

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

---

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

**DR. ANTAL-SZALMÁS PÉTER**



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

---

Debrecen, 2015



# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A biomarker definíciója, típusai, legfontosabb alkalmazási lehetőségek

Az orvosbiológiai kutatások gyors fejlődésének következtében az elmúlt 10-15 évben számtalan új diagnosztikai technológia vonult be az egészségügyi ellátásba, melyek olyan információkat biztosítanak a beteget kezelő orvosok számára, ami jelentősen fokozza a betegellátás 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.

A *National Institutes 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”. A megfogalmazás meglehetősen tág, hiszen magában foglalja a legkülönbözőbb vizsgálati területeket (labordiagnosztika, patológia, képalkotó eljárások, EKG-EEG, stb.), és egymástól rendkívül eltérő technológiákat sorol egy csoportba.

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. 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 valósidejű monitorozását, a terápia hatékonyságának, illetve toxicitásának megítélését. Végül a legértékesebb biomarkerek **klinikai végpontokat is reprezentálhatnak**, esetleg helyettesíthetnek is, mivel jól korrelálnak a terápiás kimenettel.

## 1.2. Új biomarkerek felfedezése, 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. Később a különböző enzimek és izoenzimek majd hormonok kerültek a vizsgálatok középpontjába az enzimológia majd a radioimmunoassay-k fejlődésével. A monoklonális ellenanyag előállítás technológiájának kidolgozása után jónéhány új marker került felismerésre, majd a klinikai gyakorlatba.

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 kibővült. 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. Itt tehát, alapvetően egy meghatározott hipotézis jelenti a biomarker azonosítás alapját.

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. Különösen ezen megközelítés során van nagy jelentősége a bioinformatikának, aminek nemcsak az igen nagyszámú adat kezelésében és feldolgozásában van szerepe, hanem az ún. kompozit score-ok megalkotásában is. Az egyes biomarkerek ugyanis, önmagukban is hatékonyan alkalmazhatók bizonyos diagnosztikus célokra, ugyanakkor már egyszerű kombinálásuk is jelentősen fokozhatja hatékonyságukat és plusz klinikai információkat adhat. Még hatékonyabban tudnak az egyedi markerek 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 score. Ugyanakkor számos olyan képlet is használt, melyek csak laboratóriumban vizsgált paraméterekre épülnek [Prostate health index (PHI), ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) score vagy az OVA1 teszt]. A tüdő malignus daganatai esetében is számos publikáció foglalkozik hasonló score rendszerek definiálásával, változó számú (2-6) laboratóriumi paramétert (tumormarkerek, akut fázis fehérjék, gyulladáshatóanyagok) kombinálva, de ezek klinikai evaluálása még várat magára.

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 3 fázisát különböztethetjük meg. A második szakasz a **kvalifikációs fázis** („**qualification phase**”), amikor már a diagnosztikus mintaként szolgáló testnedvben határozzuk meg a kandidáns biomarker szintjét, és igazoljuk, hogy eltérő koncentrációk mérhetőek 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 klinikai szenzitivitás/specificitás adatok mellett az új marker potenciális klinikai applikációi is vizsgálatra kerülnek.

### 1.3. Biomarker tesztek analitikai és funkcionális validálása

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 bemutatása révén –, hogy egy bizonyos alkalmazással kapcsolatos különleges elvárásoknak az adott módszer megfelel. A biomarker assay-k fejlesztésének különböző fázisaiban különböző szintű módszer validálásra 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.

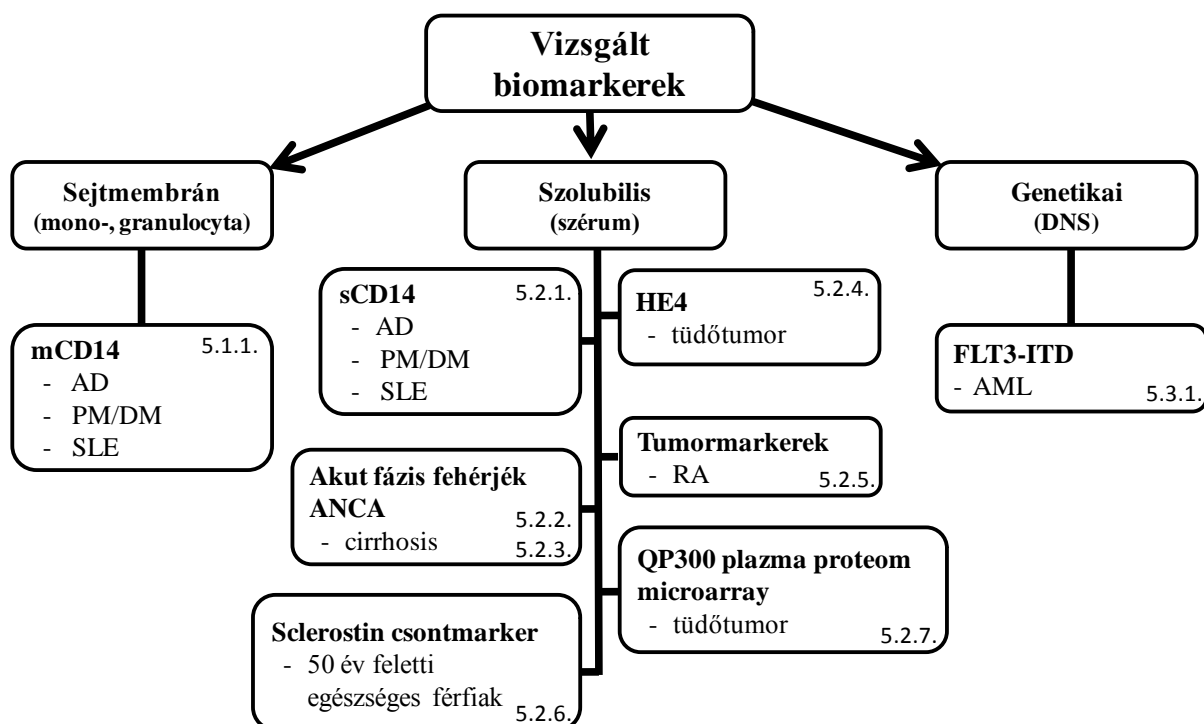
A módszervalidálás szempontjából 5 stádiumát különítjük el a biomarker assay-k fejlesztésének. Az **első fázisban** a klinikai és kísérletes céloknak megfelelő **assay elméleti kiválasztása** a fő cél. A **második, a módszerfejlesztés fázisában**, az új assay valamennyi komponensét meg kell alkotni, ki kell dolgozni az assay működésének részleteit, és el kell végezni az első validálásokat, és egy további, részletesebb validálási tervet kell kidolgozni. A **harmadik lépés a pre-study validáció**, amely már sokkal összetettebb és sokrétűbb tesztelést jelent, 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, ismételéseket és ezek okait, magyarázatát. Mindezek teljesítése után válhat a teszt **rutin diagnosztikus módszerré (5. fázis)**, amikor már az ilyen assay-knek megfelelő folyamatos QC tesztelést kell végezni. 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. Egyes források a biomarker assay fejlesztés 1. és 2. fázisát összevonják, és ezt nevezik a „módszerfejlesztés” szakaszának, majd ezt követi a korábbiakhoz hasonlóan a „pre-study validálás” majd az „in-study validálás”, ami végül egy rutin diagnosztikus tesztet eredményezhet.

### 1.4. A disszertációban vizsgált biomarkerek jellemzői

Az elmúlt 20 évnyi kutatómunka során vizsgálataim több, különböző betegségcsoport 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 monoklonális antitest (mAb)-alapú protein array rendszer fejlesztését és tesztelését végeztük daganatos betegek mintáin.

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 értékeltük. Vizsgáltuk azt, hogy mennyire képesek ezen markerek azonosítani a betegeket megfelelően illesztett kontroll csoportokhoz képest, illetve, hogy képesek-e a betegség aktivitását vagy társuló infekciókat kimutatni esetleg 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 és új eredményeket hozó markerek tulajdonságait az 1. ábra és az 1.-5. táblázat foglalja össze.



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

Marker neve	Mw - (kDa)	Biokémiai tulajdonságok	Biológiai funkciók	Előfordulás	Alkalmazási terület	Betegség
<b>CD14 molekula</b>	mCD14: 54; sCD14: 48 és 56	glikoprotein, GPI-farok	LPS receptor PRR	monocyta, macrophágok, granulocyta	AFR kimutatása, betegség aktivitási marker	fertőzések, autoimmun, atópiás-allergiás és chr. gyulladáso megbetegedések
<b>LPS kötő fehérje (LBP)</b>	60	Glikoprotein	lipid transzfer protein, PRR, LPS transzport	máj, GI és légutak epithel sejtjei	AFR kimutatása, betegség aktivitási és prognosztikai marker	fertőzések, SIRS, szepszis, IBD
<b>C reaktív protein (CRP)</b>	25	Protein	opszonin, komplement rendszert aktiválja	máj	AFR kimutatása, követése	fertőzések, szövetnekrózis, tumor, műtét
<b>Procalcitonin (PCT)</b>	13	Protein	calcitonin előalakja	máj, pancreas, vese, tüdő, izom, zsír	AFR kimutatása, követése	súlyos szisztémás bakteriális infekciók

**1. táblázat A vizsgált akut fázis fehérjék legfontosabb jellemzői** (PRR: mintázat felismerő receptor, AFR: akut fázis reakció, GI: gastrointestinalis traktus, IBD: gyulladáso bélbetegség, LPS: lipopoliszacharid, SIRS: szisztémás gyulladáso válaszreakció, chr: krónikus)

Marker neve	Mw - (kDa)	Típusai	Biológiai funkciók	Keletkezés	Alkalmazási terület	Betegség
<b>Anti-neutrofil citoplazmatikus antitest (ANCA)</b>	150	c-ANCA (anti-PR3), p-ANCA (anti-MPO), atípusos p-ANCA	i, autoantitest ii, FcR mediálta sejtaktiváció iii, kötődés a sejtfelszínre került MPO-hoz és PR3-hoz, komplement aktiválás, sejtkárosítás	i, kórokozók és saját antigének közötti keresztreakció ii, perzisztáló neutrofil antigének iii, MPO/PR3 ellenes molekulák anti-idiotípus ellenanyagai iv, fokozott TLR expresszió v, immunreguláció zavara	diagnózis, monitorozás, prognosztikai marker	vasculitisek (fertőzések, IBD, RA, autoimmun májbetegség)

