,1 bp	61,5±1,0 bp
B114	c.1788_1789insGGGGTCCCT	9,0±0,1 bp	9,1±0,1 bp
B125	c.1786_1837+3dup55 + c.1837+3_1837+4insCC	52,3±0,6 bp	52,0±1,3 bp

12. táblázat A PeakScanner és GeneScan programokkal, valamint a DNS szekvenálással meghatározott FLT3-ITD méretek összehasonlítása. ^aA 10 ITD-pozitív minta DNS-ét bidirekcionális szekvenálással vizsgáltuk, majd meghatároztuk a domináns mutáns allélben a duplikált/inzertálódott nukleotidok helyét és számát. ^bA vad-típusú és mutáns allélok méretét CE-vel határoztuk meg a PeakScanner és GeneScan programok segítségével. Az ITD méreteket a mutáns és vad-típusú allélokról amplifikálódott PCR termékek méretének különbsége adta. ^cA feltüntetett adatok: átlag±SD (n=3-10). (bp: bázispár)

6.3.1.5. A kapilláris elektroforézissel, illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása

Jól ismert tény, hogy az ITD minden esetben olvasókeret eltolódást nem okozó „in-frame” genetikai elváltozás. Ez egyben azt is jelenti, hogy az ITD-t tartalmazó nukleotidok száma mindig osztható hárommal. Meglepő módon a CE segítségével kapott ITD méret adatokra ez nem volt minden esetben igaz. Éppen ezért 10 ITD-pozitív minta DNS-ét direkt szekvenálással is megvizsgáltuk, majd a duplikált/inzertálódott nukleotidok számát a CE által meghatározott ITD mérethez hasonlítottuk (12. táblázat). A két módszer közötti korreláció nagyon erős volt ($R=0,999$), de a duplikátum/inzertum mérete DNS szekvenálással 7%-kal nagyobbak bizonyult, mint CE-vel ($\text{Méret}_{\text{szekvenálással}} = 1,07 \times \text{Méret}_{\text{CE}} + 0,5$). Kizártuk azt a lehetőséget is, hogy az észlelt eltérés az analízishez használt ingyenes PeakScanner program sajátossága miatt lenne, mivel az ABI310 készülékhez hivatalosan biztosított GeneScan szoftverrel megegyező eredményeket kaptunk (12. táblázat).

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az FLT3-ITD kimutatására leginkább alkalmas módszer a PCR-t követő kapilláris elektroforézis, melynek érzékenysége és feloldóképessége felülmúlja a hagyományos elektroforézis technikák nyújtotta lehetőségeket. Ugyanakkor megfelelő reprodukálhatósággal csak az 1% feletti mutáns/totál allél arány kvantitálható, és a meghatározott ITD méret kb. 7%-kal alacsonyabb a valós értékhez képest, ha ezt a módszert használjuk. Vizsgálatunk fontos üzenete még, hogy a saját fejlesztésű módszerek alapos analitikai validálása - akár kísérletes, akár rutin klinikai alkalmazásról van szó - elengedhetetlen.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A tesztelt biomarkerek alkalmazásával nyert lényeges tapasztalatok, a biomarkerek felhasználásának legfontosabb szempontjai

Az Eredmények részben bemutatott vizsgálataim különböző betegcsoportok köré rendezhetőek, ami lényegében követi az évek során bekövetkezett munkahely változásaimat és új kutatói együttműködések kialakulását. A DEOEC Regionális Immunológiai Laboratóriumában eltöltött idő az immunpatomechanizmusú betegségek vizsgálatának időszaka, amit a Laboratóriumi Medicina Intézet (előtte KBMPI) onkológiai tárgyú kutatásai követtek. Már ebben az Intézetben, a Dr. Bhattoa Harjit Pal kollégám által elindított study-ba kapcsolódtam be, melynek során csontanyagcsere vizsgálatok egész sorát végeztük el. A Dr. Papp Mária tanárnővel (Belgyógyászati Intézet, Gasztroenterológiai Tanszék) kialakított eredményes kooperáció bizonyos mértékig visszavezetett a gyökerekhez, a cirrhosishoz társuló immunológiai változások és infekciók kimutatására alkalmas markerek és autoantitestek vizsgálata révén. Izgalmas kapocs volt az immunológia és onkológia között a Dr. Takács László akadémikus úrral (BioSystems International kft.) közös innovatív munka, ahol mAb-alapú protein array rendszer fejlesztését és tesztelését végeztük daganatos betegek mintáin.

7.1.1. *Immunológia mechanizmusú betegségek*

Korábbi munkáinkban a monocytákon lévő CD14 molekula expresszióját, funkcióját és sheddingjét vizsgáltuk részletesen egészséges egyének mintáiban, így logikusnak tűnt, hogy ezt követően a CD14-expressziót és a szérumban sCD14 szintet különböző kóros állapotokban határozzuk meg. A CD14 és a Toll like receptor család tagjai a veleszületett immunrendszer mintázat felismerő receptorai, és az ezekben bekövetkező változás befolyásolhatja az ezeket expresszáló sejtek aktivitását is. Miután ezek a sejtek fontos elemei az immunrendszernek a funkcióikban bekövetkező változások hatással lehetnek pl. a fertőzésekkel szembeni védekezés hatékonyságára, illetve az autoimmun betegségek kialakulására. Vizsgálatainkkal ezért az autoimmun kórképeket céloztuk meg (poly- és dermatomyositis, SLE), illetve olyan immunpatomechanizmusú betegségeket, ahol a kóros állapot kialakulásában egy krónikus bakteriális expozíciónak is potenciálisan jelentősége lehet (atópiás dermatitis).

Az AD betegek jól ismertően fogékonyabbak bizonyos bőrfertőzésekkel szemben, a *S. aureus* például a betegek 90%-nak a bőrből kimutatható, és vélhetően szerepe van a

bőrtünetek kialakulásában. A baktérium különböző molekuláris összetevői képesek a különböző immunsejtek (T lymphocyták, macrophagok, eosinophil sejtek és keratinocyták) stimulálására, ami szerepet játszhat a krónikus gyulladásos reakció exacerbációjában [373,374,376]. Az atópiás bőrben kialakuló ismétlődő lokális infekciók hátterében több faktor is állhat: a bőr integritásának sérülése, a defenzinek és egyéb antimikrobiális molekulák csökkent lokális termelése, a Th2/Th22 irányba polarizált immunrendszer, melyet a Th17 hatás csökkenése kísér, vagy a monocyta/macrophag rendszer aktivitásának zavara [373,374,376,379,380]. Eredeti hipotézisünk szerint az ezen utóbbi sejtek felszínén lévő mintázatzelismerő receptorok csökkent expressziója is szerepet játszhat ebben a változásban. Eredményeink azonban nem igazolták ezt a feltevést: a granulocyták CD14-expressziója magasabb volt a kontrollokhöz képest, míg a monocyták esetében nem volt számottevő különbség. Sokkal valószínűbb tehát, hogy a mintázatzelismerő receptorok expresszió változása nem oka, hanem sokkal inkább következménye az ismétlődő bakteriális infekcióknak AD-ben. Jól ismert tény, ugyanis, hogy a Gram-pozitív és -negatív baktériumok különböző molekuláris komponensei képesek fokozott CD14-, TLR2- és TLR4-expressziót indukálni a leukocytákon [413,414], illetve a bakteriális szepszis kialakulása során fokozódik ezen sejteken a receptorok száma [415,416].

Érdekes módon a szérumban sCD14 koncentrációja csökkenést mutatott az AD-s betegek mintáiban. Az újonnan szintetizálódó CD14 molekulák - a bakteriális stimuláció hatására - vélhetően nagyobb arányban kerülnek ki a sejtmembránba, és kevésbé szekretálódnak, továbbá csökkenhet a felszíni CD14 molekulák vedlése (shedding-je) is [35]. Mindkét hatás fokozza a granulocyták CD14-expresszióját és csökkenti a szérumban sCD14 szintet.

A szisztémás autoimmun betegségek közé tartozó poly- és dermatomyositis esetében fordított irányú változásokat tapasztaltunk, és nem az összes beteg és a kontrollok, hanem az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között. Az aktív betegek CD14-expressziója csökkent, a sCD14 szintje emelkedett, és ezek az eltérések szignifikánsan korreláltak a betegség egy ismert aktivitási markerének (LDH) szérumban koncentrációjával. Ez alapján a CD14-expresszió növekedése és a sCD14 koncentráció csökkenése a betegségaktivitás markere lehet ebben a betegcsoportban.

Az SLE-s betegek esetében két független vizsgálatot végeztünk. A sCD14 szint mérésére alkalmas, új, áramlási citometriás módszer beállítása során egy random szelektált, heterogén betegcsoport szérumban sCD14 szintjét hasonlítottuk egészséges kontrollok értékeihez, és szignifikánsan magasabb eredményeket kaptunk az új módszer és egy kereskedelmi forgalomban lévő ELISA segítségével is. A szérumban sCD14 koncentráció normál tartománya 1-5 mg/L a különböző publikációkban [43-46,417,418], saját eredményeink ennek az alsó részébe estek. Nagy valószínűséggel technikai különbségek

magyarázhatják ezeket az eltéréseket. A sejtfelszíni CD14-expresszió mértéke jelentős variabilitást mutatott pl. az alkalmazott mAb típusától függően [33,419], és hasonló hatás a sCD14 mérésére használt immunoassay-k esetébe is nagyon valószínű. Az SLE-s betegek szérumában is magasabb sCD14 értékekről számoltak be Nockher és mtsai. [43]. Az inaktív betegek esetében 4,1 mg/L, az aktív stádium esetében pedig 7,1 mg/L volt az átlagos szérum sCD14 koncentráció. A korábbi publikációk és a saját eredményeink közötti eltéréseket magyarázhatják technikai okok és a betegcsoportok összetételében és méretében lévő jelentős különbségek. Mindezek alapján tehát, a sejtfelszíni CD14-expresszió és a szérum sCD14 mérése akár az SLE diagnosztikáját is segíthetik, vagy a betegek követése során, illetve a terápiára adott válasz megítélésben lehetnek hasznosak [43,420]. Ez utóbbi vizsgálata történt meg a második tanulmányunkban.

A második SLE-s vizsgálatban a kortikoszteroid terápia hatását vizsgáltuk meg az SLE-s monocyták CD14-expressziójára. Az inaktív, szteroid terápia mentes és az alacsony dózisú kezelést kapó betegek sejteinek CD14-expressziója minimális, nem szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollokhöz képest. Ezzel szemben a pulzus szteroid kezelés 40-50%-kal csökkentette a sejtfelszíni CD14 molekulák számát hasonlóan két korábbi vizsgálathoz [45,421]. Más szerzők [422-424], ugyanakkor, nem észleltek ilyen változást. A különbségek egyik magyarázata az alkalmazott *in vivo* szteroid kezelés dózisa és időtartama közötti eltérésekben lehet. A CD14-expresszió csökkenést mutató tanulmányokban magas koncentrációban és minimum 2-3 napig alkalmazták a szteroid kezelést. Másrészt technikai okok állhatnak az eltérések hátterében. Az alkalmazott anti-CD14 mAb-ok különböző CD14 szubpopulációkat ismerhetnek fel, amelyek a szteroid kezelésre különbözőképpen reagálnak [33,425]. A CD14-expresszió csökkenése is több mechanizmussal történhet. Ahogy korábban is írtuk az újonnan szintetizálódott CD14 molekulák sorsa lehet közvetlen szekréció vagy transzport a plazmamembránba, és ennek arányát befolyásolhatja a szteroid kezelés. Másrészt a CD14 gén promóter régiójában található egy Sp1 transzkripciósfaktort kötő hely, és a dexamethason képes gátolni az Sp1 faktor kötődését ehhez a regulatórikus elemhez [426]. Az *in vivo* szteroid terápia hatását az SLE-s betegek leukocytaíra csak néhány tanulmány vizsgálta eddig. A CD40L-expressziójának változása, csökkent arachidonsav felszabadulás és calcineurin aktivitás jellemezte a kezelés során ezeket a sejteket [427-429].

Végül megvizsgáltuk azt, hogy a sejtfelszíni CD14-receptorszám változásának lehet-e valamilyen funkcionális hatása. A pulzus szteroid terápia során az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expressziója csökkent, és ezt egyértelműen kísérte az LPS-kötő képesség és az LPS-indukálta TNF α szekréció csökkenése. Ezek a változások a monocyták

immunreaktivitásának redukcióját jelzik, és ez egy potenciális faktora lehet a szteroid kezelés immunszuppresszív hatásának.

A CD14-expresszió változásának lehet még egy másik jelentősége is. Ezek a receptorok képesek az endotoxin molekulák, de akár Gram-negatív baktériumok megkötésére is, elősegítve ezzel ezek eliminálását és detoxifikációját. Amennyiben csökken a sejtfelszíni CD14 molekulák száma lecsökkenhet ez a funkció is, ami különböző bakteriális fertőzésekkel szemben fokozottabb fogékonyságot eredményezhet [430].

7.1.2. Tüdőtumor

Az elmúlt néhány évben két tanulmányunkban is foglalkoztunk a tüdőtumor kimutatására alkalmas új markerek azonosításával. Ez nem véletlen, ugyanis, mind a nők, mind a férfiak között incidenciáját tekintve a tüdőtumor a második/harmadik leggyakoribb rosszindulatú daganatos betegség világszerte, és a daganatos halálozás arányát tekintve pedig mindkét nemben listavezető [397,431]. Különösen szomorú az, hogy ha az országok rangsorát nézzük Magyarország áll az első helyen; a tüdőtumor 100.000 lakosra vetített éves incidenciája meghaladja a 40 főt, ami a legmagasabb a világon. Ennek oka pontosan nem ismert, de biztosan szerepet játszik benne a dohányzás rendkívül magas aránya az elmúlt évtizedekben. A dohányzás és a tüdőrák kialakulásának összefüggése ma már teljesen elfogadott, jól látható pl., hogy a fejlődő országokban (pl. Mexikó, Közép- és Dél-Afrika), ahol a dohányzók aránya alacsony, ott alacsonyabb a tüdőrák incidenciája is, és egy olyan országban, mint Kína, ahol jelentősen emelkedik a dohányzás mértéke, ott fokozódik a tüdőrák előfordulása [431]. Elfogadott tény az is, hogy nemcsak a dohányfüsttel belélegzett karcinogének, hanem a szennyezett levegőjű nagyvárosok levegőjében lévő különböző méretű apró részecskék is tartalmaznak rákkeltő anyagokat, és így a légszennyeződés is egyértelmű okozója lehet a tüdőráknak. Bár az Európai Unió 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ határértéket fogad el, de a levegőben lévő részecskék mennyisége és a rákkockázat között gyakorlatilag lineáris összefüggés van igazi küszöb nélkül; azaz bármilyen alacsony is a szálló por mennyisége az is fokozott rákkockázattal jár [432].

A tüdőrák mortalitási adatai kiugróan rosszak világszerte; az Egyesült Államokban, például, a 2004-2010 közötti adatokat figyelembe véve a tüdőtumoros betegek mindösszesen 17,8%-a volt még életben 5 évvel a diagnózis felállítása után. A legnagyobb gond az, hogy ez a daganat nagyon gyakran már előrehaladott stádiumban kerül felismerésre, amikor már távoli áttétek képződtek és ekkor a terápiás lehetőségek már alig hatékonyak, és a hosszabb távú túlélési esélyek nagyon szerények. Ugyanakkor a tünetmentes és korai stádiumban azonosított betegeknek 88% esélye van a tízéves

túlélésre. Kulcsfontosságú tehát, olyan diagnosztikus és még inkább olyan szűrőteszteknek az azonosítása, amellyel a korai (lehetőleg I-IIA stádiumú) daganat felismerhető [397,431,433].

A klinikai gyakorlatban jelenleg első helyen álló szűrőteszt az alacsony dózisú mellkas CT (LDCT) vizsgálat. Egy 2011-ben lezárult nagy amerikai tanulmány jelentette ebben az esetben a mérőöldkövet. Ebben a 9 éves study-ban 53.000 fokozott tüdőrák kockázatú, 55-74 év közötti egyén vett részt, akiket 3 éven keresztül évente egyszer mellkas röntgennel vagy LDCT-vel vizsgáltak meg. Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy az LDCT szűrőteszt alkalmazása 20%-kal csökkentette a tüdőtumoros mortalitást az egyszerű mellkas röntgennel szűrt populációhoz képest [434]. 2013 végére több amerikai tudományos társaság - többek között a US Preventive Services Task Force, az amerikai kormány független tanácsadó testülete - is javasolta az LDCT szűrőprogram elindítását az USA-ban. Ami még lényegesebb, javasolták a teszt állami egészségbiztosító (MEDICARE) által történő finanszírozását is. A MEDICARE szakmai tanácsadó testülete 2014 nyarán elvetette a javaslatot, azonban a kibontakozó társadalmi vita eredményeként 2015. február 5-én a MEDICARE közleményben tudatta, hogy financiálisan támogatja az LDCT szűrőprogramot. A vizsgálatot annál végezhetik el, aki 55-70 év közötti és jelenleg dohányzik vagy nem hagyta abba dohányzást 15 évnél régebben. A vizsgálat előtt a teszt potenciális eredményeinek és veszélyeinek részletes ismertetése történik meg speciális centrumokban, és a beteg dönt a szűrőteszt elvégzéséről vagy elhagyásáról [433,435-437]. Az Európai Unió egyelőre nem implementálta az amerikai eredményeket és ezt az új szűrőprogramot. A döntéshozók a holland-belga NELSON vizsgálat eredményére várnak, és ezt tervezik poolozni több kisebb európai study eredményével is, ami várhatóan kb. még 2 évet vesz igénybe. Ez alatt vizsgálják meg a szűrőprogram orvosi hatékonyságát és gazdaságossági mutatóit, és ez alapján döntenek a szűrés indításáról és paramétereiről (pl. kit kell szűrni és milyen gyakorisággal?) [433].

Az LDCT szűréssel kapcsolatban felmerült egyik probléma a fokozott sugárterhelés kérdése, ami alkalmanként az éves normál sugárdózis kb. 50%-át jelenti. A CT technológia folyamatos fejlődésével valószínűleg ez hamarosan nem lesz már komoly gond. A másik - sokkal súlyosabb - kifogás az LCDT szűrés nagyon magas fals pozitivitása volt. A vizsgálat során 100 kiszűrt kerek árnyákból 4-ről igazolódott be, hogy tumoros elváltozás. Az összes többi esetben az ismételt vizsgálatok, biopszia és műtét fölöslegesen terhelték meg az egészségügyi ellátó rendszert, és - ami legalább olyan fontos - indokolatlan aggodalmat és pszichés megterhelést jelentettek a kiszűrt egyének számára. Ennek a problémának a megoldása többféleképpen is történhet. Mindenképpen lehet optimalizálni az LDCT tesztet különösen annak kiértékelését. Az amerikai vizsgálatban az észlelt árnyék

átmérőjét vették alapul, és ennek küszöbértéke 4 mm volt. Amikor ezt az értéket 7-8 mm-re növelték jelentősen csökkent a fals pozitivitás aránya, és csak minimális számú beteg veszett el. Az európai vizsgálat a tüdőben lévő képletet 3D-ben rekonstruálja, és annak térfogatát határozza meg, és veszi alapul a pozitivitás eldöntésének kérdésében. Végül olyan számítógépes képanalizáló programok fejlesztése és tesztelése zajlik jelenleg, amelyek a CT felvétel akár több száz paraméterét is értékelik, és ez alapján formálnak véleményt [433]. Egy másik lehetőség olyan biomarkereknek az azonosítása, amelyek önmagukban vagy az LDCT szűréssel kiegészítve még specifikusabban és szenzitívebben azonosítják a tüdőtumoros betegeket a vizsgált egészséges populációban.

A tüdőtumor szűrésére alkalmas biomarkerek azonosítása és tesztek fejlesztése komoly kihívás, ugyanakkor komoly lehetőség is, hiszen egy jelentős, társadalmi szintű, egészségügyi problémáról van szó, ami ugyanakkor jelentős, potenciális gazdasági lehetőséget is rejt magában. A jelenleg rutinszerűen alkalmazott szérumszűrő tumormarkerek önmagukban nem alkalmasak a tüdőtumoros betegek szűrésére, sokkal inkább a betegek követésére, a terápia hatékonyságának jelzésére, recidíva kimutatására használhatók. Saját vizsgálataink is azt mutatták, hogy a petefészek tumor diagnosztikájában alkalmazott HE4 jó hatékonysággal különíti el a tüdőtumoros férfiakat a kontrolloktól, de ez elsősorban a késői III-IV. stádiumú betegek esetében igazán hatékony, és sokkal kevésbé effektív a korai stádiumú rákban. Jelentősen javította a teszt teljesítményét, az I.-II. stádiumú tüdődaganat esetében is, ha a HE4-et a CEA-val és a CA 125-tel kombináltuk egyetlen paraméterre bináris logisztikus regresszióval (szenzitivitása: 80%, specificitása: 93%). Ez a fajta megközelítés - kompozit score-ok képzése az egyedi paraméterekből - biztosan a jövő útja. A jelenleg piacon lévő assay-k alkalmazzák is ezt a metodikát. A 20/20 Genesystem PAULA tesztje három tumormarker (CEA, CA 125, Cyfra 21-1) és egy daganat-specifikus autoantitest (NY-ESO-1) szérumszűrő koncentrációját méri, és ebből kalkulál egyetlen score-t, ami a tüdőtumor jelenlétének valószínűségét adja meg (szenzitivitása: 71%, specificitása: 83%) [438]. A Somalogic aptamer alapú detektáló rendszere (SomaScan) 12 szérumszűrő koncentrációját méri egyidejűleg és ezeket egyesíti egyetlen paraméterre (szenzitivitása: 89%, specificitása: 83%) [439]. Az Oncimmune szérumszűrője (EarlyCDT-Lung) jelenleg 7 tumorspecifikus autoantitest szintjét méri, és ha ezek közül bármelyik értéke küszöb feletti, pozitív a teszt eredménye - (szenzitivitása: 37%, specificitása: 91%) [440]. Ebbe a sorba illik bele a saját fejlesztésű QP300 rendszerünk is, ahol 4 QP300 marker és a Cyfra 21-1 fuzionálása egyetlen paraméterre nagyon hatékony új tesztet eredményezett: szenzitivitása: 88%, specificitása: 92%. Ezek az eredmények egy potenciális korai tüdőrák diagnosztikum alapjait vethetik meg. Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy a tesztelést alacsony esetszámú populáción végeztük el, és mindenképpen szükség van ennek

bővítésére. Rendkívül fontos és izgalmas kérdés a tüdőtumoron belüli alcsoportok vizsgálata is, és itt nem csak a korai stádiumú betegekről van szó, hanem a különböző szövettani kategóriákról (SCLC vs. NSCLC) vagy a dohányzó, illetve nem dohányzó betegek tüdőtumorról, ami az újabb vélemények szerint akár külön kórkép is lehet [441].