**2. táblázat A vizsgált autoantitest legfontosabb jellemzői** (MPO: myeloperoxidase, PR3: proteinase 3, FcR: Fc receptor, TLR: toll-like receptor, RA: rheumatoid arthritis, IBD: gyulladáso bélbetegség)

Marker neve	Mw - (kDa)	Biokémiai tulajdonságok	Biológiai funkciók	Előfordulás	Alkalmazási terület	Tumor lokalizáció
<b>Neuron specifikus enoláz (NSE)</b>	87	protein	foszfopiruvát hidroláz enzim $\gamma$ alegysége	idegrendszer, neuroendokrin sejtek, vvt, thrombocyta	követés, prognosztikai marker, stádium becslés	idegrendszer, tüdő (SCLC), mellékvese, pancreas, melanoma
<b>Carcino-embriónális antigén (CEA)</b>	150 - 300	glikoprotein	sejt adhéziós molekula	bél mucosa a fetalis és embriónális élet során	követés, prognosztikai marker, stádium becslés	GI, tüdő, emlő, ovárium, uterus
<b>CA 15-3</b>	290 - 400	glikoprotein	mucin komponens	emlő carcinoma sejtek, normál epithel sejtek	követés, terápia monitorozása	emlő (tüdő, pancreas, GI, ovárium)
<b>CA 125</b>	200	glikoprotein	mucin komponens	ovárium carcinoma, bronchus epithel	követés, rizikó csoport szűrése, összefüggés a tumor kiterjedtségével	ovárium (endometrium, tüdő)
<b>CA 19-9</b>	1.000	glikolipid; haptén: Lewis <sup>a</sup> vércsoport antigén	sejt-sejt interakció	fetalis GI epithel, mucosa sejtek (pancreas, epeutak, GI, endometrium, nyálmirigy)	követés, összefüggés a tumor kiterjedtségével	pancreas (hepatobiliaris, hepatocellularis, GI, emlő cc.)
<b>Szöveti polipeptid antigén (TPA)</b>	22	polipeptid (Cytokeratin 8, 18, 19 fragmense)	ic. strukturális és kommunikációs elemek	epithel sejtek	proliferációt jelző marker	minden tumor
<b>Cyfra 21-1</b>	30	polipeptid (Cytokeratin 19 fragmense)	ic. strukturális és kommunikációs elemek	tüdő ill. sokféle szövet	követés, összefüggés a tumor kiterjedtségével	tüdő (NSCLC)
<b>Human epididymis protein 4 (HE4)</b>	20 - 25	glikoprotein	proteáz inhibitor	epididymis, tüdő epithel	követés, összefüggés a tumor kiterjedtségével	ovárium (emlő, endometrium, GI, tüdő)

**3. táblázat Az új eredményeket mutató tumormarkerek legfontosabb jellemzői** (GI: gastrointestinalis traktus, ic.: intracelluláris, SCLC: kissejtes tüdőrák, NSCLC: nem kissejtes tüdőrák)



Marker neve	Mw - (kDa)	Biokémiai tulajdonságok	Biológiai funkciók	Előfordulás	Alkalmazási terület	Betegség
<b>Sclerostin</b>	25	protein	i, Wnt szignalizációs útvonal inhibitora ii, gátolja a csontfelépülést iii, stimulálja a RANKL szekréciót iv, aktiválja az osteoclastokat	osteocyta	i, diagnosztika ii, törési kockázat becslése iii, terápia hatásának követése iv, terápiás célpont	van Buchem betegség (i, genetikai ok miatt hiányzik) osteoporosis (ii, iii, iv)

4. táblázat A sclerostin csontmarker legfontosabb jellemzői (RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand)

Marker neve	Mw - (kDa)	Biokémiai tulajdonságok	Biológiai funkciók	Előfordulás	Alkalmazási terület	Betegség
<b>Fms-like tirozinkináz 3 (FLT3)</b>	100	receptor tirozinkináz	FLT3 ligand (FL) kötődése az őssejtek proliferációját indukálja, apoptosist gátolja	hemopoetikus progenitor sejtek, thymus, nyirokcsomó, máj, placenta, gonádok, agy, retina	-----	-----
<b>FLT3-ITD mutáció</b>	-----	belső tandem duplikáció és inzerció a 14.-15. exon (JM) régióban; ITD hossza 3-400 bp, inzerció hossza 3-36 bp	i, az FLT3 ligand független konstans aktivációja ii, fokozott proliferáció iii, csökkent apoptosist	akut myeloid leukemia (AML)	diagnózis, prognosztikai marker, követés	akut myeloid leukemia (AML)

5. táblázat A vizsgált genetikai marker legfontosabb jellemzői (ITD: belső tandem duplikáció, JM: juxtamembrán, bp: bázispár)

## 2. 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.

### 2.1. 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.

### 2.2. 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 cirrrosishoz 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 tüdő tumoros 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 tüdő tumoros betegek mintáin. Új kompozit paraméterek alkotása a betegek és kontrollok jobb megkülönböztetésére.

### 2.3. Genetikai markerek vizsgálata

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

### **3. BETEGEK**

#### **3.1. Atópiás dermatitis (AD)**

A DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján gondozott 30 AD-s beteg (12 nő, 18 férfi,  $19,7 \pm 9,3$  év; intrinsic AD: 10, extrinsic AD: 20), valamint 56 egészséges személy mintáit vizsgáltuk meg. A betegek gondozását Dr. Szegedi Andrea professzornő és munkatársai végezték.

#### **3.2. Szisztémás lupus erythematosus (SLE)**

A DEOEC Belgyógyászati Intézet Klinikai Immunológia Tanszékén gondozott 18 SLE-s beteget (16 nő, 2 férfi,  $38,8 \pm 11,7$  év) vontunk be vizsgálatunkba. Közülük 10 beteg volt inaktív és terápiamentes stádiumban. A másik csoportba 8 olyan beteg került, akik kis dózisu szteroidot kaptak rendszeresen, majd betegségük fellángolása miatt pulzus szteroid kezelésben (1 g/nap, három napig) részesültek, és a kezelés előtti és utáni minták szolgáltatották a „kis dózisu szteroid” és a „pulzus szteroid” adatokat. A kontroll csoportot 11 egészséges személy képezte (9 nő, 2 férfi,  $34,4 \pm 9,2$  év). A szérum sCD14 mérését 23 SLE-s beteg (1 férfi, 22 nő,  $40,9 \pm 12,4$  év) és 53 kontroll személy (29 férfi, 24 nő,  $40,4 \pm 15,1$  év) mintáin végeztük el. A betegek gondozását Dr. Kiss Emese tanárnő és munkatársai végezték.

#### **3.3. Polymyositis/dermatomyositis (PM/DM)**

A vizsgálatban a DEOEC Belgyógyászati Intézet Klinikai Immunológia Tanszékén gondozott 76 PM-es (60 nő és 16 férfi,  $54,0 \pm 12,1$  év; aktív: 23, inaktív: 53), valamint 34 DM-es beteg (27 nő, 7 férfi,  $53,1 \pm 13,9$  év; aktív: 14, inaktív: 20) és kontrollként 35 egészséges személy vett részt. A betegek gondozását Dr. Dankó Katalin professzornő és munkatársai végezték.

#### **3.4. Cirrhosis**

Az akut fázis fehérvérjék vizsgálata során 368 jól karakterizált, követés alatt álló cirrhotikus beteget (férfi/nő: 204/164; kor:  $56,4 \pm 10,8$  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). A munka második részében a betegeket egy prospektív követéses vizsgálatba vontunk be. A vizsgálat végpontja a betegek halála vagy klinikailag szignifikáns fertőzés megjelenése volt. Az ANCA vizsgálatba bevont egészséges kontrollok száma 100 volt (45 férfi, 55 nő;  $50,5 \pm 16,7$  év). A betegek gondozását Dr. Papp Mária tanárnő és munkatársai végezték.

#### **3.5. Akut myeloid leukemia (AML)**

Az FLT3-ITD meghatározására alkalmas módszer validálásához 73 felnőtt AML-es beteg (37 nő, 36 férfi;  $51,7 \pm 18,5$  év) DNS mintáit használtuk fel. Ezeket a betegeket a DEOEC Belgyógyászati Intézet Hematológiai Tanszékén Dr. Udvardy Miklós professzor úr és

munkatársai, illetve a Nyíregyházi Jósa András Kórház Hematológiai Osztályán Dr. Szerafin László főorvos úr és munkatársai gondozták.

### **3.6. Rheumatoid arthritis (RA)**

A reumatológiai betegségekhez társuló tumormarker eltéréseket 75 RA-s beteg (62 nő és 13 férfi;  $50,1 \pm 13,8$  év) mintájában vizsgáltuk meg. Kontrollként 50 egészséges donor szolgált (41 nő és 9 férfi;  $54,5 \pm 9,3$  év). A betegek gondozását a DEOEC Belgyógyászati Intézet Rheumatológia Tanszékén Dr. Szekanecz Zoltán professzor úr és munkatársai végezték.

### **3.7. Tüdőtumoros betegek - NKTH mAB-CHIC study**

A szérumban HE4 szintet 98 újonnan diagnosztizált tüdőtumoros férfibeteg és 98 egészséges kontroll (átlagéletkor  $62,0-62,0$  év) mintáiban mértük le. A QP300 chipet 46 tüdőtumoros és 46 kontroll személy mintáin vizsgáltuk (20 férfi, 26 nő;  $55,2$  év). A betegek gondozását a DEOEC Tüdőgyógyászati Klinikáján Dr. Szilasi Mária professzornő és munkatársai végezték.

### **3.8. Ötven évnél idősebb férfiak csontstátuszának vizsgálata**

A vizsgálat során egészséges magyar férfiak csontstátuszát jellemeztük, csontdenzitás méréssel, a csontanyagcsere biokémiai markereinek meghatározásával és a táplálkozási szokások felméréssel. A vizsgálatban résztvevő 206 férfi ( $60,2$  év) beválasztását és adatainak összegyűjtését Dr. Bhattoa Harjit Pal adjunktus úr végezte.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. A sejtfelszíni receptorok jelölése, kvantitálása**

A sejtfelszíni CD14 receptorok mennyiségi meghatározásához direkt (LeuM3-PE, MY4-PE) és indirekt (26ic és 60bca) módon jelölt anti-CD14 mAb-okat, ill. „2.” antitesteket (anti-egér IgG-FITC és anti-egér IgG-PE) használtunk. A sejtek fluoreszcencia intenzitását EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométerrel mértük le. A receptorok abszolút számát, mAb-bal fedett standard bead-ek (QIFIKIT) segítségével határoztuk meg.

### **4.2. A CD14 mediálta LPS kötés vizsgálata**

A CD14 mediálta LPS kötésének vizsgálatához a betegek és a kontrollok izolált mononukleáris sejteit  $10 \mu\text{g/mL}$  blokkoló anti-CD14 mAb (60bca) jelenlétében vagy anélkül inkubáltunk, majd a mintákhoz  $10$  vagy  $1000 \text{ ng/mL}$  FITC-LPS-t (FITC-cel jelölt *Salmonella minnesota* Re 595) és 4% normál humán szérumot (NHS) adtunk. A minták mérése mosási lépések után áramlási citométerrel történt. A CD14-függő LPS kötés mértékének meghatározásához az antitest nélkül inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitásából (össz LPS kötés) levontuk a blokkoló antitest jelenlétében mért szignált (CD14-független kötés).

### **4.3. Az LPS indukálta sejtaktiváció mérése – a szekretált TNF $\alpha$ mennyiségének meghatározása**

Mononukleáris sejteket izoláltunk ficoll sűrűséggradiens segítségével steril körülmények között, ezt követően az adhéziójuk alapján szelektált monocytákat anti-CD14 mAb-bal (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  60bca) vagy anélkül inkubáltuk, majd 10 vagy 1000 ng/mL ReLPS-t és 4% NHS-t mértünk duplikátumban a megfelelő lyukakba. A mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk, majd a felülészók TNF $\alpha$  koncentrációját az OptEIA ELISA kit segítségével határoztuk meg. A sejtek CD14-függő aktiválódását úgy kalkuláltuk, hogy a blokkoló anti-CD14 antitest hiányában mért TNF $\alpha$  mennyiségéből kivontuk a gátló antitest jelenlétében mért TNF $\alpha$  mennyiségét.

### **4.4. A szolubilis CD14 mérésére alkalmas áramlási citometriás módszer kifejlesztése**

A teszt alapvetően egy kompetitív immunoassay, amelyben a szérumban lévő sCD14 és az izolált monocytákon kifejeződő membrán CD14 (mCD14) verseng egy CD14 ellenes monoklonális antitesthez való kötődésért. A sejtekhez kötődött - direkt vagy indirekt módon jelölt - antitest mennyiségét áramlási citométerrel határoztuk meg. A fluoreszcens szignál nagysága fordítottan arányos a szérumban lévő sCD14 mennyiségével.

Az optimalizált protokoll során az izolált mononukleáris sejteket először humán IgG-vel inkubáltuk, hogy blokkoljuk a monocytákon lévő Fc-receptorokat. Ezt követően 32-szeresére hígított szérumot mértünk a sejtekhez. A standard görbe pontjait egy ismert sCD14 koncentrációjú (1.969,3 ng/mL) kevert szérum hígításai adták. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD14 mAb 60bca hozzáadása után 30 perces inkubálás következett. A sejtekhez kötődött antitesteket anti-egér IgG-FITC konjugátummal detektáltuk, a mintákat áramlási citométeren mértük és analizáltuk. A monocyták elkülönítése a FSC/FL1 dot-ploton történt, mintánként 5.000 monocytá átlagos fluoreszcencia intenzitását mértük meg, és a kalibrációs görbe alapján kiszámoltuk a minták sCD14 koncentrációját.

A módszer optimalizálása során egy kontroll minta esetében 3,2% és 13,3%, míg egy SLE-s beteg mintájának esetében 3,4% és 11,5% volt az intra- és inter-assay CV%. Egy ismert sCD14 koncentrációjú szérumban lévő mintát, illetve rekombináns sCD14-et használva a különálló komponensek és a keverékek esetében is 100-115% között volt a visszanyerés.

## **4.5. Laboratóriumi vizsgálatok**

### **4.5.1. Rutin hematológiai és kémiai/immunkémiai laboratóriumi tesztek**

A monocyták abszolút sejt számát a Sysmex SF3000 automatán mértük le, a szérumban lévő laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitását Integra 700 kémiai automatával határoztuk meg. A szérumban lévő IgE koncentrációjának meghatározása a Modular E170, míg az allergén-specifikus IgE koncentrációjának mérése a MAST CLA1 analízátor segítségével történt. A szérumban lévő IgM reumafaktor (RF) meghatározása nefelometria, míg az anti-CCP autoantitest szintek mérése

Immunoscan-RA CCP2 ELISA teszt segítségével történt. A vesefunkciót a szérumban urea, kreatinin (Cobas Integra-800), és cisztatin C (BN-II nefelométer) mérése alapján értékeltük. Az eGFR (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) értékeket a 4v-MDRD formula alapján kalkuláltuk.

#### **4.5.2. Szérumban tumormarkerek mérések**

A tumormarkerek (CEA, CA19-9, CA 15-3, CA 125, CA 72-4, NSE, Cyfra 21-1) meghatározását egy Modular E170, a HE4 mérést egy Architect, míg a TPA és TK meghatározását egy Liason készülék segítségével végeztük.

#### **4.5.3. Csontanyagcsere vizsgálata**

A plazma 25-OH-D-vitamin szintjét egy Jasco HPLC készülék segítségével mértük Bio-Rad reagens kitéket alkalmazva. A szérumban parathormon (PTH), osteocalcin (OC), keresztkötött I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTX-I) és I. típusú prokollagén N-terminális propeptid (PINP) értékeket Modular E170 készülék segítségével határoztuk meg. A szérumban sclerostin szint meghatározása egy ELISA módszer segítségével történt. A csontdenzitás (bone mineral density; BMD) mérést egy LUNAR Prodigy denzitométer segítségével végeztük az L1–L4 lumbális csigolyákon (LS), valamint a femur nyakon (FN) és az eredményt T-score-ban adtuk meg.

#### **4.5.4. Akut fázis fehérjék koncentrációjának mérése**

A CRP szinteket egy Integra 700 automatával mértük. A PCT meghatározás „two-site” immunoluminometriás esszével történt Liaison analizátorral. Az LBP és sCD14 koncentrációját ELISA assay-k segítségével határoztuk meg.

#### **4.5.5. Anti-mikrobiális antitestek mérése**

Az ASCA IgG, IgA és az anti-OMP Plus IgA antitestek mérése gyári ELISA kiték segítségével történt (QUANTA Lite) a gyártó útmutatásainak megfelelően.

#### **4.5.6. Az Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata**

##### **4.5.6.1. Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens (IIF) technikával**

Az antitestek szemikvantitatív meghatározásához az EUROIMMUN cég etanol, illetve formalin fixált granulocytákat tartalmazó biochipjeit használtuk. A lemezek értékelését egy EUROStar II Plus mikroszkóppal végeztük. Az 1:10 hígításban kapott pozitív szignál esetén tekintettük a mintát pozitívnak. Az ANCA-titer meghatározása sorozat hígítással történt.

##### **4.5.6.2. Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhotikus betegekben**

Az IIF technikával pozitívnak talált minták esetében meghatároztuk az IgA<sub>1</sub> és IgA<sub>2</sub> alosztályú ANCA arányát, illetve a szekretoros komponenst hordozó IgA (sIgA) ANCA mennyiségét. A vizsgálathoz az EUROIMMUN etanollal fixált granulocytákat tartalmazó lemezeit használtuk. A sejteket a minták 1:10-es hígításával inkubáltuk, majd az IgA

alosztályok, illetve a sIgA detektálása 3 specifikus egér mAb-bal, egymástól függetlenül történt. A fluoreszcens detektáláshoz anti-egér IgG-FITC másodlagos antitestet használtunk. Az IgA<sub>1</sub> és IgA<sub>2</sub> ANCA antitestek mennyiségének meghatározása egy image analízis alapú kvantitálási technika segítségével történt, melyet Quantum Simply Cellular beadek segítségével standardizáltunk. A módszer reprodukálhatósága 5-5 mérés alapján: 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 IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub> és a sIgA esetében. A sIgA pozitívításának megítélésére egy küszöbértéket határoztunk meg 40 kontroll minta értékelése alapján: az átlag+3SD ebben a csoportban 23,4 AU fluoreszcencia intenzitás volt.

#### *4.5.6.3. Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával*

Az anti-MPO IgA és anti-Proteinase 3 IgA antitestek mennyiségét ELISA kettek (QUANTA Lite) segítségével mértük. Az eredményeket OD-ban adtuk meg. Az anti-MPO és anti-PR3 pozitívítás küszöb OD értéke 0,159 és 0,140 volt, amit 92 egészséges kontroll mintáiban mért átlag+3SD kalkulálás alapján határoztunk meg.

### **4.6. A QP300 array analitikai vizsgálata és tesztelése tüdő tumoros betegek mintáin**

A QP300 kit, egy mAb-alapú fehérje microarray, ami 290 különböző plazmafehérjén található, immunogén epitóp felismerésére és kvantitálására képes. Az array alapvetően egy kompetitív immunoassay. A mAb-ok 9x9 mm-es kerámia chippekhez kötöttek és egy biotinnal jelölt plazma fehérje „tracer” verseng a mintában lévő fehérjékkel a mAb-hoz való kötődésért. A bekötődött „tracer” mennyiségét streptavidin-peroxidáz konjugátum és kemilumineszcens szubsztrát segítségével határozzuk meg. A szubsztrát hozzáadása után az Evidence Investigator készülék CCD kamerája készít képeket a chippekről, és végzi el az image-k denzitálását. A csak a plazma tracer jelenlétében mért lumineszcencia adja a maximális jelintenzitást (RLU<sub>max</sub>). A vizsgált plazmák jelenlétében mért fényintenzitást (RLU) az RLU<sub>max</sub> értékhez hasonlítjuk minden mAb esetében és RLU/RLU<sub>max</sub>% értéket számolunk.