Az előző bekezdésben felsorolt elsősorban proteomikai megközelítésű assay-k mellett természetesen drámai gyorsasággal fejlődnek a genetikai alapú tesztek is. Az újgenerációs szekvenálási technikák árának csökkenése és széles körű elérhetővé válása tette pl. lehetővé a "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) létrejöttét, ami hihetetlen mennyiségű információt tartalmaz a legkülönbözőbb típusú daganatokról [442]. Ezen project keretében publikáltak nemrégiben két jelentős study-t, amelyekben 178 tüdő laphámrák [443] és 230 tüdő adenocarcinoma [444] vizsgálatát végezték el. Ennek során DNS, mRNS és miRNS szekvenálás történt kópiaszám analízissel, metilációs vizsgálattal és proteomikai tesztekkel kombinálva. A munka során számos új driver gén, terápiás célpont és daganat alcsoport került azonosításra. Ezek az eredmények számos új teszt alapját képezhetik, akár olyanokét is, amelyek pl. a plazmából izolált DNS analíziséből következtetnek a daganat jelenlétére vagy annak különböző változásaira (metasztázis képzés, terápia rezisztencia, stb.) [445].

7.1.3. Cirrhosis

A cirrhosis a máj különböző etiológiájú krónikus megbetegedéseinek lehet az eredménye, melynek során a máj parenchyma hegszövetté alakul, és a máj funkciói jelentősen beszűkülnek. A cirrhosis leggyakoribb komplikációi az ascites, varix vérzések, hepatikus encephalopathia és a különböző bakteriális fertőzések kialakulásának megnövekedett kockázata. Ez utóbbiak gyakran társulnak az alapbetegséghez és indukálhatják a többi szövődmény kialakulását is, ráadásul felismerésük sem egyszerű [394-396]. A cirrhosishoz társuló infekciók kimutatása vagy predikciója tehát, egy lényeges klinikai probléma, és ennek megoldására különböző akut fázis fehérjék tesztelését végeztük el egy igen nagy létszámú és részletesen karakterizált betegcsoport esetében. A 4 tesztelt marker (CRP, PCT, LBP és sCD14) közül a szérumsCD14 szintje nem tért el szignifikánsan az infekcióval bíró és infekciómentes betegekből, míg a másik három marker képes volt különbséget tenni a két csoport között. A leghatékonyabbnak a CRP mérése bizonyult: 10 mg/L határértékkel már önmagában is érzékeny markere volt a bakteriális fertőzéseknek. A CRP kombinálása a PCT meghatározásával némileg emelte a diagnosztikai pontosságot (szensitivitást 10%-kal, NPÉ-t 5%-kal), ugyanakkor a diagnosztikai folyamat költségeinek jelentős emelkedésével járt (3.500 Ft vs. 500 Ft). Sajnálatos módon ezen szerológiai tesztek gyengébb teljesítményt nyújtottak a betegség

előrehaladottabb stádiumaiban vagy olyan betegek esetében, akiknél ascites is igazolódott. A CRP a bakteriális infekciók kialakulásának - rövid távú - prognosztikai markere is volt.

A CRP, mint a bakteriális fertőzések jellemző paramétere már jó ideje ismert, még cirrhotikus betegek esetében is [446]. Korábbi klinikai tanulmányokban, melyek 20-127 esetet dolgoztak fel, a CRP és a PCT bizonyult a legjobb markernek a bakteriális fertőzések azonosítására, de a diagnosztika pontosságuk és határértékeik jelentősen eltértek egymástól a különböző study-kban [447-454]. A CRP esetében a szenzitivitás 62-80%, a specificitás 68-96% között, a ROC-AUC pedig 0,72-0,91 között változott [63,447,448,455]. Saját vizsgálatunkban a szenzitivitás 84%, a specificitás 91%, a ROC-AUC pedig 0,93 volt. Az általunk meghatározott optimális határérték (9,2 mg/L) alacsonyabbnak adódott, mint a többi tanulmányban, melyekben ez 20 mg/L [451], 24,7 mg/L [452], 55,9 mg/L [448], valamint 80,0 mg/L [450] volt. Egy lehetséges magyarázat ezekre az eltérésekre a betegpopulációk közötti különbség. Saját tanulmányunkhoz képest a korábbi eredményeket jóval kisebb betegcsoportokon végezték, mely torzíthatja az eredményt. Továbbá a korábbi tanulmányokban a fertőzőes esetek a legtöbb beteg esetében együtt jártak szisztémás gyulladásos válaszreakcióval (SIRS), szepszissel, bizonyos esetekben még szeptikus sokk-kal is [456]. A mi egész fertőzőes betegcsoportunk sokkal inkább a mindennapos klinikai eseteket reprezentálta. A fertőzések hozzávetőlegesen 25%-a enyhe volt, és főként a húgyutakra lokalizálódott.

A második legjobb markernek a PCT bizonyult, de a teljesítménye minden tekintetben elmaradt a CRP mögött. Hasonló eredmények jelentek meg korábbi cirrhotikus publikációkban is [447,449,450,452]. Ezekben az esetekben a PCT szint jelentősen megemelkedett a fertőzött betegekben a kontrollhoz képest, bár a median érték széles tartományban változott: 0,74 µg/L [454], 2,8 µg/L [453], 3,2 µg/L [447], 9,8 µg/L [449], 10,1 µg/L [450]. Mi is szignifikánsan emelkedett PCT szinteket mértünk a fertőzőes betegekben, de a median érték alacsonyabbnak adódott: 0,24 µg/L. Továbbá a PCT diszkriminatív ereje 0,15 µg/L cut-off értéket alkalmazva szintén kissé gyengébb volt (szenzitivitás: 72%, specificitás 84%, AUC-ROC: 0,84), mint két korábbi tanulmányban (szenzitivitás: 85 és 95%, specificitás: 96 és 98%, AUC-ROC: 0,97 és 0,98) [449,450]. Az általunk vizsgált betegcsoport egy negyede csupán enyhe fertőzésben szenvedett, mely vagy nem, vagy kismértékben jár csak PCT koncentrációemelkedéssel [64], de ezek a diszkrepanciák technikai különbségekkel is magyarázhatók. Annak ellenére, hogy klasszikus (nem szenzitív) PCT tesztet használtak minden korábbi tanulmányban, a vizsgálatok eredménye eltérő lehet a különböző detektálási módszerek következtében [64,66].

A vizsgálatok második részében az ANCA előfordulását vizsgáltuk cirrhosis betegek mintáiban és - elsőként az irodalomban - megmutattuk, hogy fokozott az ANCA IgA előfordulása és szérum koncentrációja ebben a betegcsoportban a kórkép etiológiájától függetlenül. A szérum totál IgA koncentráció emelkedése alkoholos májcirrhosisban jól ismert jelenség és ennek megfelelően a legmagasabb pozitivitási arányt és ANCA IgA titereket az alkoholos eredetű májcirrhosisos betegek mintáiban kaptuk (nem bemutatott adat). A magasabb totál IgA - és hasonlóan az ANCA IgA - pozitívítás és koncentráció oka pontosan nem ismert ezekben a betegekben, azonban a gastrointestinalis traktus szerepe nagyon valószínű. A bél barrier funkciójának - mind fizikai, mind immunológiai értelemben - bekövetkező károsodása a cirrhosisnak jól ismert velejárója, és a betegség előrehaladásával fokozódik [130,395]. A kapszula endoszkópián átesett cirrhosisos betegek 2/3-ánál a vizsgálat a vékonybél falának gyulladásos elváltozását mutatta mind makroszkóposan, mind hisztológiai vizsgálattal [457,458], amihez a vékonybél bakteriális kolonizációja is társult. Mindennek eredményeképpen a bakteriális eredetű komponensek a sérült bélfalon keresztül bekerülhetnek a submucosalis szövetekbe majd a keringésbe - bakteriális transzlokáció -, ami stimulálhatja a szekretoros immunrendszert és hozzájárulhat a betegség-specifikus komplikációk kialakulásához [130]. Ezt a mechanizmust támogatja az is, hogy a bélbaktériumok különböző összetevőivel szemben mutathatók ki ellenanyagok a cirrhosisos betegek szérumában, vagy olyan saját antigének ellen keletkeznek autoantitestek, amelyek keresztreakálnak bizonyos bakteriális mintázatokkal [119,121,127,459-461]. A szekretoros immunrendszer fokozott aktivitását jelzi ezekben a betegekben, az emelkedett sIgA szint is [462]. Nagyszámú kísérletes adat támasztja alá azt, hogy a béltraktus bakteriális kolonizációjának mértéke és fajösszetétele egyértelműen befolyásolja a lokális IgA termelést, ami különböző mechanizmusok révén a szisztémás keringésben is megjelenik [97,461].

Tudván, hogy a cirrhosisra fokozott bakteriális transzlokáció jellemző, és a bakteriális eredetű molekulák keresztreakálhatnak bizonyos granulocita antigénekkal hipotézisünk szerint a szérumban kimutatott IgA ANCA antitestek alapvetően béltraktus eredetűek. Ezt hivatott igazolni az IgA szubtipizálás, ugyanis a csökkent IgA₁/IgA₂ antitest arány, illetve a szekretoros komponens jelenléte az IgA szekréció mucosalis eredetének elfogadott markerei. Eredményeink igazolták elképzelésünket: az ANCA IgA₂ antitestek aránya jelentősen emelkedett volt (46%) a szérumban általában mért értékhez képest (10%), és a szekretoros komponens az antitestek 87%-án jelen volt (normálisan ez kb. 1%). A mi vizsgálatainkhoz hasonló módon - IgA szubtipizálás segítségével - igazolták a coeliacia specifikus autoantitestek mucosalis eredetét, míg kizárták ezt a Guillain-Barré szindróma esetében [463-465].

Az ANCA béltraktus eredetének indirekt bizonyítékát a gyulladásos bélbetegségek esetében szintén kimutatott ANCA pozitivitás adhatja, ahol a cirrhosishoz képest talán még fokozottabb a bélfal permeabilitása [96]. Ismert továbbá az is, hogy pasztörizált *E. coli*-val és *S. aureus*-szal immunizált patkányokban ANCA-kat tudtak kimutatni [466]. A klinikai adatokkal összevetve az ANCA pozitivitás szignifikánsan gyakrabban fordult elő azokban a betegekben, akiknél klinikailag jelentős bakteriális infekció zajlott és egyben független rizikófaktora volt újabb infekciók kialakulásának. Ez az eredmény is az ANCA keletkezés bakteriális eredetét támasztja alá.

Az ANCA vizsgálatokat indirekt immunfluoreszcens technikával végeztük el és csak a két leggyakoribb antigén (MPO, PR3) tesztelése történt meg ELISA segítségével. Az anti-MPO és anti-PR3 pozitivitás aránya alacsony volt, ugyanakkor mindhárom jellegzetes IIF mintázat (c-, p-, atípusos p-ANCA) számottevő gyakorisággal fordult elő a betegekben, ami azt jelzi, hogy a cirrhosishoz társuló ANCA IgA kialakulásának hátterében több különböző ritkább antigén is állhat.

7.1.4. Csontanyagcsere betegségek

A postmenopausában lévő nők csontstátusza és az ezzel összefüggő csonttörések kockázata több tanulmány tárgya volt már [410,411] azonban a férfiak helyzete Magyarországon kevésbé ismert. Éppen ezért a 2009 és 2010 szeptembere között indult vizsgálatba 229 fő 50 év feletti férfit vontunk be, meghatároztuk a csontanyagcserében szerepet játszó hormonok és a csontmetabolizmus biokémiai markereinek szintjét és BMD mérést végeztünk. A rutin csontmarkerek mellett több új csontanyagcserével összefüggő analit szintjét meghatároztuk (sclerostin, OPG, RANKL, DKK-1), azonban ebbe a dolgozatba csak a sclerostin mérés eredményei kerültek.

A sclerostin méréseket illetően a mi vizsgálatunk volt az első olyan study, ahol a sclerostin szint meghatározása szisztematikusan kiválasztott 50 év feletti férfiakban történt. Egyetlen hasonló tanulmány volt az irodalomban, de abban a résztvevő férfiaknak nem kellett a mieinkhez hasonló kritériumoknak megfelelni a vizsgálatba való beválasztáskor [243]. A mérések értékelése során azt tapasztaltuk, hogy a szérumban a sclerostin szintet elsősorban a résztvevők biológiai tulajdonságai (életkor és vesefunkció) befolyásolják, ezért ezeket az eredményeket a 7.3. fejezetben tárgyaljuk a dolgozatban szereplő hasonló megfigyelésekkel együtt.

7.2. Biomarker tesztek analitikai validálása

Ahogy a Bevezetés 2.4 pontjában részletesen tárgyaltuk az új biomarkerek azonosítása után hasonlóan komoly feladat az azok mérésére alkalmas mérőmódszerek kifejlesztése és ezek analitikai, funkcionális és klinikai validálása. A legrészletesebb "bevizsgálás"-t akkor kell elvégeznünk, ha egy teljesen új assay-t hozunk létre, és ekkor szükség lehet a Bevezetés-ben ismertetett szinte valamennyi kontroll teszt elvégzésére. Az ilyen eljárások szabályozásával nemcsak nemzetközi publikációk, de nemzetközi társaságok ajánlásai is foglalkoznak.

A Clinical Laboratory Standards Institute számos ilyen guideline-t jegyez, melyek közül kettő (LA21-A2 és LA23-A) az új immunoassay-k analitikai és klinikai validálását szabályozza. Az új módszer valamennyi reagensének (antitest, antigén, kalibrátorok, standardok és kontrollok, stb.) megfelelő minőségűnek kell lennie, és ennek biztosítására tesz javaslatokat a guideline. Nagyon lényeges a vizsgálati minta típusa (szérum, plazma, alvadásgátlószer fajtája, stb.), a reagensok és minták kezelésének, tárolásának és stabilitásának kérdése, melyet megfelelően standardizálni kell a klinikai validálás előtt. Hasonlóan fontos a reakció körülmények optimalizálása, majd a rendszer analitikai tulajdonságainak kontrollálása (torzítás, reprodukálhatóság, a cut-off-ok és kalibrációs görbe validálása, alsó és felső detektálási határ meghatározása, linearitás vizsgálata, interferáló anyagok tesztelése és a keresztreaktivitás vizsgálata). A klinikai tesztelés előírásai is igen részletesek, már a vizsgálat előkészítésétől kezdve: vizsgálati protokoll készítése, vizsgálati célok megfogalmazása, etikai engedélyek, nem várt események és ezek kezelése, a betegek tájékoztatása és vizsgálatra való előkészítése, vizsgálati helyek kiválasztása, eredmények értékelésének menete, stb. Hasonlóan összetett lehet az eredmények klinikai értékelése is; ide elsősorban a klinikai szenzitivitás, specificitás, negatív és pozitív prediktív érték meghatározása tartozik. Ebben a fázisban a leghatékonyabb módszer a "receiver operating characteristic (ROC) plot" analízis, ahol egy konkrét numerikus érték - a ROC görbe alatti terület - jellemzi a vizsgált marker klinikai effektivitását [467,468].

Sokkal egyszerűbb a helyzet, ha egy kereskedelmi forgalomban lévő assay helyi implementálásáról van szó, hiszen a felsorolt tesztek a gyártó cég laboratóriumaiban már elvégezték, így csak a torzítás, intra- és inter-assay reprodukálhatóság, átszennyeződés (bizonyos automaták esetében), linearitás és a mérési eredmény időbeli változása tartozik a vizsgálandó paraméterek közé. Ezeket a teszteléseket akár 3 különböző koncentrációjú minta segítségével 5 mérési nap alatt el lehet végezni [469].

A doktori értekezésben több új assay kifejlesztése szerepel, és ezeket is próbáltuk - a lehetőségekhez képest - az itt leírtaknak megfelelően tesztelni. A sCD14 meghatározására

alkalmas áramlási citometriás módszer esetében különböző anti-CD14 és detektáló antitesteket teszteltünk, intra- és inter-assay CV% meghatározás, és - "spike"-olt minták segítségével, illetve egy másik ELISA módszerrel való összevetés során - torzítás vizsgálat is történt. Emellett vizsgáltuk a módszer dinamikus tartományát, teszteltük a versengő "tracer"-nek használt monocyták számát, és - bár viszonylag alacsony számú kontroll bevonásával - próbáltunk férfi/nő referencia tartományokat definiálni. Az analitikai validálás után a módszert több betegcsoporton is teszteltük ROC analízis segítségével.

A második példa az ANCA IgA alosztályainak meghatározására alkalmas, image-analízis alapú, kvantitatív metodika beállítása, ahol a fluoreszcencia intenzitást kalibrációs beadek segítségével fordítottuk le sejthez kötött antitestszámra. Itt intra- és inter-assay reprodukálhatóság vizsgálata történt, illetve egy másik - szemikvantitatív - módszerrel vetettük össze a kvantitatív módszer eredményeit.

Különösen nehéz olyan módszerek analitikai vizsgálatát elvégezni, ahol több száz vagy ezer analit egyidejű kvantitálása történik, ami a különböző "omika" technikákra jellemző. Ilyen jellegű próbálkozásról is beszámoltunk a doktori értekezésben. Az újonnan fejlesztett QP300 rendszer esetében a maximális jelintenzitás (RLU_{max}) és egy kontroll minta relatív jelintenzitásának (RLU/RLU_{max}%) inter-assay és lotok közötti variabilitását tudtuk meghatározni, de miután a detektált antigének egy része pontosan nem ismert, másrészt egyszerre 290 analit torzításának megvalósítása rendkívül költséges lenne, ezért ilyen vizsgálatot nem végeztünk. A klinikai validálás tüdő tumoros betegek és egészséges kontrollok mintáinak összevetése alapján ROC analízissel történt, és a teszt meglehetősen hatékonnak bizonyult.

A molekuláris genetikai diagnosztika területe robbanásszerű változáson megy át és egyre több teszt a rutin diagnosztika részévé válik. Nyilvánvalóan ezekre a vizsgálatokra - különösen a kvantitatív meghatározásokra - ugyanazon analitikai szabályoknak kell vonatkozni, mint a klinikai kémia tesztekre. Ennek szellemében - és ezt bemutatandó - végeztük el az FLT3-ITD genetikai eltérés vizsgálatára alkalmas PCR + AGE/PAGE/CE metodikák analitikai tesztelését egy munkánkban. Igazán széles körű tesztelést a kvantitatív, kapilláris elektroforézis esetében tudunk végezni. Meghatároztuk a módszer különböző numerikus paramétereinek intra- és inter-assay variabilitását, a mutáns/totál allél arány meghatározásának analitikai szenzitivitását, kvantitálási határát (funkcionális szenzitivitását) és linearitását, az ITD méret meghatározásának feloldását és torzítását egy referencia módszerhez (DNS szekvenálás) viszonyítva.

7.3. Preanalitikai faktorok és a biológiai variabilitás jelentősége a biomarker vizsgálatok értékelése során

A laboratóriumi diagnosztikában a vizsgálatot kérő orvosok legfontosabb elvárása, hogy megbízható eredményt kapjanak. Jelenlegi tudásunk szerint a laboratóriumi vizsgálatok hibáinak legjelentősebb forrása sorrendben a preanalitikai majd a posztanalitikai fázis, és legkevésbé maga a mérés elvégzése járul ehhez hozzá. Az elmúlt 10 évben az analitikai hibák előfordulásának aránya tizedére csökkent, egyrészt a technológiai fejlődés (műszerek, reagensok standardizálása), másrészt az információs technológia, harmadrészt a modern minőségbiztosítási rendszerek és minőségi kontrollok széles körű elterjedése miatt. Jelenleg kisebb annak az esélye, hogy egy laboratóriumi mérés analitikailag hibásan történik, mint az, hogy valakinek elvész a csomagja a repülőtéren vagy, hogy egy radiológiai vizsgálatot hibásan értékelnek [470,471].