### **4.7. Molekuláris genetikai vizsgálatok**

#### **4.7.1. 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” segítségével.

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

A FLT3 gén 14-15. exonját és a köztük lévő intront amplifikáló PCR-hez használt primerek: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' és 5'-CTTTCAGCATTGACG-GCAACC-3'. A PCR-t egy Verity készülékkel végeztük. A PCR terméket 3%-os TBE-

agaróz-, illetve 6%-os poliakrilamid gélen (AGE és PAGE) futtattuk meg. A vad típusú allél jelenléte esetén 331 bp-os, míg mutáns allél jelenléte esetén ennél nagyobb méretű PCR termékek is keletkeztek.

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

A fragmentanalízis vizsgálathoz lényegében a 4.7.2. pontban leírt PCR-t végeztük el fluoreszcensen jelölt forward primert használva. A PCR termék + méret standard + formamid elegyének denaturálás utáni analízise az ABI310 kapilláris elektroforézis készülékkel történt.

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

A PCR termékek pontos bázissorrendjét bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg a BigDye Terminator (v. 3.1) kit és az ABI Prism 310 Genetic Analyzer készüléket alkalmazva.

### **4.8. Statisztikai módszerek**

A vizsgált numerikus paraméterek normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov vagy Shapiro Wilk teszt segítségével ellenőriztük. A kontroll és a különböző betegcsoportok adatait - normalitásuktól függően - Student-féle t-próbával, Mann-Whitney U-teszttel és Wilcoxon-teszt segítségével hasonlítottuk össze. A kategórikus változókat Chi-négyzet teszttel, a korrelációkat Pearson vagy Spearman SRO teszttel vizsgáltuk. Az egyes markerek hatékonyságát ROC analízissel értékeltük. A betegek infekciómentes, illetve teljes túlélését Kaplan–Meier görbék és LogRank/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.

A kompozit score-ok kialakítása során logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk; vagy valamennyi markert belevittük a regressziós analízisbe, vagy Random forest analízissel Mann-Whitney U vagy t-teszttel válogattuk ki a regresszióba kerülő - legjobb - markereket.

A statisztikai számításokat Statistica for Windows, GraphPadPrism 5, SPSS 15.0 és az R szoftverekkel végeztük. A különbségeket  $p < 0,05$  értéknél tekintettük szignifikánsnak.



## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. SEJTASSZOCIÁLT BIOMARKEREK

A potenciális biomarkerek egy nagy csoportját alkotják a perifériás vérben lévő sejtek felszínén található molekulák. Ezek legszélesebb 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 a legfontosabb LPS-koreceptor, mely jelentős szerepet játszik a monocyták, neutrofil granulocyták aktivációjában, és így potenciálisan szerepe lehet bizonyos immunmediálta kórképek kialakulásában, illetve aktivitásának változásában. Ennek tesztelésére több betegcsoport esetében vizsgáltuk a CD14-expresszió és a klinikai kép közötti összefüggéseket, illetve a CD14-expresszió és a perifériás monocyták aktivitásának a változását.

#### 5.1.1. A CD14-expresszió változásai különböző immunpatomechanizmusú kórképekben

##### 5.1.1.1. Atópiás dermatitis (AD)

Az AD-s betegek esetében 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. Ennek megfelelően az elvégzett ROC analízis alapján a granulocytá CD14-expresszió mérsékelt hatékonysággal különítette el az összes AD-s beteget a kontrolloktól (AUC=0,693), míg az intrinsic AD vs. kontroll összevetés már nagyobb effektivitást mutatott (AUC=0,788).

##### 5.1.1.2. Poly- és dermatomyositis (PM és DM)

A PM-es és DM-es betegek monocytáinak CD14-expressziója a betegség aktivitásának függvényében változott: szignifikánsan alacsonyabb volt az aktív betegekben az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva. Ráadásul a monocyták CD14-expressziója és – a betegség aktivitásának egyik markere – a szérum LDH aktivitás között szignifikáns negatív korrelációt tudunk kimutatni. 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). Hasonló volt az aktív és inaktív PDM-es betegek megkülönböztetésének hatékonysága is (AUC=0,638).

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

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 különbséget csak a pulzus terápiában részesült betegek és a többi csoport adatai között észleltünk. Ha a pulzus szteroid terápia előtti és utáni értékpárokat Wilcoxon-féle párosított teszttel hasonlítottuk össze, szignifikáns ( $p < 0,03$ ) CD14-expresszió csökkenést tudtunk kimutatni. ROC analízissel összevetve a kontrollok és SLE-s betegcsoportok értékeit a CD14-expresszió diszkriminatív hatékonysága minimális volt az inaktív SLE (AUC=0,618) és az alacsony dózisú szteroid terápiában részesülő SLE (AUC=0,602) csoportok esetében. Ugyanakkor magas ROC-AUC értéket kaptunk a pulzus szteroid kezelt betegek és az egyéb csoportok összevetése során (AUC=0,863-0,977).

A sejtfelszíni CD14 ligandkötését SLE-s betegek monocytáin FITC-LPS és áramlási citométer alkalmazásával vizsgáltuk. 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 dózisú szteroid terápiában részesült betegek adatai között. 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 (10 ng/mL LPS:  $p < 0,02$ ; 1000 ng/mL LPS:  $p < 0,02$ ).

A kontrollok és az SLE-s betegek monocytáinak CD14-függő aktivációját az LPS kötéshez hasonló módon határoztuk meg a sejtek által termelt TNF $\alpha$  mérésével. A kontroll csoporthoz viszonyítva a pulzus, illetve a kis dózisú szteroid kezelésben részesült betegek LPS-indukálta TNF $\alpha$  termelése alacsonyabb volt, de ez az eltérés csak a pulzus terápiában részesültek esetén volt szignifikáns. Ha a terápia előtti és utáni értékpárokat Wilcoxon teszttel hasonlítottuk össze szignifikáns különbséget tapasztaltunk a monocyták pulzus terápia előtti és utáni CD14-függő TNF $\alpha$  szekréciójában (10 ng/mL LPS:  $p < 0,05$ ; 1000 ng/mL LPS:  $p < 0,04$ ).

## 5.2. 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 meglehetősen nagy, és ebbe a csoportba sorolhatóak a plazmában magas, közepes és alacsony koncentrációban előforduló molekulák is. Vizsgálataink során ismert és újabb molekulák, akut fázis fehérjék (CRP, PCT, LBP, sCD14), specifikus autoantitestek (ANCA), tumormarkerek (HE4, CA 125, TPA, CEA, Cyfra 21-1, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, TK, NSE) és a sclerostin csontanyagcsere marker 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. Végül egy új, plazma proteom profilozására alkalmas rendszer (QP300) analitikai és klinikai tesztelését taglaljuk.

### **5.2.1. A szérumban sCD14 koncentrációjának mérése különböző immunpatomechanizmusú kórképekben**

A korábban tárgyalt membrán-expresszált 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, 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. Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy bizonyos immunpatomechanizmusú kórképekben mutat-e változást a szérumban sCD14 szintje.

#### *5.2.1.1. Atópiás dermatitis*

Az AD-s betegek esetében 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. 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 (AUC=0,690), míg az extrinsic AD vs. kontroll összevetés valamivel nagyobb effektivitást mutatott (AUC=0,731).

#### *5.2.1.2. Poly- és dermatomyositis*

A PM-es és a DM-es betegcsoportokat összevetve nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és a kontrollok szérumban sCD14 koncentrációiban ezért a későbbiekben az összes myositises beteget egy homogén – PDM elnevezésű - betegcsoportba vontuk össze.

Ezt követően a betegeket két csoportra osztottuk betegségük aktivitása alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy a sCD14 koncentráció szignifikánsan magasabb volt az aktív betegekben, mint az inaktív betegekben vagy a kontrollokban. 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 LDH aktivitás között szignifikáns korrelációt tudtunk kimutatni.

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). Ugyanakkor az aktív és inaktív PDM-es betegek megkülönböztetésében igen jó hatékonyságot mutatott (AUC=0,802).

#### *5.2.1.3. Szisztémás lupus erythematosus*

A sCD14 mérése 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 szérumsCD14 koncentráció  $1.904 \pm 411$  ng/mL volt, és a férfiak ( $1.897 \pm 336$  ng/mL,  $n=29$ ) és nők ( $1.912 \pm 495$  ng/mL,  $n=24$ ) értékei nem mutattak szignifikáns ( $p < 0,9$ ) különbséget. Az új, áramlási citometriás módszerrel kapott eredmények alapján a betegek sCD14 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a kontrollokénál. Az ELISA-val nagyon hasonló sCD14 szinteket mértünk, a két módszer jól korrelált egymással ( $R=0,92$ ). Annak ellenére, hogy a vizsgálati csoportok mintaszáma alacsony volt az elvégzett ROC analízis alapján a sCD14 mérés diagnosztikus ereje jelentős volt ( $AUC=0,838$ ).

### **5.2.2. Akut fázis fehérjék vizsgálata a májcirrhosishoz társuló fertőzések diagnosztikájában**

A cirrhosishoz társuló fertőzések jelentősen fokozzák a cirrhosis mortalitását, amit a fertőzés által indukált súlyos szövödmények (dekompenzáció, varix vérzés és egyéb vérzéses szövödmények, 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. Vizsgálatunk során rutinszerűen használt és kevésbé frekvenciált akut fázis fehérjék diagnosztikus hatékonyságát vizsgáltuk meg a cirrhosishoz társuló infekciók kimutatásában.

#### *5.2.2.1. Az AFF-k szintjének alakulása a fertőzöses és fertőzés nélküli betegek csoportjában*

A vizsgálatba bevont 368 cirrhosisos beteg közül 139 esetében alakult ki bakteriális infekció. A fertőzöses és fertőzés nélküli betegek összehasonlítása során egyértelmű volt, hogy a fertőzések jelenlétében szignifikánsan magasabbak a CRP ( $p < 0,0001$ ), PCT ( $p=0,019$ ) és LBP ( $p < 0,0001$ ) szintek. Ugyanakkor a két csoport sCD14 szintje között nem volt szignifikáns különbség. Az egyes markerek közötti összefüggést megvizsgálva pozitív korrelációt ( $R=0,23-0,62$ ;  $p < 0,003-0,0001$ ) találtunk a PCT, LBP, sCD14, FVS szám, abszolút PMN szám és a CRP szintek között a fertőzött betegcsoportban.

#### *5.2.2.2. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrhosishoz társuló fertőzések kimutatásában*

ROC analízissel is megvizsgáltuk, hogy a tesztelt AFF-k 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 ( $AUC=0,930$ ), ami a PCT esetében ( $AUC=0,840$ ) már valamivel alacsonyabb értéket mutatott, míg a többi AFF esetében a tesztek diszkriminatív ereje jóval gyengébb volt (LBP –  $AUC=0,670$ ; sCD14 –  $AUC=0,570$ ). Az eredmények alapján a szérumsCD14 mérés nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására cirrhosisos betegekben. A CRP viszont érzékeny markernek tűnik, és különösen a PCT szint meghatározásával kombinálva a bakteriális infekciók detektálásának érzékeny markere lehet.

### *5.2.2.3. 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 fertőzöses és fertőzésmentes betegek mintáit összevetve - a Child A, B és C stádiumú betegcsoportokon. A ROC-AUC alacsonyabb volt a Child B (AUC=0,910) és C (AUC=0,870) csoportban a Child A (AUC=0,970) csoport eredményéhez képest, és az ascites jelenléte is rontotta a CRP hatékonyságát.

### *5.2.2.4. 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. Ugyanakkor sem az LBP, sem a sCD14 koncentrációjában nem volt szignifikáns különbség az egyes Child csoportok között, illetve az ascites-pozitív és -negatív betegek esetében.

### *5.2.2.5. 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 alacsonyabb CRP koncentráció esetén mind a 3, mind a 12 hónapon belüli infekció kialakulásának valószínűsége kisebb volt a magasabb CRP-vel bíró esetekhez képest. 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).

## **5.2.3. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrhosisos 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 cirrhosisos betegek esetében az átlagosnál jóval gyakrabban alakulnak ki ilyen fertőzések, (gyakran minimális klinikai tünetekkel), ezért valószínűnek tűnt, hogy ezek az antitestek a cirrhosisos betegek vérében is jelen vannak. Ezt vizsgáltuk meg részletesebben, és eközben teszteltük azt is, hogy ezek az antitestek mennyire lehetnek alkalmasak a cirrhosishoz társuló fertőzések kimutatására, illetve előrejelzésére.

### *5.2.3.1. Az ANCA-k előfordulásának gyakorisága cirrhosisban*

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. A fluoreszcens festődési mintázat különböző volt az IgA és IgG típusú ANCA-k esetében. Az IgA antitestek

jelenlétében 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%).

#### 5.2.3.2. Az IgA típusú ANCA további karakterizálása

A cirrhotikus betegekben tovább vizsgáltuk az IgA típusú ANCA jellemzőit. Egy kvantitatív indirekt immunfluoreszcens módszert használva meghatároztuk az IgA<sub>1</sub> és IgA<sub>2</sub> típusú ANCA-k arányát, és az IgA<sub>2</sub> típusú antitestek gyakorisága jelentősen emelkedett volt (46,2±8,5%) és csak minimálisan tért el az IgA<sub>1</sub> ANCA arányához képest. A szekretoros komponens pozitív ANCA a cirrhotikus betegek 86,8%-ban volt kimutatható. Ez megint sokkal magasabb, mint az egészséges egyének vérében a sIgA aránya (1%).

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 cirrhotikus betegekben detektált IgA típusú ANCA-k eltérő antigén specificitást mutatnak a klasszikus ANCA mintázatokhoz viszonyítva.

#### 5.2.3.3. Az ANCA és a klinikai paraméterek összefüggése

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

#### 5.2.3.4. 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 esetben is. A fertőzésekkel összefüggésbe hozható legfontosabb klinikai paraméterek a cirrhotikus előrehaladottsága (Child C, ascites jelenléte), hepatikus encephalopathia és a kísérő betegségek jelenléte volt.

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. Az IgA

ANCA pozitívnak is hasonló hatása volt a két éves követési periódus során. Az IgA ANCA és az infekciók kialakulásának összefüggését Cox regressziós modell alapján is analizáltuk, és az IgA antitestek jelenléte független prediktora volt a fertőzések megjelenésének (a nem, Child score és kísérő betegségekre való korrekció után is) ( $p=0,006$ ).

#### **5.2.4. A HE4 tumormarker vizsgálata tüdő tumoros betegek szérumban**

A tüdő tumor a világon a második/harmadik legnagyobb incidenciájú rosszindulatú daganat, ami az összes daganatos megbetegedés 16,5%-át jelenti, és vezető a daganatos halálozások között is. 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. Ezért új, jobb diagnosztikus hatékonyságú paraméterek azonosítása feltétlenül kívánatos. Az egyik ilyen lehetséges új alternatíva a Human epididymis protein 4 (HE4), amely az ovárium 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 az ovárium 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 szérumban 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. A HE4 összefüggést mutatott a vesefunkciót jelző eGFR-rel is (Spearman's  $\rho= -0,278$ ,  $p=0,005$ ) a kontrollokban, jelezve hogy a veseműködés hatékonyságának minimális csökkenése is emelheti enyhén a HE4 szérumban koncentrációját. Szignifikánsan emelkedett volt a HE4 koncentráció a jelenleg dohányzó kontrollok szérumban. Ezek a hatások nem befolyásolták a HE4 koncentrációt a tüdő tumoros betegek esetében.

A tüdő tumoros betegek és a megfelelően illesztett kontrollok adatait összevetve szignifikánsan ( $p<0,001$ ) emelkedett HE4 értékeket tudunk a betegek szérumban kimutatni. Az analízist elvégezve az összes zavaró tényezőre való korrekciókkal szintén szignifikáns ( $p=0,001$ ) különbség volt a 2 csoport szérumban HE4 koncentrációjában.

A HE4 diszkriminatív erejének (összes tumoros beteg vs. egészséges kontrollok) jellemzésére ROC analízist végeztünk. A HE4-hez tartozó ROC görbe alatti terület 0,848 volt; a legjobb cut-off érték (97,6 pmol/L) mellett a szenzitivitás 64,3%, a specificitás 95,9%-nak adódott. A CEA, TPA és Cyfra 21-1 szenzitivitása hasonló vagy jobb volt, mint a HE4-é, a

specifitásban nem volt lényeges különbség a HE4 és a többi marker között. A HE4 értékek az NSE kivételével valamennyi tumormarkerrel szignifikánsan korreláltak.

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 kontrollokhöz viszonyítva, és még magasabb értékeket mutatott a II., III. és IV. stádiumban. Szignifikáns korreláció volt a tumor CT/MRI-vel meghatározott mérete és a HE4 koncentráció között is.

A szérumban HE4 szint a tüdődaganat minden szövettani típusában szignifikánsan magasabb értéket mutatott az egészséges kontrollokhöz képest, de az egyes szövettani típusok között nem volt szignifikáns különbség. A betegek túlélési adatait analizálva úgy tűnt, hogy a diagnóziskor mért magas HE4 (>97,6 pmol/L) értéknek nincs prognosztikai jelentősége.

A laboratóriumi diagnosztika viszonylag új irányvonala több egyedi marker kombinálása és konvertálása egyetlen hatékonyabb paraméterre. Bináris logisztikus regressziót használva a legjobb szenzitivitást és specificitást a HE4+CEA+CA 125 kombinációja adta, különösen az I-II. stádiumú betegek esetében (AUC=0,927; szenzitivitás: 80,0%, specificitás: 92,9%).

#### **5.2.5. 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 szérumban 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 felszínén. A CEA mellett számos további tumormarker (CA 15-3, CA 125, CA 19-9) tartalmaz nagyméretű szénhidrát komponens is, és funkcionálhat adhéziós molekulaként. Ráadásul több ilyen tumormarker is kimutatható volt különböző típusú autoimmun betegségekben. Miután RA-s betegek mintáiban nem történt még ilyen jellegű vizsgálat, munkánk célja az említett tumormarkerek pozitívitásának és koncentrációjának összehasonlítása volt RA-s betegek és egészséges kontrolljaik között.

A tumormarker koncentrációkat összevetve szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) több RA-s beteg rendelkezett pozitív értékekkel a kontrollokhöz képest a CA19-9 (8,1% vs. 0%), a CA 125 (10,8% vs. 7,1%) és a CA 15-3 (17,6% vs. 14,3%) ( $p < 0,05$ ) esetében. A CA19-9 és CA 125 szérumban koncentrációk a betegekben szignifikánsan magasabbak voltak ( $p < 0,05$ ). 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, a CEA a reumafaktorral (RF), a RF az anti-CCP-vel és a CRP-vel függött össze szignifikánsan.

### **5.2.6. 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, 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.

#### **5.2.6.1. Sclerostin szintek 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 szint mérése a csontanyagcsere jellemzésének ígéretes, új paramétere.

Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a teljes populációt (194 egészséges férfi) vizsgálva szignifikáns korreláció volt a sclerostin szint és az életkor, a cystatin C, a femur nyakon, illetve a lumbális csigolyákon mért csontdenzitás, továbbá a szérum kreatinin koncentráció és az eGFR között. Multivariancia lineáris regressziós analízist végezve is hasonló eredményt kaptunk, a szérum sclerostin szint szignifikáns előrejelzői az életkor és a cystatin C voltak.

Az életkor befolyásoló hatását kiküszöbölendő a populáció medián életkora alapján 2 csoportot képeztünk: 59 évnél fiatalabb és öregebb férfiak. Az idősebb férfiak esetében szignifikánsan magasabb szérum sclerostin, cystatin C és alacsonyabb eGFR szintet mértünk, és csak ebben a csoportban volt szignifikáns korreláció a szérum sclerostin és az életkor, illetve a cystatin C szint között. Egy regressziós modellbe építve az életkor és a cystatin C hatását csak a cystatin C volt a szérum sclerostin 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 szérum sclerostin szint összefüggést mutatott a csontdenzitással is, de csak a lumbális csigolyán mért értékekkel. A normál LS-BMD-vel (T score  $> -1,0$ ) rendelkező egyének szérumában szignifikánsan magasabb sclerostin szintet mértünk, a csökkent LS-BMD-jű (T score  $\leq -1,0$ ) csoporthoz képest. Még kifejezettebb volt a különbség, ha a normál LS-BMD-jű csoporton belül az idősebb és középkorú férfiakat hasonlítottuk össze.