Miután a preanalitikai fázisnak ilyen nagy jelentősége van a vizsgálatok megbízhatóságát illetően, az utóbbi néhány évben kitüntetett figyelem fordult ebbe az irányba. A European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) önálló Preanalitikai munkacsoportot hozott létre (Working group for Preanalytical Phase) az itt előforduló hibák felderítésére és orvosolására. A munkacsoport foglalkozik többek között a betegek vérvételre való előkészítésének (éhgyomri állapot), a vérvétel technikájának (vérvételi tű mérete, leszorítás helye és időtartama, felület fertőtlenítése, csövek típusa, kezelése és sorrendje), a minta tárolásának, szállításának (a koagulációra hagyott idő, tárolási/szállítás hőmérséklet és idő, fagyasztás hőmérséklete/ideje, olvasztási/fagyasztási ciklusok) és előkészítésének (centrifugálás paraméterei) standardizálásával [470,471]. Ezeket a folyamatokat nemzetközi irányelvek is szabályozzák már, a Clinical and Laboratory Standards Institute 2007-ben alkotta meg a vérvételt standardizáló GP41-A6 (korábban H3-A6) guideline-ját, a GP44-A4 (korábban H18-A4) irányelv pedig a minta kezelés és feldolgozás előírata. De emellett van ajánlásuk a kapilláris és artériás vérvételre, a vérvételi csövekre és ezek kezelésére is [470-472]. Nagyon fontos ennek a fázisnak a standardizálása a biomarker kutatásban is az új biomarkereket tesztelő klinikai study-k tervezése során [473].

A preanalitikai fázisban nagyon sok olyan paraméter van, ami befolyásolható és így standardizálható is, vannak ugyanakkor olyan a betegekkel kapcsolatos biológiai faktorok, amelyek nem alakíthatóak. Ilyenek pl. a nem, életkor, rassz, testtömeg index, krónikus gyógyszer/alkohol fogyasztás, dohányzás és különböző kóros állapotok. Az ezekből eredő variabilitás tisztázása nagyon fontos egy új biomarker esetében, mert ezek jelentősen befolyásolhatják a mérési eredményeket, amit pl. specifikus referencia tartományok definiálásával lehet kezelni [473-475].

Saját vizsgálataink során is többször szembesültünk ezzel, a biológiai variabilitásból adódó problémával. A HE4 tumormarker vizsgálata során az egészséges kontrollokban egyértelmű életkor függést tudtunk kimutatni: a HE4 szint magasabb volt az idősebb betegekben és ezt korábban is leírták már [476,477]. Ugyanakkor a dohányzás is hasonló hatással bírt - szignifikánsan magasabb volt a HE4 koncentráció a dohányzó kontrollok mintáiban - ami új megállapítás. A HE4 szint negatívan korrelált az eGFR csökkenésével, ami azt jelzi, hogy a vesefunkció változása is számottevően befolyásolhatja a HE4 szérumkoncentrációját. Hasonló összefüggést találtunk egy csontanyagcsere marker vizsgálata során is. Az ötven év feletti egészséges férfiak szérum sclerostin szintjét mérve összefüggést találtunk az idősebb életkor és a sclerostin koncentráció között, ugyanakkor pozitív összefüggés volt a csontmarker és a cystatin C, illetve a kreatinin koncentrációja, és negatív korreláció a sclerostin és az eGFR között. A cystatin C a vesefunkció talán leghatékonyabb markere: egyenletesen termelődik és nem függ a nemtől, kortól és izomtömegtől, ezért szélesebb körben használható [478]. A vesefunkció folyamatos kismértékű beszűkülése jellemző az életkor előrehaladásával, így az idősebb korban észlelt sclerostin szint emelkedés ezzel is összefügghet. Mind a HE4, mind a sclerostin példája jól mutatja, hogy azok a markerek (proteinek), amelyek kisméretűek (HE4 25 kDa, sclerostin 22 kDa), és eliminációjuk a vérből dominálón a vesén keresztül történik nagyon érzékenyek a vesefunkció változásaira, ami mindenképpen figyelembe veendő értékelésük során.

A HE4 és egyéb tumormarkerek diagnosztikus alkalmazása során különböző nem-daganatos betegségek is okozhatnak differenciáldiagnosztikai problémát. A klinikai gyakorlatban alkalmazott tumormarkerek egy része felépítését tekintve nagyméretű, mucinózus glükoprotein, funkciójára nézve pedig adhéziós molekula, melyek szerepet játszhatnak a legkülönbözőbb sejt-sejt interakciók elősegítésében. Korábbi adatok igazolták, hogy a CA 19-9, CA 125 és a CA 15-3 szintje emelkedett lehet különböző szisztémás autoimmun kórképekben (SLE, Sjögren szindróma, scleroderma, myositis) [405-409,479], míg saját vizsgálataink RA-ban mutattak hasonló eredményeket. Vélhetően a gyulladásos reakcióban résztvevő sejtek expresszálják ezeket az adhéziós molekulákat, ami elősegítheti szinoviális inváziójukat, ezzel együtt azonban a sejtekről leváló markerek megjelennek a keringésben is. Nem véletlen tehát az, hogy a tumormarkerek pozitivitása alapján nem következtethetünk automatikusan valamilyen daganat jelenlétére, hiszen a különböző szervek egyéb benignus állapotai vagy szisztémás gyulladásos/autoimmun kórképek is állhatnak a marker emelkedés hátterében.

7.4. A biomarker kutatás és a biomarkerek diagnosztikus alkalmazásának jövője

7.4.1. Multiplex biomarker array-k és azok potenciális lehetőségei

A biomarker kutatás talán legdinamikusabban fejlődő területe a nagy áteresztőképességű, egyidejűleg több száz/ezer/tízezer/százezer paramétert tesztelő „omika” technológiák alkalmazása. A rutin diagnosztikában is jól alkalmazható eredmények elsősorban a **genomikai** vizsgálatok kapcsán láttak napvilágot. Az újgenerációs szekvenálás ("next-generation sequencing" - NGS) fejlődésével és árának drasztikus csökkenésével a mindennapok számára is elérhetővé vált a teljes genom vagy exom szekvenálás, ami egy-egy személy teljes DNS állományának vagy a kódoló DNS régióknak a feltérképezését jelenti. A technológia által nyújtott hatalmas mennyiségű genetikai információ - jelenleg már több ezer egyén teljes genom szekvenálásának anyaga elérhető különböző adatbázisokban - nemcsak a genetikai kutatásoknak adott hatalmas lökést, de egyre nagyobb klinikai jelentősége is van. Számos monogén, ritka betegség esetében sikerült megtalálni az ennek kialakulásáért felelős genetikai eltérést, és ez alapján lehetőség nyílt az ezen kórképekben szenvedő betegek genetikai diagnosztikájára is. A technika alkalmas SNP-k és új mutációk, kisebb inzerciók/deléciónak, kópia szám és strukturális variációk kimutatására is. A NGS lehetővé tette szomatikus mutációk vizsgálatát is, pl. ugyanazon beteg tumoros és tumormentes szöveteiből izolált DNS szekvenciájának összehasonlításával. Ez alapján a daganatban lévő potenciálisan diagnosztikus vagy prognosztikai/prediktív értékkel bíró genetikai eltérések azonosíthatóak, vagy a terápia rezisztencia hátterében álló okok felderíthetőek. És persze vannak különleges klinikai alkalmazások is, mint a vérben keringő tumorsejtek karakterizálása vagy az anyai vérben lévő magzati DNS vizsgálata alapján kromoszómális aneuploidia kimutatása ("nem invazív prenatalis teszt") [480,481].

Az újgenerációs szekvenálás forradalmasította a génexpresszió vizsgálatára épülő **transzkriptomikát** is. Hagyományosan a valós-idejű kvantitatív PCR és a microarray technikák jelentették az mRNS expresszió vizsgálatának alapját. Míg az első módszer meglehetősen költséges és nem használható egyidejűleg több ezer gén expressziójának a vizsgálatára, addig a második nem elég szenzitív, és az eredménye többnyire utólagos verifikációt igényel. Az RNS-Seq metodika ugyanakkor képes több ezer gén aktivitását párhuzamosan mérni az mRNS transzkriptek mennyiségének abszolút kvantitálásával. Képes a különböző splice variánsok, új átíró régiók vagy exonok és új promóterek azonosítására. Ezzel a módszerrel lehetőség nyílik a nem kódoló RNS molekulák vizsgálatára is, amelyek közül a micro- és kisméretű interferáló RNS (miRNS és siRNS) poszttranszkripciós szabályzó funkcióval is bír [482].

A humán genomhoz vagy akár a transzkriptomhoz hasonlítva a proteom sokkal komplexebb és dinamikusabban változó rendszer. Miután a sejtek/szövetek életében a fehérjék jelentik a funkció szempontjából meghatározó molekulákat, a patológiás változások és a diagnosztika szempontjából a proteom analízisének igen nagy jelentősége van. A teljes proteom vizsgálata ugyanakkor nem egyszerű feladat. A humán genomban lévő kb. 23.000 kódoló génről a splice variánsok miatt már jóval több fehérje íródhat át, amelyek aztán kb. 430 féle poszttranszlációs módosításon mehetnek át, részben vagy egészen degradálódhatnak különböző proteázok által, és komplexeket képezhetnek más fehérjékkel és molekulákkal. A rutin laboratóriumi diagnosztikában jónéhány fehérje és peptid vizsgálata történik hosszú idő óta hagyományos technológiák segítségével. A proteom kutatásban is megjelentek ugyanakkor nagyátértékelő képességű metodikák, amelyek megteremtették a modern **proteomika** alapjait. A két legjobban elterjedt proteomikai eszköz a tömegspektrométer és ennek variánsai (különböző elválasztási technikákkal kombinálva), illetve a különböző protein microarray-k (szilárd és szuszpenziós megoldások). Ezek alkalmazásának logikája - hasonlóan az összes többi "omika" technikákhoz - működhet egy koncepció mentén ("biased" vagy "bottom-up"; pl. proinflammatorikus citokinek mérésére alkalmas microarray) vagy lehet egyszerűen hipotézismentes "adathalászat" ("unbiased" vagy "top-down"; pl. egy totál plazma proteom array) [483-485].

A biomarkerek felfedezése szempontjából legnagyobb jelentősége a plazma proteom analízisének van, hiszen az emberi vér az, ami közvetlen kapcsolatban áll minden - kóros és normál szövettel - így a patológiás elváltozások molekuláris lenyomatát tartalmazhatja. Ugyanakkor a plazma proteom vizsgálata is számos elméleti és technikai problémát vet fel. A humán plazma kb. 3.000-10.000 különböző fehérjét tartalmaz, amelyek különböző komplexek formájában találhatók, ráadásul kb. 12 nagyságrendet ölel át a koncentrációjuk, és a plazma fehérjék mennyiségének több mint 95%-át 10 major fehérjekomponens adja. Ahhoz, hogy ezeket a fehérjéket - vagy egy jelentős részüket - egy multiplex rendszerben mérjük, rendkívül széles dinamikus tartománnyal rendelkező módszerre lenne szükségünk, az alacsony koncentrációjú fehérjék esetében pedig rendkívüli érzékenységre és az abundáns fehérjék előzetes depletálására. Az antitest alapú microarray-k esetében gondot jelenthet az antigéneket felismerő antitestek közötti keresztreaktivitás, így az egyszerre detektálható fehérjék száma nem túl magas (40-60), ugyanakkor más affinitás alapú megoldások (aptamer assay-k) akár 1.000-re is növelhetik a vizsgált fehérjék számát [483-485].

A proteomika eredményeinek klinikai elterjedése lemaradásban van a genomikához és transzkriptomikához képest, amit elsősorban a validált biomarkerpanelek és az alkalmazott

metodikák megfelelő standardizációjának hiánya, a szükséges eszközök magas ára és a szükséges magas szintű szaktudás hiánya magyarázhat. Ennek ellenére ismertek már élő klinikai alkalmazások pl. autoantitest profilírozás proteomikai eszközökkel [483-485].

A 6.2.7. fejezetben egy saját, újonnan fejlesztett proteomikai rendszert mutattunk be, ami a plazma proteom screenelésére alkalmas. Összesen 290 egyedi plazma protein epitóp felismerésére képes a rendszer, ami a fehérjék szintjén redundáns, de az epitópok szintjén nem. Ez azt jelenti, hogy egy-egy plazma fehérjével több a chipen lévő antitest is képes reagálni, de ezek a protein különböző epitópjaihoz kötődnek. Ennek igazolását az antitesteket előállító BSI kft. végezte el az antitestek keresztreaktivitásának tesztelésével, phage display technológiát alkalmazva és az antitesteket kódoló immunglobulin gén variábilis régiójának szekvenálásával. A rendszer klinikai kipróbálása során igazoltuk, hogy az array alkalmas olyan markerek azonosítására, amelyek önállóan vagy egymással kombinálva hatékonyan különböztetik meg a tüdőtumoros betegeket és az egészséges kontrollokat. Az adatok analízise során az is kiderült, hogy több olyan antitest is van a chipen, ami ugyanazt a fehérjét ismeri fel, mint a hatékonynak talált antitestek, azonban ezek eredménye nem mutat különbséget a betegek és kontrollok között (nem bemutatott adatok). Tehát, vannak olyan fehérje epitópok, amelyek változnak a daganatos betegek mintáiban, míg ugyanannak a fehérjének más epitópjai nem. Ez alapján a QP300 kit nemcsak proteom, hanem az epitom profilírozására alkalmas eszköznek tűnik, és mint ilyen jelenleg egyedülállónak tekinthető.

Az egyik talán legfiatalabb az "omika" technológiák közül a **metabolomika**, ami a szervezetben található kisméretű molekulák, metabolitok vizsgálatával foglalkozik. Ezek az anyagok az összes makromolekuláink (fehérjék, DNS, RNS, poliszacharidok) építőkövei (aminosavak, cukrok, nukleotidok, stb.), amelyek vagy a szervezetben keletkeznek, vagy kívülről kerülnek be oda. Nemcsak a makromolekulák felépülésében van fontos szerepük, hanem a szervezetben zajló minden biokémiai folyamatban (pl. energiatermelés); gyakran ezek eredményeként is jönnek létre. A metabolitok vizsgálatának legfontosabb eszközei az NMR spektroszkópia és tömegspektrometria. Az előbbinek meglehetősen alacsony az érzékenysége és nem túl sok metabolit egyidejű vizsgálatára képes, míg az utóbbi egyidejűleg több száz analit tesztelésére alkalmas. Ennek megfelelően a tömegspektrometria alkalmazása terjedt el széles körben ezen a területen. A biológiai minták vizsgálata történhet direkt injektálással vagy valamilyen szeparációs technikát követően. Az első esetben a biológiai mintákban nagy mennyiségben lévő makromolekulák zavarhatják a meghatározást (nagy háttér zaj, alacsony érzékenység), a szeparálási eljárások viszont módosíthatják a minták metabolit összetételét. A szeparálási eljárások közül elsősorban a gáz- és folyadék-kromatográfiát, valamint a kapilláris

elektroforézist használják a gyakorlatban. Az emberi szervezetben lévő metabolitok teljeskörű feltérképezésére indult 2008-ban a Human Metabolom Project, és az ennek eredményeként létrejött Human Metabolom Adatbázis jelenleg több mint 7900 metabolitot tartalmaz. 2011-ben hozták létre a Szérum Metabolom Adatbázist, ami jelenleg több mint 4300 molekulát tartalmaz a megfelelő szérumkoncentrációval, ismert funkciókkal és betegség asszociációkkal. Ezeknek a potenciális biomarkereknek a klinikai evaluálása is megkezdődött már, és különböző daganatos, kardiovaszkuláris és neurológiai kórképek esetében sikerült betegség-asszociált metabolit profilt azonosítani [485].

7.4.2. További jelentős technológiai fejlesztések

Az "omika" technikák eredményei mellett további új technológiai fejlesztések is elősegítik a biomarkerek felfedezését, illetve ezek klinikai adaptálását. Ezek az új metodikák és eljárások alapvetően a miniaturizálás irányába mutatnak. Idesorolhatók pl. az egy sejt "transzkriptomikai" vizsgálatok, amelyek egyetlen sejt génexpressziós változásait képesek jellemezni. Amennyiben egy adott szövetből több száz vagy ezer egyedi sejt változásait követjük nyomon az adott szövetben zajló génaktivitás lokális feltérképezésére is lehetőségünk van [486].

Egy másik izgalmas terület a nanotechnológia alkalmazása pl. a proteomika területén. A különböző nanostruktúrájú felszínek, nanopórusokkal bíró mágneses vagy arany részecskék, szén nanocsövek vagy polimer nanostruktúrák hatalmas felszínnel bíró speciális tulajdonságú képletek, amelyek a különböző, affinitás alapú assay-k érzékenységet több ezerszeresére is növelhetik. Ez lehetővé teszi azt, hogy akár az attoM koncentráció tartományban történjenek a meghatározások, ráadásul nagyfokú miniaturizációt hozhat magával. Ezek a nanostruktúrák alkalmasak lehetnek a proteomikai eljárásokat megelőző tisztítási lépések modernizálására is. A fémoxid tartalmú nanorészecskék pl. nagyon jól használhatók a foszfoproteinek dúsítására [487].

Végül akár a jelenleg használt laboratóriumi automaták kiváltására is képesek lehetnek, de legalábbis újgenerációs POCT készülékek alapját vethetik meg a legújabb mikrofluidikai technológiák. Ezekben a rendszerekben a minta és a reagens igény jelentősen redukálható és minimalizálható az emberi tényező hatása is, hiszen néhány μL de még inkább nL mintára van csak szükség, amit közvetlenül a rendszerbe kerül és további emberi beavatkozás nem is történik. Ezeket a rendszereket "lab-on-chip" vagy "biochip" vagy "mikrototal-analízis rendszer"-nek (μTAS) nevezzük. A diagnosztikai folyamat minden lépése (minta előkészítés, reagenssel összemérés, reakció és detektálás) miniaturizáltan a chip felületén történik meg. Az alkalmazási terület igen sokszínű, az

általános kémiai teszteken túl immunoassay-k, sejtes vizsgálatok vagy genetikai meghatározások is a chipre kerülhetnek. Akár egy "PCR készülék" is beépíthető ebbe a rendszerbe: 3 különböző hőmérsékletű (90°C, 72°C, 55°C) reakció kamra kerül kialakításra, amelyek között a PCR mix egyetlen csepp formájában egy piezoelektromos mikropumpa által irányítva mozog. A PCR termék feldolgozása is történhet ugyanitt, pl. egy elektrokinetikusan kontrollált DNS hibridizációs mikrofluidikai kamrában, ahol a fluoreszcens detektálás is megtörténhet. A megfelelően kialakított chipen végbemenő reakciók lezajlásának detektálására nagyon jól használható technika az impedancia mérése, ami egyre szélesebb körben kezd elterjedni [488].

7.4.3. Markerkombinációk használata a laboratóriumi diagnosztikában

Ahogy a Bevezetés 2.4.6. részében is taglaltuk az egyedi markerek önálló alkalmazása mellett egyre nagyobb teret kapnak a laboratóriumi diagnosztikában a markerkombinációk, illetve kompozit score-ok is, mert sokkal hatékonyabban működnek, mint az egyedi markerek.

Saját kísérletes eredményeink is egyértelműen igazolták ezt a tendenciát. A doktori értekezés 6.2.4. fejezetében a tüdőtumoros betegek mintáiban a HE4 és további rutin tumormarkerek diagnosztikus hatékonyságát vizsgáltuk, és a bináris logisztikus regresszióval egy képletbe hozott HE4, CEA és CA 125 sokkal effektívebben különböztette meg a daganatos betegeket és a kontrollokat, mint az egyedi markerek. Ehhez hasonlóan működik a 7.1.2. pontban említett két kereskedelmi forgalomban lévő tüdőtumor diagnosztikum: a PAULA teszt 4 (CEA, CA 125, Cyfra 21-1, NY-ESO-1) a SomaScan assay, pedig 12 szérumfehérje mérését egyesítve értékeli a betegek mintáit [438,439].

A kompozit score-ok alapjául rendkívül jól használhatóak a 7.4.1. pontban ismertetett „omika” technikák által szolgáltatott nagyszámú egyedi adatok. Az FDA által is elfogadott 2 emlő tumor diagnosztikum pl. alapvetően génexpressziós mintázat azonosítása alapján működik. Az Oncotype Dx 21 gén expresszióját vizsgálja a tumoros emlő szövetben és 0-100 közötti score-t ad meg, ami a kemoterápiára adott választ, illetve a 10 éven belül bekövetkező daganat kiújulás valószínűségét jellemzi. A MammaPrint assay 70 gén expresszióját határozza meg, és hasonlóan az előző teszthez, alacsony és magas rizikójú csoportba sorolja az emlőtumoros betegeket a daganat kiújulás szempontjából. A „Tissue of Origin” teszt nem vagy alig differenciált metasztázisok primer daganatának azonosítására használható. Ez a microarray rendszer 1660 gén expressziójának vizsgálatával 15 jól karakterizált tumor szövettani típust ismer fel, ami a szolid tumorok

90%-át lefedi [321-324].). Saját fejlesztésű protein array eredményeink is ebbe a sorba illeszthetőek. A QP300 rendszer, ami 290 fehérje marker egyidejű mérésére képes, sikeresen azonosított 4 plazma proteint, amelyek hagyományos tumormarkerrel kombinálva rendkívül hatékonyan különítették el a tüdőtumoros betegeket és kontrolljaikat.