### 5.2.7. A plazma proteom jellemzésére használható új mAb-alapú array 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 összehasonlítható betegcsoport mintáin, és azokat választjuk ki, amelyek a leghatékonyabban tesznek különbséget a két vizsgált csoport között.

#### 5.2.7.1. A QP300 array analitikai tesztelése

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. 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.

A kísérletek első részében a biotinnal jelölt plazmát („tracer”) inkubáltuk önmagában a chipen – sem kontroll, sem beteg plazma nem volt jelen a rendszerben. Az így kapott maximális jelintenzitás az RLUMax. Az inter-assay variabilitást 56 kísérlet során mért egyedi RLUMax értékekből számoltuk. A CV% 105/290 mAb esetében volt 20%-nál nagyobb. Kritikus értékelésnek alávetve az eredményeket bizonyos chipen egyes kísérletekben a chipen lévő szinte valamennyi mAb esetében kiugró eredményeket adtak az 56 mérés RLUMax átlagához viszonyítva. Az 56 QP300 kitben lévő 1008 chipből összesen 26 ilyen chipet azonosítottunk. Feltételezve, hogy ezek a chipen a gyártás során nem megfelelően lettek elkészítve, az ezek által generált valamennyi adatot kiejtettük az analízisből ("outlier"-ek). Ezek után a CV% csak 38 mAb esetben haladta meg a 20%-ot. A lotok közötti variabilitást két azonos időben készült, de eltérő sorozatszámú QP300 kit esetében vizsgáltuk. Az átlagos RLUMax értékek az 5068 (n=56) és 5263 (n=13) számú sorozatok között nagyon hasonlóak voltak, ( $R = 0,998$ ). Három antitest esetében volt kisebb eltérés a két lot között.

Egészséges kontrollok egyedi mintáit összemérve egy kontroll poolt készítettünk, majd ennek aliquotjait használtuk fel a QP300 kit analitikai validálásához. Minden kísérletben a 300x-os mintahígításhoz tartozó RLU/RLUMax%-ot határoztuk meg. Az inter-assay (n=10) CV% 44/290 mAb esetében volt 20% feletti. Kritikus értékelésnek alávetve az eredményeket egyetlen chip egy kísérletben a chipen lévő szinte valamennyi mAb esetében kiugró eredményeket adott a 10 mérés RLU/RLUMax% átlagához viszonyítva. Feltételezve, hogy ez a chip a gyártás során nem megfelelően lett elkészítve, az ezen chip által generált valamennyi adatot kiejtettük az analízisből. Ezt követően a CV% 37 mAb esetben haladta meg a 20%-ot.

### 5.2.7.2. Tüdőtumoros betegek és kontrolljaik egyedi mintáinak összevetése a QP300 kittel

Az analízis során azt vizsgáltuk meg, hogy a QP300 biomarkerek, a klasszikus tumormarkerek, valamint az albumin, totál protein és a CRP képesek-e önmagukban vagy egymással kombinálva a tüdőtumoros betegek és egészséges kontrollok megkülönböztetésére. A vizsgálatban 46-46 korban, nemben és dohányzási szokásokban illesztett beteg és kontroll vett részt.

Az analízis első lépésében a tumormarkerek diszkriminatív erejét vizsgáltuk meg, önmagukban. Az elvégzett ROC analízis alapján a HE4 (AUC=0,835), TPA (AUC=0,809) és CA 125 (AUC=0,807) markerek ROC görbealatti területei voltak a legnagyobbak. A CRP, albumin és totál protein diszkriminatív erejét megvizsgálva a CRP a HE4-hez hasonló eredményt adott (AUC=0,830), a másik 2 marker ennél alacsonyabbat.

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 (AUC=0,924): a betegek és kontrollok 89,0%-át azonosította helyesen.

A következő lépésben a QP300 kit biomarkereit vizsgáltuk meg. A 8 - kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney U teszttel - legjobban teljesítő markert vittük egy bináris logisztikus regressziós modellbe és az ennek eredményeként kapott új paraméter rendkívül hatékonynak bizonyult (AUC=0,945): a vizsgálatban résztvevő személyek 83,8%-át azonosította helyesen. 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 volt.

A 290 BSI markerből az önmagában legjobban teljesítők kiválasztására a klasszikus statisztikai módszerek mellett egy másik metódust is kipróbáltunk. Random forest analízissel állítottuk sorrendbe az egyes antitesteket. 1000 döntési fa analízise után a 8 legjelentősebb markert 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 volt.

## 5.3. GENETIKAI MARKEREK

### 5.3.1. Az FLT3-ITD tesztelésére alkalmas módszer beállítása és validálása

Az FLT3 gén 14-15. exonját és a köztük 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 a két említett numerikus paraméter meghatározása is fontos. 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 3 módszer - PCR-t követő agaróz vagy poliakrilamid vagy kapilláris elektroforézis - analitikai tulajdonságait és hatékonyságát vetettük össze.

#### *5.3.1.1. Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban 3 különböző elektroforetikus módszerrel*

Az FLT3-ITD kimutathatóságát 73 AML-es felnőtt beteg 95 darab DNS mintájában vizsgáltuk meg. A három módszer diagnosztikus érzékenysége hasonlóan adódott, bármelyik segítségével 18 beteg 20 mintájában sikerült pozitivitást kimutatni. Alapvetően mindhárom módszer képes volt az FLT3-ITD pozitívitás azonosítására, azonban különbség volt az eredményekben a mutáns allélek számát, méretét és intenzitását illetően.

#### *5.3.1.2. Az elektroforetikus rendszerek reprodukálhatóságának vizsgálata*

Két ITD-pozitív mintát használtunk a vizsgálathoz. A B35 mintára - a vad allélra jellemző 331 bp-os csúcs mellett - egy nagy és egy alig látható kisebb mutáns csúcs volt jellemző 387 és 339 bp-nál. A B80 mintánál - a vad allélra jellemző 331 bp-os csúcs mellett - egy nagy és egy nagyon kis intenzitású mutáns csúcsot láttunk 355 és 398 bp-nál CE segítségével.

A PCR termékek méretéből kalkulált intra- és inter-assay CV% rendkívül alacsony volt (<0,2%). Az ITD mérete szintén jó reprodukálhatóságot mutatott (intra- és inter-assay CV% <1%, ill. <2%) ha az ITD nagyobb volt, mint 24 bp. A B35 minta ITD1 esetében kisebb, 9 bázispárnyi inzerciót észleltünk, relatíve nagyobb intra- és inter-assay CV%-kal (7 és 11%).

A mutáns/vad-típusú, illetve mutáns/összes allél hányados reprodukálhatósága már változatosabb képet mutatott. 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% 10-14%-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 allélról 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.

#### 5.3.1.3. 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 mixeket az FLT3 PCR-rel amplifikáltuk. A domináns mutáns allél kimutatható volt 1-2%-os hígításnál mind az AGE, mind a PAGE segítségével, 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. 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 (mutáns/összes allél, illetve mutáns/vad típus) detektálási limitjét.

#### 5.3.1.4. Az elektroforetikus rendszerek felbontásának vizsgálata

Megvizsgáltuk a három elektroforézis rendszer maximális felbontását is. A B114 mintában a vad és mutáns allél PCR termékének 9 bázispárnyi különbségét mindhárom módszer ki tudta mutatni. Ugyanakkor a B147 minta esetében a 370 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.

#### 5.3.1.5. A CE-vel, illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása

Jól ismert tény, hogy az ITD minden esetben olvasókeret eltolódást nem okozó „in-frame” genetikai elváltozás. 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. 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 ( $\text{Méret}_{\text{szekvenálással}} = 1,07 \times \text{Méret}_{\text{CE}} + 0,5$ ).

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. A tesztelt biomarkerek alkalmazásával nyert lényeges tapasztalatok, a biomarkerek és felhasználásuk legfontosabb szempontjai

#### 6.1.1. *Immunológia mechanizmusú betegségek*

Korábbi munkáinkban a monocytákon lévő CD14 molekula expresszióját, funkcióját és sheddingjét vizsgáltuk részletesen egészséges egyének mintáiban, így logikusnak tűnt, hogy ezeket a paramétereket 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, ami hatással lehet 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 ismertén fogékonyabbak bizonyos bőrfertőzésekkel szemben, és az atópiás bőrben kialakuló ismétlődő lokális infekciók háttérében több faktor is állhat: a bőr integritásának sérülése, a defenzinek és egyéb antimikrobiális molekulák csökkent termelése vagy a monocyta/macrophag rendszer aktivitásának zavara. Eredeti hipotézisünk szerint az ezen utóbbi sejtek felszínén lévő mintázatfelismerő receptorok csökkent expressziója is szerepet játszhat ebben a változásban. Eredményeink azonban nem igazolták ezt a feltevést, a granulocyták CD14-expressziója magasabb volt a kontrollokhoz képest, míg a monocyták esetében nem volt számottevő különbség. Sokkal valószínűbb tehát, hogy a mintázatfelismerő receptorok expresszió változása nem oka, hanem sokkal inkább következménye az ismétlődő bakteriális infekcióknak AD-ben. Érdekes módon a szérumban sCD14 koncentrációja csökkenést mutatott az AD-s betegek mintáiban. Az újonnan szintetizálható CD14 molekulák - a bakteriális stimuláció hatására - vélhetően nagyobb arányban kerülnek ki a sejtmembránba, és kevésbé szekretálódnak, továbbá csökkenhet a felszíni CD14 molekulák leválása (sheddingje) is. 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, ráadásul nem az összes beteg és a kontrollok, hanem az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között. Az aktív betegek CD14-expressziója csökkent és a sCD14 szintje emelkedett, ráadásul 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 betegség aktivitás markere lehet ebben a betegségcsoportban.

Az SLE-s betegek esetében a sCD14 szint mérésére alkalmas új, áramlási citometriás módszer beállítása során egy random szelektált, heterogén betegcsoport sCD14 szérumszintjét hasonlítottuk egészséges kontrollok értékeihez, és szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk. Hasonló eredményeket mutattak be Nockher és mtsai is, bár magasabb sCD14 értékekről számoltak be. Ezt részben technikai okok részben a betegcsoportok összetételében és méretében lévő különbség magyarázhatja. A második SLE-s vizsgálatban a kortikoszteroid terápia hatását vizsgáltuk meg az SLE-s monocyták CD14-expressziójára. Számottevő változást a sejtfelszíni CD14-expresszióban csak pulzus szteroid kezelés esetében tapasztaltunk, hasonlóan két korábbi vizsgálatához. Más szerzők, ugyanakkor, nem észleltek ilyen változást. A különbségeket egyrészt a mCD14 detektálás technikájában lévő különbségek magyarázhatják, másrészt az alkalmazott *in vivo* szteroid kezelés dózisa és időtartama közötti eltérések állhatnak ennek hátterében. A pulzus szteroid terápia során az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expresszió csökkenését egyértelműen kísérte az LPS-kötő képesség és az LPS-indukálta TNF $\alpha$  szekréció csökkenése. Ezek a változások a monocyták immunreaktivitásának redukcióját jelzik, és ez egy potenciális faktora lehet a szteroid kezelés immunszuppresszív hatásának. Mindezek alapján tehát, a sejtfelszíni CD14-expresszió és a szérumsCD14 mérése akár az SLE diagnosztikáját segíthetik, vagy a betegek követése során a terápiára adott válasz megítélésben lehetnek hasznosak.

### **6.1.2. Tüdőtumor**

Az elmúlt néhány évben két tanulmányunkban is foglalkoztunk a tüdőtumor kimutatására alkalmas új markerek azonosításával. Ez nem véletlen, ugyanis, mind a mai napig incidenciáját tekintve a tüdőtumor a második/harmadik leggyakoribb rosszindulatú daganatos betegség világszerte, és a daganatos halálozás arányát tekintve pedig listavezető. Különösen szomorú az, hogy ha az országok rangsorát nézzük Magyarország áll az első helyen. 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, és ekkor 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 daganat felismerhető.

A klinikai gyakorlatban jelenleg első helyen álló szűrőteszt az alacsony dózísú mellkas CT (LDCT) vizsgálat, melyet 2015. eleje óta financiálisan is támogatják a biztosítók az Egyesült Államokban. Az Európai Unió és így Magyarország sem implementálta egyelőre az amerikai gyakorlatot, a döntéshozók nagy európai study-k eredményeire várnak. Az LDCT szűréssel kapcsolatban felmerült egyik probléma a fokozott sugárterhelés kérdése, a másik - sokkal

súlyosabb - kifogás a nagyon magas fals pozitivitás. Ennek a problémának a megoldása többféleképpen is történhet. Mindenképpen lehet optimalizálni az LDCT tesztet különösen annak kiértékelését, de egy másik potenciális lehetőség olyan biomarkereknek az azonosítása, amelyek önmagukban vagy az LDCT szűréssel kiegészítve még specifikusabban és szenzitívebben azonosítják a tüdő tumoros betegeket a vizsgált egészséges populációban.

A jelenleg rutinszerűen alkalmazott szérumban tumormarkerek önmagukban nem alkalmasak a tüdő tumoros betegek szűrésére sokkal inkább a betegek követésére, a terápia hatékonyságának jelzésére, recidíva kimutatására használhatók. Saját vizsgálataink is azt mutatták, hogy az ovárium tumor diagnosztikájában alkalmazott HE4 jó hatékonysággal különíti el a tüdő tumoros férfiakat a kontrolloktól, de ez elsősorban a késői III.-IV. stádiumú betegek esetében igazán hatékony. Jelentősen javította a teszt teljesítményét, az I.-II. stádiumú tüdő daganat esetében is, ha a HE4-t a CEA-val és a CA 125-tel kombináltuk egyetlen paraméterre bináris logisztikus regresszióval. Ez a fajta megközelítés - kompozit score-ok képzése az egyedi paraméterekből - biztosan a jövő útja. A jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő assay-k (a 20/20 Genesystem PAULA tesztje, a Somalogic SomaScan detektáló rendszere és az Oncimmune EarlyCDT-Lung szérumban tesztje) alkalmazzák is ezt a metodikát. 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. Ezek az eredmények egy potenciális korai tüdőrák diagnosztikum alapjait vethetik meg.

Az előző bekezdésben felsorolt elsősorban proteomikai megközelítésű assay-k mellett természetesen gyorsvonati sebességgel fejlődnek a genetikai tesztek is. Az új generációs szekvenálási technikák árának csökkenése és széles körű elérhetővé válása tette lehetővé pl. a "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) létrejöttét, ami hatalmas mennyiségű információt tartalmaz a legkülönbözőbb típusú daganatokról.

### **6.1.3. Cirrhosis**

A cirrhosis a máj különböző etiológiájú krónikus megbetegedéseinek lehet az eredménye, melynek során a parenchyma hegszövétté alakul át és a máj funkciói jelentősen beszűkülnek. A cirrhosis egyik leggyakoribb komplikációja a különböző bakteriális fertőzések kialakulása, melyek indukálhatják a többi szövődmenyt is, ráadásul felismerésük sem egyszerű. 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 leghatékonyabbnak a CRP mérése bizonyult: 10 mg/L határértékkel, már önmagában is érzékeny markere volt a bakteriális fertőzéseknek, míg a CRP kombinálása a PCT meghatározásával némileg emelte a diagnosztikai pontosságot, 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 ascites jelenlétében. A CRP a bakteriális infekciók kialakulásának prognosztikai markerei is volt. A CRP, mint a bakteriális fertőzések jellemző paramétere már jó ideje ismert, még cirrhotikus betegek esetében is. 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. Saját vizsgálatunk legnagyobb előnye, hogy a korábbi eredményeket jóval kisebb betegcsoportok tesztelésével kapták, ráadásul ezekben domináltak a súlyos bakteriális infekciók (SIRS, szepszis), míg a mi fertőzőes betegcsoportunk sokkal inkább a mindennapos klinikai eseteket reprezentálja.

A vizsgálatok második részében az ANCA előfordulását vizsgáltuk cirrhotikus betegek mintáiban és - elsőként az irodalomban - megmutattuk, hogy fokozott az ANCA IgA előfordulása és szérumszintje ebben a betegcsoportban a kórkép etiológiájától függetlenül. A magasabb totál IgA - és hasonlóan az ANCA IgA - pozitivitás és koncentráció oka pontosan nem ismert ezekben a betegekben, azonban a gastrointestinalis traktus szerepe nagyon valószínű. Tudván, hogy a cirrhotisra fokozott bakteriális transzlokáció jellemző és a bakteriális eredetű molekulák keresztreakálhatnak bizonyos granulocita antigénnel hipotézisünk szerint a szérumban kimutatott IgA ANCA antitestek alapvetően béltraktus eredetűek. Ezt hivatott igazolni az IgA szubtipizálás, ugyanis a csökkent IgA<sub>1</sub>/IgA<sub>2</sub> antitest arány, illetve a szekretoros komponens jelenléte az IgA szekréció mucosalis eredetének elfogadott markerei. Eredményeink igazolták elképzelésünket, az ANCA IgA<sub>2</sub> 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 Guillon-Barre szindróma esetében. 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 számottevő gyakorisággal fordult elő a betegekben, ami azt jelzi, hogy a cirrhotishoz társuló ANCA IgA kialakulásának hátterében több különböző ritkább antigén is állhat.

#### **6.1.4. Csontanyagcsere betegségek**

A postmenopausában lévő nők csontstátusza és az ezzel összefüggő csonttörések kockázata több tanulmány tárgya volt már, 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 csontanyagcsereben szerepet játszó hormonok és a csontmetabolizmus biokémiai markereinek szintjét és BMD mérést végeztünk. 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. A mérések értékelése során azt tapasztaltuk, hogy a szérumban lévő sclerostin szintet elsősorban a résztvevők biológiai tulajdonságai (életkor és vesefunkció) befolyásolják, ezért ezeket az eredményeket a 6.3. fejezetben diszkutáljuk a dolgozatban szereplő hasonló megfigyelésekkel együtt.

#### **6.2. Biomarker tesztek analitikai validálása**

Ahogy a Bevezetés 1.3. 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 Bevezetésben ismertetett szinte valamennyi kontroll teszt elvégzésére. 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, átszenyeződés, linearitás és a mérési eredmény időbeli változása a vizsgálandó paraméterek. A doktori értekezésben több új assay fejlesztése szerepel és ezeket is próbáltuk - a lehetőségekhez képest - az itt leírtaknak megfelelően tesztelni. A sCD14 szintet mérő áramlási citometriás módszer esetében különböző anti-CD14 és detektáló antitesteket teszteltünk, intra- és inter-assay CV% meghatározás, és torzítás vizsgálat is történt. Emellett a módszer lineáris tartományát, és a versengő "tracer"-nek használt monocyták számát teszteltük, és próbáltunk férfi/nő referencia tartományokat definiálni. A módszert több betegcsoporton is megvizsgáltuk ROC analízis segítségével.

A második példa az ANCA IgA alosztályainak meghatározására alkalmas, image-analízis alapú, kvantitatív metodika beállítása, ahol a fluoreszcencia intenzitást kalibrátor beadek segítségével fordítottuk le sejthez kötött antitestszámra. Itt az intra- és inter-assay CV% meghatározása történt meg, és egy másik módszerrel vetettük össze a kvantitálás 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<sub>max</sub>) és egy kontroll minta relatív jelintenzitásának (RLU/RLU<sub>max</sub>%) inter-assay és lotok közötti variabilitását tudtuk

meghatározni. A klinikai validálás tüdő tumoros betegek és egészséges kontrollok mintáinak összevetése alapján ROC analízissel történt, és a teszt meglehetősen hatékonynak bizonyult.