Akár néhány rutin laboratóriumi paraméter, akár több tíz vagy száz, valamely omikai módszer által biztosított adat kombinációját szeretnénk végrehajtani nagyszámú matematikai megközelítés (formula és algoritmus) áll a rendelkezésünkre. A módszerek egy része szolgálhat a változók számának redukálására (pl. főkomponens analízis) vagy alkalmas lehet az egyedi markerek hatékonysága alapján sorrend felállítására, amivel az önmagában leghatékonyabb markerek kiválaszthatóak (klasszikus összehasonlító statisztikák – t-teszt, Mann-Whitney U-teszt; döntési fák alkalmazása – random forests analízis). A metódusok másik csoportja az összes változóból vagy a redukált számú (önmagában leghatékonyabb) paraméterekből kiindulva képes a klinikai döntést elősegítő formula vagy algoritmus megalkotására (logisztikus regresszió; döntési fák alkalmazása - random forests, adaptive boosting trees, gradient boosting trees és extra trees; mediod klasszifikációs algoritmus; "linear discriminate" analízis; "support vector machine" analízis és neurális hálók alkalmazása). Ezek közül különösen hatékonyak az önmagukat fejlesztő algoritmusok ("machine learning algorithm"), melyek képesek javítani a teljesítményükön miközben az analízist végzik az újabb és újabb adatbázisokon. A kompozit score-ok megalkotásának matematikai folyamata azonban kevésbé definiált és standardizált, a különböző matematikai technikák jelentősen eltérő eredményeket adhatnak, ráadásul egy-egy alkalmazás esetében más-más modell és eszköz működik a leghatékonyabban [483,489-491].

A score rendszerek kidolgozása a biomarker kutatás egyik legígéretesebb területe, és egyre több példa mutatja ezek alkalmazhatóságát a rutin klinikai gyakorlatban.

7.4.4. Biomarkerek és személyre szabott orvoslás

A gyakorlati medicina területén igen jelentős szemléletváltás van folyamatban; az evidencia alapú orvoslás mellett egyre nagyobb hangsúlyt kap a személyre szabott betegellátás ("personalized medicine"). Az evidencia alapú megközelítés egy-egy gyógyszer/eljárás hatékonyságát nagy betegpopulációkon tesztelte, és szigorú kritériumok alapján döntött arról, hogy egy szer klinikailag hatékonynak tekinthető-e vagy sem. Ezek a klinikai vizsgálatok, majd a való élet is igazolta, hogy ugyan egy nagyobb populáción általában valóban működik egy terápia, de bizonyos egyének kevésbé vagy egyáltalán nem

reagálnak rá, másoknál pedig lehet hatékony a kezelés, de súlyos mellékhatások is jelentkeznek [4]. Ugyanakkor több olyan gyógyszer is elveszett a klinikai tesztek során, ami bár nagyon jól működött a vizsgált betegek néhány százalékán, de a populáció nagy része nem reagált rá, és ez az adott gyógyszer fejlesztésének terminálását eredményezte. Másrészt számos esetben fordult elő, hogy a széles körben jól működő gyógyszer fejlesztését le kellett állítani vagy vissza kellett vonni a piacról extrém ritkán jelentkező súlyos mellékhatások miatt. A személyre szabott medicina célja éppen az, hogy egy beteg genomikai/proteomikai adottságai alapján válasszuk ki azt a terápiát, ami nála nagy valószínűséggel működni fog és nem okoz káros mellékhatásokat. A személyre szabott terápia megválasztása várhatóan jelentősen csökkenteni fogja a diagnózis felállítása és a terápia megkezdése között eltelt időt, növeli a kezelésre ténylegesen reagáló betegek számát, és csökkenti az adverz események előfordulásának gyakoriságát, ami együtt potenciálisan jelentős költséghatékonyság növekedést eredményezhet [4,492,493].

Úgy tűnik, hogy a személyre szabott medicina fejlődésének markáns lökést adhatnak a biomarker felfedezések. Az adott terápiára eltérően reagáló betegek között meglévő rendkívül nagyszámú biológiai eltérés közül azonosítanunk kell azokat, amelyek a terápia hatékonyságát valóban befolyásolják, majd rutin diagnosztikai célra is hasznosítható módszert kell ennek kimutatására fejlesztenünk. Az amerikai FDA felismerve a célzott terápiák alkalmazásához szükséges specifikus diagnosztikus tesztek jelentőségét 2011-ben fogadta be az első ún. társdiagnosztikumot. Ezek olyan hatóság által engedélyezett diagnosztikus tesztek, amelyek bizonyítják egy adott kóros állapot meglétét és elősegítik a specifikus gyógyszer kiválasztását, illetve dózisének megállapítását. Jelenleg az FDA már több mint 15 társdiagnosztikumot fogadott be, de ezek száma folyamatosan nő. A legdinamikusabban fejlődő terület az onkológia (Her2 expresszió, EGFR, K-RAS, FLT3, KIT, BRAF, ALK mutációk, stb.), de ismertek egyéb kórképek is (pl. depresszió, Alzheimer kór, cystas fibrosis), ahol bizonyos - elsősorban genetikai - tesztek végezhető/végezendők bizonyos gyógyszerek felírása előtt [4,492,494-497].

Az FDA kifejezetten szorgalmazza a terapeutikumok és a kísérő diagnosztikus tesztek párhuzamos fejlesztését, szabadalmaztatását és engedélyeztetését, ami azonban nem egyszerű kérdés. A gyógyszerfejlesztő cégek nagy része nem rendelkezik diagnosztikum fejlesztési potenciállal, ráadásul a diagnosztikum fejlesztés akár megduplázhathatja a gyógyszerfejlesztés és kipróbálás, amúgy is igen magas, költségeit. Nyilván nehéz a két fejlesztési folyamat időbeli koordinálása is. A diagnosztikum fejlesztésbe belekezdeni igazán akkor van értelme, ha az adott gyógyszer túl van a kipróbálások nagy részén és a piaci bevezetése és sikere nagyon valószínű. Ha azonban csak ekkor kezdik el a fejlesztést nem lesz kész az assay addigra, amikor a gyógyszer már bevezethető lenne. Másrészt,

amennyiben a kísérő diagnosztikum rendelkezésre áll a gyógyszer klinikai tesztelésének fázisában lehetőséget teremt arra, hogy csak célzottan kerüljenek be a betegek a klinikai kivizsgálásba, ami csökkentheti a résztvevők számát és a költségeket. Ugyanakkor egyre nagyobb gondot jelent társadalmi szinten az egyre drágább gyógyszerek és ezek diagnosztikumainak finanszírozása. Ami ebből a laboratóriumokat érinti az a diagnosztikus tesztek alkalmazása, fejlesztése és nem utolsósorban költsége [492,493,498,499]. Mindezen problémák ellenére az új biomarkerek felismerése és csatasorba állítása jelentős mértékben segítheti a személyre szabott terápiák egyre intenzívebb fejlesztését és egyre szélesebbkörű elterjedését.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- A granulocyták fokozott CD14-expressziója jellemző az atópiás dermatitises betegekre, ez azonban csak mérsékelt hatékonysággal tesz különbséget a betegek és kontrollok között. *A monocyták CD14-expressziójának csökkenése összefüggést mutat a betegség aktivitásával poly- és dermatomyositisben, és mérsékelt hatékonyságú aktivitási markerként szolgálhat*.*
- A monocyták CD14-expresszió csökkenése nem tűnik aktivitási markernek SLE-ben, de jól követi a nagy dózisú kortikoszteroid terápia hatását, és potenciálisan alkalmas lehet ennek a monitorozására. A pulzus szteroid kezelés hatására bekövetkező CD14 receptor szám csökkenést az SLE-s monocytákon csökkent LPS-indukálta sejtaktiváció kíséri.
- Sikertült egy új, áramlási citometriás, szérumban sCD14 mérésére alkalmas módszert beállítani. Az új teszttel elvégzett mérések alapján csökkent szérumban sCD14 szint jellemző az atópiás dermatitises betegekre, ez azonban csak mérsékelt hatékonysággal tesz különbséget a betegek és kontrollok között. Az SLE-s betegek és az egészséges kontrollok között számottevő különbség van a sCD14 koncentrációban. *A szérumban sCD14 koncentráció emelkedése összefüggést mutat a betegség aktivitásával poly- és dermatomyositisben és jó hatékonyságú aktivitási markerként szolgálhat*.*
- A vizsgált akut fázis fehérjék közül a CRP a legérzékenyebb teszt a cirrhosishoz társuló fertőzések kimutatására, bár előrehaladott betegség esetén hatékonysága csökken. Jól használható még emellett a szignifikáns bakteriális fertőzések előrejelzésére is az aktuálisan infekciómentes betegek esetében.
- Az IgA típusú ANCA antitestek pozitivitása kifejezetten gyakori cirrhosisban, és magas titerben mutathatók ki ezek az antitestek. Összefüggést mutatnak a bakteriális infekciók jelenlétével, és egyben független prediktorai is ezek kialakulásának. Az ANCA IgA₂ alosztály emelkedett aránya és a magas szekretoros komponens pozitívítás felveti a béltraktusban lévő immunsejtek és a cirrhosisra jellemző fokozott bakteriális transzlokáció szerepét ezen antitestek kialakulásában.
- A HE4 szérumszintjét számos preanalitikai faktor (életkor, dohányzás, vesefunkció) befolyásolhatja. A HE4 a petefészek tumor diagnosztizálásának elősegítése mellett a tüdő tumor hatékony markere is lehet, ráadásul magasabb értéket mutat az előrehaladottabb tumoros állapotokban, és korrelál a tumor méretével és kiterjedtségével. A HE4, CEA és CA 125 kombinálása egyetlen kompozit score-rá

tovább fokozza a diagnosztikus hatékonyságot, és akár a korai stádiumú tüdőráknak is érzékeny markere lehet.

- Az adhéziós tulajdonsággal bíró tumormarkerek (CA 19-9, CA 125, CA 72-4) a daganatos betegségek mellett az autoimmun gyulladásos megbetegedések közül RA-ban is pozitivitást mutathatnak.
- A vizsgált 50 év feletti férfi populációban a szérumban a sclerostin szint emelkedik az életkor előrehaladtával. A Cystatin C-vel, kreatininnal és az eGFR-rel való összefüggése egyértelműen jelzi, hogy a sclerostin koncentrációt befolyásolja a veseműködés hatékonysága. Az idősebb korra jellemző mérsékelt vesefunkció beszűkülés lehet részben magyarázata a sclerostin emelkedett szintjének az idősebb betegek mintáiban.
- Az FLT3-ITD kimutatására leginkább alkalmas módszer a PCR-t követő kapilláris elektroforézis, melynek érzékenysége és feloldóképessége felülmúlja a hagyományos elektroforézis technikák nyújtotta lehetőségeket. Ugyanakkor megfelelő reprodukálhatósággal csak az 1% feletti mutáns/totál allél arány kvantitálható és a meghatározott ITD méret kb. 7%-kal alacsonyabb a valós értékhez képest, ha ezt a módszert használjuk.
- *Az újonnan kifejlesztett, 290 antitestet tartalmazó, mAb-alapú, plazma proteom profilozására alkalmas fehérje array (QP300) analitikai tesztelése során 252 mAb adott megbízhatóan reprodukálható adatot. A QP300 kit segítségével lehetőség nyílik hatékonyan működő új biomarkerek azonosítására. Különböző matematikai algoritmusok segítségével 4 QP300 marker és a Cyfra 21-1 teszt eredményét kombinálva egyetlen kompozit score-rá, tüdőtumoros betegek és egészséges kontrollok elkülönítésére alkalmas hatékony paraméter állítható elő*.*

**még nem publikált eredmények*

9. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

- A sCD14 mérésére beállított áramlási citometriás módszer egyszerű és olcsó alternatívája lehet a sCD14 mérő immunoassay-knek. A potenciális rutin diagnosztikai applikációk közé tartozhat *a betegség aktivitásának monitorozása a myositises betegek esetében**, illetve a kortikoszteroid terápia hatékonyságának értékelése SLE-ben.
- A cirrhotishoz társuló infekciók jelentős mértékben befolyásolják ezen betegek életkilátásait. A szérum CRP, PCT és ANCA mérése jól használható az infekciók kimutatására és előrejelzésére is. Ezek beépítése a cirrhotisos betegek követése során alkalmazott labordiagnosztika profilba számottevően javíthatja a betegek ellátását. Az általánosan használt 5 mg/L-es CRP cut-off érték helyett ezen betegek esetében 10 mg/L-es küszöbérték javasolt.
- A HE4 marker, különösen a CEA és CA 125 kombinálásával, a tüdőtumороk diagnosztikájának értékes, új paramétere lehet. Értékelésénél mindenképpen figyelembe kell venni, hogy az életkor, dohányzás és a vesefunkció beszűkülése növelheti a szérumszintjét.
- Az adhéziós tulajdonsággal bíró tumormarkerek (CA 19-9, CA 125, CA 72-4) a daganatos betegségek mellett az autoimmun gyulladásos megbetegedések közül RA-ban is pozitivitást mutathatnak. Rutin tumormarkerként történő klinikai alkalmazásuk során ez a differenciál diagnosztikai szempontból fontos tény mindenképpen figyelembe veendő.
- A csontanyagcsere egyik új, jelenleg még kísérleti fázisban lévő markere a sclerostin szint mérése. Ennek szérum koncentrációját számottevően növeli a vesefunkció beszűkülése és az életkorral is összefüggést mutat. Ezeket a preanalitikai faktorokat a marker értékelése során figyelembe kell venni.
- Az FLT3-ITD kimutatása már jelenleg is része az AML diagnosztikai profiljának. Amennyiben az ITD méretét, és a mutáns allél arányát is meg akarjuk határozni a legoptimálisabb módszer a PCR-t követő kapilláris elektroforézis. Ennek értékelésénél azonban mindenképpen figyelembe kell venni, hogy megfelelő reprodukálhatósággal csak az 1% feletti mutáns/totál allél arány kvantitálható, és a meghatározott ITD méret kb. 7%-kal alacsonyabb a valós értékhez képest.
- *A QP300 array a plazma proteom profilírozásának értékes új módszere, mely hatékonyan használható új, betegségspecifikus biomarkerek azonosítására. A 4 QP300 és egy klasszikus tumormarkert alkalmazó kompozit paraméterünk a tüdőtumor diagnosztikájának hatékony új paramétere lehet*.*

**még nem publikált eredmények*

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként családomnak, feleségemnek és kislányomnak szeretnék köszönetet mondani türelmükért, segítségükért és szeretetükért. Hálásan köszönöm édesapám és édesanyám gondoskodását, törődését, odaadó támogatását, amivel elindították életemet.

Szakmai szempontból mindenekelőtt Dr. Szegedi Gyula akadémikus úrnak szeretnék köszönetet mondani, amiért az egyetem elvégzése után lehetővé tette, hogy a III. sz. Belgyógyászati Klinikán kezdjek el dolgozni, majd hozzájárult, ahhoz is, hogy a belgyógyász munkát laboratóriumi tevékenységre cseréljem. Hálával gondolok Dr. Sipka Sándor professzor úrra, akivel az első kísérleteimet tervezhettem, és aki első saját publikációm elkészítésében is segédkezett. Köszönettel tartozom Dr. Muszbek László akadémikus úrnak, amiért Intézetébe fogadott, segített és támogatott, és lehetővé tette, hogy a modern laboratóriumi diagnosztika alapjait elsajátíthassam. Hálásan köszönöm Dr. Kappelmayer János professzor úr több, mint egy évtizedes bizalmát, támogatását, ösztönzését és segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Jos van Strijp és Dr. Kok van Kessel professzoroknak, utrechti mestereimnek, akiktől a kutatás szeretetét megtanulhattam és szépségét megismerhettem. Milyen kár, hogy a "just for fun" kutatás ma már nem létezik!

Köszönetet mondok valamennyi PhD hallgatónak - Aleksza Magdolna, Sümegi Andrea, Bubán Tamás, Vida András, Tornai Dávid - a közösen eltöltött izgalmas és stimuláló időszakokért, a közösen átélt sikerek emlékével.

Hálásan köszönöm a kutatómunkában közvetlenül velem együtt dolgozó analitikus kolléganőim - Szöllősiné Ibolya, Veszprémi Anikó és Gálné Szabó Gabriella - segítségét. Külön köszönettel tartozom Vargáné Földesi Rozikának az elmúlt években nyújtott áldozatos munkájáért, támogatásáért.

Köszönet illeti a kutatómunkában résztvevő belgyógyász, bőrgyógyász, onkológus, reumatológus, sebész, szülész-nőgyógyász, tüdőgyógyász és urológus kollégákat is. Külön köszönöm Dr. Papp Mária doktornő segítségét, a fáradtságos, de izgalmas közös munkálkodást.

Köszönettel tartozom Dr. Takács László akadémikus úrnak és a Biosystems International kft.-ben dolgozó kollégáknak, amiért a laboratóriumi reagens fejlesztés izgalmas új területére nyújtottak betekintést.

Hálásan köszönöm a III. sz. Belgyógyászati Klinika, a Regionális Immunológiai Laboratórium, a Laboratóriumi Medicina Intézet és utrechti Eijkman Winkler Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden dolgozójának segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani Vargáné Földesi Rozikának, Tornai Dávidnak, Gálné Szabó Gabriellának és Sümegi Andreának a doktori értekezés és tézisleírás elkészítésében nyújtott pótolhatatlan segítségért.

11. JEGYZÉKEK

11.1. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bloom JC. Biomarkers in clinical drug development: definitions and disciplines. *In* Biomarkers in Clinical Drug Development. Bloom JC, Dean RA. eds. 1st ed. Marcel Dekker, New York, 2003,132: p 1–10.
2. Biomarkers Definition Working Group, NIH. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89–95.
3. Cummings J, Ward TH, Dive C. Fit-for-purpose biomarker method validation in anticancer drug development. *Drug Discovery Today.* 2010;15:816–825.
4. Németh Gy, Jelinek I. A személyre szabott medicina, a biomarker-kutatás és a gyógyszerfejlesztés új irányai. *Magyar Onkológia.* 2013;57:5–10.
5. Sokoll LJ, Rai JA, Chan DW. Tumor markers. *In* Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Carl AB, Edward RA, David EB.eds. 5th ed. Elsevier, St Louis, 2012, p 617–667.
6. Bence-Jones H. Papers on chemical pathology. Lecture III. *Lancet.* 1847;ii:269–272.
7. Sell S. Cancer markers of the 1990s. *Clin Lab Med.* 1990;10:27–31.
8. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015;21:84–93.
9. Anensen N, Haaland I, D'Santos C, Van Belle W, Gjertsen BT. Proteomics of p53 in diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006;7:199–207.
10. Robinson SW, Fernandes M, Husi H. Current advances in systems and integrative biology. *Comput Struct Biotechnol J.* 2014;11:35–46.
11. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2006;24:971–983.
12. Lee JW, Smith WC, Nordblom GD, Bowsher RR. Validation of assays for the bioanalysis of novel biomarkers: Practical recommendations for clinical investigation of new drug entities. *In* Biomarkers in Clinical Drug Development. Bloom JC, Dean RA. eds. 1st ed. Marcel Dekker, New York, 2003,132: p 119–148.
13. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39883
14. ISO 9000:2005. Quality management systems-fundamentals and vocabulary. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=42180
15. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009;133:743–755.
16. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res.* 2000;17:1551–1557.
17. Lee JW, Weiner RS, Sailstad JM, Bowsher RR, Knuth DW, O'Brien PJ, Fourcroy JL, Dixit R, Pandite L, Pietrusko RG, Soares HD, Quarmby V, Vesterqvist OL, Potter DM, Witliff JL, Fritche HA, O'Leary T, Perlee L, Kadam S, Wagner JA. Method validation and measurement of biomarkers in nonclinical and clinical samples in drug development: a conference report. *Pharm Res.* 2005;22:499–511.
18. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L, Rogers JA, Millham R, O'Brien PJ, Sailstad J, Khan M, Ray C, Wagner JA. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res.* 2006;23:312–328.
19. DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res.* 2003;20:1885–1900.
20. Lee JW, Figeys D, Vasilescu J. Biomarker assay translation from discovery to clinical studies in cancer drug development: quantification of emerging protein biomarkers. *Adv Cancer Res.* 2007;96:269–298.
21. Findlay JW. Some important considerations for validation of ligandbinding assays. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2009;877:2191–2197.
22. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res.* 2007;24:1962–1973.

23. Valentin MA, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55:869–877.
24. Kelley M, DeSilva B. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *AAPS J.* 2007;9:E156-E163.
25. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21:1249–1273.
26. Sturgeon C, Hill R, Hortin GL, Thompson D. Taking a new biomarker into routine use--a perspective from the routine clinical biochemistry laboratory. *Proteomics Clin Appl.* 2010;4:892–903.
27. Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin Proteomics.* 2013;10:13.
28. Regnier FE, Skates SJ, Mesri M, Rodriguez H, Tezak Z, Kondratovich MV, Alterman MA, Levin JD, Roscoe D, Reilly E, Callaghan J, Kelm K, Brown D, Philip R, Carr SA, Liebler DC, Fisher SJ, Tempst P, Hiltke T, Kessler LG, Kinsinger CR, Ransohoff DF, Mansfield E, Anderson NL. Protein-based multiplex assays: mock submissions to the US Food and Drug Administration. *Clin Chem.* 2010;56:165–171.
29. Mamma Print® 510(k) Substantial Equivalence determination decision summary. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K062694.pdf
30. Az Európai Parlament és a Tanács 98/79/EK irányelve az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről. Az Európai közösségek hivatalos lapja. 1998;13/21 kötet:319-355. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0079&from=EN>
31. Sümegi A. A CD14 molekula és egyes toll-like receptorok jellemzése atopiás és autoimmun kórképekben. Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés. Debrecen, 2007.
32. Antal-Szalmás P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J of Clin Invest.* 2000;30:167–179.
33. Antal-Szalmás P, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J, Van Kessel KP. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1997;61:721–728.
34. Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, Hess S, Kruger C, Stelter F, Eckerskorn C, Schutt C, Engelmann H. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol.* 1995;25:604–610.
35. Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol.* 1993;23:2144–2151.
36. Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrara P, Ziegler-Heitbrock HW, et al. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol.* 1994;24:2006–2012.
37. Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *J Immunol.* 2013;190:1304–1311.
38. Su GL, Dorko K, Strom SC, Nussler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol.* 1999;31:435–442.
39. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity-cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:1–3.
40. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249:1429–1431.
41. Akashi-Takamura S, Miyake K. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother.* 2006;12:233–240.
42. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 2007;261:511–528.
43. Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:15–19.
44. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis.* 1995;171:639–644.
45. Nockher WA, Scherberich JE. Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoid in vivo and in vitro. *J Immunol.* 1997;158:1345–1352.
46. Krüger C, Schütt C, Obertacke U, Joka T, Müller FE, Knoller J, Koller M, König W, Schönfeld W. Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol.* 1991;85:297–301.

47. Pugin J, Schurer Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2744–2748.
48. Loppnow H, Stelter F, Schönbeck U, Schlüter C, Ernst M, Schütt C, Flad HD. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun*. 1995;63:1020–1026.
49. Rahman SH, Salter G, Holmfield JH, Larvin M, McMahon MJ. Soluble CD14 receptor expression and monocyte heterogeneity but not the C-260T CD14 genotype are associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med*. 2004;32:2457–2463.
50. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dorner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9:614–621.
51. Griga T, Klein W, Epplen JT, Hebler U, Stachon A, May B. CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promotor polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:808–811.
52. Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:699–704.
53. Nishimura S, Zaitzu M, Hara M, Yokota G, Watanabe M, Ueda Y, Imayoshi M, Ishii E, Tasaki H, Hamasaki Y. A polymorphism in the promoter of the CD14 gene (CD14/-159) is associated with the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr*. 2003;143:357–362.
54. Pforte A, Schiessler A, Gais P, Beer B, Ströbel M, Ehlers M, Schütt C, Ziegler-Heitbrock HW. Increased expression of the monocyte differentiation antigen CD14 in extrinsic allergic alveolitis. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1993;48:607–612.
55. Wuthrich B, Kagi MK, Joller-Jemelka H. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 1992;284:339–342.
56. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, Altörjay I, Antal-Szalmas P, Palyu E, Udvardy M, Molnar T, Farkas K, Veres G, Harsfalvi J, Papp J, Papp M. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:767–777.
57. Buzás E, Falus A. Akutfázis-reakció és gyulladás. In *Az immunológia alapjai*: Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. Szerkesztők. 3. kiadás. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2007, p 192–193.
58. Richard NM, Ramzi SC. Acute and chronic inflammation. In *Basic Pathology*. Kumar V, Contran RS, Robbins SL. eds. 6th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, p 25–46.
59. Markanday A. Acute phase reactants in infections: Evidence-based review and a guide for clinicians. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2:ofv098. doi: 10.1093/ofid/ofv098.
60. Salazar J, Martinez MS, Chávez-Castillo M, Núñez V, Anez R, Torres Y, Toledo A, Chacín M, Silva C, Pacheco E, Rojas J, Bermúdez V. C-reactive protein: An in-depth look into structure, function, and regulation. *International Scholarly Research Notices*. 2014; Volume 2014; Article ID 653045:1-11.
61. Vilahur G, Badimon L. Biological actions of pentraxins. *Vascul Pharmacol*. 2015;73:38–44.
62. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin*. 2006;22:503–519.
63. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39:206–217.
64. Christ-Crain M, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections-hype, hope, more or less? *Swiss Med Wkly*. 2005;135:451–460.
65. Schneider HG, Lam QT. Procalcitonin for the clinical laboratory: a review. *Pathology*. 2007;39:383–390.
66. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36:941–952.
67. Limper M, de Kruif MD, Duits AJ, Brandjes DP, van Gorp EC. The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J Infect*. 2010;60:409–416.
68. Vikse J, Henry BM, Roy J, Ramakrishnan PK, Tomaszewski KA, Walocha JA. The role of serum procalcitonin in the diagnosis of bacterial meningitis in adults: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2015;38:68–76.
69. Ding PH, Jin LJ. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontal Res*. 2014;49:1–9.
70. Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, Gürtler K, Oh DY, Sur S, Lundvall L, Hamann L, van der Ploeg A, Pickkers P, Giamarellos-Bourboulis E, Kubarenko AV, Weber AN, Kabesch M, Kumpf O, An HJ, Lee

- JO, Schumann RR. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*. 2013;39:647–660.
71. Schumann RR. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:989–993.
 72. Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham P, Craven CJ. Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci*. 2004;13:422–430.
 73. Krasity BC, Troll JV, Weiss JP, McFall-Ngai MJ. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1039–1044.
 74. Lamping N, Hoess A, Yu B, Park TC, Kirschning CJ, Pfeil D, Reuter D, Wright SD, Herrmann F, Schumann RR. Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg94, Lys95, Lys99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol*. 1996;157:4648–4656.
 75. Han J, Mathison JC, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem*. 1994;269:8172–8175.
 76. Yu B, Wright SD. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein - Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem*. 1996;271:4100–4105.
 77. Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*. 2003;278:15587–15594.
 78. Schröder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zähringer U, Göbel UB, Schumann RR. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol*. 2000;165:2683–2693.
 79. Schröder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Göbel UB, Schumann RR. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol*. 2004;173:2683–2691.
 80. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*. 1994;180:1025–1035.
 81. Thompson PA, Tobias PS, Viriyakosol S, Kirkland TN, Kitchens RL. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS. *J Biol Chem*. 2003;278:28367–28371.
 82. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS host cell interactions. *J Endotoxin Res*. 2005;11:225–229.
 83. Schumann RR, Zweigner J. A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clin Chem Lab Med*. 1999;37:271–274.
 84. Villar J, Pérez-Méndez L, Espinosa E, Flores C, Blanco J, Muriel A, Basaldúa S, Muros M, Blanch L, Artigas A, Kacmarek RM. GRECIA and GEN-SEP Groups. Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe sepsis. *PLoS ONE*. 2009;4:e6818.
 85. Sakr Y, Burgett U, Nacul FE, Reinhart K, Brunkhorst F. Lipopolysaccharide binding protein in a surgical intensive care unit: a marker of sepsis? *Crit Care Med*. 2008;36:2014–2022.
 86. Mierzechala M, Krzystek-Korpacka M, Gamian A, Durek G. Quantitative indices of dynamics in concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as prognostic factors in severe sepsis/septic shock patients – comparison with CRP and procalcitonin. *Clin Biochem*. 2011;44:357–363.
 87. Pavcnik-Arnol M, Hojker S, Derganc M. Lipopolysaccharide-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infection: comparison with procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Intensive Care Med*. 2004;30:1454–1460.
 88. Su GL, Freeswick PD, Geller DA, Wang Q, Shapiro RA, Wan YH, Billiar TR, Twardy DJ, Simmons RL, Wang SC. Molecular-cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide-binding protein - evidence for extrahepatic expression. *J Immunol*. 1994;153:743–752.
 89. Human C-reactive protein complexed with phosphocholine - 1B09. RCSB Protein Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1B09&bionumber=1>.
 90. Procalcitonin: New findings relating to synthesis, biochemistry and function of procalcitonin in infection and sepsis diagnosis. PCT Literature Review 01, Brahms GmbH tájékoztató anyag; <http://www.pingxiti.com/pdf/pct-synthesis-biochemistry-function105415.pdf>.
 91. Sinico RA, Radice A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing: detection methods and clinical application. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:S112–S117.
 92. Kallenberg CG, Mulder AH, Tervaert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med*. 1992;93:675–682.
 93. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity*. 2005;38:93–103.

94. Lochman I, Král V, Lochmanová A, Lupač J, Cebecauer L. ANCA in the diagnosis of neutrophil-mediated inflammation. *Autoimmun Rev.* 2011;10:295–298.
95. Lindgren S, Nilsson S, Nässberger L, Verbaan H, Wieslander J. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. *Swedish Internal Medicine Liver Club (SILK). J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:437–442.
96. Terjung B, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol.* 2001;126:37–46.
97. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:463–473.
98. Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:494–501.
99. Falk RJ, Jennette IC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med.* 1988;318:1651–1657.
100. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (C-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med.* 1995;123:925–932.
101. Khan I, Watts RA. Classification of ANCA-associated vasculitis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15:383.
102. Papp M, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, Palatka K, Vitalis Z, Foldi I, Lakos G, Tumpek J, Udvardy ML, Harsfalvi J, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Bene L, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Veres G, Papp J; Hungarian IBD Study Group, Lakatos PL. Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:984–992.
103. Mulder AH, Horst G, van Leeuwen MA, Limburg PC, Kallenberg CG. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. Characterization and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1054–1060.
104. Bansi D, Chapman R, Fleming K. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic liver diseases: prevalence, titre, specificity and IgG subclass. *J Hepatol.* 1996;24:581–586.
105. Csernok E, Lamprecht P, Gross WL. Clinical and immunological features of drug-induced and infection-induced proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies and myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22:43–48.
106. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, van Wijk RT, Limburg PC, Kallenberg CG. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol.* 2000;32:734–741.
107. Fulcher DA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:344–345.
108. Konstantinov KN, Ulff-Moller CJ, Tzamaloukas AH. Infections and antineutrophil cytoplasmic antibodies: Triggering mechanisms. *Autoimmun Rev.* 2015;14:201–203.
109. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303:1532–1535.
110. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15:623–625.
111. Xu PC, Cui Z, Chen M, Hellmark T, Zhao MH. Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:1236–1243.
112. Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, van Timmeren MM, Berg EA, Poulton CE, McGregor J, Burkart M, Hogan SL, Hu Y, Winnik W, Nachman PH, Stegeman CA, Niles J, Heeringa P, Kitching AR, Holdsworth S, Jennette JC, Preston GA, Falk RJ. ANCA epitope specificity determines pathogenicity detectability and clinical predictive value. *J Clin Invest.* 2013;123:1773–1783.
113. Falk RJ, Jennette JC. ANCA disease: where is this field heading? *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:745–752.
114. Kain R, Exner M, Brandes R, Ziehermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med.* 2008;14:1088–1096.
115. Kain R, Rees AJ. What is the evidence for antibodies to LAMP-2 in the pathogenesis of ANCA associated small vessel vasculitis? *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25:26–34.

116. Pendergraft WF, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jennette JC, Falk RJ. Autoimmunity is triggered by cPR-3 (105–201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med*. 2004;10:72–79.
117. Bautz DJ, Preston GA, Lionaki S, Hewins P, Wolberg AS, Yang JJ, Hogan SL, Chin H, Moll S, Jennette JC, Falk RJ. Antibodies with dual reactivity to plasminogen and complementary PR3 in PR3-ANCA vasculitis. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2421–2429.
118. Yang J, Bautz DJ, Lionaki S, Hogan SL, Chin H, Tisch RM, Schmitz JL, Pressler BM, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA. ANCA patients have T cells responsive to complementary PR-3 antigen. *Kidney Int*. 2008;74:1159–1169.
119. Terjung B, Söhne J, Lechtenberg B, Gottwein J, Muennich M, Herzog V, Mähler M, Sauerbruch T, Spengler U. P-ANCAs in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut*. 2010;59:808–816.
120. Yang P, Danielsson D, Jarnerot G. *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* inhibit the perinuclear but not the circulating antineutrophil cytoplasmic antibody reaction. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:529–534.
121. Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO. PANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol*. 1998;18:153–160.
122. Selmi C, Gershwin ME. Autoantibodies in autoimmune liver disease: biomarkers versus epiphenomena. *Gut*. 2010;59:712–713.
123. Tadema H, Abdulahad WH, Lapse N, Stegeman CA, Kallenberg CG, Heeringa P. Bacterial DNA motifs trigger ANCA production in ANCA-associated vasculitis in remission. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:689–696.
124. Husmann CA, Holle JU, Moosig F, Mueller S, Wilde B, Cohen Tervaert JW, Harper L, Assmann G, Gross WL, Epplen JT, Wiczorek S. Genetics of toll like receptor 9 in ANCA associated vasculitides. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:890–896.
125. Morgan MD, Day CJ, Piper KP, Khan N, Harper L, Moss PA, Savage CO. Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells. *Immunology*. 2010;130:64–73.
126. Rimbart M, Hamidou M, Braudeau C, Puéchal X, Teixeira L, Caillon H, Néel A, Audrain M, Guillevin L, Josien R. Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory T cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *PLoS One*. 2011;6:e18734.
127. Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B Jr, Par G, Par A, Veres G, Csak T, Osztoivits J, Szalay F, Lakatos PL. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis – a tell-tale sign of compromised immunity? *PloS One*. 2010;5:e12957.
128. Christou L, Pappas G, Falagas ME. Bacterial infection-related morbidity and mortality in cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:1510–1517.
129. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2008;28:26–42.
130. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41:422–433.
131. Saab S, Hernandez JC, Chi AC, Tong MJ. Oral antibiotic prophylaxis reduces spontaneous bacterial peritonitis occurrence and improves short-term survival in cirrhosis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:993–1001.
132. Duffy MJ. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur J Intern Med*. 2007;18:175–184.
133. Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB. Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am J Cancer*. 1938;28:485–495.
134. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R. Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Lett*. 2015;358:1–7.
135. Tsung JS. Creatine kinase and its isoenzymes in neoplastic disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1986;23:65–75.
136. Harmsma M, Schutte B, Ramaekers FC. Serum markers in small cell lung cancer: opportunities for improvement. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836:255–272.
137. Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SL. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer*. 1986;57:1230–1234.
138. Chu TM. Prostate specific antigen. In *Serological cancer markers*. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 99–115.
139. Dimandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications. *Clinical Chemistry*. 2002;49:342.

140. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett.* 1987;214:317–322.
141. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.* 1991;51:222–226.
142. Partin AW, Piantadosi S, Subong EN, Kelly CA, Hortopan S, Chan DW, Wolfert RL, Rittenhouse HG, Carter HB. Clearance rate of serum-free and total PSA following radical retropubic prostatectomy. *Prostate Suppl.* 1996;7:35–39.
143. Mulders TM, Bruning PF, Bonfrer JM. Prostate-specific antigen (PSA). A tissue-specific and sensitive tumor marker. *Eur J Surg Oncol.* 1990;16:37–41.
144. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA.* 1993;270:860–864.
145. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol.* 1992;147:815–816.
146. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 1992;267:2215–2220.
147. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, de Kernion JB, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Subong EN, Parson RE, Gasior GH, Loveland KG, Southwick PC. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA.* 1998;279:1542–1547.
148. Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong EN, Gasior GH, Chan DW. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology.* 1996;48:55–61.
149. Lughezzani G, Lazzeri M, Haese A, McNicholas T, de la Taille A, Buffi NM, Fossati N, Lista G, Larcher A, Abrate A, Mistretta A, Bini V, Redorta JP, Graefen M, Guazzoni G. Multicenter European External Validation of a Prostate Health Index-based Nomogram for Predicting Prostate Cancer at Extended Biopsy. *Eur Urol.* 2013;5433:1–7.
150. Lazzeri M, Abrate A, Lughezzani G, Gadda GM, Freschi M, Mistretta F, Lista G, Fossati N, Larcher A, Kinzikееva E, Buffi N, Dell'Acqua V, Bini V, Montorsi F, Guazzoni G. Relationship of chronic histologic prostatic inflammation in biopsy specimens with serum isoform [-2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and prostate health index in men with a total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml and normal digital rectal examination. *Urology.* 2014;83:606–612.
151. Bratt O, Lilja H. Serum markers in prostate cancer detection. *Curr Opin Urol.* 2015;25:59–64.
152. Maragliano R, Vanoli A, Albarello L, Milione M, Basturk O, Klimstra DS, Wachtel A, Uccella S, Vicari E, Milesi M, Davi MV, Scarpa A, Sessa F, Capella C, La Rosa S. ACTH-secreting pancreatic neoplasms associated with Cushing syndrome: clinicopathologic study of 11 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:374–382.
153. Pelosof LC, Gerber DE. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2010;85:838–854.
154. Taketa K. Alpha-fetoprotein in the 1990s. *In* Serological cancer markers. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 31–46.
155. Tatarinov Y. New data on the embryo-specific antigenic components of human blood serum. *Vopr Med Khim.* 1964;10:584–588.
156. Kelsten ML, Chan DW, Bruzek DJ, Rock RC. Monitoring hepatocellular carcinoma by using a monoclonal immunoenzymometric assay for alpha-fetoprotein. *Clin Chem.* 1988;34:76–81.
157. Rich N, Singal AG. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28:843–853.
158. Milose JC, Filson CP, Weizer AZ, Hafez KS, Montgomery JS. Role of biochemical markers in testicular cancer: diagnosis, staging, and surveillance. *Open Access J Urol.* 2011;4:1–8.
159. Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi KF, Fan D, Toth C, Thomas P, Jessup JM. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:380–385.
160. Sikorska HM, Fuks A, Gold P. Carcinoembryonic antigen. *In* Serological cancer markers. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 47–97.

161. Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousova M, Holubec L, Sturgeon C. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer*. 2014;134:2513–2522.
162. Zhang Y, Yang J, Li H, Wu Y, Zhang H, Chen W. Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:11683–11691.
163. Shimada H, Noie T, Ohashi M, Oba K, Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. *Gastric Cancer*. 2014;17:26–33.
164. Hayes DF, Tondini C, Kufe DW. Clinical applications of CA 15-3. In *Serological cancer markers*. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 201–307.
165. Paoletti C, Hayes DF. Molecular testing in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2014;65:95–110.
166. Rancourt C, Matte I, Lane D, Piché A. The role of MUC16 mucin (CA125) in the pathogenesis of ovarian cancer. In *Ovarian cancer - Basic science perspective*. Farghaly S. ed. 1st ed. Intech, 2012. p 67–84.
167. Hogdall EV, Hogdall CK, Tingulstad S, Hagen B, Nustad K, Xu FJ, Bast RC, Jacobs IJ. Predictive values of serum tumour markers tetranectin, OVX1, CASA and CA125 in patients with a pelvic mass. *Int J Cancer*. 2000;89:519–523.
168. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*. 2001;276:27371–27375.
169. Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod*. 1989;4:1–12.
170. Bast RC Jr, Brewer M, Zou C, Hernandez MA, Daley M, Ozols R, Lu K, Lu Z, Badgwell D, Mills GB, Skates S, Zhang Z, Chan D, Lokshin A, Yu Y. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res*. 2007;174:91–100.
171. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, Gajewski W, Kurman R, Bast RC Jr, Skates SJ. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2009;112:40–46.
172. Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R, Fass L, Kaur J, Hu K, Shojaei H, Whelan RJ, Patankar MS. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer*. 2014;13:129.
173. Lamerz R. CA19-9: GIGA (gastrointestinal cancer antigen). In *Serological cancer markers*. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 309–339.
174. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol*. 1990;85:350–355.
175. Schlom J, Colcher D, Milenic DE, Horan Hand P, Greiner WJ, Kuroki M, Thor A, Molinolo A, Ohuchi N. TAG-72 as a tumor marker. In *Serological cancer markers*. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 387–416.
176. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*. 2004;37:529–540.
177. Gaston KE, Grossman HB. Proteomic assays for the detection of urothelial cancer. *Methods Mol Biol*. 2010;641:303–323.
178. Buccheri G, Ferrigno D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer*. 2001;34:S65–S69.
179. Oehr P, Luthgens ML, Liu Q. Tissue polypeptide antigen and specific TPA. In *Serological cancer markers*. Sell S. ed. 1st ed. Humana Press. Totowa NJ, 1992, p 193–206.
180. Pujol JL, Boher JM, Grenier J, Quantin X. Cyfra 21-1, neuron specific enolase and prognosis of non-small cell lung cancer: prospective study in 621 patients. *Lung Cancer*. 2001;31:221–231.
181. Pujol JL, Molinier O, Ebert W, Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G, Paesmans M, Quoix E, Moro-Sibilot D, Szturmowicz M, Bréchet JM, Muley T, Grenier J. Cyfra 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer*. 2004;90:2097–2105.
182. Bingle CD, Vyakarnam A. Novel innate immune functions of the whey acidic protein family. *Trends in Immunology*. 2008;29:444–453.
183. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellström KE. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:3695–3700.
184. Li J, Dowdy S, Tipton T, Podratz K, Lu WG, Xie X, Jiang SW. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9:555–566.
185. 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.

186. Boehm MK, Perkins SJ. Structural models for carcinoembryonic antigen and its complex with the single-chain Fv antibody molecule MFE23. *FEBS Letters*. 2000;475:11–16.
187. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology*. 1999;9:67–81.
188. Bouchard D. Étude des fonctions d'une protéine à motif wheyacidic protein: la HE4 humaine. MSc. diplomadolgozat. 2006;p17.
189. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, Babaian R, Bast RC Jr, Dowell B, Esteva FJ, Haglund C, Harbeck N, Hayes DF, Holten-Andersen M, Klee GG, Lamerz R, Looijenga LH, Molina R, Nielsen HJ, Rittenhouse H, Semjonow A, Shih IeM, Sibley P, Sölétormos G, Stephan C, Sokoll L, Hoffman BR, Diamandis EP; National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*. 2008;54:e11–79.
190. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, Bonfrer J, Ecke TH, Grossman HB, Hayes P, Hoffmann RT, Lerner SP, Löhe F, Louhimo J, Sawczuk I, Taketa K, Diamandis EP; National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. *Clin Chem*. 2010;56:e1–48.
191. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer (version 3.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
192. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Ovarian cancer - Including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
193. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
194. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Uterine Neoplasms__(version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
195. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer__(version 3.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
196. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers (version 3.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
197. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Rectal Cancer (version 3.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
198. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Hepatobiliary Cancers (version 2. 2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
199. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
200. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Central Nervous System Cancers (version 1.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
201. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Neuroendocrine Tumors (version 1.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
202. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma (version 3.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
203. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Bone Cancer (version 1.2016) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
204. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Small Cell Lung Cancer (version 1.2016) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
205. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Thyroid Carcinoma (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
206. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Prostate Cancer Early Detection (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
207. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Prostate Cancer (version 1.2016) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
208. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Testicular Cancer (version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
209. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Occult Primary (version 1.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
210. Jehoon L, Samuel V. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med*. 2012;32:105–112.
211. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. 2014;51:189–202.

212. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:1046–1053.
213. Woitge HW, Seibel MJ, Ziegler R. Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clin Chem.* 1996;42:1796–1804.
214. Takahashi M, Naitou K, Ohishi T, Kushida K, Miura M. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;54:219–224.
215. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocr Rev.* 1988;9:438–448.
216. Power MJ, Fottrell PF. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1991;28:287–335.
217. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J.* 1990;271:345–350.
218. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res.* 1987;2:427–436.
219. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta.* 2001;313:95–105.
220. Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem.* 2008;54:188–196.
221. Nenonen A, Cheng S, Ivaska KK, Alatalo SL, Lehtimäki T, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Vuori I, Väänänen HK, Halleen JM. Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1804–1812.
222. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Jankkila AJ, Väänänen HK. Tartrateresistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1337–1345.
223. Gerrits MI, Thijssen JH, van Rijn HJ. Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin Chem.* 1995;41:571–574.
224. Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Beltrametti P, Zucchi F, Arrigoni M, Frignani S, Abbiati G. Serum levels of pyridinium crosslinks in postmenopausal women and in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:279–284.
225. Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, Qvist P, Delmas PD. Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: the OFELY prospective study. *J Bone Miner Res.* 2002;17:826–833.
226. Peris P, Alvarez L, Vidal S, Kasper D, Leeming DJ, Monegal A, Angeles Martínez M, Pons F, Guañabens N. Biochemical response to bisphosphonate therapy in pagetic patients with skull involvement. *Calcif Tissue Int.* 2006;79:22–26.
227. Christgau S. Circadian variation in serum crosslaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clin Chem.* 2000;46:431.
228. Ju HS, Leung S, Brown B, Stringer MA, Leigh S, Scherrer C, Shepard K, Jenkins D, Knudsen J, Cannon R. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chem.* 1997;43:1570–1576.
229. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11:S2–S17.
230. Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of urinary hydroxyproline: an overview. *Chin Med J (Engl).* 2004;117:291–295.
231. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26:97–122.
232. Holzer G, Noske H, Lang T, Holzer L, Willinger U. Soluble cathepsin K: a novel marker for the prediction of nontraumatic fractures? *J Lab Clin Med.* 2005;146:13–17.
233. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6323–6331.
234. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:1–9.
235. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporos Int.* 2012;23:1199–1212.

236. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. 2005;8:739–750.
237. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The role of the Wnt signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349:2483–2494.
238. Veverka V, Henry AJ, Slocombe PM, Ventom A, Mulloy B, Muskett FW, Muzylak M, Greenslade K, Moore A, Zhang L, Gong J, Qian X, Paszty C, Taylor RJ, Robinson MK, Carr MD. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: Molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem*. 2009;284:10890–10900.
239. van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PC, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, Van Hul W, Hamersma H, Dikkers FG, Hamdy NA, Papapoulos SE, L6wik CW. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res*. 2009;88:569–574.
240. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*. 2008;23:860–869.
241. Jinhu X, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2012;27:499–505.
242. Kirmani S, Amin S, McCready LK, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, M6ller R, Khosla S. Sclerostin levels during growth in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:248–255.
243. M6dder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd, Khosla S. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res*. 2011;26:373–379.
244. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2011;26:2812–2822.
245. Kuipers AL, Zhang Y, Yu S, Kammerer CM, Nestlerode CS, Chu Y, Bunker CH, Patrick AL, Wheeler VW, Miljkovic I, Zmuda JM. Relative influence of heritability, environment and genetics on serum sclerostin. *Osteoporos Int*. 2014;25:905–912.
246. Durosier C, van Lierop A, Ferrari S, Chevalley T, Papapoulos S, Rizzoli R. Association of circulating sclerostin with bone mineral mass, microstructure, and turnover biochemical markers in healthy elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:3873–3883.
247. Costa AG, Cremers S, Dworakowski E, Lazaretti-Castro M, Bilezikian JP. Comparison of two commercially available ELISAs for circulating sclerostin. *Osteoporos Int*. 2014;25:1547–1554.
248. Arasu A, Cawthon PM, Lui LY, Do TP, Arora PS, Cauley JA, Ensrud KE, Cummings SR. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Serum sclerostin and risk of hip fracture in older Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:2027–2032.
249. Ardawi MS, Rouzi AA, Al-Sibiani SA, Al-Senani NS, Qari MH, Mousa SA. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. The CEOR study. *J Bone Miner Res*. 2012;27:3691–3699.
250. Szulc P, Bertholon C, Borel O, Marchand F, Chapurlat R. Lower fracture risk in older men with higher sclerostin concentration: a prospective analysis from the MINOS study. *J Bone Miner Res*. 2013;28:855–864.
251. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, Ceccarelli E, Ruvio M, Pietrini MG, Capodarca C, Franci MB, Campagna MS, Calabr6 A, Cataldo D, Stolakis K, Dotta F, Nuti R. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:1737–1744.
252. Yamamoto M, Yamauchi M, Sugimoto T. Elevated sclerostin levels are associated with vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:4030–4037.
253. M6dder UI, Clowes JA, Hoey K, Peterson JM, McCready L, Oursler MJ, Riggs BL, Khosla S. Regulation of circulating sclerostin levels by sex steroids in women and in men. *J Bone Miner Res*. 2011;26:373–379.
254. Chung YE, Lee SH, Lee SY, Kim SY, Kim HH, Mirza FS, Lee SK, Lorenzo JA, Kim GS, Koh JM. Long-term treatment with raloxifene, but not bisphosphonates, reduces circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2012;23:1235–1243.
255. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*. 2005;280:26770–26775.
256. Yu EW, Kumbhani R, Siwila-Sackman E, Leder BZ. Acute decline in serum sclerostin in response to PTH infusion in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E1848–E1851.
257. Norman A W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008;88:491S–499S.

258. Bendik I, Friedel A, Roos FF, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. *Front Physiol.* 2014;5:248.
259. Holick MF. Photobiology of Vitamin D. *In* Vitamin D. Feldman D, Pike JW, Adams JS. eds. 3rd ed. Elsevier, London, 2011, p 13–22.
260. Collins ED, Norman AW. Vitamin D. *In* Handbook of Vitamins. Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ. eds. 1st ed. Marcel Dekker, New York, 2001, p 51–113.
261. Lehmann B, Genehr T, Knuschke P, Pietzsch J, Meurer M. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in an in vitro human skin equivalent model. *J Invest Dermatol.* 2001;117:1179–1185.
262. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266–281.
263. Wahl DA, Cooper C, Ebeling PR, Eggersdorfer M, Hilger J, Hoffmann K, Josse R, Kanis JA, Mithal A, Pierroz DD, Stenmark J, Stöcklin E, Dawson-Hughes B. A global representation of vitamin D status in healthy populations. *Arch Osteoporos.* 2012;7:155–172.
264. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, Pierroz DD, Weber P, Hoffmann K. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr.* 2014;111:23–45.
265. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, Wong JB, Egli A, Kiel DP, Henschkowski J. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2009;339:b3692.
266. Tieland M, Brouwer-Brolsma EM, Nienaber-Rousseau C, Van Loon LJ, De Groot LC. Low vitamin D status is associated with reduced muscle mass and impaired physical performance in frail elderly people. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:1050–1055.
267. Hirani V. Associations between vitamin D and self-reported respiratory disease in older people from a nationally representative population survey. *J Am Geriatr Soc.* 2013;61:969–973.
268. Huaman MA, Sterling TR, Shepherd BE, Fiske CT. 25-Hydroxyvitamin D levels after recovery from tuberculosis: insights into pathogenesis. *Tuberculosis.* 2014;94:51–54.
269. Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan S. The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:427–432.
270. Dong JY, Zhang WG, Chen JJ, Zhang ZL, Han SF, Qin LQ. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients.* 2013;5:3551–3562.
271. Cheng TY, Lacroix AZ, Beresford SA, Goodman GE, Thornquist MD, Zheng Y, Chlebowski RT, Ho GY, Neuhaus ML. Vitamin D intake and lung cancer risk in the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:1002–1011.
272. Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523:107–114.
273. Schrotten NF, Ruifrok WP, Kleijn L, Dokter MM, Silljé HH, Lambers Heerspink HJ, Bakker SJ, Kema IP, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Hillege HL, de Boer RA. Short-term vitamin D₃ supplementation lowers plasma renin activity in patients with stable chronic heart failure: an open-label, blinded end point, randomized prospective trial (VitD-CHF trial). *Am Heart J.* 2013;166:357–364.
274. Karakas M, Thorand B, Zierer A, Huth C, Meisinger C, Roden M, Rottbauer W, Peters A, Koenig W, Herder C. Low levels of serum 25-hydroxyvitamin D are associated with increased risk of myocardial infarction, especially in women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:272–280.
275. Tsur A, Feldman BS, Feldhammer I, Hoshen MB, Leibowitz G, Balicer RD. Decreased serum concentrations of 25-hydroxycholecalciferol are associated with increased risk of progression to impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36:1361–1367.
276. Bouillon R, Carmeliet G, Lieben L, Watanabe M, Perino A, Auwerx J, Schoonjans K, Verstuyf A. Vitamin D and energy homeostasis - Of mice and men. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:79–87.
277. Zhao Y, Sun Y, Ji HF, Shen L. Vitamin D levels in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a meta-analysis. *Nutrition.* 2013;29:828–832.
278. Eyles DW, Burne THJ, McGrath JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol.* 2013;34:47–64.
279. Yin K, Agrawal D.K. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res.* 2014;7:69–87.
280. White AN, Ng V, Spain CV, Johnson CC, Kinlin LM, Fisman DN. Let the sun shine in: effects of ultraviolet radiation on invasive pneumococcal disease risk in Philadelphia, Pennsylvania. *BMC Infect Dis.* 2009;9:196.
281. Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadornova Y, Binion DG, Issa M. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011;35:308–316.

282. Satirapoj B, Limwannata P, Chaiprasert A, Supasynhd O, Choovichian P. Vitamin D insufficiency and deficiency with stages of chronic kidney disease in an Asian population. *BMC Nephrol.* 2013;14:206.
283. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med.* 2004;229:1136–1142.
284. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol.* 2013;40:265–272.
285. Carlberg C, Seuter S, de Mello VD, Schwab U, Voutilainen S, Pulkki K, Nurmi T, Virtanen J, Tuomainen TP, Uusitupa M. Primary vitamin d target genes allow a categorization of possible benefits of vitamin D₃ supplementation. *PLoS One.* 2013;8:e71042.
286. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:6800–6805.
287. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:4443–4451.
288. Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K. Oral administration of an active form of vitamin D₃ (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2495–2503.
289. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183:5458–5467.
290. Wöbke TK, Sorg BL, Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol.* 2014;5:244.
291. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J. Immunol.* 2012;188:2127–2135.
292. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 202;3:221–227.
293. Duque J, Fresno M, Iniguez MA. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2005;280:8686–8693.
294. Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10:645–656.
295. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:7917–7925.
296. Kim CS, Joo SY, Lee KE, Choi JS, Bae EH, Ma SK, Kim SH, Lee J, Kim SW. Paricalcitol attenuates 4-hydroxy-2-hexenal-induced inflammation and epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *PLoS One.* 2013;8:e63186.
297. Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol.* 2011;31:3653–3669.
298. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Clin Invest.* 1984;74:1451–1455.
299. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA, Roberts AB. TGF-beta and vitamin D₃ utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83⁺ dendritic cells. *J Immunol.* 2005;174:2061–2070.
300. Bauer D, Krege J, Lane N, Leary E, Libanati C, Miller P, Myers G, Silverman S, Vesper HW, Lee D, Payette M, Randall S. National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporos Int.* 2012;23:2425–2433.
301. Johansson H, Odén A, Kanis JA, McCloskey EV, Morris HA, Cooper C, Vasikaran S. A meta-analysis of reference markers of bone turnover for prediction of fracture. *Calcif Tissue Int.* 2014;94:560–567.
302. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, McClung M, Morris HA, Silverman S, Trenti T, Wahl DA, Cooper C, Kanis JA. IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22:391–420.

303. Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1994;9:1137–1141.
304. Lane NE, Lukert B. The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. *Endocrinol Metab. Clin North Am.* 1998;27:465–483.
305. Dufour DR. Liver Disease. In Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Carl AB, Edward RA, David EB. eds. 5th ed. Elsevier, St Louis, 2012, p 1637–1693.
306. Propst A, Propst T, Zangerl G, Ofner D, Judmaier G, Vogel W. Prognosis and life expectancy in chronic liver disease. *Dig Dis Sci.* 1995;40:1805–1815.
307. Freeman RB Jr, Wiesner RH, Roberts JP, McDiarmid S, Dykstra DM, Merion RM. Improving liver allocation: MELD and PELD. *Am J Transplant.* 2004;4:114–131.
308. Mattei PL, Corey KC, Kimball AB. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28:333–337.
309. Ceccarelli F, Perricone C, Massaro L, Cipriano E, Alessandri C, Spinelli FR, Valesini G, Conti F. Assessment of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus: Lights and shadows. *Autoimmun Rev.* 2015;14:601–608.
310. Hudson M, Steele R. Canadian Scleroderma Research Group (CSRG), Baron M. Update on indices of disease activity in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;37:93–98.
311. Navarro-Compán V, Gherghe AM, Smolen JS, Aletaha D, Landewé R, van der Heijde D. Relationship between disease activity indices and their individual components and radiographic progression in RA: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54:994–1007.
312. Salluh JI, Soares M. ICU severity of illness scores: APACHE, SAPS and MPM. *Curr Opin Crit Care.* 2014;20:557–565.
313. Karvellas CJ, Bagshaw SM. Advances in management and prognostication in critically ill cirrhotic patients. *Curr Opin Crit Care.* 2014;20:210–217.
314. Babaian RJ, Fritsche HA, Zhang Z, Zhang KH, Madyastha KR, Barnhill D. Evaluation of ProstASURE Index in the Detection of Prostate Cancer: a Preliminary Report. *Urology.* 1998;51:132–136.
315. <http://www.ova-1.com/physicians/how-ova1-works>
316. Ando S, Kimura H, Iwai N, Shima M, Ando M, Kuriyama T. Optimal combination of seven tumour markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2001;21:3085–3092.
317. Dowling P, Clarke C, Hennessy K, Torralbo-Lopez B, Ballot J, Crown J, Kiernan I, O'Byrne KJ, Kennedy MJ, Lynch V, Clynes M. Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. *Int J Cancer.* 2012;131:911–923.
318. Mrazova V, Mocak J, Varmusova E, Kavkova D, Bednarova A. Use of multidimensional data analysis for prediction of lung malignity. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;50:210–215.
319. Lee HJ, Kim YT, Park PJ, Shin YS, Kang KN, Kim Y, Kim CW. A novel detection method of non-small cell lung cancer using multiplexed bead-based serum biomarker profiling. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143:421–427.
320. Farlow EC, Vercillo MS, Coon JS, Basu S, Kim AW, Faber LP, Warren WH, Bonomi P, Liptay MJ, Borgia JA. A multi-analyte serum test for the detection of non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2010;103:1221–1228.
321. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, Jeong J, Wu J, Langone KC, Watson D. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem.* 2007;53:1084–1091.
322. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernardis R, Wessels LF, Van't Veer LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics.* 2006;7:278.
323. Bloom G, Yang IV, Boulware D, Kwong KY, Coppola D, Eschrich S, Quackenbush J, Yeatman TJ. Multi-platform, multi-site, microarray-based human tumor classification. *Am J Pathol.* 2004;164:9–16.
324. Pathwork diagnostics. The pathwork tissue of origin laboratory developed test. <http://www.pathworkdx.com/TissueoforiginTest/>
325. Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmás P. Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem.* 2007;14:519–530.
326. Drexler HG, Quentmeier H. FLT3: receptor and ligand. *Growth Factors.* 2004;22:71–73.
327. Rosnet O, Schiff C, Pébusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood.* 1993;82:1110–1119.

328. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, Civinn CI. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:459–463.
329. Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Avvisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia*. 2002;16:2185–2189.
330. Carow CE, Kim E, Hawkins AL, Webb HD, Griffin CA, Jabs EW, Civin CI, Small D. Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;70:255–257.
331. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol*. 2001;113:1076–1077.
332. Berenstein R. Class III receptor tyrosine kinases in acute leukemia - Biological functions and modern laboratory analysis. *Biomark Insights*. 2015;10:1–14.
333. Annesley CE, Brown P. The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia. *Front Oncol*. 2014;4:263.
334. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, Birnbaum D, Dubreuil P. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1993;8:909–918.
335. Brazel CY, Ducceschi MH, Pytowski B, Levison SW. The FLT3 tyrosine kinase receptor inhibits neural stem/progenitor cell proliferation and collaborates with NGF to promote neuronal survival. *Mol Cell Neurosci*. 2001;18:381–393.
336. Mitton KP, Swain PK, Khanna H, Dowd M, Apel IJ, Swaroop A. Interaction of retinal bZIP transcription factor NRL with Flt3-interacting zinc-finger protein Fiz1: possible role of Fiz1 as a transcriptional repressor. *Hum Mol Genet*. 2003;12:365–373.
337. Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev*. 2003;17:241–248.
338. Litzow MR. More flitting about FLT3. *Blood*. 2005;106:3331–3332.
339. Naoe T, Kiyoi H. Normal and oncogenic FLT3. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:2932–2938.
340. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1911–1918.
341. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326–4335.
342. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100:59–66.
343. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol*. 2004;112:68–78.
344. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113:983–988.
345. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97:2434–2439.
346. Schmidt-Arras D, Schwäble J, Böhmer FD, Serve H. Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1867–1883.
347. Zheng R, Small D. Mutant FLT3 signaling contributes to a block in myeloid differentiation. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:1679–1687.
348. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107:3700–3707.
349. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;124:481–484.

350. Choudhary C, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int J Hematol.* 2005;82:93–99.
351. Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Böhmer FD, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood.* 2003;101:3164–3173.
352. Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M, Small D. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood.* 2005;105:1759–1767.
353. Chan PM. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. *Protein Cell.* 2011;2:108–115.
354. Ferrara F, Palmieri S, Mele G. Prognostic factors and therapeutic options for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2004;89:998–1008.
355. Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol.* 2005;12:68–75.
356. Kang HJ, Hong SH, Kim IH, Park BK, Han KS, Cho HI, Shin HY, Ahn HS. Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2005;29:617–623.
357. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001;61:7233–7239.
358. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006;107:3724–3726.
359. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2013;88:318–327.
360. Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, Neumann A, Pouryamout L. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol.* 2014;93:1279–1286.
361. Au WY, Fung AT, Ma ES, Liang RH, Kwong YL. Low frequency of FLT3 gene internal tandem duplication and activating loop mutation in therapy-related acute myelocyticleukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;149:169–172.
362. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1980; 92:44–47.
363. Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. 2004;13:829–837.
364. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292:344–347.
365. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292:403–407.
366. Carey E, Carey WD. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete?, *Cleve. Clin. J. Med.* 2010;77:519–527.
367. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact.* 2010;184:16–20.
368. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999;111:507–513.
369. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 2007;43:25–30.
370. Evidence Investigator. Multiplexing. Proven, Perfected, Evolved. The first biochip analyser for protein and molecular arrays. Randox LT107, 2014; <http://pdf.medicaexpo.com/pdf/randox-laboratories/lt107-evidence-investigator/69798-147318.html>
371. Czirják L. (Szerkesztő) *Klinikai Immunológia. 2. kiadás. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006. p 139-155, 178-191, 562-565.*
372. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:S118–S127.
373. Leung DY, Jain N, Leo HL. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:634–638.

374. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2015. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00149-X.
375. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Aller Clin Immunol*. 2003;112:252–262.
376. Miyagaki T, Sugaya M. Recent advances in atopic dermatitis and psoriasis: genetic background, barrier function, and therapeutic targets. *J Dermatol Sci*. 2015;78:89–94.
377. Galli E, Cicconi R, Rossi P, Casati A, Brunetti E, Mancino G. Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr Mol Med*. 2003;3:127–138.
378. Biedermann T. Dissecting the role of infections in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2006;86:99–109.
379. Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Aller Clin Immunol*. 2001;108:269–274.
380. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2002;347:1151–1160.
381. Dalakas MC. Mechanisms of disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:219–227.
382. Pagnini I, Vitale A, Selmi C, Cimaz R, Cantarini L. Idiopathic inflammatory myopathies: An update on classification and treatment with special focus on juvenile forms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015;1-11 doi: 10.1007/s12016-015-8512-9.
383. Grundtman C, Malmstrom V, Lundberg IE. Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:208.
384. Haq SA, Tournadre A. Idiopathic inflammatory myopathies: from immunopathogenesis to new therapeutic targets. *Int J Rheum Dis*. 2015 doi: 10.1111/1756-185X.12736.
385. Barsotti S, Terenzi R, La Paglia GM, Bellucci E, Baldini C, Neri R. One year in review 2015: idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:593–601.
386. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:979–987;
387. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells*. 2007;23:1–10.
388. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004;16:23–26.
389. Szanto A, Szodoray P, Kiss E, Kapitany A, Szegedi G, Zeher M. Clinical, serologic, and genetic profiles of patients with associated Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2006;67:924–930.
390. Kawai M, Szegedi G. Immune complex clearance by monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2007;6:497–502.
391. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11:329–341.
392. Mirabelli G, Cannarile F, Bruni C, Vagelli R, De Luca R, Carli L. One year in review 2015: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:414–425.
393. Parker BJ, Bruce IN. High dose methylprednisolone therapy for the treatment of severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16:387–393.
394. Strauss E. The impact of bacterial infections on survival of patients with decompensated cirrhosis. *Ann Hepatol*. 2014;13:7–19.
395. Sipeki N, Antal-Szalmás P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20:2564–2577.
396. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, Gustot T, Bernardi M, Canton R, Albillos A, Lammert F, Wilmer A, Mookerjee R, Vila J, Garcia-Martinez R, Wendon J, Such J, Cordoba J, Sanyal A, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Burroughs A, Ginès P. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol*. 2014;60:1310–1324.
397. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, et al. The Global Burden of Cancer - 2013. *JAMA Oncol*. 2015;1:505–527.
398. Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M; U.S. Preventive Services Task Force. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004;140:740–753.
399. Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, Karkavitsas N, Siafakas NM. Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 2002;69:25–29.
400. Molina R, Marrades RM, Augé JM, Escudero JM, Viñolas N, Reguart N, Ramirez J, Filella X, Molins L, Agustí A. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015. DOI: 10.1164/rccm.201404-0603OC

401. Bourzac K. Early warning system. The costs of lung-cancer screening overshadow the benefits of swift diagnosis — but ingenious technologies could help. *Nature*. 2014;513:S4–S6.
402. Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R, Lin SJ, Koch AE. Increased synovial expression of the adhesion molecules CD66a, CD66b and CD31 in rheumatoid and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;76:180–186.
403. Torsteinsdóttir I, Arvidson NG, Hällgren R, Håkansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol*. 1999;50:433–439.
404. Lefevre S, Meier FM, Neumann E, Muller-Ladner U. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2015;1:130–141.
405. Shimomura C, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Nakao H, Otsubo T, Ueki Y, Tezuka H, Yamashita S, Matsunaga M, et al. Elevation of tumor associated antigen CA 19-9 levels in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 1989;16:1410–1415.
406. Kimura K, Ezoe K, Yokozeki H, Katayama I, Nishioka K. Elevated serum CA125 in progressive systemic sclerosis with pleural effusion. *J Dermatol*. 1995;22:28–31.
407. Valerio Marzano A, Morabito A, Berti E, Caputo R. Elevated circulating CA 15.3 levels in a subset of systemic sclerosis with severe lung involvement. *Arch Dermatol*. 1998;134:645–652.
408. Takeda N, Ihn H, Teramoto S. Markedly increased levels of IL-6 and CA125 in pleural fluids of an elderly person with overlap syndrome of systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Age Ageing*. 2001;30:171–179.
409. Safadi R, Ligumsky M, Goldin E, Ilan Y, Haviv YS, Nusair S. Increased serum CA 19-9 antibodies in Sjögren's syndrome. *Postgrad Med J*. 1998;74:543–544.
410. Bhattoa HP, Bettembuk P, Ganacharya S, Balogh A. Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal Hungarian women. *Osteoporos Int*. 2004;15: 447–451.
411. Bruyere O, De Cock C, Mottet C, Neuprez A, Malaise O, Reginster JY. Low dietary calcium in European postmenopausal osteoporotic women. *Public Health Nutr*. 2009;12:111–114.
412. Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone*. 2014;66:46–55.
413. Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun*. 2005;73:7613–7619.
414. Wittebole X, Coyle SM, Kumar A, Goshima M, Lowry SF, Calvano SE. Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leukocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol*. 2005;141:99–106.
415. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, Seki S, Hiraide H, Moldawer LL, Mochizuki H. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock*. 2005;23:39–44.
416. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of Toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*. 2004;22:403–409.
417. Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, Buurman WA, van Deutekom H, Speelman P, Van der Poll T. Serum concentrations of lipopolysaccharide activity-modulating proteins during tuberculosis. *J Infect Dis*. 1998;178:1839–1842.
418. Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, Leturcq DJ, Moriarty AM, Raghu G, Baughman RP, Hudson LD. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:937–944.
419. Rodeberg DA, Morris RE, Babcock GF. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. *Infect Immun*. 1997;65:4747–4753.
420. Scherberich JE, Nockher WA. CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and sCD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37:209–213.
421. Nupponen I, Repo H, Kari A, Pohjavuori M, Andersson S. Early dexamethasone decreases expression of activation markers on neutrophils and monocytes in preterm infants. *Acta Paediatr*. 2002;91:1200–1207.
422. Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Döcke WD, Volk HD, Konertz W, Kox WJ. Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*. 2001;29:2137–2142.

423. Landmann R, Schaub B, Link S, Wacker HR. Unaltered monocyte function in patients with major depression before and after three months of antidepressive therapy. *Biol Psychiatry*. 1997;41:675–681.
424. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14⁺CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*. 1998;112:501–506.
425. Pedron T, Girard R, Chaby R. Variation of LPS-binding capacity, epitope expression, and shedding of membrane-bound CD14 during differentiation of human monocytes. *J Immunol*. 1995;155:1460–1471.
426. Jarvis BW, Qureshi N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced transcription factor Sp1 binding by spectrally pure diphosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides*, protein kinase inhibitor H-8, and dexamethasone. *Infect Immun*. 1997;65:1640–1643.
427. Katsiari CG, Liossis SN, Souliotis VL, Dimopoulos AM, Manoussakis MN, Sfrikakis PP. Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2002;103:54–62.
428. Sipka S, Szanto S, Szucs K, Kovacs I, Kiss E, Antal-Szalmas P, Lakos G, Aleksza M, Illes A, Gergely P, Szegedi G. Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001;28:2012–2017.
429. Sipka S, Szucs K, Szanto S, Kovacs I, Lakos G, Kiss E, Antal-Szalmas P, Szegedi G, Gergely P. Glucocorticosteroid dependent decrease in the activity of calcineurin in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:380–384.
430. Schiff DE, Kline L, Soldau K, Lee JD, Pugin J, Tobias PS, Ulevitch RJ. Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*. 1997;62:786–794.
431. Bender E. The dominant malignancy: lung cancer is the leading cause of cancer mortality. *Nature*. 2014;513:S2–S3.
432. Watson T. Breathing trouble Large-scale studies are confirming suspicions that air pollution significantly increases the risk of lung cancer. *Nature*. 2014;513:S14–S15.
433. John KF. The screening imperative Lung cancer kills more people than any other malignancy. Let's not delay in implementing a screening programme. *Nature*. 2014;513:S7.
434. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011;365:395–409.
435. Volk RJ, Hawk E, Bevers TB. Should CMS cover lung cancer screening for the fully informed patient? *JAMA*. 2014;312:1193–1194.
436. David F. Yankelevitz. Should lung cancer screening by chest CT scan be a covered benefit? Yes. *Chest*. 2015;147:287–289.
437. Sox HC. Implementing lung cancer screening under Medicare: the last chance to get it right? *JAMA*. 2014;312:1206–1207.
438. Doseeva V, Colpitts T, Gao G, Woodcock J, Knezevic V. Performance of a multiplexed dual analyte immunoassay for the early detection of non-small cell lung cancer. *J Transl Med*. 2015;13:1–15.
439. Ostroff RM, Bigbee WL, Franklin W, Gold L, Mehan M, Miller YE, Pass HI, Rom WN, Siegfried JM, Stewart A, Walker JJ, Weissfeld JL, Williams S, Zichi D, Brody EN. Unlocking biomarker discovery: large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer. *PLoS One*. 2010;5:e15003.
440. Jett JR, Peek LJ, Fredericks L, Jewell W, Pingleton WW, Robertson JF. Audit of the autoantibody test, EarlyCDT®-lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice. *Lung Cancer*. 2014;83:51–55.
441. Deweerdt S. Crucial clues. Studies in never-smokers have revealed key lung-cancer mutations — but the cause of the disease is still a mystery. *Nature*. 2014;513:S12–S13.
442. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015;19:A68–A77.
443. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489:519–525.
444. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511:543–550.
445. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS, Marass F, Humphray S, Hadfield J, Bentley D, Chin TM, Brenton JD, Caldas C, Rosenfeld N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013;497:108–112.
446. Runyon BA. Ascitic fluid and serum C-reactive protein concentrations in patients with and without peritonitis. *Am J Clin Pathol*. 1986;86:773–775.
447. Bota DP, Van Nuffelen M, Zakariah AN, Vincent JL. Serum levels of C-reactive protein and procalcitonin in critically ill patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med*. 2005;146:347–351.

448. Tsiakalos A, Karatzaferis A, Ziakas P, Hatzis G. Acute-phase proteins as indicators of bacterial infection in patients with cirrhosis. *Liver Int.* 2009;29:1538–1542.
449. Elefsiniotis IS, Skounakis M, Vezali E, Pantazis KD, Petrocheilou A, Pirounaki M, Papatsibas G, Kontou-Kastellanou C, Moulakakis A. Clinical significance of serum procalcitonin levels in patients with acute or chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:525–530.
450. Viallon A, Zeni F, Pouzet V, Lambert C, Quenet S, Aubert G, Guyomarch S, Tardy B, Bertrand JC. Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines. *Intensive Care Med.* 2000;26:1082–1088.
451. Lin ZY, Chuang WL, Dai CY, Yu ML, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY. Clinical application of serum C-reactive protein measurement in the detection of bacterial infection in patients with liver cirrhosis. *Kaohsiung J Med Sci.* 2002;18:121–126.
452. Li CH, Yang RB, Pang JH, Chang SS, Lin CC, Chen CH, Chen HY, Chiu TF. Procalcitonin as a biomarker for bacterial infections in patients with liver cirrhosis in the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2011;18:121–126.
453. Connert S, Stremmel W, Elsing C. Procalcitonin is a valid marker of infection in decompensated cirrhosis. *Z. Gastroenterol.* 2003;41:165–170.
454. Spahr L, Morard I, Hadengue A, Vadas L, Pugin J. Procalcitonin is not an accurate marker of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 2001;48:502–505.
455. Márquez M, Fernández-Gutiérrez C, Montes-de-Oca M, Blanco MJ, Brun F, Rodríguez-Ramos C, Girón-González JA. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2009;158:219–229.
456. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, Boccia S, Colloredo-Mels G, Corigliano P, Fornaciari G, Marengo G, Pistrà R, Salvagnini M, Sangiovanni A. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis.* 2001;33:41–48.
457. De Palma GD, Rega M, Masone S, Persico F, Siciliano S, Patrone F, Matantuono L, Persico G. Mucosal abnormalities of the small bowel in patients with cirrhosis and portal hypertension: a capsule endoscopy study. *Gastrointest Endosc.* 2005;62:529–534.
458. Bhonchal S, Nain CK, Prasad KK, Nada R, Sharma AK, Sinha SK, Singh K. Functional and morphological alterations in small intestine mucosa of chronic alcoholics. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:e43–e48.
459. Nolan JP, DeLissio MG, Camara DS, Feind DM, Gagliardi NC. IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet.* 1986;1:176–179.
460. Kreisel W, Siegel A, Bahler A, Spamer C, Schiltz E, Kist M, Seilnacht G, Klein R, Berg PA, Heilmann C. High prevalence of antibodies to calreticulin of the IgA class in primary biliary cirrhosis: a possible role of gut-derived bacterial antigens in its aetiology? *Scand J Gastroenterol.* 1999;34:623–628.
461. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* 2012;33:160–167.
462. Pelletier G, Briantais MJ, Buffet C, Pillot J, Etienne JP. Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gut.* 1982;23:475–480.
463. Osman AA, Richter T, Stern M, Mothes T. The IgA subclass distributions of endomysium and gliadin antibodies in human sera are different. *Clin Chim Acta.* 1996;255:145–152.
464. Colombel JF, Mascart-Lemone F, Nemeth J, Vaerman JP, Dive C, Rambaud JC. Jejunal immunoglobulin and antigliadin antibody secretion in adult coeliac disease. *Gut.* 1990;31:1345–1349.
465. Koga M, Yuki N, Hirata K. Subclass distribution and the secretory component of serum IgA anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neuroimmunol.* 1999;96:245–250.
466. Savige J, Nassis L, Cooper T, Paspaliaris B, Martinello P, MacGregor D. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis after immunisation with bacterial proteins. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20:783–789.
467. Hannon WH, Atkinson MA, Ball DJ, Lorenz RG, Matsson PNJ, Moore DM, Whitley RJ. Assessing the quality of immunoassay systems: radioimmunoassays and enzyme, fluorescence, and luminescence immunoassays; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute guideline I/LA23-A. 2004;24:1–35.
468. Lightfoote MM, Ball DJ, Hannon WH, Ridderhof JC, Vogt RF, Jr. Clinical evaluation of immunoassays; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute guideline I/LA21-A2. 2008;24:1–54.
469. Krouwer JS, Cembrowski GS, Tholen DS. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute guideline EP10-A3. 2014;24:1–52.

470. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, Bowen RA, Church S, Delanghe J, Grankvist K, Kitchen S, Nybo M, Nauck M, Nikolac N, Palicka V, Plebani M, Sandberg S, Simundic AM. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:229–241.
471. Lippi G, Banfi G, Church S, Cornes M, De Carli G, Grankvist K, Kristensen GB, Ibarz M, Panteghini M, Plebani M, Nybo M, Smellie S, Zaninotto M, Simundic AM. European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group for Preanalytical Phase. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:357–370.
472. <http://shop.clsi.org/general-lab-documents/>
473. O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, Edwards M, Jeromin A, Lista S, Bazenet C, Soares H, Lovestone S, Hampel H, Montine T, Blennow K, Foroud T, Carrillo M, Graff-Radford N, Laske C, Breteler M, Shaw L, Trojanowski JQ, Schupf N, Rissman RA, Fagan AM, Oberoi P, Umek R, Weiner MW, Grammas P, Posner H, Martins R. STAR-B and BBBIG working groups. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement*. 2015;11:549–560.
474. Pineda-Tenor D, Laserna-Mendieta EJ, Timón-Zapata J, Rodelgo-Jiménez L, Ramos-Corral R, Recio-Montealegre A, Reus MG. Biological variation and reference change values of common clinical chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:851–862.
475. Clerico A, Carlo Zucchelli G, Pilo A, Passino C, Emdin M. Clinical relevance of biological variation: the lesson of brain natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP assay. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:366–378.
476. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem*. 2011;57:1534–1544.
477. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC Jr, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206:349e1–e7.
478. Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:389–395.
479. Cantagrel A, Moulinier L, Beljio K, Duffaut M, Laroche M, Bon E, Mazières B. Increase of CA 19.9 in dysimmune inflammatory rheumatism. Apropos of 6 cases. *Rev Rhum Ed Fr*. 1994;61:599–606.
480. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155:27–38.
481. Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet*. 2013;14:415–426.
482. Kai-Oliver M, Alexandra H, Maren L, Johanna-Gabriela W, Frank S. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013;24:22–30.
483. Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, Kellner R, Kubicek M, Lottspeich F, Maser E, Mewes HW, Meyer HE, Müllner S, Mutter W, Neumaier M, Nollau P, Nothwang HG, Ponten F, Radbruch A, Reinert K, Rothe G, Stockinger H, Tarnok A, Taussig MJ, Thiel A, Thierry J, Ueffing M, Valet G, Vandekerckhove J, Verhuven W, Wagener C, Wagner O, Schmitz G. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:724–744.
484. Brody EN, Gold L, Lawn RM, Walker JJ, Zichi D. High-content affinity-based proteomics: unlocking protein biomarker discovery. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10:1013–1022.
485. Trifonova O, Lokhov P, Archakov A. Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling. *OMICS*. 2013;17:550–559.
486. Kanter I, Kalisky T. Single cell transcriptomics: methods and applications. *Front Oncol*. 2015;5:53.
487. Kobeissy FH, Gulbakan B, Alawieh A, Karam P, Zhang Z, Guingab-Cagmat JD, Mondello S, Tan W, Anagli J, Wang K. Post-genomics nanotechnology is gaining momentum: nanoproteomics and applications in life sciences. *OMICS*. 2014;18:111–131.
488. Gong CS, Lei KF. Advances in miniaturized instruments for genomics. *Biomed Res Int*. 2014;2014:734675.
489. Brian TL, Jack RC. A Comparison of biomarker and fingerprint-Based classifiers of disease. In *Biomarker*. Khan TK. ed. 1st ed. Intech, Rijeka, 2012, p 179–200.
490. Juho R, Daniel DA, Olugbemiro S, John ST, Delmiro FR. Biomarker discovery by sparse canonical correlation analysis of complex clinical phenotypes of tuberculosis and malaria. *PLOS Computational Biology*. 2013;9:1–10.

491. Swan AL, Mobasher A, Allaway D, Liddell S, Bacardit J. Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. *OMICS*. 2013;17:595–610.
492. Stricker S. The era of personalized medicine in oncology: novel biomarkers ushering in new approaches to cancer therapy. *Am Health Drug Benefits*. 2011;4:387–388.
493. Heger NE, Kellogg MD. Personalized therapeutics and companion diagnostics: a new paradigm in testing and treatment. *Clin Chem*. 2014;60:795–796.
494. Emily AS, Cristina PR. Genomic medicine and targeted therapy for solid tumors. *Journal of Surgical Oncology*. 2015;111:38–42.
495. Hasan N, Kumar R, Kavuru MS. Lung cancer screening beyond low-dose computed tomography: the role of novel biomarkers. *Lung*. 2014;192:639–648.
496. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer*. 2007;6:25.
497. Dugeswar K, Deepesh G, Archana T. Biomarker for cancer: a great promise for future. *World J Oncol*. 2011;2:151–157.
498. Schmidt C. Challenges ahead for companion diagnostics. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104:14–15.
499. Reinke T. Targeted medications. New focus on companion tests. *Manag Care*. 2012;21:35–38.

11.2. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1., **P. Antal-Szalmás:** Evaluation of CD14 in host defense.
European Journal of Clinical Investigation, 2000;30:167-179. IF: 2,071
- 2., **P. Antal-Szalmás**, I. Szöllősi, G. Lakos, E. Kiss, I. Csipő, A. Sümegi, S. Sipka, JAG. van Strijp, KPM. van Kessel, Gy. Szegedi: A novel flow cytometric assay to quantify soluble CD14 concentration in human serum.
Cytometry, 2001;45:115-123. IF: 2,220
- 3., A. Sümegi*, **P. Antal-Szalmás***, M. Aleksza, I. Kovács, S. Sipka, M. Zeher, E. Kiss, Gy. Szegedi: Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from Systemic Lupus Erythematosus. (*megosztott elsőszerezős közlemény)
Clinical Immunology, 2005;117:271-279. IF: 3,217
- 4., E. Szekanecz, C. Andras, Z. Sandor, **P. Antal-Szalmás**, J. Szanto, L. Tamasi, E. Kiss, Z. Szekanecz: Malignancies and soluble tumor antigens in rheumatic diseases.
Autoimmunity Reviews, 2006;6:42-47. IF: 3,760
- 5., E. Szekanecz, Z. Sándor, **P. Antal-Szalmás**, L. Soós, G. Lakos, T. Besenyey, A. Szentpétery, E. Simkovics, J. Szántó, E. Kiss, AE. Koch, Z. Szekanecz: Increased production of the soluble tumor-associated antigens CA19-9, CA125, and CA15-3 in rheumatoid arthritis: potential adhesion molecules in synovial inflammation?
Annals of The New York Academy of Sciences, 2007;1108:359–371. IF: 1,731
- 6., A. Sümegi, A. Szegedi, M. Gál, J. Hunyadi, Gy. Szegedi, **P. Antal-Szalmás:** Analysis of components of the CD14/TLR system on leukocytes of patients with atopic dermatitis.
International Archives of Allergy and Immunology, 2007;143:177-184. IF: 2,160
- 7., J. Kappelmayer, M. Udvardy, **P. Antal-Szalmás:** Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia.
Current Medicinal Chemistry, 2007;14:519-530. IF: 4,944
- 8., T. Bubán, K. Koczok, R. Földesi, G. Szabó, A. Sümegi, M. Tanyi, L. Szeráfin, M. Udvardy, J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmás:** Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2012;50:301-310. IF: 3,009

- 9., M. Papp, Z. Vitalis, I. Altorjay, I. Tornai, M. Udvardy, J. Harsfalvi, A. Vida, J. Kappelmayer, PL. Lakatos, **P. Antal-Szalmas**: Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections.
Liver International, 2012;32:603-611. IF: 3,870
- 10., M. Papp, N. Sipeki, Z. Vitalis, T. Tornai, I. Altorjay, I. Tornai, M. Udvardy, K. Fechner, S. Jacobsen, B. Teegen, A. Sümegi, GM. Veres, PL. Lakatos, J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmas**: High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis.
Journal of Hepatology, 2013;59:457-466. IF: 10,401
- 11., HP. Bhattoa, J. Wamwaki, E. Kalina, R. Foldesi, A. Balogh, **P. Antal-Szalmas**: Serum sclerostin levels in healthy men over 50 years of age.
Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2013;31:579-584. IF: 2,114
- 12., B. Nagy Jr, HP. Bhattoa, Z. Steiber, M. Csobán, M. Szilasi, G. Méhes, M. Müller, J. Lázár, J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmás**: Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014;52:1639-1648. IF: 2,707

11.3. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1., A Ph.D fokozat megszerzése óta lektorált tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- 1., L. Virág, GS. Scott, **P. Antal-Szalmás**, M. O'Connor, H. Ohshima, Cs. Szabó: Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity.
Molecular Pharmacology, 1999;56:824-833. IF: 5,465
- 2., I. Csipő, E. Kiss, P. Soltész, **P. Antal-Szalmás**, Gy. Szegedi, JHM. Cohen, RP. Taylor, M. Kávai: Effect of plasmapheresis on ligand binding capacity and expression of erythrocyte complement receptor type 1 of patients with systemic lupus erythematosus.
Clinical and Experimental Immunology, 1999;118:458-464. IF: 2,831
- 3., S. Sipka, **P. Antal-Szalmás**, I. Szöllősi, I. Csipő, G. Lakos, Gy. Szegedi: Ceramide stimulates the uptake of neutral red in human neutrophils, monocytes and lymphocytes.
Annals of Hematology, 2000;79:83-85. IF: 1,448
- 4., **P. Antal-Szalmás**, MJJG. Poppelier, R. Broekhuizen, J. Verhoef, JAG. van Strijp, KPM. van Kessel: Diverging pathways for lipopolysaccharide (LPS) and CD14 in human monocytes.
Cytometry, 2000;41:279-288. IF: 2,557
- 5., Z. Szabó, M. Szilasi, L. Brugós, S. Szántó, I. Kovács, M. Széles, G. Lakos, **P. Antal-Szalmás**, I. Edes, S. Sipka: Differences in the changes of allergen-specific IgE serum levels and the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with allergic rhinoconjunctivitis during the ragweed season.
Immunology Letters, 2000;74:201-205. IF: 1,546
- 6., Gy. Nagy, E. Pállinger, **P. Antal-Szalmás**, M. Aleksza, M. Marschalkó, M. Brózik, A. Falus, P. Gergely: Measurement of intracellular interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in whole blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.
Immunology Letters, 2000;74:207-210. IF: 1,546
- 7., Z. Szekanecz, S. Szántó, Z. Szabó, I. Kovács, A. Kulcsár, G. Lakos, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, Gy. Szegedi: Biokémiai és gyulladásos markerek vizsgálata rheumatoid arthritishez társuló osteoporosisban I. Keresztmetszeti vizsgálat.
Ca és csont, 2000;3:62-71.
- 8., S. Sipka, K. Szücs, S. Szántó, I. Kovács, G. Lakos, **P. Antal-Szalmás**, Gy. Szegedi, P. Gergely: Inhibition of calcineurin activity and protection against cyclosporine A induced cytotoxicity by prednisolone sodium succinate in human peripheral mononuclear cells.
Immunopharmacology, 2000;48:87-92. IF: 1,370
- 9., S. Sipka, S. Szántó, K. Szucs, I. Kovács, E. Kiss, **P. Antal-Szalmás**, G. Lakos, M. Aleksza, A. Illés, P. Gergely, Gy. Szegedi: Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus.
Journal of Rheumatology, 2001;28:2012-2017. IF: 2,591
- 10., S. Sipka, K. Szucs, S. Szántó, I. Kovács, G. Lakos, E. Kiss, **P. Antal-Szalmás**, Gy. Szegedi, P. Gergely: Glucocorticosteroid dependent decrease in the activity of calcineurin in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus.
Annals of the Rheumatic Diseases, 2001;60:380-384. IF: 3,188

- 11., Z. Barta, I. Csipő, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, G. Szabó, Gy. Szegedi: Saccharomyces cerevisiae elleni antitest előfordulása Crohn-betegségben. *Orvosi Hetilap*, 2001;142:2303-2307.
- 12., P. Soltész, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, G. Lakos, Gy. Szegedi, E. Kiss: Plasmapheresis modulates Th1/Th2 imbalance in patients with systemis lupus erythematosus according to measurement of intracytoplasmic cytokines. *Autoimmunity*, 2002;35:51-56. IF: 0,921
- 13., B. Irinyi, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, J. Hunyadi, A. Szegedi: Cytokine production of CD4+ and CD8+ peripheral T lymphocytes in patients with chronic idiopathic urticaria. *Acta Dermatology and Venereology*, 2002;82:249-253. IF: 1,580
- 14., M. Aleksza, B. Irinyi, A. Lukács, **P. Antal-Szalmás**, J. Hunyadi, A. Szegedi: Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 2002;147:1135-1141. IF: 2,696
- 15., E. Bodolay, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, J. Végh, P. Szodoray, P. Soltész, A. Szegedi, Z. Szekanecz: Serum cytokine levels and type 1 and type 2 intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease. *Journal of Rheumatology*, 2002;29:2136-2142. IF: 2,987
- 16., B. Irinyi, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, J. Hunyadi, A. Szegedi: Citokin szintek vizsgálata krónikus idiopátiás urticariában szenvedő betegekben. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*, 2002;79:3-7.
- 17., A. Szegedi, M. Aleksza, A. Gonda, B. Irinyi, S. Sipka, J. Hunyadi, **P. Antal-Szalmás**: Elevated rate of T helper 1 (TH1) lymphocytes and serum IFN-gamma levels in psoriatic patients. *Immunology Letters*, 2003;86:277-280. IF: 1,710
- 18., **P. Antal-Szalmás**, M.J. Poppelier, A. Sümegi, T. van der Bruggen, J. Verhoef, KPM. van Kessel, JAG. van Strijp: Spare CD14 molecules on human monocytes enhance the sensitivity for low LPS concentrations. *Immunology Letters*, 2004;93:11-15. IF: 2,136
- 19., T. Bubán, M. Schmidt, R. Broll, **P. Antal-Szalmás**, M. Duchrow: Detection of mutations in the cDNA of the proliferation marker Ki-67 protein in four tumor cell lines. *Cancer Genetics Cytogenetics*, 2004;149:81-84. IF: 1,577
- 20., G. Tóth, J. Schlammadinger, J. Aradi, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, M. Balázs, P. Kovács, Z. Fehér, A. Falus: A DNA uptake-stimulating protein increases the antiproliferative effect of c-myc antisense oligonucleotide on leukemic cells. *Cell Biology International*, 2004;28:817-823. IF: 1,015
- 21., J. Szantó, C. András, J. Tsakiris, S. Gomba, Z. Szentirmay, S. Bánlaki, I. Szilágyi, C. Kiss, **P. Antal-Szalmás**, A. Horváth, L. Lengyel, M. Castiglione-Gertsch: Secretory breast cancer in a 7.5-year old boy. *Breast*, 2004;13:439-442. IF: 0,760
- 22., M. Aleksza, A. Szegedi, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, K. Dankó: Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározásának klinikai jelentősége dermatomyositisben. *Magyar Immunológia*, 2004;3:40-44.
- 23., L. Kerekes, **P. Antal-Szalmás**, B. Dezső, S. Sipka, A. Furka, I. Mikó, P. Sáy: A tripszin és lipáz hatásának in vitro vizsgálata foszfolipáz A2 enzimekkel, endotoxinokkal és citokinekkal előkezelt kutya pancreas metszeteken. *Magyar Sebészet*, 2005;58:120-124.

- 24., M. Aleksza, A. Szegedi, **P. Antal-Szalmás**, B. Irinyi, L. Gergely, A. Ponyi, J. Hunyadi, S. Sipka, M. Zeher, Gy. Szegedi, K. Dankó: Altered cytokine expression of peripheral blood lymphocytes in polymyositis and dermatomyositis.
Annals of the Rheumatic Diseases, 2005;64:1485-1489. IF: 6,956
- 25., **P. Antal-Szalmás**, G. Ivády, A. Molnár, Z. Hevessy, V. Kissné Sziráki, A. V. Oláh, Á. Lenkey, J. Kappelmayer: „Turnaround time”: a laboratóriumi eredménykiadás hatékonyságának új paramétere.
Orvosi Hetilap, 2007;148:1317-1327.
- 26., **P. Antal-Szalmás**, M. Aleksza, A. Gonda, E. Herédi, S. Sipka, J. Hunyadi, A. Szegedi: A TH1/TH2 és TC1/TC2 sejtek arányának és abszolút sejtszámának változása psoriasisos betegek vérmintáiban.
Magyar Immunológia, 2007;6:22-30.
- 27., E. Szekanecz, G. Szucs, Z. Szekanecz, T. Tarr, **P. Antal-Szalmás**, S. Szamosi, J. Szántó, E. Kiss: Tumor-associated antigens in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus: associations with organ manifestations, immunolaboratory markers and disease activity indices.
Journal of Autoimmunity, 2008;31:372-376. IF: 7,881
- 28., Z. Szekanecz, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, P. Soltész, K. Veres, S. Szántó, Z. Szabó, A. Végvári, S. Szamosi, G. Lakos, S. Sipka, G. Szegedi, J. Varga, G. Szücs: Combined plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis for 12 months: follow-up of immunopathological and clinical effects.
Clinical Rheumatology, 2009;28:347-350. IF: 1,668
- 29., M. Tanyi, J. Olasz, G. Lukács, J. Tanyi, L. Tóth, **P. Antal-Szalmás**, Z. Rész, T. Bubán, C. András, L. Damjanovich: A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas.
European Journal of Surgical Oncology, 2009;35:1128-1130. IF: 2,564
- 30., A. Zarjou, V. Jeney, P. Arosio, M. Poli, **P. Antal-Szalmás**, A. Agarwal, G. Balla, J. Balla: Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.
Journal of the American Society of Nephrology, 2009;20:1254-1263. IF: 7,689
- 31., T. Bubán, L. Tóth, M. Tanyi, J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmás**: Ki-67: egy régi játékos, új arcai.
Orvosi Hetilap, 2009;150:1059-1570.
- 32., P. Lakatos, L. Kiss, K. Palatka, I. Altorjay, **P. Antal-Szalmás**, E. Palyu, M. Udvardy, T. Molnar, K. Farkas, G. Veres, J. Harsfalvi, J. Papp, M. Papp: Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease.
Inflammatory Bowel Diseases, 2011;17:767-777. IF: 4,855
- 33., A. Vida, A. Troelstra, **P. Antal-Szalmás**, TJP. van Bommel, AFM. Verheul, J. Verhoef, KPM. Van Kessel, JAG. Van Strijp: Neutralization of *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles.
Inflammation Research, 2011;60:801-805. IF: 2,109
- 34., Z. Hevessy, R. Hudák, V. Kiss-Sziráki, **P. Antal-Szalmás**, M. Udvardy, L. Rejtő, L. Szeráfin, J. Kappelmayer: Laboratory evaluation of a flow cytometric BCR-ABL immunobead assay.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2011;50:689-692. IF: 2,150

- 35., M. Tanyi, J. Olasz, JL. Tanyi, L. Tóth, **P. Antal-Szalmás**, T. Bubán, Cs. András, H. Urbancsek, Z. Garami, O. Csuka, L. Damjanovich: Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families.
Familial Cancer, 2012;11:519-524. IF: 1,935
- 36., A. Mokánszki, A. Ujfalusi, E. Balogh, A. Sümegi, **P. Antal-Szalmás**, Zs. Kassai Bazsané, Z. Molnár, A. Varga, T. Sapy, A. Jakab, E. Olah: Meiotic segregation study of a novel t(3;6)(q21;q23) in an infertile man using fluorescence in situ hybridization (FISH).
Systems Biology in Reproductive Medicine, 2012;58:160-164. IF: 1,847
- 37., A. Vida, B. Bardoel, F. Milder, L. Majoros, A. Sümegi, A. Bácsi, G. Vereb, KP. van Kessel, JA. van Strijp, **P. Antal-Szalmás**: Fusion of the Fc part of human IgG1 to CD14 enhances its binding to gram-negative bacteria and mediates phagocytosis by Fc receptors of neutrophils.
Immunology Letters, 2012;146:31-39. IF: 2,337
- 38., B. Nagy Jr, ZT. Krasznai, H. Balla, M. Csoban, **P. Antal-Szalmás**, Z. Hernadi, J. Kappelmayer: Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease.
Annals of Clinical Biochemistry, 2012;49:377-380. IF: 1,922
- 39., HP. Bhattoa, E. Nagy, C. More, J. Kappelmayer, A. Balogh, E. Kalina, **P. Antal-Szalmás**: Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in healthy Hungarian men over 50 years of age: The HunMen Study.
Osteoporosis International, 2013;24:179-186. IF: 4,165
- 40., J. Kappelmayer, I. Beke Debreceni, A. Vida, **P. Antal-Szalmás**, KJ. Clemetson, B. Nagy Jr: Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation.
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013;11:775-778.
- 41., HP. Bhattoa, U. Onyeka, E. Kalina, A. Balogh, G. Paragh, **P. Antal-Szalmás**, M. Kaplar: Bone metabolism and the 10-year probability of hip fracture and a major osteoporotic fracture using the country-specific FRAX algorithm in men over 50 years of age with type 2 diabetes mellitus: a case-control study.
Clinical Rheumatology, 2013;32:1161-1167. IF: 1,774
- 42., H. Andrikovics, A. Bors, N. Meggyesi, M. Koszarska, Cs. Bödör, H. Rajnai, B. Csernus, B. Kajtár, D. Alpár, **P. Antal-Szalmás**, Zs. Kiss-László, L. Pajor, J. Kappelmayer, A. Matolcsy, MC. Müller, A. Tordai. A BCR-ABL1 génfüzió molekuláris monitorozásának hazai standardizációja az Európai LeukemiaNet EUTOS program keretében.
Hematológia Transzfuziológia, 2013;46:112-120.
- 43., J. Hunyadi, C. András, I. Szabó, J. Szántó, K. Szluha, S. Sipka, P. Kovács, A. Kiss, Gy. Szegedi, I. Altorjay, P. Sápy, **P. Antal-Szalmás**, L. Tóth, G. Fazekas, E. Rajnavölgyi: Autologous dendritic cell based adoptive immunotherapy of patients with colorectal cancer - A Phase I-II Study.
Pathology & Oncology Research, 2014;20:357-365. IF: 1,855
- 44., N. Sipeki, **P. Antal-Szalmás**, PL. Lakatos, M. Papp: Immune dysfunction in cirrhosis.
World Journal of Gastroenterology, 2014;20:2564-2577. IF: 2,369
- 45., E. Szánthó, HP. Bhattoa, M. Csobán, **P. Antal-Szalmás**, A. Ujfalusi, J. Kappelmayer, Z. Hevessy: Serum thymidine kinase activity: analytical performance, age-related reference ranges and validation in chronic lymphocytic leukemia.
PLoS One, 2014;9:e91647. IF: 3,234

- 46., M. Tanyi, J. Olasz, JL. Tanyi, L. Tóth, **P. Antal-Szalmás**, Z. Ress, T. Bubán, K. Palatka, C. András, H. Urbancsek, Z. Garami, O. Csuka, L. Damjanovich: MLH1 and MSH2 mutation screening in HNPCC families of Hungary - Two new MMR gene mutations.
European Journal of Surgical Oncology, 2014;40:1445-1452. IF:3,009
- 47., J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmás**, B. Nagy Jr: Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders.
Clinica Chimica Acta, 2015;438:35-42. IF:2,824
- 48., N. Sipeki, L. Davida, E. Palyu, I. Altorjai, J. Harsfalvi, **P. Antal-Szalmás**, Z. Szabo, G. Veres, Z. Shums, GL. Norman, PL. Lakatos, M. Papp: Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies (APLA) in Crohn's disease.
World Journal of Gastroenterology, 2015;21:6952-6964. IF: 2,369
- 49., M. Papp, N. Sipeki, T. Tornai, I. Altorjai, GL. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, K. Fechner, W. Stöcker, **P. Antal-Szalmás**, G. Veres, PL. Lakatos: Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: the importance of specific target antigens (GP2 and CUZD1).
Journal of Crohn's & Colitis, 2015;9:659-668. IF: 6,234
- 50., PL. Lakatos, N. Sipeki, G. Kovacs, E. Palyu, GL. Norman, Z. Shums, PA. Golovics, BD. Lovasz, **P. Antal-Szalmás**, M. Papp: Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's disease.
Journal of Chron's & Colitis, 2015;9:891-898. IF: 6,234
- 51., E. Kulcsar-Jakab, Z. Petho, Z. Pap, E. Kalina, R. Foldesi, A. Balogh, **P. Antal-Szalmás**, HP. Bhattoa: Cystatin C as a potential predictor of osteoprotegerin levels in healthy men, a cross-sectional, observational study.
BMC Musculoskelet Disord. 2015;16:227 IF: 1,717

2., Egyéb, tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- 1., **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, P. Surányi, I. Csipő, T. Seres, L. Maródi, K. Toma, Gy. Szegedi: Új citofluorimetriás módszer a teljes vérben lévő humán neutrofil granulociták és monociták fagocita aktivitásának meghatározására.
Laboratóriumi Diagnosztika, 1994;21:77-88.
- 2., **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, G. Szabó, J. Csongor, L.-né. Szöllősi, Gy. Szegedi: A fagocitózist jellemző luminol függő kemilumineszcencia mérés korszerűsítése.
Laboratóriumi Diagnosztika, 1994;21:267-273.
- 3., L. Brúgós, S. Sipka, M. Szilasi, Z. Szabó, G. Lakos, **P. Antal-Szalmás**, I. Édes, Gy. Szegedi: Halolaj-kapszula adagolás hatása parlagfű okozta allergiás rhinoconjunctivitisben.
Allergológia és Klinikai Immunológia, 1999;2:42-47.
- 4., Z. Szekanecz, Á. Illés, M. Széles, M. Aleksza, G. Lakos, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, Gy. Szegedi: Az isoprinosine hatásai a celluláris és humorális immunitásra Hodgkin-kórban és rheumatoid arthritisben.
Allergológia és Klinikai Immunológia, 2001;4:48-59.
- 5., **P. Antal-Szalmás**, B. Nagy Jr, I. Beke-Debreceni, J. Kappelmayer: Measurement of soluble biomarkers by flow cytometry.
The eJournal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2012;23:30-37.
- 6., Z. Molnár, J. Wamwaki, Z. Pető, E. Kalina, R. Földesi, Á. Balogh, **P. Antal-Szalmás**, HP. Bhattoa: Szklerosztinszint-meghatározás egészséges férfiakban.
Lege Artis Medicinae Kid, 2014;4:63-68.

- 7., Zs. Pető, É. Kulcsár-Jakab, O. Ugu, Z. Molnár, E. Kalina, Á. Balogh, Gy. Paragh, **P. Antal-Szalmás**, M. Káplár, HP. Bhattoa: Az országspecifikus FRAX-algoritmus által meghatározott 10 éves csípő- és major osteoporoticus törések valószínűségének vizsgálata 2-es típusú diabeteses férfiak csoportjában. *Lege Artis Medicinae Kid*, 2014;4:155-161.

3., Könyvfejezet

- 1., Gergely Lajos, Gyimesi Edit, **Antal-Szalmás Péter**: Áramlási citometria alkalmazása a klinikai immunológiai laboratóriumi gyakorlatban. (12.6. fejezet); Petrányi Győző (szerkesztő): Klinikai Immunológia., Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2000, pp. 882-891.

4., Oktatási anyagok

- 1., **Antal-Szalmás Péter**: Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége a daganatos betegségek diagnosztikájában. Góth László szerkesztő: DEEFK-ODLA „Molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek.” jegyzet, 2003, pp. 128-139.
- 2., Balogh István, **Antal-Szalmás Péter**: Anyagcsere rendellenességek molekuláris genetikai diagnosztikája. Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok, DEOEC ÁOK, magyar nyelvű jegyzet, 2010, pp. 9-18.
- 3., **Antal-Szalmás Péter**: Laboratóriumi informatika. Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok, DEOEC ÁOK, magyar nyelvű jegyzet, 2010, pp. 75-82.
- 4., **Antal-Szalmás Péter**, V. Oláh Anna: A vese glomeruláris funkciójának laboratóriumi vizsgálata. Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok, DEOEC ÁOK, magyar nyelvű jegyzet, 2010, pp. 111-118.
- 5., **Antal-Szalmás Péter**, Miszti-Blasius Kornél: Vizeletvizsgálat. Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok, DEOEC ÁOK, magyar nyelvű jegyzet, 2010, pp. 119-127.
- 6., Istvan Balogh, **Peter Antal-Szalmás**: Molecular genetic diagnosis of inherited metabolic disorders. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 9-18.
- 7., **Peter Antal-Szalmás**: Laboratory informatics. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 75-82.
- 8., **Peter Antal-Szalmás**, Anna V. Oláh: Laboratory investigation of glomerular function. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 111-118.
- 9., **Peter Antal-Szalmás**, Kornel Miszti-Blasius: Urinalysis. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 119-127.

11.4. SCIENTOMETRIAI ADATOK

Antal-Szalmás Péter tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2015.12.08.)

Tudományos és oktatási közlemények	Szama		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	66	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	50	707	856
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	9	7	7
rövid közlemény	---	7	44	50
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	1	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)	---	0	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	67	---	758	913
V. További tudományos művek	8	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	7	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	3	3
Jelentés, guideline	---	0	0	0
VI. Idézett absztraktok⁵	0	---	0	0
Összesített impakt faktor⁴	170,8	---	---	---
Idézettség száma^{1, 4}	---	---	761	916
Hirsch index¹	18	---	---	---