A molekuláris genetikai területe robbanásszerű változáson megy át, és egyre több teszt válik a rutin diagnosztika részévé is. Ezekre a vizsgálatokra - különösen a kvantitatív tesztekre - hasonló analitikai szabályoknak kell vonatkoznia, mint a klinikai kémia tesztekre. Ennek szellemében végeztük el az FLT3-ITD vizsgálatára alkalmas PCR + AGE/PAGE/CE metodikák analitikai tesztelését egy munkánkban. Igazán széles körű tesztelést a kapilláris elektroforézis esetében tudtunk végezni. Meghatároztuk a módszer numerikus paramétereinek intra- és inter-assay variabilitását, a mutáns/totál allél arány mérésének analitikai szenzitivitását, kvantitálási határát és dinamikus tartományát, valamint az ITD méret meghatározásának feloldását, míg ennek torzítását egy referencia módszerhez (DNS szekvenálás) viszonyítva értékeltük.

### **6.3. Preanalitikai faktorok és 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 forrásai sorrendben a preanalitikai majd a postanalitikai fázis, és legkevésbé maga a mérés elvégzése járul ehhez hozzá. Miután a preanalitikai fázisnak ilyen nagy jelentősége van, 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 az itt előforduló hibák felderítésére. Nagyon fontos ennek a fázisnak a standardizálása az új biomarkereket tesztelő klinikai study-k tervezése során is.

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 befolyásolhatják a mérési eredményeket, amit pl. specifikus referencia tartományok definiálásával lehet kezelni.

Saját vizsgálataink során is szembesültünk ezzel a biológiai variabilitásból adódó problémával. A HE4 tumormarker az egészséges kontrollokban egyértelmű életkor függést mutatott és a dohányzásnak, valamint a vesefunkció változásának is szignifikáns hatása volt. Hasonló összefüggést találtunk egy csontanyagcsere marker vizsgálata során is. Az 50 év feletti egészséges férfiak szérum sclerostin szintje számottevően nőtt az életkorral és vesefunkció beszűkülésével. A vesefunkció folyamatos kismértékű beszűkülése jellemző az életkor előrehaladásával, így az idősebb korban észlelt sclerostin szint emelkedés ezzel is összefügghet. Mindkét példa jól mutatja, hogy azok a markerek, amelyek kisméretűek (HE4 25 kDa, sclerostin 22 kDa), és eliminációjuk a vérből dominálón a vesén keresztül történik

érzékenyek a vesefunkció változásaira, ami mindenképpen figyelembe veendő értékelésük során.

A HE4 és egyéb tumormarkerek diagnosztikus alkalmazása során különböző nem-daganatos betegségek is okozhatnak differenciál diagnosztikai 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 CA19-9, CA 125 és a CA 15-3 szintje emelkedett lehet különböző szisztémás autoimmun kórképekben, míg saját vizsgálataink RA-ban mutattak hasonló eredményeket. A gyulladásos reakció sejtjei expresszálják ezeket az adhéziós molekulákat, ami elősegítheti szinovialis inváziójukat, ezzel együtt azonban a sejtekről leváló markerek megjelennek a keringésben. Nem véletlen tehát, hogy a tumormarker-pozitivitás alapján nem gondolhatunk automatikusan valamilyen daganat jelenlétére, hiszen a különböző benignus állapotok vagy szisztémás gyulladásos/autoimmun kórképek is állhatnak a marker emelkedés hátterében.

#### **6.4. A biomarker kutatás és a biomarkerek diagnosztikus alkalmazásának jövője**

A biomarker kutatás talán legdinamikusabban fejlődő területe a nagyáteresztő-képességű, egyidejűleg nagyszámú paramétert tesztelő "omikai" technológiák alkalmazása. A rutin diagnosztikában is jól alkalmazható eredmények elsősorban a genomikai vizsgálatok kapcsán láttak napvilágot, azonban a transzkriptomika, proteomika vagy a metabolomika is sok új és gyakorlati szempontból is jelentős eredményt adott már eddig is.

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 miniatürizálás irányába mutatnak. Idesorolhatók pl. az egy sejt transzkriptomikai vizsgálatok, amelyek egyetlen sejt génexpressziós változásait képesek jellemezni. Egy másik izgalmas terület a nanotechnológia alkalmazása. A különböző nanostruktúrájú felszínek, hatalmas felülettel bíró speciális tulajdonságú képletek, amelyek a különböző affinitás alapú assay-k érzékenységét több ezerszeresére is növelhetik. Ezek a nanostruktúrák alkalmasak lehetnek a proteomikai eljárások tisztítási lépéseinek modernizálására is. Végül akár a jelenleg használt laboratóriumi automaták kiváltására is képesek lehetnek, de legalábbis újgenerációs POCT készülékek alapját vehetik meg a legújabb mikrofluidikai technológiák ("lab-on-chip" rendszerek). A diagnosztikai folyamat minden lépése (minta előkészítés, reagenssel összemérés, reakció és detektálás) automatizáltan és miniatürizáltan a chip felületén történik meg.

Ahogy a Bevezetés 1.2. részében is taglaltuk az egyedi markerek önálló alkalmazása mellett egyre nagyobb teret kapnak a laboratóriumi diagnosztikában a markerkombinációk, illetve kompozit score-ok is. A score rendszerek kidolgozása a biomarker kutatás egyik legígéretesebb területe, és egyre több példa mutatja ezek alkalmazhatóságát a rutin klinikai gyakorlatban. Saját kísérletes eredményeink is igazolták ezt a tendenciát. A tüdőtumoros

beteg mintáiban a HE4 és további rutin tumormarkerek diagnosztikus hatékonyságát vizsgáltuk, és a logisztikus regresszióval egy képletbe hozott HE4, CEA és CA 125 hatékonyabban különböztette meg a betegeket és a kontrollokat, mint az egyedi markerek.

Végül úgy tűnik, hogy a biomarker felfedezések egyik fontos hajtóereje a személyre szabott medicina egyre nagyobb térhódítása lesz. Az adott terápiára eltérően reagáló betegek között meglévő biológiai eltérések közül azonosítanunk kell a terápia hatékonyságát valóban befolyásoló paramétereket, és diagnosztikai módszereket kell ezek kimutatására fejlesztenünk. Az amerikai Food and Drug Administration (FDA) felismerve a célzott terápiák alkalmazásához szükséges specifikus diagnosztikus tesztek jelentőségét kifejezetten szorgalmazza a terapeutikumok és a kísérő diagnosztikus tesztek párhuzamos fejlesztését, szabadalmaztatását és engedélyeztetését.

## 7. 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 fehérvérjék 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 IgA<sub>2</sub> alosztály emelkedett aránya és a magas szekretoros komponens pozitívitás 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 gyulladással járó megbetegedések közül RA-ban is pozitívítást 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 253 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, tüdő tumoros betegek és egészséges kontrollok elkülönítésére alkalmas hatékony paraméter állítható elő\*.*

*\*még nem publikált eredmények*

## 8. 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 cirrrosishoz 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 cirrrosisos betegek követése során alkalmazott labor diagnosztika 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 tüdőtumrok diagnosztikájának értékes, új paramétere lehet. Értékelésénél mindenképpen figyelembe kell venni, hogy az életkor, dohányzás és a vesefunkció beszűkülése növelheti a szérum szintjét.
- Az adhéziós tulajdonsággal bíró tumormarkerek (CA 19-9, CA 125, CA 72-4) a daganatos betegségek mellett az autoimmun gyulladással megbetegedések közül RA-ban is pozitívítást 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 profilozásának értékes új módszere, mely hatékonyan használható új, betegség-specifikus biomarkerek azonosítására. A 4 QP300 és egy klasszikus tumormarkert alkalmazó kompozit paraméterünk a tüdőtumor diagnosztikájának hatékony új paramétere lehet\*.*

*\*még nem publikált eredmények*



## 9. 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. Szöllösi, 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 elsőszerzős közlemény)  
*Clinical Immunology*, 2005;117:271-279. IF: 3,217
- 4., E. Szekanecz, C. Andras, Z. Sandor, **P. Antal-Szalmas**, 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. Besenyei, 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-Szalmas:** 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. Szerafin, M. Udvardy, J. Kappelmayer, **P. Antal-Szalmas:** 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. Altörjay, 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

## 10. TOVÁBBI TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

### 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- $\gamma$ ) 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. Szekanez, S. Szántó, Z. Szabó, I. Kovács, A. Kulcsár, G. Lakos, M. Aleksza, **P. Antal-Szalmás**, S. Sipka, Gy. Szegedi: Biokémiai és gyulladáshoz kapcsolódó markerek vizsgálata reumatoid 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. Szücs, 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. Szücs, 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 systemic 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**, MJ. 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. Schlamadinger, 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 sejt számának 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, JL. 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., PL. Lakatos, LS. Kiss, K. Palatka, I. Altorjay, **P. Antal-Szalmás**, E. Palyu, M. Udvardy, T. Molnár, 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. Altörjay, P. Sáy, **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. Újfalusi, 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. Rész, 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. Altörjai, 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. Altörjai, 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-Szalmas**, 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-Szalmas**, 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. Szekanez, 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-Szalmas**: Molecular genetic diagnosis of inherited metabolic disorders. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 9-18.
- 7., **Peter Antal-Szalmas**: Laboratory informatics. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 75-82.
- 8., **Peter Antal-Szalmas**, Anna V. Oláh: Laboratory investigation of glomerular function. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 111-118.
- 9., **Peter Antal-Szalmas**, Kornel Miszti-Blasius: Urinalysis. Practicals in laboratory medicine, DEOEC ÁOK, angol nyelvű jegyzet, 2010, pp. 119-127.



## 11. SCIENTOMETRIAI ADATOK

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

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	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
<b>II. Könyv</b>	0	---	---	---
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
<b>b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	1	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>3</sup></b>	0	---	0	0
<b>Oktatási közlemények összesen (II.-III.)</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)<sup>4</sup></b>	<b>67</b>	<b>---</b>	<b>758</b>	<b>913</b>
<b>V. További tudományos művek</b>	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
<b>VI. Idézett absztraktok<sup>5</sup></b>	0	---	0	0
<b>Összesített impakt faktor<sup>4</sup></b>	<b>170,8</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>Idézettség száma<sup>1, 4</sup></b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>761</b>	<b>916</b>
<b>Hirsch index<sup>1</sup></b>	<b>18</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

## 12., 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, utrecht mestereimnek, akiktől a kutatás szeretét 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 és tüdőgyógyász 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 utrecht Eijkman Winkler Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden dolgozójának segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani Vargáné Földesi Rozikának, Tornai Dávidnak és Sümegi Andreának a doktori értekezés és téziszfüzet elkészítésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért.