

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az angiotenzin-konvertáló enzim és a kitotrioizidáz aktivitás optimalizált alkalmazása a szarkoidózis diagnosztikájában

Csongrádi Alexandra

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. <i>A szarkoidózisról általánosságban.....</i>	6
3.2. <i>A szarkoidózis epidemiológiai adatai</i>	6
3.3. <i>A szarkoidózis manifesztációja.....</i>	7
3.4. <i>A szarkoidózisban alkalmazott terápia</i>	9
3.5. <i>A szarkoidózis kialakulásában szerepet játszó predisponáló tényezők</i>	10
3.5.1. Környezeti tényezők.....	11
3.5.2. Genetikai tényezők.....	12
3.6. <i>A szarkoidózis immun-patomechanizmusa.....</i>	12
3.7. <i>A szarkoidózis autoimmun jellege</i>	14
3.8. <i>A szarkoidózis diagnosztikája</i>	15
3.9. <i>Potenciális biomarkerek a szarkoidózis diagnosztikában.....</i>	18
3.9.1. Az angiotenzin-konvertáló enzim	19
3.9.2. A kitotrioxidáz.....	21
4. Célkitűzés	23
5. Anyagok és módszerek.....	24
5.1. <i>Vizsgálati populációk</i>	24
5.2. <i>Szérum és DNS izolálása.....</i>	24
5.3. <i>ACE aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetikai módszerrel</i>	25
5.4. <i>Interferencia vizsgálatok.....</i>	26
5.5. <i>ACE genetikai polimorfizmusának vizsgálata.....</i>	26
5.6. <i>Szérum CTO aktivitás meghatározása</i>	26
5.7. <i>Szérum CTO koncentráció meghatározása</i>	27
5.8. <i>A CHIT1 gén duplikációs polimorfizmusának meghatározása</i>	27
5.9. <i>A CHIT1 gén direkt DNS-szekvenálása</i>	28
5.10. <i>A CHIT1 gén mutációk cisz-transz elhelyezkedésének vizsgálata</i>	28
5.11. <i>Statisztikai elemzés.....</i>	29
5.12. <i>Etikai engedély.....</i>	29

6. Eredmények	30
6.1. Az albumin-mediált endogén gátlóhatás megszüntetése	30
6.2. A hemolízis, ikterusz és a lipémia ACE aktivitásra kifejtett hatásainak vizsgálata .	31
6.3. Az ACE aktivitás I/D genotípus függő és független referencia tartományainak meghatározása	32
6.4. A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusának hatásai a CTO aktivitására és mennyiségére	34
6.5. A CHIT1 gén Del29 mutációjának azonosítása a magyar populációban	39
7. Megbeszélés	42
8. Összefoglalás	47
9. Summary	48
10. Hivatkozások	49
Saját közlemények jegyzéke	63
Tárgyszavak	65
Keywords	65
Köszönetnyilvánítás	66
Függelék	67

1. Rövidítések jegyzéke

ACE	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
CTO	kitotrioizidáz (chitotriosidase)
CHIT1	kitotrioizidáz gén (chitinase 1)
I/D	inzerció/delécio
Dup24	a kitotrioizidáz gén 24 bp nagyságú duplikációs mutációja
Del29	a kitotrioizidáz gén 29 bp nagyságú deléciós mutációja
bp	bázispár
FEV1	erőltetett kilégzési térfogat az első másodpercben (forced expiratory volume in 1 sec)
FVC	erőltetett vitálkapacitás (forced vital capacity)
TLR	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern)
PRR	mintázat-felismerő receptor (pathogen recognition receptor)
hsp	hő sokkfehérje (heat shock protein)
HLA	humán leukocita antigén
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
kDa	kilodalton
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
EF	ejekciós frakció
IL	interleukin

2. Bevezetés

A szarkoidózis több szervrendszert, de jellemzően a tüdőt érintő, ismeretlen eredetű granulomatózus megbetegedés, mely kortól, nemtől és etnikumtól függetlenül világszerte előfordul [1]. Az érintettek közel 50%-a tünetmentes, így gyakran rutin vizsgálat alkalmával a mellkasröntgenen megjelenő kétoldali nyirokcsomó megnagyobbodás ad okot a feltárására. A pontos diagnózis felállítása érdekében számos klinikai vizsgálat, köztük olyan invazív szöveti mintavétel elvégzése is szükséges lehet, mely jelentős terhet ró főként azon betegekre, akiknél nincs olyan granulóma mely mintavétel szempontjából könnyen és biztonságosan hozzáférhető [2].

Habár a felfedezése óta számos laboratóriumi tesztet fejlesztettek ki, azonban nem invazív, szarkoidózis specifikus labordiagnosztikai teszt továbbra sem elérhető. A szérumban angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitás az egyik leggyakrabban meghatározott biomarker, azonban a különféle tesztek specificitása és szenzitivitása igen változó [3]. Az ACE egy cink függő metalloproteináz enzim, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) egyik kulcsenzime. Az angiotenzin I aktív angiotenzin II-vé történő átalakulását katalizálja, ezáltal kiemelkedő szerepet tölt be az artériás vérnyomás, valamint a szervezet só-, és vízháztartásának szabályzásában. Aktivitását jelentősen befolyásolja az ACE gén inzerció/delécio (*I/D*) polimorfizmusa [4]. Szarkoidózisban az ACE-t a granulóma epitheloid sejtjei termelik, így aktivitása feltehetően arányos a szervezetben megjelenő granulómák számával [3].

A kitotrioizidáz (CTO) a kitin bontásában résztvevő hidroláz, melynek aktivitása szarkoidózisban – az ACE-val arányos mértékben – megnő [5]. A CTO aktivitását azonban a kitotrioizidáz gén (CHIT1) polimorfizmusai nagymértékben befolyásolják [6].

Az ACE és a CTO két potenciális biomarker a szarkoidózis diagnosztikájában. Kutatómunkánk során az ACE aktivitás meghatározásának optimalizálására, valamint az ACE és a CHIT1 gének polimorfizmusainak feltárására fókuszáltunk, mely közelebb vihet egy olyan laboratóriumi módszer kidolgozásához, mely alkalmas lehet a szarkoidózis vérből történő diagnosztizálására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A szarkoidózisról általánosságban

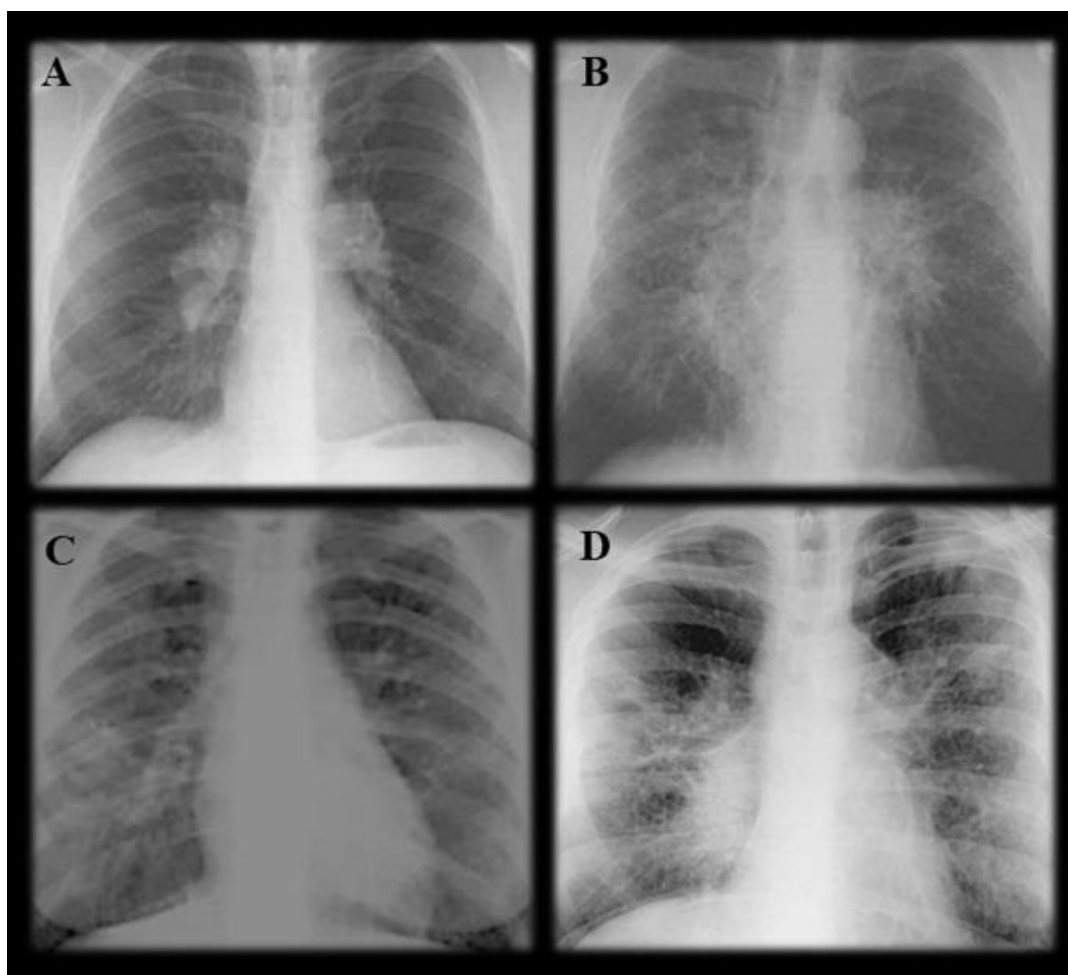
A szarkoidózis egy multiszisztémás gyulladásos megbetegedés, melyet a szervezetben, de elsősorban a tüdőben megjelenő nem nekrotizáló granulómák jellemeznek. Történelme egészen a 19. századig nyúlik vissza, amikor Jonathan Hutchinson angol sebész-bőrgyógyász 1877-ben, Londonban azonosította az első esetet [7]. A szarkoid kifejezést viszont 1899-ben Ceasar Boeck norvég bőrgyógyász használta először, mellyel a megjelenő jó indulatú léziókat a szarkómához hasonlította [8], [9]. Korai felfedezése ellenére azonban a szarkoidózis etiológiája a mai napig ismeretlen, melynek feltárását a betegség különböző megjelenési formái és multiszisztémás jellege nagyban megnehezíti. Feltételezések alapján a fokozott genetikai hajlam mellett bizonyos környezeti tényezők és antigénekkal történő expozíció, továbbá autoimmun folyamatok aktivációja együttesen járul hozzá a szarkoidózis kialakulásához [1].

3.2. A szarkoidózis epidemiológiai adatai

A szarkoidózis epidemiológiai adatainak leírása a tünetmentes betegek számának bizonytalanságából adódóan világszerte kihívást jelent. Gyakorisága a különböző földrajzi térségeken és etnikai csoportoknál jelentős eltérést mutat, incidenciája évente 1-64/100 000 eset közé tehető [1]. Megjelenése az afro-amerikaiaknál, különösen a nők körében [10], [11] és az észak-európai országokban a leggyakoribb [12], a kaukázusi népcsoportoknál mérsékeltebb [13], [14] míg az ázsiai országokban [15], [16] és spanyol térségben fordul elő a legritkábban [17], [18]. A szarkoidózis alacsony incidenciája ellenére gyakori az esetek családi halmozódása, kiváltképpen az afro-amerikaiaknál, mely alátámasztja a betegségre való hajlam örökölhetőségét [19], [20]. A szarkoidózis előfordulása nemcsak térség és etnikai csoport alapján változik, hanem a korosztály és nemek szerinti megoszlás is eltérő. Leggyakrabban a fiatal felnőtteket érinti és jellemző a női predominancia. Az esetek több mint 80%-a 20 és 50 év közötti, azonban a szarkoidózis gyakoriságát tekintve 50 és 65 év között egy második csúcs is megfigyelhető [11], [12], [21].

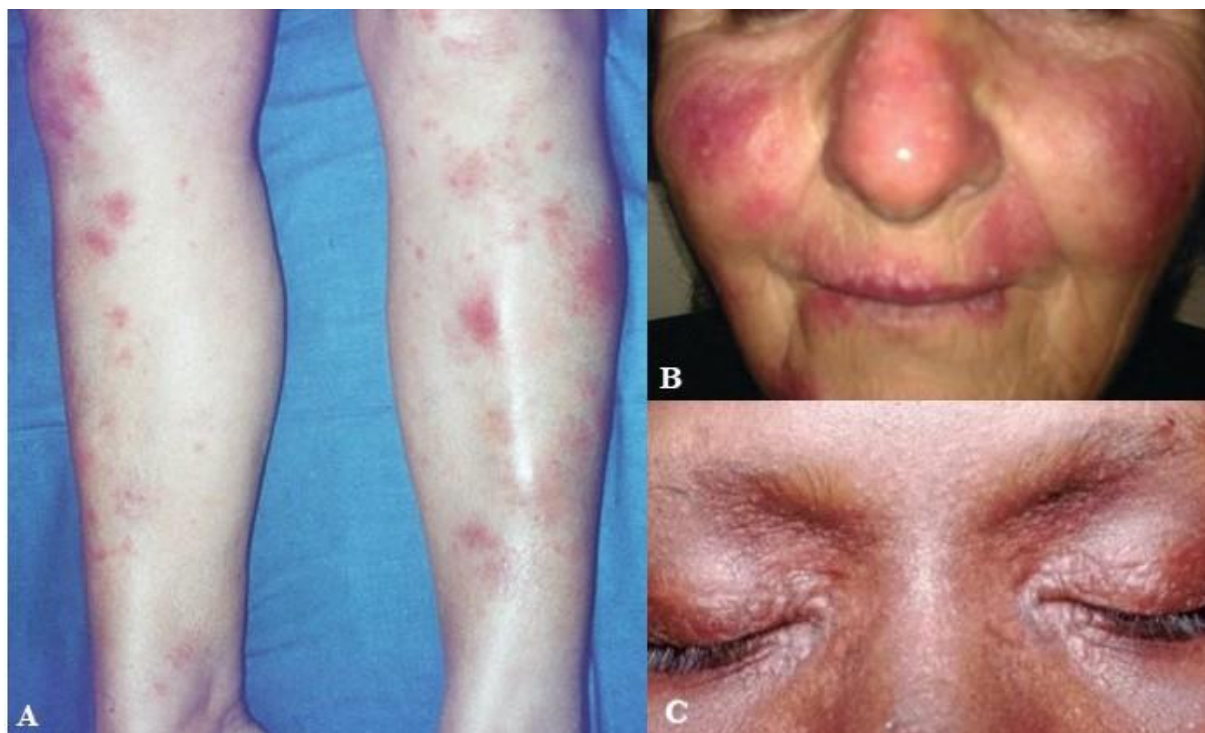
3.3. A szarkoidózis manifesztációja

A szarkoidózis klinikai megjelenése a különböző szervek érintettségétől függően nagyfokú variabilitást mutat. Kezdetben gyakran fordulnak elő nem specifikus, szisztémás tünetek, mint pl. fáradtság, láz, illetve súlycsökkenés. Fontos megjegyezni azonban, hogy az esetek többségében teljes tünetmentesség jellemző [22]. A szarkoidózisos páciensek 90%-ban megfigyelhető a tüdő érintettsége. Rendszeresen előforduló légzőszervi tünetek közé tartozik a száraz köhögés, nehézlégzés, illetve a mellkasi diszkomfort érzése. Leggyakoribb megjelenési formája a bilaterális hiláris limfadenopátia és a pulmonális infiltráció, amit általában valamely bőrelváltozás, illetve a szemben megjelenő lézió is kísér. A mellkasröntgenen található eltérések alapján a tüdőszarkoidózis négy stádiumát különítjük el, melyek közül legsúlyosabb a szövet fibrózisos átépülése (**1. ábra**).



1. ábra: A szarkoidózis radiológiai stádiumai mellkasi röntgenfelvételek alapján. (A) *I. stádium:* bilaterális hiláris limfadenopátia; (B) *II. stádium:* bilaterális hiláris limfadenopátia pulmonális beszűrődéssel (C) *III. stádium:* pulmonális beszűrődés limfadenopátia nélkül; (D) *IV. stádium:* tüdőfibrózis [23].

A tüdőérintettség nem kizárólagos, az extrapulmonális manifesztáció (10-30%) a tüdőelváltozások kialakulása előtt, után vagy akár azzal egyidőben is érvényre juthat [24], [25]. A granulomaképződés a szervezetben bárhol előfordulhat, a tüdő után a szem érintettsége a második leggyakoribb (13-79%), mely uveitis és retina gyulladás formájában a látás romlásához, akár elvesztéséhez is vezethet [26]. A bőrelváltozások (20-35%) közül a leggyakrabban előforduló, nem specifikus tünet az erythema nodosum, illetve gyakori a lupus pernio megjelenése az arcon, a fülön és az ízületeken. Egyéb bőrelváltozások is megjelenhetnek pl. maculopapulosus léziók, papulák, hiper-, és hipopigmentáció formájában egyaránt **(2.ábra)** [27].



2. ábra: Jellegzetes bőrelváltozások szarkoidózisban. (A) erythema nodosum: a lábszár feszítő oldalán megjelenő fájdalmas csomók (B) lupus pernio: lilás elszíneződésű indurált csomók az orcán (C) Maculopapulosus kiütések a szem körül [28]–[30].

A májban megjelenő granulómák (10-30%) annak funkcióváltozását, megnagyobbodását okozhatják, ritkán portális hipertenzióhoz vezethet [31]. A kardiális szarkoidózis (20-27%) súlyos szövődményeket okozhat, mely fatális kimenetelű is lehet. A granulomaképződés és a gyulladásos folyamatok miatt kialakuló ödéma következtében ingerületvezetési zavarok és kamrai aritmia is felléphet, idővel pedig a miokardium fibrotikus átépülése pangásos szívelégtelenséget okozhat, de a granulómák elhelyezkedésétől függően

akár a hirtelen szívhalál is beállhat [32]. A mozgásszervrendszeri tünetek (10-25%) rendszerint az ízületi fájdalom és gyulladás, mely a mozgás megnehezítségében nyilvánul meg. Továbbá kisebb ciszták jelenhetnek meg a csontokban, az ízületekben és az izomzatban egyaránt [33]. Az idegrendszer viszonylag ritkán, az esetek 10%-ban érintett, megjelenése különösen a központi idegrendszerben okozhat nagy károkat. A léziók jelenléte az agyban többek között meningitist, arcidegbénulást, és rohamokat is kiválthat, illetve kialakulhat perifériás neuropátia is. A hipotalamusz és a hipofízis érintettsége mellékvese vagy hipofízis elégtelenséghez vezethet, mely diabetes insipidust és hipogonadizmust eredményez [21], [34]. A szarkoidózis legritkábban a veséket érinti (5%). A megváltozott kalcium homeosztázis okozta hiperkalcémia és hiperkalciurea talaján nefrokalcinózis, esetenként veseelégtelenség alakulhat ki [1], [35].

A szarkoidózis lefolyását tekintve akut, szubakut és krónikus is lehet. Az akut szarkoidózis klasszikusan előforduló, jellegzetes tünetegyüttese a Löfgren-szindróma, melyet jellemzően a bilaterális hiláris limfadenopátia és az erythema nodosum mellett ízületi gyulladás és láz kísér. A szubakut szarkoidózist elsősorban az általános tünetek, mint pl. súlyvesztés, ízületi fájdalom, láz és perifériás limfadenopátia megjelenése jelezheti. A hosszú ideig fennálló, progrediáló tüdőérintettséggel és fibrózissal járó állapotot a krónikus lefolyású esetek közé soroljuk, melyet a betegség lassú kezdete és a tünetek nagyfokú variabilitása jellemez [1].

A legtöbb beteg számára a szarkoidózis jóindulatú granulomatózus megbetegedés, az esetek egy részében viszont hosszantartó, életet veszélyeztető állapot alakulhat ki. A szarkoidózis prognózisát nagyban befolyásolja a betegség stádiuma, klinikai manifesztációja és a fennálló extrapulmonális érintettség. A prognózis függ továbbá a páciens nemétől, életkorától és etnikai hovatartozásától is. A betegek közel kétharmadánál jelentkezhethet spontán remisszió, a további 10-30% perzisztens vagy krónikus lefolyású stádiumba kerül. A kezdeti időszakban nagyobb az esély a tünetek remissziójára, mely a diagnózist követő első két évben stádiumtól függően az esetek 50-90%-ban figyelhető meg. Löfgren-szindrómában szenvedő betegek prognózisa kifejezetten kedvező, a betegek 80%-a néhány hónapon belül spontán gyógyul [21], [36]. A szarkoidózis mortalitása 1-5%-ra tehető, mely általában a tüdőfibrózis okozta légzési elégtelenség, továbbá a szív, illetve az idegrendszer érintettsége miatt vezet elhalálozáshoz [2].

3.4. A szarkoidózisban alkalmazott terápia

A szarkoidózis kezelésére oki terápia jelenleg nem áll rendelkezésre, ellenben a megfelelő gyógyszerekkel a patológiás granulóma képződés folyamata lassítható, így a tünetek

megjelenése mérsékelhető. A kezelés szükségességét a betegség progressziója nagyban befolyásolja, mely a tünetmentesség nagy száma miatt a legtöbb esetben nem indokolt. A terápia megkezdése szervkárosodás fellépésekor, életet veszélyeztető állapotban, illetve a súlyos tünetekkel járó krónikus stádiumban elengedhetetlen. Ugyanakkor gyógyszeres kezelés szükséges a szív, az idegrendszer, a vese manifesztációja, valamint a más terápiára nem reagáló látást érintő kóros állapot esetén is. A szarkoidózisos betegek állapotának folyamatos monitorozása kiemelt fontossággal bír, hiszen a prognózis romlása mellett fennáll a spontán remisszió lehetősége is, mely esetén a páciens állapota nem igényel további gyógyszeres terápiát. Az elsővonalbeli kezelés kortikoszteroidok, rendszerint prednizon alkalmazása, mely csökkenti a perzisztens granulóma formálódásért felelős citokinek, köztük a TNF α és INF γ termelődését [22], [37]. A kortikoszteroidok megbízhatónak bizonyultak a tünetek enyhítésében és a szervi diszfunkciók visszafordításában, azonban alkalmazásuk mindig kockázatos. Tolerálhatatlan mellékhatások (pl. mellékvese-kéreg elégtelenség, diabetes mellitus, hipertónia), továbbá kortikoszteroid refrakter állapot kialakulása második vonalbeli terápiák alkalmazását indokolja. Ilyen gyógyszerek pl. az antimalariás hatóanyagok, a metotrexát vagy az azatioprin, melyek a szteroid terápiához képest kevésbé hatékonyak, ezért gyakran kiegészítő szerekként vagy kombinációban kerülnek alkalmazásra. Lehetőség van továbbá más hatóanyagok alkalmazására, ilyenek a TNF α antagonisták, mint pl. az infliximab, adalimumab, rituximab de a szarkoidózis kezelésében hatásosnak bizonyult a mikofenolát mofetil, és a leflunomid is. Krónikus stádiumban lévő betegnél, vagy súlyos szervi elégtelenség fennállásakor a végső terápiát a transzplantáció jelentheti [21].

3.5. A szarkoidózis kialakulásában szerepet játszó prediszponáló tényezők

A szarkoidózis kialakulásában kulcsfontosságú szerepet tölt be a genetikai és környezeti prediszponáló tényezők együttes jelenléte. A szarkoidózis immunpatogenezisének ismerete ellenére, magát a folyamatot elindító pontos ingert a mai napig nem sikerült azonosítani, mely feltételezhetően egy vagy több eddig ismeretlen antigén elleni túlzott sejtes immunválasz következménye. A tüdő érintettségének túlsúlya miatt az antigének vélhetően a légzőszervrendszeren keresztül, belégzés során jutnak a szervezetbe. Amennyiben a szervezet nem képes teljes mértékben eliminálni az ismeretlen antigéneket, az állandósult gyulladásos állapot végül kontrollálatlan granulóma képződéshez vezet [38]. Az ACCESS (A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis) az eddigi legnagyobb szarkoidózissal foglalkozó

esettanulmány, mely során kb. 700 szarkoidózisos beteget és közel 30 000 hozzátartozót vizsgáltak, azonban olyan epidemiológiai ágenszt vagy genetikai lokuszt nem sikerült azonosítani, mely egyértelműen a szarkoidózishoz köthető. Viszont számos szerves és szervetlen környezeti tényező került leírásra, mely összefüggésbe hozható a szarkoidózis kialakulásával [19].

3.5.1. Környezeti tényezők

Bizonyos, széles körben felhasznált fémekkel történő hosszútávú expozíció, mint pl. a berillium [39], alumínium [40] vagy cirkónium [41] okozhatják szarkoid típusú granulómák megjelenését. Továbbá, különböző környezeti ágenseknek való hosszútávú kitettség, mint pl. a fa tüzelése során felszabaduló anyagok, a talajban található szerves anyagok, bizonyos növények pollenjei, illetve a nedves épületekben megtelepedett penészgomba és dohos környezet tovább fokozhatja a szarkoidózis kialakulásának lehetőségét. Így nem meglepő, hogy azon foglalkozási körökben, melyben az emberek folyamatosan ki vannak téve ezen faktoroknak (pl. kertészeti anyagokkal, építkezési kellékekkel dolgozó emberek, tűzoltók) gyakoribb a szarkoidózis megjelenése [1], [38], [39].

A szarkoidózis klinikai és hisztológiai megjelenése hasonló a tuberkulózishoz, így már felfedezésekor felmerült a kérdés, hogy van-e összefüggés a *Mycobacterium tuberculosis* fertőzés és a szarkoidózis kialakulása között. Gupta és munkatársai meta-analízise alapján a szarkoidózisos betegek 30%-nál mutathatóak ki *Mycobacterium*-specifikus DNS szakaszok a granulómákból [42]. Az *M. tuberculosis* hősokkfehérjéi (Mtb-hsp), a kataláz-peroxidáz enzim (katG), illetve a szuperoxid-dizmutáz A peptid (sodA) antigénként indukálhatják a szarkoidózis kialakulását [43]. Immunhisztokémiai analízis során Dubaniewicz és munkatársai sikeresen mutattak ki Mtb-hsp65, Mtb-hsp70 és Mtb-hsp16 expressziót szarkoidózisos betegek nyirokcsomó szöveteiben [44], valamint igazolták Mtb-hsp ellenes antitestek jelenlétét is [45]. A *Cutibacterium acnes* (korábban *Propionibacterium*), a bőr kommenzalista baktériuma az egyetlen olyan mikroorganizmus, amit sikeresen kitenyésztettek szarkoid granulómából [46], valamint az *M. tuberculosis*-hoz hasonlóan kimutatták az örökítőanyag-maradványainak jelenlétét is [47]. Emellett több tanulmányban is megerősítették, hogy a *C. acnes* képes tüdőgranulómák kialakulását indukálni egérmodellben, mely tovább erősíti antigén szerepének valószínűségét [48], [49].

3.5.2. Genetikai tényezők

A legnagyobb kockázatot az antigénprezentációért felelős fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) régió MHC II osztályának, a Humán Leukocita Antigén (HLA) komplex génjeiben bekövetkező mutációi jelentik. A szarkoidózis kialakulásával elsősorban a HLA-DRB1 és HLA-DQB1 allélok esetén találtak összefüggést, pl. a HLA-DRB1*0301/DQB1*0201 erősen összefügg a Löfgren-szindróma kialakulásával, így a kedvezőbb prognózissal [50]. A HLA-DRB1*01/*04 allélt hordozó egyéneknél kisebb a szarkoidózis kialakulásának esélye [51], míg a HLA-DRB1*14:01 variánst hordozó betegeknél nagyobb valószínűséggel fog kialakulni a krónikus stádium [52]. Továbbá a tüdőt érintő szarkoidózis kialakulásával a HLA-DRB1*03:01-DRB3*01:01 polimorfizmust hozták összefüggésbe [53]. A nem-HLA gének közül szintén az antigénprezentáció folyamataiért felelős további citokinek, receptorok, mint pl. a TGF β , a TNF α , és TLR4 és NOD2 bizonyos polimorfizmusai szintén erőteljesen köthetők a szarkoidózis kialakulásához [1].

3.6. A szarkoidózis immun-patomechanizmusa

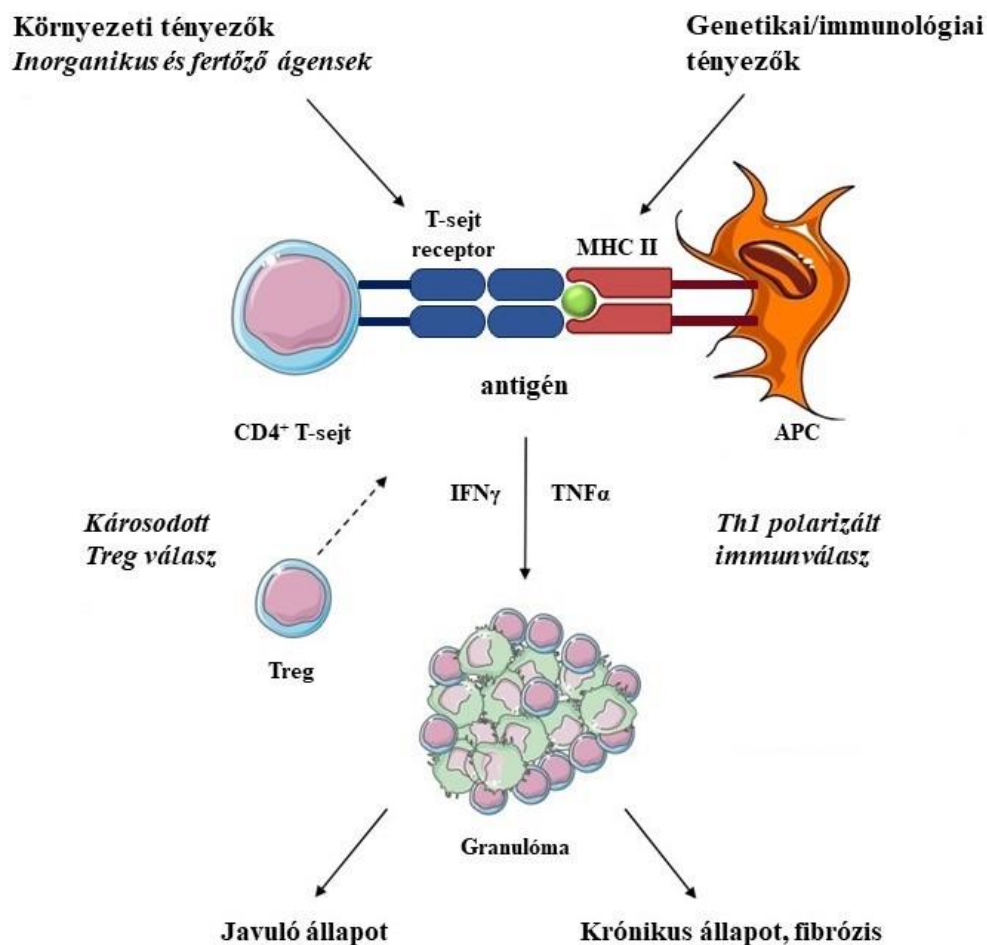
Ezen megfigyelések alapján a szarkoid granulóma formációt az egyén genetikai háttérétől függően fertőző és nem fertőző ágensek egyaránt képesek elindítani. Bizonyos mikroorganizmusok részben degradálódott maradványai olyan patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) hordoznak, melyek antigén prezentáló sejtek felszínén található mintázatfelismerő receptorokat (PRR) aktiválnak [43]. A PRR-eket a nem fertőző ágensek által kiváltott, saját struktúrák sérüléseiből származó veszély asszociált molekuláris mintázatai (DAMP) szintén képesek aktiválni. A veleszületett immunitás PRR receptorainak családjába tartoznak a Toll-szerű (TLR) és a NOD-szerű receptorok (NLR), melyek közül korábban a TLR2, a TLR9 és a NOD1 receptorok upregulációját is leírták szarkoidózisos betegeknél [54]. Ezen PRR receptorok aktiválódása során olyan citokinek szabadulnak fel, mint pl. az IL-6, IL-12, IL-18 és TNF α , melyek elősegítik az epitheloid és óriássejtek képződését, ezáltal a granulóma formálódását.

A degradált mikroorganizmusok extracelluláris anyagait makrofágok fagocitálják és bontják le. Amennyiben nem sikerül teljes mértékben eltávolítani, a degradálatlan antigének a makrofágok fagoszómáiban tovább perzisztálnak, melynek következtében nagy mennyiségű TNF α -t termelnek, mely sejtes infiltrációt indukálva további immunsejtek, főként CD4⁺ T-sejtek toborzását teszi lehetővé. Az aktivált CD4⁺ T-sejtek citokin profiljuktól függően T-helper

1 (Th1) és T-helper 2 (Th2) alcsoportba differenciálódnak **(3. ábra)**. A granulómák fenntartását vagy feloldását a Th1 és Th2 sejtek aránya határozza meg [1]. A szarkoidózis során a Th1 sejtek mennyisége megemelkedik, így a Th1/Th2 sejtek közötti egyensúly a Th1 sejtek irányába tolódik el. Ennek következtében megnő Th1 által szekretált citokinek mennyisége, az IL-2 és az IFN γ hatékonyan indukálja a T-sejt proliferációt, míg a TNF α elősegíti a makrofágok óriássejteké történő differenciálódását, mely a granulomaképződés folyamatait támogatja. A Th2 sejtek főként IL-4 és IL-13 citokineket szekretálnak, mely hatására a makrofágok fibroblaszt és kollagén proliferációját serkentik, mely a granulóma fibrotikus átépüléséhez vezet [1], [55].

A Th17 és Th17.1 sejteket a közelmúltban hozták összefüggésbe a szarkoidózis patogenezisével [56]. A Th17 sejtek IL-17A-t és IL-17F-t termelnek, azonban megfigyelték, hogy szarkoidózisban a Th17 sejtek IFN γ -t is szekretálnak. A Th17 sejtek nagy plaszticitással rendelkeznek, így képesek Th1-szerű, Th17.1 fenotípusba differenciálódni, mely főként IFN γ -t termel. Mindkét sejttípust kimutatták szarkoidózisos betegek mintáiból, így manapság elfogadottá vált az a nézet, mely szerint a granulóma képződéshez a túlzott Th1 válasz mellett Th17 asszociált faktorok is hozzájárulnak [57].

A regulatórikus T-sejtek (Treg) feladata a fent említett effektor funkciók gátlása. Szarkoidózisban szenvedő betegeknél azonban Treg sejtek nem képesek kontrollálni a gyulladásos folyamatokat, melynek hátterében feltételezhetően a sejtek defektusa vagy kimerülése állhat [58]. Így ezen szabályzó funkciók sérülése, valamint a Th1 és Th17 sejtek által kiváltott gyulladásos folyamatok krónikus aktivációja együttesen járul hozzá a proinflammatorikus folyamatok állandó fenntartásához **(3. ábra)**.



3. ábra: A szarkoidózis immunológiai, genetikai és környezeti alapjainak vázlata. A környezeti tényezők genetikai és immunológiai faktorokkal kerülnek kölcsönhatásba, ami a patogén antigénre adott túlzott Th1 válasz kiváltását és granulóma formálódását eredményezi. A polarizált Th1 válasz a károsodott Treg válasszal együttesen tartja fenn a gyulladásos reakciót. Az ábra Moller és munkatársai nyomán készült [51]. MHC= fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex), Th1= segítő T-sejt 1 (T-helper 1), Treg= regulatórikus T-sejt, APC= antigén prezentáló sejt (antigen-presenting cell)

3.7. A szarkoidózis autoimmun jellege

Régóta ismert, hogy a szarkoidózis különböző autoimmun betegségek mellett is kialakulhat, mely közös patogenezist és genetikai hajlamot feltételez [59]. Leggyakrabban Sjögren-szindrómával társuló szarkoidózisos esetet írnak le, ahol a páciensek mindkét betegség jeleit mutatják, mint pl. az epitheloid sejt granulóma kialakulása, a könny-, és nyálmirigyek diszfunkciója, valamint kimutatható az anti-Ro és anti-La antitestek jelenléte is. Mindkét

megbetegedés CD4⁺ T-sejt szám növekedéssel jár, valamint összefüggésbe hozható a HLA-DR3 gén defektjével [60]. Mycobacteriális antigének ellen termelt antitest koncentráció, főként az anti-Mtb-hsp65 szint megemelkedését szintén több autoimmun és krónikus gyulladásos megbetegedés során leírták, mint pl. a rheumatoid arthritis (RA), szisztémás lupus erythematosus (SLE) vagy a gyulladásos bélbetegségek (IBD) [61]. Továbbá az Mtb-hsp-vel homológ humán hősokk fehérje szintén képes aktiválni az Mtb-hsp specifikus T-sejt klónt, mely keresztreakció magyarázat lehet a gyulladás és az autoimmun folyamatok közötti kapcsolatra [62]. A TLR-ek aktivációját, főként a TLR2, TLR4 és TLR9 upregulációját szintén összefüggésbe hozták autoimmun és gyulladásos betegségek, mint pl. a szepszis, I-es típusú diabetes mellitus, RA, SLE vagy IBD patogenezisével. A TLR9 receptort elsősorban a szarkoidózis kialakulásában is szerepet játszó tényezők, a *M. tuberculosis* és *C. acnes* antigenjei, valamint a nehézfémek aktiválják. A TLR9 együttműködve a TLR2 és TLR4 receptorokkal összeköti a veleszületett és a szerzett immunrendszer válaszait, mely autoimmun folyamatokat válthat ki [43]. A szarkoidózis lehetséges autoimmun természetére utal, hogy a különböző HLA genotípusok több autoimmun betegség kialakulásával is összefüggésbe hozhatók [63], továbbá a szarkoidózis kezelésére alkalmazott immunszuppresszív terápia is hatásosnak bizonyult [60]. Az autoantitestek magas titere viszonylag ritka szarkoidózisban, gyakoribb a generalizált hipergammaglobulinémia miatt kialakuló alacsony autoantitest koncentráció [54]. Szarkoidózis specifikus autoantitest még nem került leírásra, viszont lehetséges autoantigénként tartják számon a vimentint, mely HLA-DRB1*0301 pozitív szarkoidózisos betegeknél erős immunválaszt vált ki [64]–[66]. Azonban az továbbra sem tisztázott, hogy a T-sejtes válaszok autoimmun folyamatot vagy az immunrendszer normális működését tükrözik, illetve egyes feltételezések szerint egy átmeneti autoimmun állapot kialakulása sem zárható ki. Habár sok a hasonlóság az autoimmun kórképekkel, továbbra sem elérhető olyan közvetlen bizonyíték, mely egyértelműen alátámasztaná a szarkoidózis kizárólagos autoimmun jellegét [54], [64].

3.8. A szarkoidózis diagnosztikája

A szarkoidózis korai és pontos diagnózisa a több szervrendszert érintő tünetek változatossága, valamint a tünetek esetleges hiánya miatt nagy kihívást jelent a klinikusok számára. Az esetek 50%-nál rutin vizsgálat alkalmával a mellkasröntgenen észlelt eltérések alapján még a panaszmentesség ideje alatt merül fel a szarkoidózis lehetősége [67], [68].

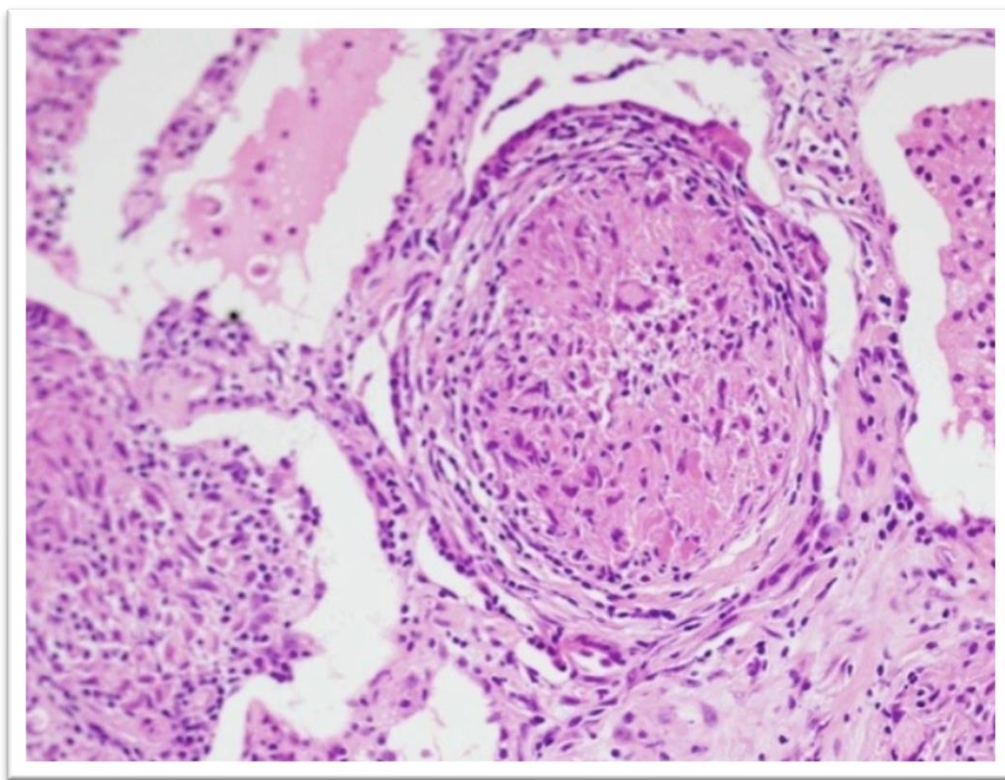
További nehézséget okoz, hogy nem áll rendelkezésre olyan specifikus módszer, mely alapján a szarkoidózis diagnózisa egyértelműen kimondható. Ennek következtében a diagnózis felállításához három kritériumnak kell teljesülnie: (1) az egyértelmű klinikai és radiológiai jelek mellett (2) nem nekrotizáló granulómák jelenlétének igazolása szövettani vizsgálattal, valamint (3) az alternatív megbetegedések kizárása is szükséges [69].

A számottevő tüdő és mellkasi nyirokcsomó érintettség következtében kulcsfontosságú radiológiai lelet a mellkasi röntgenfelvétel, mely alapján a tüdőt érintő elváltozások stádiuma is megállapítható (**1. ábra**). A parenchimális és mediasztinális érintettség vizsgálatában segíthet a nagy felbontású komputertomográfia (HRCT), viszont a nyirokcsomó státusz megítélésére nem alkalmas. A vizsgálatot kontrasztanyag nélkül végzik, így a mediasztinális képletek elkülönítése nehezebb, amit a nagy szeletvastagság tovább hátráltat. Ezért elsőként hagyományos natív, valamint kontrasztanyagot mellkasi CT végzése lehet célszerű. Az extrapulmonális manifesztáció feltárására szükség lehet mágneses rezonancia (MR) vizsgálatra is. Emellett a ^{18}F -fluorodeoxiglükóz pozitron emissziós tomográfia (FDG-PET) a gyulladás mértékének és a granulómák elterjedésének vizsgálatára alkalmas érzékeny módszer, mely segítségével a biopsziához szükséges granulómák pontos helye is meghatározható [70], [71]. Ez a vizsgálat azonban elég költséges, így alkalmazása szarkoidózis diagnosztikában nem jellemző.

A spontán remisszió magas esélye miatt a szöveti mintavétel alól kivételt képezhet a tünetmentes bilaterális hiláris limfadenopátia (a tüdőszarkoidózis I. stádiuma), valamint a klinikai megjelenés alapján is diagnosztizálható szarkoidózis specifikus tünetegyüttesek, mint pl. a Löfgren vagy Heerfordt szindróma (a szarkoidózis egy ritka megjelenési formája, uveitis, parotitis és arcidegek bénulásával jár, amit láz kísér). A mintavételezés elsősorban a legkönnyebben hozzáférhető elváltozásokból pl. szubkután léziókból, vagy megnagyobbodott nyirokcsomókból történik [21], [22]. Fontos megjegyezni azonban, hogy az erythema nodosum léziói nem alkalmasak a mintavételezésre, mert szövettani megjelenése granulómák hiányában a szarkoidózis fennállása mellett is negatív eredményhez vezethet [69]. Amennyiben könnyen hozzáférhető granulóma nem elérhető, a tüdő és a mellkasi nyirokcsomók vizsgálata szükséges. A tüdőszarkoidózis stádiumainak függvényében a mintavétel helyének és módjának megválasztása nagymértékben befolyásolja a diagnosztikai eredményességet. A transzbronchiális biopszia az I. stádiumban 55-75%, míg a II.-III. stádiumban az esetek 80-90%-ban lesz sikeres [72]. A hiláris és mediasztinális nyirokcsomók vizsgálatára alkalmas szöveti minta nyerhető továbbá thorakoszkópos és mediasztinoszkópos eljárások során is,

melyet napjainkban egyre inkább a minimálisan invazív endobronchiális ultrahangos (EBUS) eljárások váltanak fel [21], [73]. Bronchoszkópos nyirokcsomó biopszia végezhető továbbá EBUS nélkül, carinapunctio során.

A biopszia során nyert szöveti mintából hisztokémiai vizsgálatok segítségével kimutatható a szarkoidózisra jellemző jól körülhatárolt, kompakt szerkezetű epitheloid sejtes granulóma, ahol a gyulladásos folyamatokban résztvevő makrofágok, limfociták, valamint fibroblasztok koncentrikus elrendeződést mutatnak (**4. ábra**). A makrofágok epitheloid sejtekké differenciálódhatnak, illetve többmagvú óriássejtekké olvadhatnak össze, melyek a $CD4^+$ T-limfocitákkal együttesen alkotják a granulóma központi részét. Az óriássejtek citoplazmájában gyakran tartalmaznak inklúziós testeket, pl. Schaumann vagy aszteroid testet. A perifériás részen jellemző a $CD8^+$ T-limfociták és a fibroblasztok jelenléte, ahonnan esetenként megindulhat a granulóma fibrotikus elváltozása mely a centrális rész felé haladva a granulóma teljes átépüléséhez vezethet [69], [74]. A szarkoid granulómák túlnyomó többségére nem jellemző, azonban a szarkoidózis bizonyos fenotípusai esetén a nem nekrotizáló granulómák mellett kis mértékű fibrinoid nekrozis is megfigyelhető [71], [75].



4. ábra: Az epitheloid sejtes granulóma szövettani képe (hematoxilin-eozin festés). A centrális részen lévő többmagvú óriássejteket T-limfocita gyűrű veszi körbe. A granulóma széli részein koncentrikusan meginduló hegesedés (fibrózis) látható [76].

A szarkoidózis diagnózisának elengedhetetlen része az alternatív betegségek kizárása. Legfontosabb a fertőző betegségek és a malignus elváltozások elkülönítése, melynek lehetőségét a szisztémás tünetek, mint pl. a láz, fáradtság vagy a súlycsökkenés is növeli. Tenyésztéssel és specifikus mikrobiológiai vizsgálatokkal kizárhatók a kórokozók által kiváltott fertőzések, mint pl. a mycobactériumok okozta tuberkulózis, vagy a gombás fertőzések esetén pl. a kriptokokkózis, hisztoplazmózis. Ezen esetekben a biopsziás mintákban nekrotizáló granulómák jelenléte figyelhető meg [21]. Ezzel ellentétben a karcinómák 4,4%-nál a regionális nyirokcsomókból vett mintákban szarkoid típusú granulóma mutatható ki [69], így a limfóma és más malignus elváltozások elkülönítése a szarkoidózistól alapos körültekintést igényel [77]. További differenciálás lehet szükséges a tüdő porbelégzőes betegségei (pl. berilliózis, szilikózis), immundeficiencia (pl. krónikus granulomatózis) és gyulladás indukálta (pl. eozinofil granulomatózis) betegségek esetén is [21], [78]. Ennélfogva a szarkoidózis diagnózisának felállítása meglehetősen nehéz és összetett feladatnak bizonyul mely során a klinikai jelek és betegek kórtörténetének ismerete mellett az alapos szakértői mérlegelés és releváns orvosi vizsgálatok egyaránt nélkülözhetetlenek.

3.9. Potenciális biomarkerek a szarkoidózis diagnosztikában

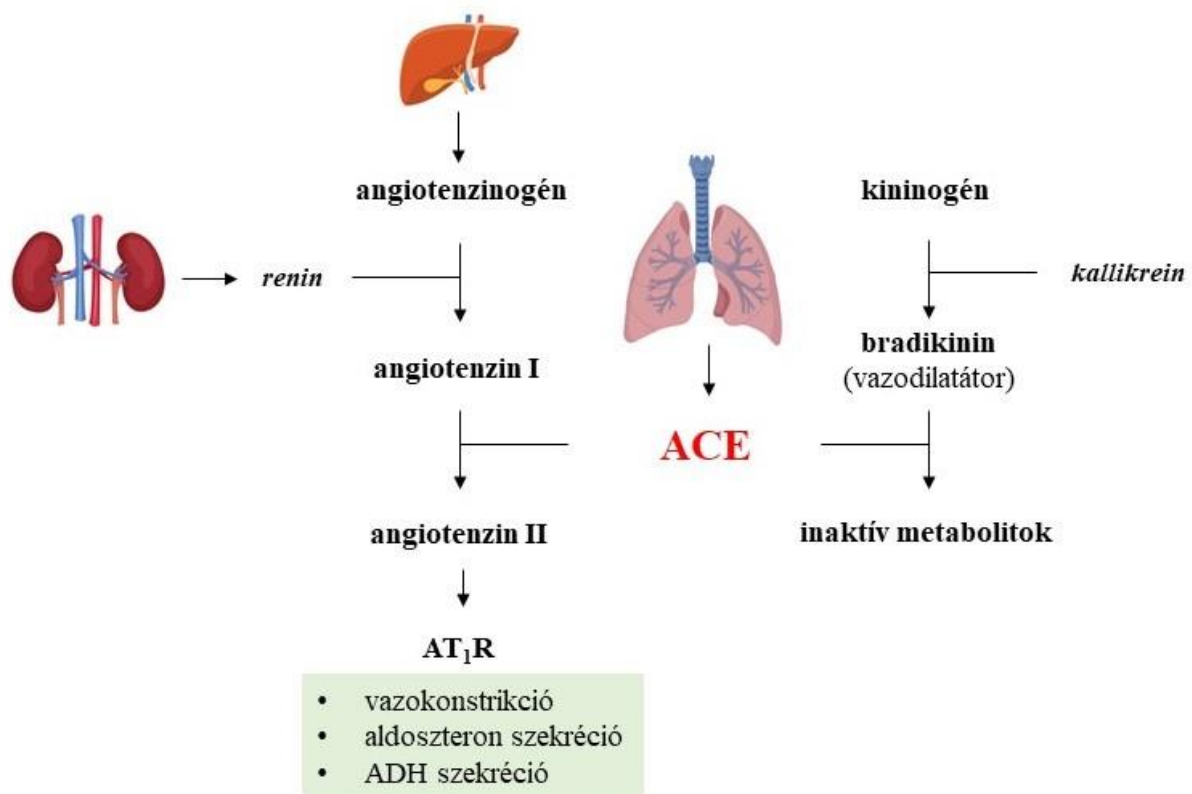
Szarkoidózis gyanú esetén a biopsziavételezés mindössze diagnosztikai jelentőséggel bír, azonban terápiás előnyökkel nem jár. Ez sok esetben nagy terhet jelent a betegek számára, főként, ha mintavétel szempontjából nincs könnyen hozzáférhető granulóma. Ezért napjainkban egyre nagyobb az igény olyan reproductívan meghatározható, a szarkoidózis diagnosztizálására alkalmas biomarkerek iránt, melyek kevésbé invazív mintavétel során is elérhetőek. A szarkoidózis specifikus biomarkerek feltárása azonban több szempontból is problematikus. Kétes etiológiája miatt a szarkoidózis patomechanizmusa pontosan nem ismert, mely jelentősen megnehezíti a megfelelő biomarker leírását. Emellett multisztémás jellege és eltérő fenotípusos megjelenése tovább korlátozza egy unikális biomarker azonosítását [1]. Ennek ellenére számos potenciális biomarker segítheti a szarkoidózis diagnosztizálását, melyek alkalmasak lehetnek továbbá a szarkoidózis aktivitásának követésére, a terápia hatékonyságának ellenőrzésére, valamint hasznosak lehetnek a prognózis felállításában is. Ezek a biomarkerek többnyire a granulóma formálódás folyamataiban részt vevő fehérjék, citokinek, kemokinek, melyek elsősorban a CD4⁺ T-sejtek és a makrofágok aktivációja által kiváltott

gyulladásos reakciók során szabadulnak fel. Egy részük vérből meghatározható szerológiai marker, mint pl. a szolubilis interleukin 2 receptor (sIL-2R) [79], szérumban amiloid A (SAA) [80], lizozim [81], kitotriozidáz [82] vagy az angiotenzin-konvertáló enzim, mely az egyetlen olyan marker, ami a klinikai gyakorlatba is bekerült [83]. Az aktivált makrofágokból és granulómákból felszabaduló kalcitriol hatására hiperkalcémia és hiperkalciuria alakulhat ki, így érdemes figyelemmel kísérni a betegek kalcium háztartását is. Bronchoalveoláris lavage során nyert folyadékból (BALF) meghatározható a CD4/CD8 arány, melynek értéke a szarkoidózisos betegek 60%-nál meghaladja a 3,5-öt [84]. Továbbá informatív lehet a kilélegzett levegőből meghatározott 8-izoprosztán [85] és szén-monoxid [86] mennyisége is.

3.9.1. Az angiotenzin-konvertáló enzim

A leggyakrabban alkalmazott szérumban biomarker az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) [87], melynek szarkoidózisban emelkedett aktivitását már 1975-ben leírták [88]. Az ACE egy cink függő metalloproteináz enzim, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) egyik kulcs komponense. Fő funkciója az inaktív angiotenzin I vazopresszor angiotenzin II-é történő átalakítása, illetve az értágító hatású bradikinin inaktiválása, ezáltal fontos szerepet tölt be a vérnyomás szabályozásában és a szervezet só-, és vízháztartásának fenntartásában (**5. ábra**). Az ACE-nak két izoenzimje ismert, melyet egyetlen gén kódol a 17-es kromoszóma hosszú karján (17q23). Nagysága ~21 kb, mely 26 exont és 25 intront tartalmaz. A nagyobb izoforma, a szomatikus ACE ~140 kDa nagyságú fehérje, mely két aktív centrumból (C-, és N-terminális), egy C-terminális transzmembrán régióból, illetve egy intracelluláris szegmensből áll [89]. A két aktív centrum feltehetően génduplikáció eredményeként jött létre. Mindkét katalitikus domén rendelkezik a HEMGH aminosav motívummal, ahol a két hisztidin koordinálja a cink iont. [90], [91]. Habár szekvenciájuk nagyban megegyezik, klorid aktivációs profiljuk, szubsztrát specificitásuk, inhibitoraik és fiziológiai funkcióik is eltérőek. Az N-terminális domén gátlása nincs hatással a vérnyomás szabályozására, ezért az ACE gátló gyógyszerek a C-terminális aktív centrumot célozzák meg [92]. Ezt az is igazolja, hogy a kizárólagosan N-terminális domént expresszáló transzgén egerek hasonló fenotípussal rendelkeznek, mint a teljes ACE gén knock out egerek [93], [94]. Az ACE az I-es típusú transzmembrán fehérjék közé tartozik. Az ACE szekretáz a transzmembrán régió extracelluláris részén hasít, melynek következtében az aktív enzim a keringésbe jut [91]. A szomatikus ACE számos szövetben expresszálódik, köztük pl. az erek endothél sejtjeiben, a tüdőben, vesében,

vékonybélben, a szívben továbbá az immunrendszer egyes sejtjei, a makrofágok és a dendritikus sejtek is kifejezik [95]. A kisebb izoenzim a tesztikuláris vagy germinális ACE ~70 kDa nagyságú [89]. Mindössze egy aktív centrummal rendelkezik, ami a szolubilis ACE C-terminális katalitikus doménjának felel meg. Kizárólag a herékben expresszálódik, diszfunkciója csökkent fertilitáshoz vezet, így kiemelten fontos szerepet tölt be a reprodukció során [96], [97].



5. ábra: Renin-angiotenzin-aldoszteron és kinin-kallikrein rendszerek kölcsönhatása. A májban termelődő angiotenzinogén N-terminális végéről a vese juxtaglomeruláris sejtjei által előállított renin 10 aminosav hosszúságú angiotenzin I-et hasít le, melynek C-terminálisáról az ACE további két aminosavat távolít el, ezzel létrehozva a rendszer fő effektor molekuláját, az angiotenzin II-t. Hatásait angiotenzin II receptorokon keresztül fejt ki. A vazokonstrikció mellett aldoszteron és ADH szekréciót vált ki, ezáltal fokozza a nátrium-, és folyadékretenciót, valamint a szomjúságérzetet. A plazmában keringő kininogént a kallikrein enzimatis hasítás révén bradikinné alakítja át, mely többek között vazodilatáció és ödéma kialakulásáért felelős. Az ACE a bradikinin bontásával ezen fiziológiai funkciókat gátolja [98]. ACE= angiotenzin-konvertáló enzim, AT₁R= angiotenzin II receptor 1, ADH= antidiuretikus hormon

A szarkoid granulóma epitheloid sejtjei szintén termelnek ACE-t, melynek aktivitása feltehetően arányos a szervezetben megjelenő granulómák számával. Az ACE diagnosztikai markerként történő alkalmazása azonban a mai napig vitatott kérdés. Az ACE aktivitás a szarkoidózisos betegek 30-80%-ban emelkedett, mely tesztek szenzitivitása 22-86%, specificitása 54-95% közé tehető a korábbi tanulmányok alapján [3]. A tesztek ilyen mértékben eltérő szenzitivitás és specificitás értékeinek több oka is ismert. Habár az eltérés egy része származhat a módszerek közötti különbségekből, az ACE aktivitás genetikailag is meghatározott. Az ACE gén inzerciók/deléciónak (*I/D*) polimorfizmusa befolyásolja a szérumban mérhető ACE aktivitását, mely az egyének közötti aktivitás különbségek akár 50%-ért is felelős lehet [99]. A 16-os intronba ékelődő 287 bp hosszúságú nem kódoló repetitív szekvencia jelenléte (*I* allél) vagy annak hiánya (*D* allél) jelentősen meghatározza az ACE aktivitását. Az *I* allél alacsony, míg a *D* allél magas ACE aktivitással társul, így *II* genotípusnál a legalacsonyabb, *DD* genotípusnál a legmagasabb, míg az *ID* genotípus esetén a két érték közötti ACE aktivitás mérhető. Az *II* és *DD* genotípusok közti eltérés akár kétszeres is lehet [100]. A különböző etnikai csoportokban az *I* és *D* allélok előfordulásának gyakorisága eltérő. Az ázsiai populációban az *I* allél előfordulása jelentősen gyakoribb, mint az európaiaknál, ennél fogva a szarkoidózis diagnosztizálásához célszerű a genotípus függő ACE aktivitás referencia tartományokat az adott populációra vonatkozóan meghatározni [101]–[103]. Továbbá fontos megjegyezni, hogy ACE inhibitor terápia során a szérum ACE aktivitás jelentősen lecsökken, ennek következtében diagnosztikai tesztként való alkalmazásakor fals negatív eredményt adhat. Az ACE azonban endogén gátlás alatt is áll, mely szintén befolyásolhatja a keringő enzim aktivitását [104]. Jelentős gátló hatással rendelkezik a szérum albumin (referencia tartomány: 35-52 g/l), melynek félmaximális gátló koncentrációja (IC_{50} érték) 5,7 és 9,5 g/L közé tehető [105]. Az alacsony szenzitivitás oka részben annak is tulajdonítható, hogy az ACE aktivitás más gyulladásos betegségekben is emelkedett lehet, mint pl. intersticiális tüdőbetegségek, tuberkolózis, berilliózis, Gaucher-kór illetve más granulomatózus kórképek [87].

3.9.2. A kitotrioizidáz

A kitotrioizidáz (CTO) a 18-as glikozil-hidroláz család (kitinázok) tagja, mely a kitin (N-acetilglükózamin polimerje) és a kitinszerű anyagok bontásában vesz részt. Az emberi szervezetből hiányzik az endogén kitin szubsztrát, ezért a CTO pontos fiziológiai funkciói jelenleg tisztázatlanok. Fagocita-specifikus expressziója révén vélhetően a veleszületett

immunrendszer folyamataiban vesz részt, ahol feltételezhető a kitin tartalmú patogének (gombák, ízeltlábúak, rákfélék, fonálférgek) elleni védekezésben betöltött szerepe. Megfigyelték, hogy a *Candida albicans* kolloidális és sejtfali kitinjét is képes bontani [106]. Továbbá kimutatták, hogy a CTO deficiens egyének sokkal fogékonyabbak a fonálféreg fertőzésre [107], [108].

A CTO-t kódoló gén (CHIT1) az 1-es kromoszóma hosszú karján 1q31-q32 pozícióban helyezkedik el, mely ~20 kb nagyságú és 12 exont foglal magába. Az enzim két izoformában fordul elő. Az 50 kDa nagyságú enzim egy katalitikus doménból, C-terminális kitin-kötő régióból és a kettőt összekötő szakaszból áll [109]. A 11-es exon alternatív splicing során kivágódhat, létrehozva a kisebb, 39 kDa nagyságú izoformát, melynél a C-terminális régió hiányzik, ez azonban elegendő az enzimatis aktivitáshoz [110].

A CHIT1 gén polimorfizmusa jelentősen befolyásolja a fehérje aktivitását. Egyik legelterjedtebb mutációja a 10-es exont érinti, ahol egy 24 bp nagyságú duplikáció (Dup24) hatására aktiválódik a 3' végen elhelyezkedő kriptikus splicing site, mely az átíródó mRNS-ben egy 87 bp nagyságú szakasz kereteltolódás nélküli delécióját okozza. A populáció 35%-a heterozigótaként hordozza Dup24 mutációt, illetve további 6% homozigóta mutáns, akiknél a CTO aktivitás teljes mértékben hiányzik [6], [106], [111].

A pulmonális eredetű neutrofil granulociták és makrofágok TNF α , IFN γ és GM-CSF (granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor) stimulus hatására CTO-t termelnek, mely arányos a szérum ACE aktivitásával [5]. Legmagasabb CTO aktivitást progresszív szarkoidózis esetekben mértek, mely immunszuppresszív terápia hatására jelentős mértékben csökkent. Habár a CTO aktivitás más betegségekben, mint pl. a Gaucher-kór, tuberkulózis, malária, és az Alzheimer-kór esetén is megemelkedhet, a CTO aktivitás a szarkoidózis diagnosztizálásában, monitorozásában, illetve a prognózis megállapításában is potenciális biomarker lehet [87].

4. Célkitűzés

Kísérletes munkánk során fő feladatunk az volt, hogy egy olyan módszert dolgozzunk ki, melynek segítségével a szarkoidózis biopsziavétel és szövettani vizsgálat nélkül is pontosan és megbízhatóan diagnosztizálható legyen. Ennek érdekében kísérleteink során célul tűztük ki:

1. A kutatócsoportunk által kifejlesztett, fluoreszcens, kinetikus ACE aktivitás mérés optimalizálását, mely során
 - Elimináltuk az albumin által kiváltott endogén gátló hatást.
 - Továbbá vizsgáltuk a laboratóriumi meghatározások során leggyakrabban előforduló interferáló faktorok, a hemolízis, az ikterusz és a lipémia ACE aktivitásra kifejtett hatásait.
 - Valamint meghatároztuk az *I/D* polimorfizmus genotípusától függő és független ACE aktivitás referencia tartományait.
2. Kísérleteink második felében a Dup24 polimorfizmus keringő CTO aktivitására és mennyiségére kifejtett hatásait vizsgáltuk egészséges és szarkoidózisos egyéneknél.
3. Illetve megkíséreltük olyan további mutációk azonosítását, melyek szintén befolyásolhatják a CTO aktivitását vagy annak mennyiségét.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Vizsgálati populációk

A kísérletek elvégzéséhez és a normál referencia tartományok meghatározásához kétszázegy felnőtt egyén került bevonásra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai Intézetének járóbeteg ambulanciájáról, valamint az intézet dolgozói közül. A beválogatott egyének többsége egészségesnek tartotta önmagát. A kezelt elsődleges hipertónia nem számított kizárási kritériumnak az egyének beválogatása során. A bevonásra került egyének szarkoidózis tüneteit nem észlelték magukon. A résztvevők közül senki nem kapott ACE gátló vagy szteroid kezelést, továbbá minden alany írásban hozzájárult a kísérletekben való részvételhez.

Vizsgálatainkban nyolcvan szarkoidózisos beteg is részt vett. Ezek a betegek a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Sebészeti Intézetében mediasztinális nyirokcsomó vagy tüdőszövet mintavétel miatt mellkasi műtéten estek át. A szövettani diagnózis alátámasztotta a szarkoidózis jelenlétét. Szteroid vagy ACE gátló kezelés alatt álló betegek nem vehettek részt a tanulmányban. Minden beteg írásos beleegyezését adta a kísérletekben való részvételhez.

5.2. Szérum és DNS izolálása

A vérminták gyűjtése rutin vérvételi eljárás során, steril körülmények között Vacutainer csövekbe (kat. szám: 368857, 367955, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) történt. A szérumot a vér alvadását követően 15 percig 1500 g-vel 4 °C-on történő centrifugálással választottuk el a sejtes elemektől. Az így nyert szérumot a mérések elvégzéséig -20 °C-on tároltuk.

A hemolízis, ikterusz és lipémia mértékét, mint a szérum minták minőségét jelző paramétereket HIL indexekkel jellemeztük, melyeket Cobas C6000 klinikai kémiai automata (Roche, Basel, Svájc) segítségével határoztunk meg. Amennyiben a betegmintákban a kísérletek eredményeit befolyásoló mértékű hemolízist (H index > 50), ikteruszt (I index > 50), vagy lipémiát (L index > 200) detektáltunk, a mintavételt megismételtük.

Az EDTA-val alvadásgátolt teljes vér genetikai vizsgálatok céljából került levételre, melyet a DNS izolálásának idejéig -20 °C-on tároltunk. A vérvétel és a DNS izolálás között

átlagosan egy hónap (leghamarabb két nap, legkésőbb három hónap) telt el. A genomi DNS izolálását NucleoSpin Blood kit (kat. szám: 740951.50, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Németország) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el. A tisztított DNS-t 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

5.3. ACE aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetikai módszerrel

A szérum ACE aktivitást fluoreszcens kinetikai módszerrel, Carmona és munkatársai [112] protokolljának kisebb módosításával határoztuk meg. A méréshez használt, szintetikusan előállított fluoreszcens szubsztrátot (Abz-FRK-(Dnp)-P-OH) az ACE szelektíven képes hasítani. A meghatározás alapja, hogy amíg a quenched szubsztrát intakt, a donor (Abz) és az akceptor (Dnp) molekula között energiaátadás történik. Abban az esetben, ha az ACE elhasítja a szubsztrátot, az energiátadás megszakad és a donor molekula gerjeszthetővé válik, melynek következtében fluoreszcens fényt bocsát ki. Mérés során a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitásának növekedését detektáltuk.

A reakcióelegy 15 μM Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrátot (Peptid 2.0, Chantilly, USA), 50 mM NaCl-ot, 10 μM ZnCl_2 -ot, és a szérum mintát 35-szörös végső hígításban tartalmazta 100 mM TRIS-HCl (pH 7,0) pufferben. A reakcióelegyet 96 lyukú fekete platek-ben (kat. szám: 655-900, Greiner-Bio One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria) állítottuk össze, melynek fluoreszcencia jelintenzitás változását 1 perces mérési időközökkel 30 percig követtük 37 °C-on Novostar plate reader készülékkel (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország). A mérések során a gerjesztési hullámhossz $\lambda = 340 \text{ nm}$, az emissziós hullámhossz pedig $\lambda = 405 \text{ nm}$ volt. Vakra történő korrigálás után a fluoreszcencia jelintenzitás értékeit az idő függvényében ábrázoltuk, majd a pontokra egyenest illesztettünk. Az aktivitás mértékét U/L-ben kifejezve az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

$$\text{ACE aktivitás} = S/k \cdot D,$$

ahol az S az egyenes meredeksége, k az 1 μM szubsztrát teljes hidrolíziséből származó fluoreszcencia jelintenzitás növekedés és D a szérum minta hígításának mértéke. Minden minta ACE aktivitása legalább kétszer került meghatározásra, a variációs koefficiens pedig nem haladhatta meg a 6%-ot. Az ACE aktivitás értékeit átlagként tüntettük fel.

5.4. Interferencia vizsgálatok

Egy egészséges résztvevő nátrium-citráttal alvadásgátolt vénás véreből készült hemolizátum segítségével megvizsgáltuk a hemolízis okozta interferencia ACE aktivitásra kifejtett hatását. A teljes vért fiziológiás sóoldattal ötször átmostuk, majd többszöri fagyasztás-olvasztás során a sejtek membránját roncsoltuk. A sejtörmelékét 15 percig 16000 g-vel 4 °C-on történő centrifugálással távolítottuk el. A felülúszóban lévő szabad hemoglobin koncentrációját nátrium-lauril-szulfát-hemoglobin módszerrel, Sysmex XE-2100-as hematológiai automatával (Kobe, Japán) határoztuk meg.

A lipémia ACE aktivitásra kifejtett hatását a szérum mintákhoz történő Intralipid (20%, Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Németország) hozzáadásával vizsgáltuk. Az így előállított minták triglicerid koncentrációját Cobas C6000 automatával, glicerín vakra korrigált módszerrel határoztuk meg (kat. szám: 05975573 190, Roche, Basel, Svájc).

Normál szérum mintákhoz különböző koncentrációban konjugátlan bilirubint (kat. szám: 14370, Merck Life Science, Darmstadt, Németország) hozzáadva állítottuk elő az ikterusos mintákat, melynek összbilirubin koncentrációját azobilirubin módszerrel, Cobas C6000 automata segítségével határoztuk meg.

Az interferencia mértékét abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, amennyiben az ACE aktivitás változása meghaladta a kiindulási aktivitás 10%-át.

5.5. ACE genetikai polimorfizmusának vizsgálata

Az ACE gén *I/D* genotípusát a Rigat és munkatársai által korábban leírt protokoll alapján határoztuk meg [4]. Az *I* allél jelenlétét egy második PCR reakcióval erősítettük meg, mely módszer Lindpainter és munkatársai munkáján alapszik [113]. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattuk meg, az eredményeket SYBR safe gélfestékkel (kat. szám: S33102, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá.

5.6. Szérum CTO aktivitás meghatározása

A szérum CTO aktivitást meghatározását Hollak és munkatársai által leírtak [114] kisebb módosításával végeztük el [115]. A szérum CTO aktivitást egy mesterséges szubsztrát (4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacyl-chitotrioside; kat. szám: 19715, Cayman Chemicals,

Ann Arbor, USA) felhasználásával határoztuk meg. A reakcióelegy 20 μ M szubsztrátot tartalmazott 50-szeresen hígított szérum mellett, 100 mM citrát és 200 mM foszfát pufferben, mely biztosította a reakcióelegy pH= 5,2 értékét. A méréseket 96 lyukú platek-ben (kat. szám: 655-900, Greiner-Bio One, Németország) végeztük 37 °C-on. A fluoreszcencia intenzitás változását legalább 30 percen keresztül követtük, 1 perces mérési időközökkel Novostar plate readerrel. Az excitációs hullámhossz λ = 340 nm, az emissziós hullámhossz pedig λ = 405 nm volt. A fluoreszcencia jelintenzitás értékeit az idő függvényében ábrázolva kapott lineáris egyenes meredeksége alapján határoztuk meg. A CTO aktivitást 4-Methylumbelliferone (kat. szám: M1381, Merck, Németország) kalibrációs görbe alapján számítottuk, az aktivitás értékeket U/L-ben adtuk meg.

5.7. Szérum CTO koncentráció meghatározása

A szérum CTO koncentráció meghatározását két, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével végeztük (1., kat. szám: RAB1364, Merck KGaA, Darmstadt, Németország; 2., kat. szám: EH105RB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a gyártói utasításoknak megfelelően. A szérum mintákat a reagenskészletben megtalálható szérum hígító oldattal hígítottuk a minta CTO aktivitásának megfelelően: 0-1000 mU/L = 80-szoros hígítás; 1001-2000 mU/L = 160-szoros hígítás; 2001-3000 mU/L = 240-szeres hígítás; 3001-4000 mU/L = 320-szoros hígítás; 4001-6000 mU/L = 400-szoros hígítás; 6001-10000 mU/L = 600-szoros hígítás; >10000 mU/L = 1000-szeres hígítás. A minták abszorbancia értékeit Clariostar (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország) plate readerrel mértük, melyek koncentrációját a reagenskészletben található standard alapján kalkuláltuk.

5.8. A CHIT1 gén duplikációs polimorfizmusának meghatározása

A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusát (CHIT1, chitinase 1, HGNC:1936) Livnat és munkatársai által publikált protokoll alapján határoztuk meg [116]. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattuk és SYBR safe gélfestékkel (kat. szám: S33102, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá.

5.9. A CHIT1 gén direkt DNS-szekvenálása

A kontroll csoport egyik tagjánál a CTO aktivitás hiányát nem magyarázta a Dup24 polimorfizmus. Ebből kifolyólag az érintett egyén CHIT1 gén exonjainak nukleotid szekvenciáját Sanger szekvenálással határoztuk meg. A szekvenálás során felhasznált primer párokat korábban Grace és munkatársai publikálták [117]. A tisztított PCR termékek (MinElute PCR purification kit, kat. szám: 28006, Qiagen GmbH, Németország) DNS-szekvenálását a Microsynth AG cég (Balgach, Svájc) végezte.

5.10. A CHIT1 gén mutációk cisz-transz elhelyezkedésének vizsgálata

A kontroll csoport egyik vizsgálati alanya heterozigóta formában a duplikációs (rs3831317) és a deléziós (rs536102546) mutációt egyaránt hordozza. Ezen mutációk cisz-transz elhelyezkedését PCR reakcióval vizsgáltuk, majd ezt követően a termékek DNS nukleotid szekvenciáját Sanger szekvenálással határoztuk meg. Két primer párt alkalmaztunk, melyek a mutációk közötti DNS-szekvenciát fedik le. Az első PCR primer pár (forward: 5'-AATCCAGGATCAGAAGGGTGGGC-3'; reverse: 5'-CCTTAGCTCCTGCGGGTACAT-3') abban az esetben eredményezett PCR terméket, ha 9. exonon jelen volt a deléziós mutáció. A DNS szegmens felszaporítását Veriti™ 96-well Thermal Cyclor készülékkel (kat.szám: 4375786; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük a következő protokollnak megfelelően: 95 °C 5 percig, melyet 34 ciklusban 95 °C-on 30 mp, majd 60 °C-on 30 mp, és 72 °C-on 1 perc 40 mp. A mintákat 72 °C-on 5 percig tartottuk, majd a PCR termék tisztításáig 4 °C-ra helyeztük. A második PCR primer pár (forward: 5'-CTCCAGGCTTCCTCAGACAG-3'; reverse: 5'-CCCGCCCAGTCCCTAGACCAT-3') a 10. exonon jelenlévő Dup24 mutációt ismeri fel, így csak abban az esetben eredményezett terméket, amennyiben a Dup24 genotípus jelen volt. A PCR protokoll a következő volt: 95 °C-on 5 perc, majd 30 ciklusban 95 °C 30 mp-ig, 63 °C 30 mp-ig és 72 °C 1 perc 40 mp-ig. A mintákat 5 percig 72 °C-on, majd a PCR termék tisztításáig 4 °C-on tartottuk.

Az 50 µL mennyiségű reakcióelegy 10 µL szintelen GoTaq puffert, 0,26 µL GoTaq G2 DNS polimeráz enzimet (kat.szám: M30001, Promega Corp., WI, USA), 1 µL 10 mM dNTP oldatot (kat.szám: 18427013, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5% DMSO-t, 2-2-2 µL forward és reverse primert, illetve 1 µL DNS templátot tartalmazott. A megtisztított PCR termékek szekvenálását a MicroSynth AG cég végezte.

5.11. Statisztikai elemzés

A vizsgálati populáció genotípusának Hardy-Weinberg szerinti egyensúlyi eloszlását χ^2 próbával vizsgáltuk [118]. Az adatok eloszlási mintázatát Shapiro-Wilk és D'Agostino-Pearson próbákkal vizsgáltuk. A referencia tartományokat a referencia populáció értékeinek középső 95%-a (2,5-97,5-ös percentilisek közötti értékei) alapján határoztuk meg. A genotípus-függő csoportok ACE aktivitás értékeinek különbségeit egyutas ANOVA és Tukey-féle többszörös összehasonlítási próbákkal vizsgáltuk. A normál eloszlást mutató adatokat Welch-féle páratlan T-teszttel hasonlítottuk össze, míg a nem normál eloszlást mutató adatokhoz Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7.0 szoftverrel (San Diego, CA, USA) végeztük. A normál eloszlást mutató értékeket átlag ($\pm$ standard deviáció), míg a nem normál eloszlást mutató adatokat interquartilis tartomány formájában tüntettük fel. Két változó közötti különbséget abban esetben tekintettük jelentősnek, amennyiben a $p < 0,05$ -nek adódott.

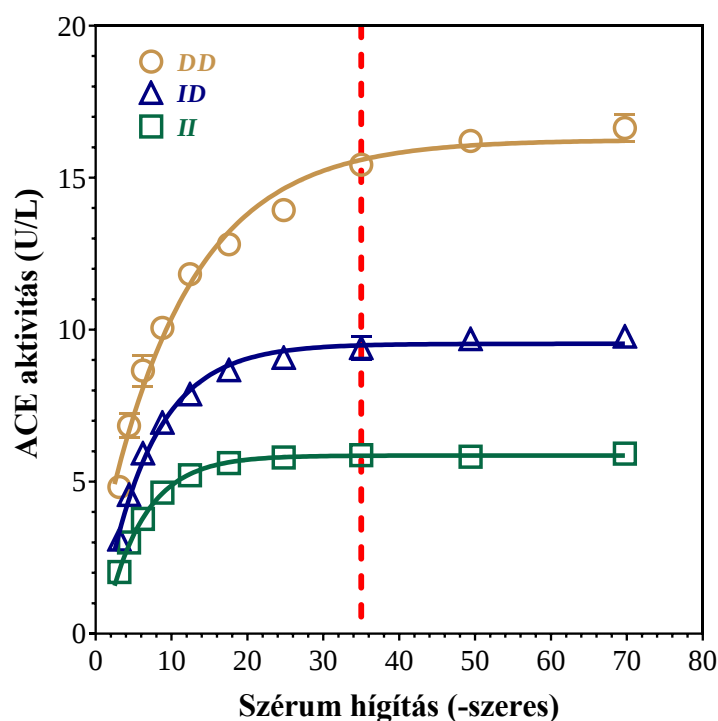
5.12. Etikai engedély

A Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (DE KK RKEB/IKEB; 4375-2015) és az Egészségügyi Tudományos Tanács (33327-1/2015/EKU) minden vizsgálatot jóváhagyott. A kísérletek elvégzése a Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveinek megfelelően történt.

6. Eredmények

6.1. Az albumin-mediált endogén gátlóhatás megszüntetése

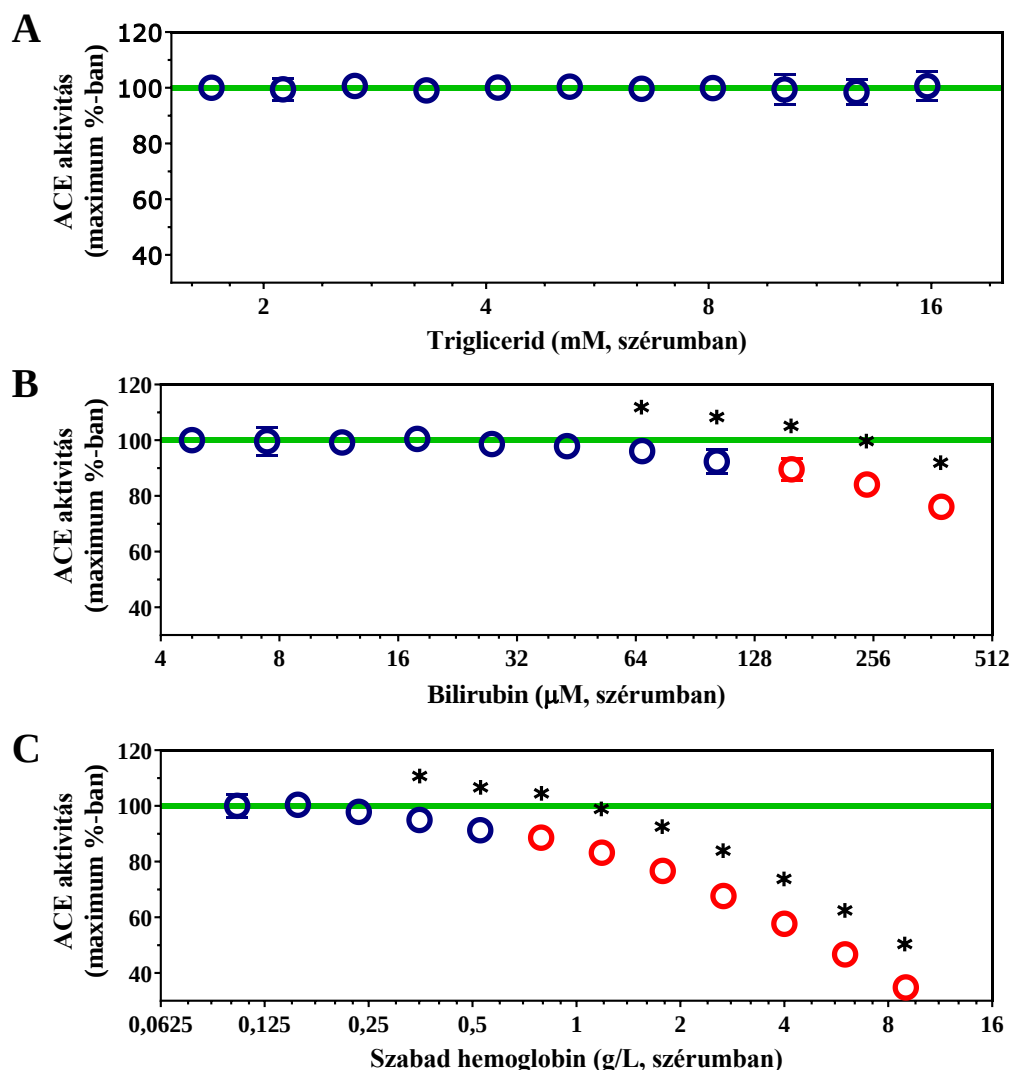
A szérumban albumin által kifejtett reverzibilis endogén ACE gátlás a szérumban a minta megfelelő hígításával kiküszöbölhető. A három különböző ACE *I/D* genotípussal rendelkező egyéntől származó szérumban a ACE aktivitását különböző szérumban hígításokon határoztuk meg (6. ábra). Mindhárom genotípus esetében a szérumban hígítás növelésével párhuzamosan az ACE aktivitás értéke is növekedett, mely maximumát 35-szörös szérumban hígításnál érte el. A 35-szörös hígításon meghatározott ACE aktivitás értéke statisztikailag egyik genotípus esetén sem különbözött a 70-szeres hígításon mért aktivitás értékektől.



6. ábra: A szérumban a minta 35-szörös hígításával az albumin ACE aktivitásgátló hatása kiküszöbölhető. Az ábrán a számított ACE aktivitás a szérumban hígítás mértékében került ábrázolásra. Minden egyes kör, háromszög és négyzet egy-egy, rendre DD, ID és II ACE genotípussal rendelkező egészséges egyén értékeit mutatja. A pontok, melyek legalább két független mérés átlagát és szórását reprezentálják, egyfázisú exponenciális csökkenés képlet felhasználásával lettek illesztve. A 35-szörös hígítás piros szaggatott vonallal van jelezve.

6.2. A hemolízis, ikterusz és a lipémia ACE aktivitásra kifejtett hatásainak vizsgálata

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a szérumbeltek minőségét rontó tényezők, mint a lipidek okozta fokozott turbiditás vagy a szabad hemoglobin és bilirubin okozta vöröses és sárgás elszíneződés milyen hatással van az ACE aktivitás mérésére. A minta turbiditása nem befolyásolta a meghatározást, az ACE aktivitás 16 mM triglicerid koncentrációig állandó volt **(7/A. ábra)**. Ezzel ellentétben, a szérumbeltek sárgasága 64 μM , illetve magasabb bilirubin koncentráció esetén jelentősen befolyásolta az ACE aktivitás értékét **(7/B. ábra)**. A 150 μM -nál magasabb bilirubin koncentráció az ACE aktivitás 10%-os alámérését eredményezte. A 0,35 g/L vagy annál magasabb hemoglobin koncentráció már jelentős mértékben befolyásolta a fluoreszcens kinetikus meghatározás eredményét **(7/C. ábra)**. A 0,71 g/L hemoglobin jelenléte megközelítőleg 10%-os ACE aktivitás csökkenést okozott a tényleges ACE aktivitáshoz képest.



7. ábra: A hemolízis és az ikterusz csökkenti az ACE aktivitást. A maximum %-ban kifejezett ACE aktivitás a triglicerid (A, mM), bilirubin (B, μ M) és szabad hemoglobin (C, g/L) koncentráció függvényében került ábrázolásra. A szimbólumok három mérés átlagát és szórását mutatják. A legalacsonyabb triglicerid, bilirubin és szabad hemoglobin koncentráció mellett mért aktivitásoktól jelentősen eltérő értékeket csillaggal (*) jelöltük (párosítatlan *t*-teszt). A 10%-os meghaladó aktivitáscsökkenést piros szimbólumokkal vizualizáltuk.

6.3. Az ACE aktivitás *I/D* genotípus függő és független referencia tartományainak meghatározása

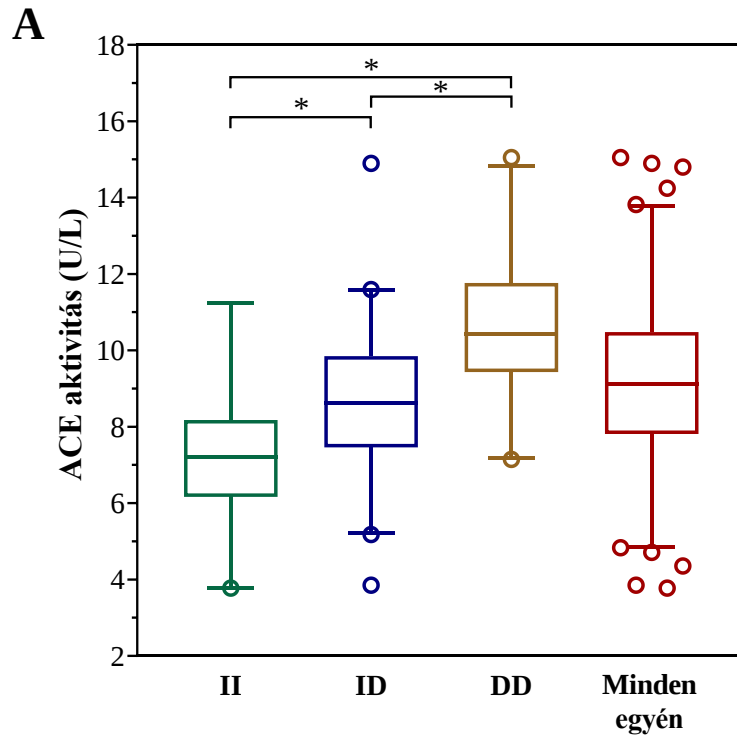
Az ACE aktivitás genotípus függő és genotípus független referencia tartományainak megállapításához 201 résztvevőt vontunk be a vizsgálatainkba. Összegyűjtöttük a jelentkezők

alapvető klinikai adatait (**1. táblázat**), illetve meghatároztuk az ACE *I/D* genotípust és a 35-szörös hígításon mért ACE aktivitást.

	Nő	Férfi	Összesen
Elemszám (n)	110	91	201
Életkor (év, átlag $\pm$ SD)	54,71 $\pm$ 14,90	54,85 $\pm$ 14,16	54,78 $\pm$ 14,52
BMI (kg/m ²)	27,29 $\pm$ 5,83	29,13 $\pm$ 5,03	28,13 $\pm$ 5,54
Aktív dohányos (n)	12	15	27
Szisztolés vérnyomás (Hgmm, átlag $\pm$ SD)	128,35 $\pm$ 18,68	128,75 $\pm$ 15,48	128,5 $\pm$ 17,22
Diasztolés vérnyomás (Hgmm, átlag $\pm$ SD)	78,42 $\pm$ 10,24	80,90 $\pm$ 9,90	79,56 $\pm$ 10,13
Bal kamrai EF (% , átlag $\pm$ SD)	59,07 $\pm$ 6,49	56,20 $\pm$ 6,78	57,71 $\pm$ 6,76
ACE aktivitás (U/L, átlag $\pm$ SD)	9,10 $\pm$ 2,06	9,15 $\pm$ 2,10	9,12 $\pm$ 2,07
II genotípus (n)	18	21	39
ID genotípus (n)	44	46	90
DD genotípus (n)	48	24	72

1. táblázat: A kontroll csoport élettani adatai. BMI= test tömeg index; EF= bal kamrai ejekciós frakció; ACE= angiotenzin konvertáló enzim

A teljes populáció genotípus eloszlása a Hardy-Weinberg szabálynak megfelelően egyensúlyban volt ($\chi^2 = 1,276$; szabadsági fok = 2). Az ACE aktivitás értékek Shapiro-Wilk próbával (*II*: 7,30 $\pm$ 1,65 U/L, $p = 0,97$, $n = 39$; *ID*: 8,72 $\pm$ 1,70 U/L, $p = 0,30$, $n = 90$; *DD*: 10,6 $\pm$ 1,70 U/L, $p = 0,41$, $n = 72$; minden résztvevő: 9,12 $\pm$ 2,08 U/L, $p = 0,64$, $n = 201$) és D’Agostino-Pearson teszttel (*II*: $p = 0,94$; *ID*: $p = 0,09$; *DD*: $p = 0,26$; minden résztvevő: $p = 0,49$) egyaránt normál eloszlást mutattak. Az *I/D* genotípus jelentős mértékben befolyásolja az ACE aktivitást, az *II* genotípusú egyének ACE aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a *DD* genotípus esetén mért ACE aktivitásoknál, míg az *ID* genotípussal rendelkezők aktivitása a két érték között helyezkedik el (*II*: 7,30 $\pm$ 1,65 U/L; *ID*: 8,72 $\pm$ 1,70 U/L; *DD*: 10,6 $\pm$ 1,70 U/L; $p < 0,0001$) (**8/A. ábra**). A különböző csoportokhoz tartozó referencia tartományokat **8/B. ábrán** foglaltuk össze.



B

Csoport	n	95%-os referencia intervallum (U/L)
II	39	3,76 – 11,25
ID	90	5,22 – 11,59
DD	72	7,19 – 14,84
Genotípus független	201	4,85 – 13,79

8. ábra: Az ACE I/D genotípus befolyásolja az ACE aktivitást. A szérumban lévő ACE aktivitás eloszlása (A) és a normál referencia tartományok (B) bemutatása az ACE I/D genotípus (inzerziós, II, n= 39; heterozigóta, ID, n= 90; deléziós, DD, n= 72; minden egyén, n= 201) függvényében. A négyzetek az interquartilis tartományt jelölik a medián értékével, a kapcsok pedig a 2,5 és 97,5 percentilis értékeket fogják közre. A kieső értékeket üres körökkel jelöltük. A csoportok közötti jelentős különbségeket csillaggal (*) jelöltük.

6.4. A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusának hatásai a CTO aktivitására és mennyiségére

Kísérletes munkánk második felében a CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusának CTO aktivitására és mennyiségére kifejtett hatásait vizsgáltuk, melyben 80, hisztopatológiai

diagnózissal igazolt szarkoidózisos beteg és 133 egészséges felnőtt vett részt (**2. táblázat**). A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmus a szarkoidózisos és a kontroll csoportban egyaránt Hardy-Weinberg egyensúlyban volt, az allélfrekvencia a csoportok között nem mutatott különbséget (vad allél:duplikációs allél= szarkoidózisos csoport: 0,794:0,206 és kontroll csoport: 0,793:0,207). A szarkoidózisos betegek szignifikánsan fiatalabbak voltak egészséges társaiknál (szarkoidózisos csoport: $42,2 \pm 12,2$ év, kontroll csoport: $48,3 \pm 15,0$ év). A bal kamrai ejekciós frakció, a vérlemezke szám, és a kreatinin koncentráció tekintetében nem volt szignifikáns eltérés a két csoport között, ami arra enged következtetni, hogy a kontroll csoport tagjai nem, vagy legfeljebb enyhe lefolyású kardiovaszkuláris betegségben szenvedtek. A limfocitaszám és a limfociták aránya a vérben szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva a szarkoidózis betegcsoportban (szarkoidózisos csoport: 1,49 G/L (1,23-1,83 G/L, kontroll csoport: 1,89 G/L (1,58-2,45 G/L); szarkoidózisos csoport: $23,9\% \pm 6,7\%$), kontroll csoport: $29,2\%$ (24,4-32,6%)). A szarkoidózis markerként alkalmazott vérlemezke/limfocita arány a szarkoidózisos betegeknél szignifikánsan magasabb volt (170 (135-221)), mint a kontroll populációban (130 (113-165)). Az erőltetett vitálkapacitás (FVC) és az erőltetett kilégzési térfogat (1 sec; FEV1) szignifikánsan magasabb volt a Dup24 duplikációt heterozigóta formában hordozó szarkoidózisos betegeknél, mint a homozigóta vad típussal rendelkező egyénekénél. Ezzel ellentétben a Tiffeneau-index a Dup24 duplikációra homozigóta betegeknél szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típust hordozó egyénekénél. Az ACE, a CTO aktivitás és a „kettős szorzat” szintén szignifikánsan magasabbnak bizonyult a szarkoidózisos csoportban a kontroll csoporthoz képest (ACE aktivitás= szarkoidózisos csoport: 11,84 U/L (10,1-13,5 U/L), kontroll csoport: 9,19 U/L (7,09-11,29 U/L), CTO aktivitás= szarkoidózisos csoport: 2882 mU/L (1497-4166 mU/L), kontroll csoport: 539 mU/L (318-884 mU/L), „kettős szorzat” = szarkoidózisos csoport: $34,19 \text{ U}^2/\text{L}^2$ (17,4-51,5 U^2/L^2), kontroll csoport: $4,86 \text{ U}^2/\text{L}^2$ (2,66-7,60 U^2/L^2).

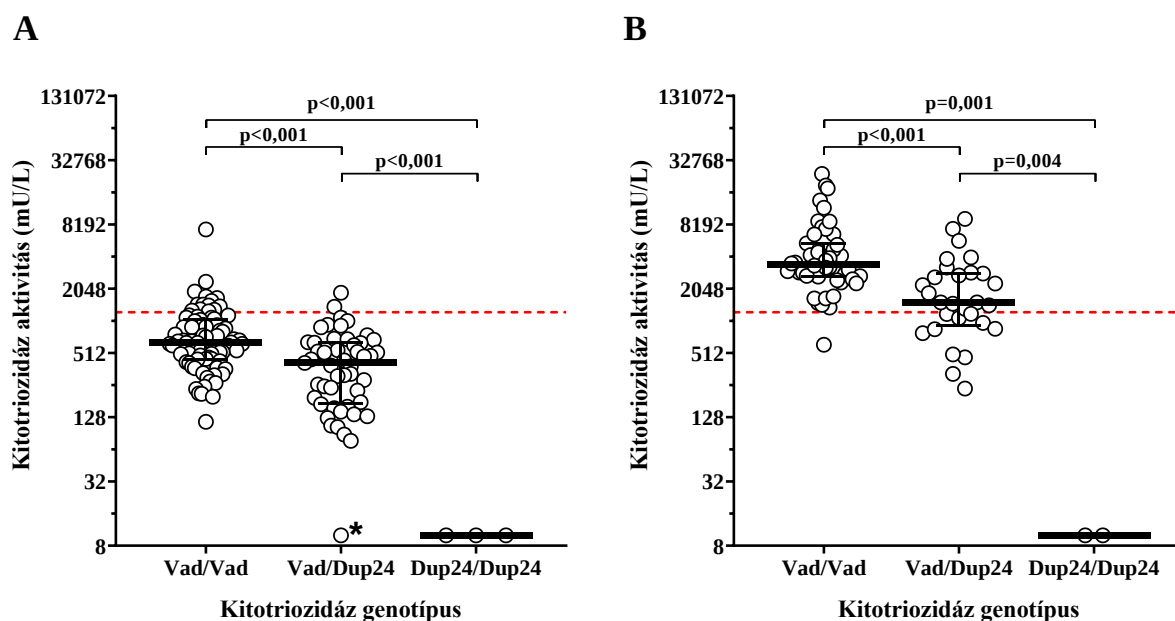
	Szarkoidózisos betegek			Kontroll populáció		
	Vad/Vad	Vad/Dup24	Dup24/Dup24	Vad/Vad	Vad/Dup24	Dup24/Dup24
Elemszám (n)	80			133		
	49	29	2	81	49	3
Nem (nő/férfi; n)	40/40			72/61		
	21/28	17/12	2/0	40/41	30/19	2/1
Életkor (év)	$42,2 (\pm 12,2)^*$			$48,3 (\pm 15,0)^*$		
	41,5 ($\pm 11,7$)	44,8 ($\pm 12,4$)	24,5 ($\pm 5,7$)	45,0 (35,0-57,0)	52,1 ($\pm 16,3$)a	50,7 ($\pm 1,5$)
Ejekciós frakció (%)	60 (± 5)			60,0 (56,0-64,0)		
	60 (± 5)	61 (± 4)	61 (± 1)	61,0 (56,0-65,0)	59,5 ($\pm 5,9$)	51,2 ($\pm 10,2$)
	247 (217-304)			255 (225-299)		

Vérlemezke szám (G/L)	254 (218-317)	240 (±51) _c	337 (±2)	260 (228-304)	252 (221-297)	250 (215-284)
Limfocita szám (G/L)	1,49 (1,23-1,83)*			1,89 (1,58-2,45)*		
	1,58 (1,25-1,95)	1,54 (±0,59)	1,76 (±1,38)	1,87 (1,61-2,12)	1,94 (±0,62)	1,66 (±0,32)
Limfocita arány (%)	23,9 (±6,7)*			29,2 (24,4-32,6)*		
	24,5 (±6,7)	22,9 (±6,3)	24,0 (±15,4)	29,7 (24,9-33,5)	27,8 (±5,4)	31,9 (±9,9)
Vérlemezke-limfocita arány	170 (135-221)*			130 (113-165)*		
	181 (±63)	174 (±61)	272 (±213)	130 (115-164)	130 (101-174)	156 (114-197)
Kreatinin koncentráció (mM)	70,8 (±16,7)			73,0 (59,8-83,3)		
	74,4 (±16,9) _{b,c}	66,5 (±14,7) _{a,c}	44,0 (±2,8) _{a,b}	74,5 (63,5-88,3)	71,0 (59,5-82,2)	62,5 (52,0-73,0)
Tüdőeltérés radiológiai stádiuma						
0. stádium (%)	2	0	0	100	100	100
1. stádium (%)	66	46	50	0	0	0
2. stádium (%)	32	54	50	0	0	0
3. stádium (%)	0	0	0	0	0	0
FVC (%)	97 (±17)			ND		
	94 (81-105) _b	103 (±13) _a	88 (±11)	ND	ND	ND
FEV1 (%)	94 (±18)			ND		
	90 (±18) _b	102 (±13) _a	84 (±19)	ND	ND	ND
Tiffeneau-index (%)	82 (78-86)			ND		
	80 (77-84) _c	82 (79-86)	94 (88-100) _a	ND	ND	ND
ACE aktivitás (U/L)	11,84 (10,1-13,5)*			9,19 (7,09-11,29)		
	11,18 (10,1-13,3)	12,56 (±3,2)	8,89 (8,7-9,1)	8,80 (±2,0) _b	9,89 (±1,9) _a	8,20 (±4,1)
ACE genotípus (II/ID/DD; %)	20 / 55 / 25			18 / 47 / 35		
	16 / 64 / 20	21 / 45 / 34	100 / 0 / 0	19 / 53 / 28	18 / 37 / 45	33 / 34 / 33
CTO aktivitás (mU/L)	2882 (1497-4166)*			539 (316-884)		
	3448 (2662-5402) _{b,c}	1520 (919-2866) _{a,c}	10 (LOD) _{a,b}	637 (447-1055) _{b,c}	413 (173-641) _{a,c}	10 (LOD) _{a,b}
Kettős szorzat (U²/L²)	34,19 (17,4-51,5)*			4,86 (2,66-7,60)		
	41,77 (28,5-55,1) _{b,c}	17,94 (12,2-38,2) _{a,c}	0,09 (0,08-0,09) _{a,b}	5,70 (3,92-9,00) _{b,c}	3,98 (1,80-6,46) _{a,c}	0,07 (0,05-0,13) _{a,b}

2. táblázat: A csoportok klinikai- és biokémiai paramétereit. *FVC= erőltetett vitálkapacitás, FEV1= erőltetett kilégzési térfogat (1 sec), ACE= angiotenzin- konvertáló enzim, CTO= kitotriozidáz, ND= nincs elérhető adat, LOD= detekciós limit. *= csoportok közötti jelentős különbség; Jelentős eltérés a következő alcsoportokhoz képest: a= homozigóta vad alcsoport; b= heterozigóta alcsoport; c= homozigóta mutáns alcsoport*

A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusa jelentős mértékben befolyásolta a szérumban CTO aktivitását (**9. ábra**). A homozigóta vad típusú egyének szérumban CTO aktivitásának átlagértéke (838,1±856 mU/L, n= 81) a kontroll csoportban 1,8-szorosa volt a heterozigótákhoz viszonyítva (471,5±367 mU/L, n= 49, p<0,001) (**9.A. ábra**). Homozigóta Dup24 genotípussal

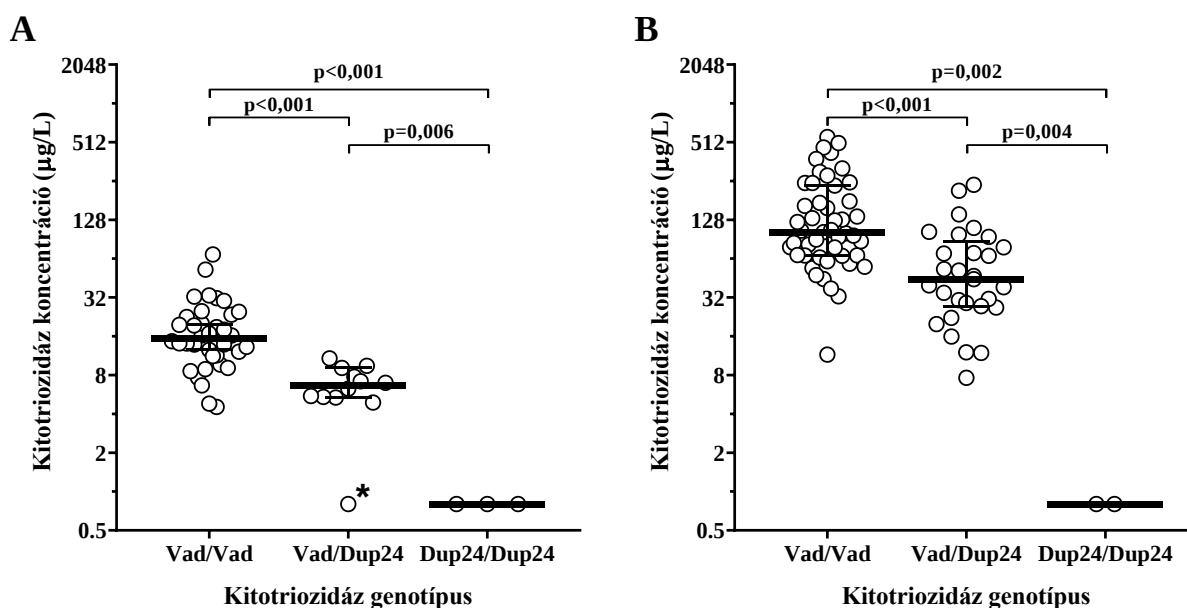
rendelkező kontroll egyénekénél ($n = 3$) a CTO aktivitás nem volt detektálható. Hasonló mintázatot véltünk felfedezni a szarkoidózisos betegcsoport vad típusú és heterozigóta tagjai között is, azonban a CTO aktivitás átlagértéke csaknem ötszöröse volt a kontroll csoportban mért aktivitás értékekhez képest (vad típus= 5125 ± 4802 mU/L, $n = 48$; heterozigóta: 2300 ± 2105 mU/L, $n = 29$). A homozigóta Dup24 genotípussal rendelkező szarkoidózisos betegekénél a szérumban CTO aktivitás szintén nem volt mérhető (9/B. ábra).



9. ábra: A Dup24 allél csökkenti a keringő CTO aktivitását mind a kontroll (A) mind pedig a szarkoidózisos (B) betegek esetében. Minden egyes szimbólum egy egyén eredményét jelöli. A vízszintes vastag vonalak az átlagot a SEM értékkel mutatják. A piros szaggatott vonal a szérumban CTO aktivitás felső normál referencia határát jelöli (1233 mU/L). A csillag (*) egy olyan egyén eredményét jelöli, aki mind a Dup24, mind pedig a Del29 CHIT1 génmutációt hordozza.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a Dup24 polimorfizmus hogyan befolyásolja a szérumban található CTO mennyiségét. Kísérleteinket egy, a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (1. számú kit) végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy a polimorfizmus jelenléte egyértelműen csökkentette a CTO mennyiségét mind az egészséges (10/A. ábra), mind pedig a szarkoidózisos populációban (10/B. ábra). A CTO koncentráció átlagértéke a kontroll csoportban a homozigóta vad genotípusú egyénekénél volt a legmagasabb ($18,9 \pm 13,0$ $\mu\text{g/L}$, $n = 36$), a heterozigóta egyénekénél közepes CTO koncentrációt detektáltunk

($7,2 \pm 1,9$ $\mu\text{g/L}$, $n = 11$), míg a homozigóta Dup24 genotípusú egyének esetén nem volt detektálható a CTO koncentráció. Hasonló mintázatot figyelhetünk meg a szarkoidózisos betegcsoportban, habár az átlag CTO koncentráció szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll populációhoz képest (vad típus= $157,1 \pm 132,4$ $\mu\text{g/L}$, $n = 47$; heterozigóta: $63,16 \pm 56,5$ $\mu\text{g/L}$, $n = 29$). A homozigóta Dup24 genotípussal rendelkező szarkoidózisos betegek szérumban nem volt mérhető a CTO koncentráció ($n = 2$).

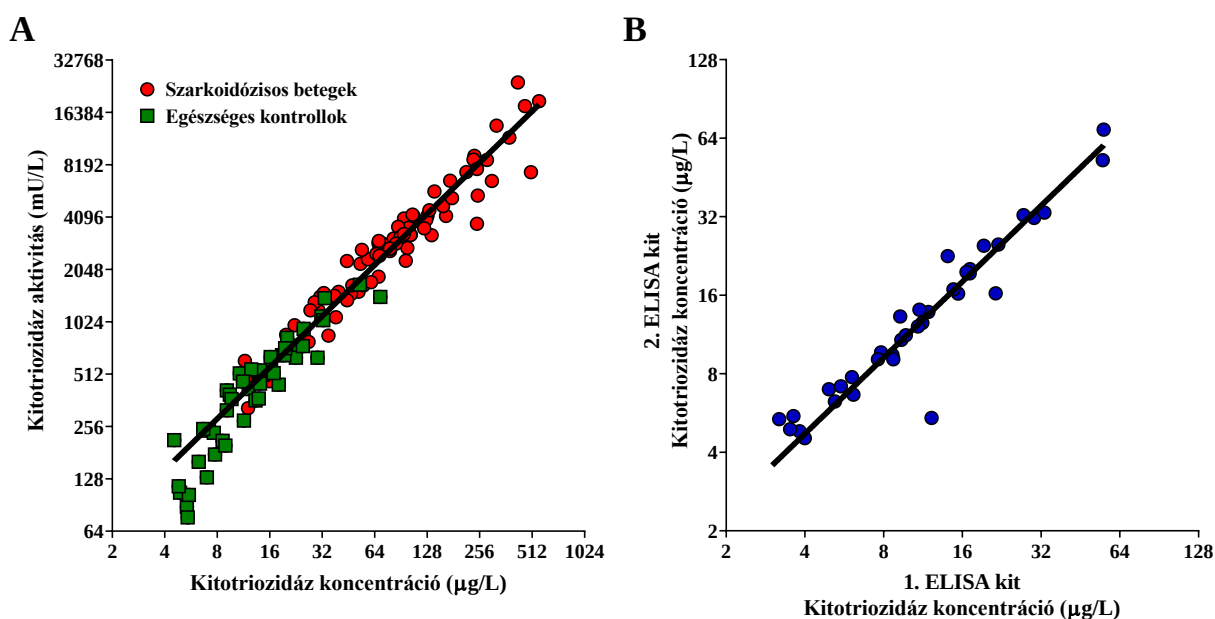


10. ábra: A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit eredménye alapján a Dup24 allél jelenléte jelentősen csökkenti a szérum CTO koncentrációját mind a kontroll (A) mind pedig a szarkoidózisos (B) betegek esetében. Minden egyes szimbólum egy egyén eredményét jelöli. A vízszintes vastag vonalak az átlagot a SEM értékkel mutatják. A csillag (*) egy olyan egyén eredményét jelöli, aki mind a Dup24, mind pedig a Del29 CHIT1 génmutációt hordozza.

Meglepő módon kísérleteink során azonosítottunk egy egészséges fiataalt, aki a Dup24 polimorfizmus hordozója ugyan, de mégsem rendelkezik detektálható szérum CTO aktivitással (9. ábra, csillaggal jelölt érték) sem pedig mérhető szérum CTO koncentrációval (10. ábra, csillaggal jelölt érték).

A meghatározott CTO aktivitás és koncentráció értékek jelentős összefüggést mutattak (11/A. ábra; az egyenes meredeksége $0,979$ $\text{mU}/\mu\text{g}$; az illesztés pontossága: $r^2 = 0,846$; $n = 123$). Ez a látszólag állandó specifikus aktivitás arra enged következtetni, hogy a duplikációs

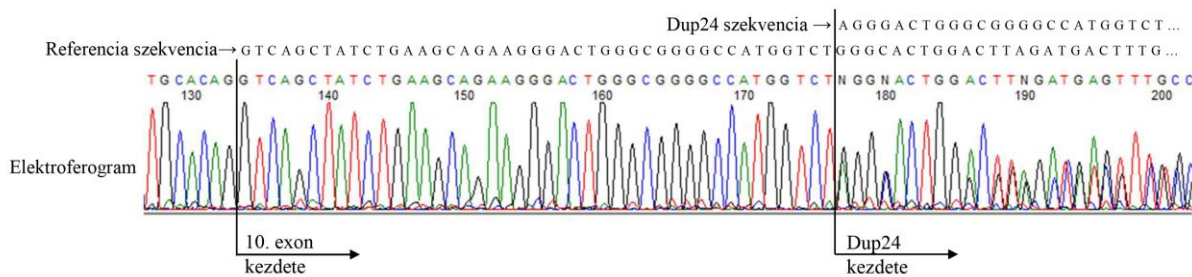
polimorfizmus a CTO aktivitást és a koncentrációt egyaránt befolyásolja, ebből kifolyólag a CTO koncentráció meghatározása nem szolgáltat többlet információt a szarkoidózis laboratóriumi diagnosztikája során. A duplikációs polimorfizmus CTO koncentrációra kifejtett hatását egy második, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (2. számú kit) szintén megerősítettük. A meghatározott koncentráció értékek az előző mérés eredményeivel összhangban voltak (**11/B. ábra**; egyenes meredeksége = 0,968; az illesztés pontossága: $r^2 = 0,954$, $n = 40$; $p < 0,001$).



11. ábra: A szérumban kitotrioxidáz aktivitás egyenesen arányos a szérumban kitotrioxidáz koncentrációval. A mérést egy, a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel határoztunk meg (A). A zöld négyzetek az egészséges egyének, míg a piros körök a szarkoidózisos betegek eredményeit mutatják. Egy második kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit 40 szérumban mintát vizsgálva hasonló értékeket eredményezett (B).

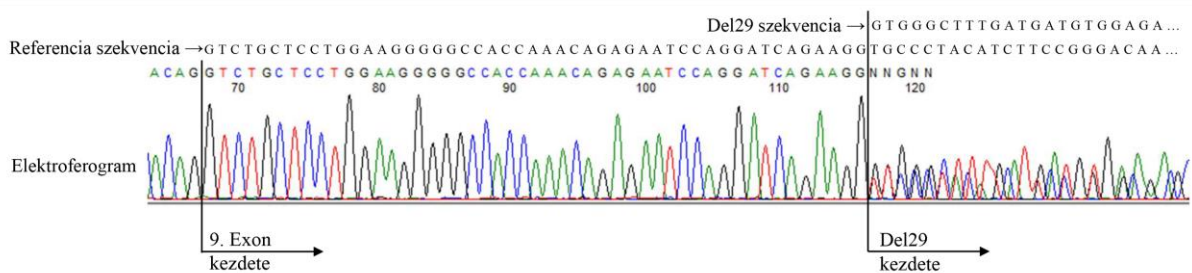
6.5. A CHIT1 gén Del29 mutációjának azonosítása a magyar populációban

Kísérletes munkánk következő részében arra az egészséges egyénre koncentráltunk, aki csak hordozója a Dup24 duplikációs polimorfizmusnak, azonban szérumban mintájából CTO aktivitás nem volt detektálható (9 és 10. ábrákon csillaggal jelölve). A CHIT1 gén 10. exon szekvenciájának meghatározása megerősítette a Dup24 duplikációs polimorfizmus heterozigóta formáját, azonban ezzel továbbra sem magyarázható a CTO aktivitás hiánya (12. ábra).



12. ábra: Reprezentatív elektroferogram részlet a proband 10. exonjából. A referencia szekvencia, a Dup24 mutáció szekvenciája és a meghatározott DNS szekvencia feltüntetésre került.

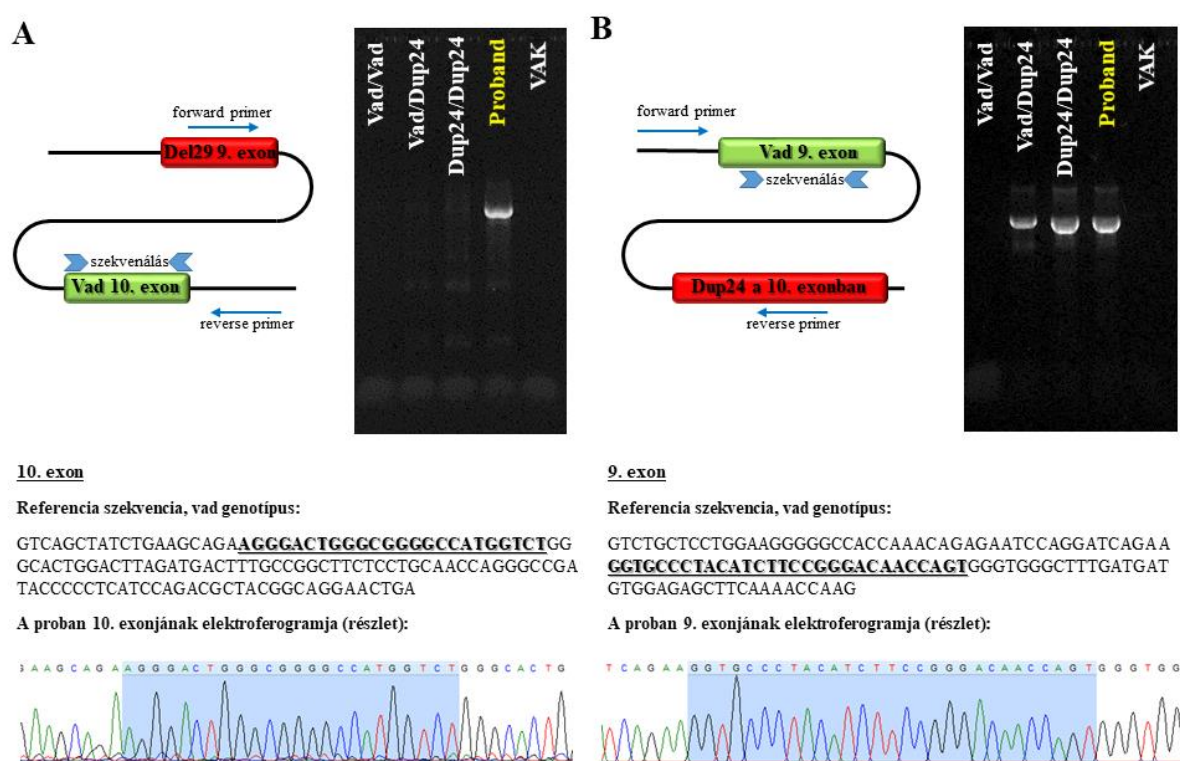
Ennélfogva a CHIT1 gén minden egyes exonja esetében DNS szekvencia analízist végeztünk, melynek eredményeként heterozigóta formában azonosítottunk egy 29 bázispár hosszú deléciós mutációt a 9-es exonban (c.(965_993)del; rs536102546; jelölve, mint Del29) **(13. ábra).**



13. ábra: Reprezentatív elektroferogram részlet a proband 9. exonjából. A referencia szekvencia, a Del29 mutáció szekvenciája és a meghatározott DNS szekvencia feltüntetésre került.

A Del29 mutáció jelenléte egy 10 aminosav hosszúságú szakasz (322-331) delécióját eredményezi a CTO fehérjében, melynek következtében kialakuló frameshift mutáció három aminosav után korai stop kodont generál, így egy trunkált CTO fehérje képződik [119]. Amennyiben az egyén összetett heterozigóta formájában hordozza mindkét mutációt, ezen genetikai vizsgálatok eredményei magyarázattal szolgálhatnak a CTO aktivitás hiányára. A mutációk cisz-transz irányú elhelyezkedését PCR reakcióval, majd azt követően a PCR termékek Sanger szekvenálásával állapítottuk meg. Elsőként olyan PCR reakciót terveztünk, mely csak abban az esetben eredményez terméket, amennyiben a 9-es exon Del29 mutációja

jelen van (**14/A. ábra**). Ekkor a PCR termék tartalmazza a teljes 10-es exont, mely nukleotid szekvenciája szekvenálással vizsgálható. Ez a PCR termék a gélelektroforézis során csak a vizsgált személy esetén volt megfigyelhető (**14/B. ábra**), míg a szekvenálás a vad típusú allél jelenlétét erősítette meg. A Dup24 polimorfizmus jelenlétét szintén egy PCR reakció segítségével igazoltuk, amelynek a terméke a teljes 9-es exont tartalmazta. A második PCR a Dup24 heterozigóta, homozigóta kontroll és a vizsgált egyén esetén is terméket eredményezett. A szekvenálás megerősítette a vad allél jelenlétét a vizsgált egyén 9-es exonjában (**14/B. ábra**, elektroferogram), ezzel alátámasztva a Del29 és Dup24 mutációk transz elhelyezkedését.



14. ábra: A vizsgált egyénnél a Dup24 és Del29 mutációk transz helyzete igazolásra került. A sematikus ábrák a primerpárok bekötődési helyét illusztrálják. Csak a vizsgált egyén DNS-e eredményezett PCR terméket abban az esetben, amikor Del29 mutációra specifikus primerpárt használtunk (A, reprezentatív gélkép, termék nagysága ≈ 1600 bp). A homozigóta vad, Dup24 heterozigóta kontroll és a vizsgált egyén DNS-e adott PCR terméket abban az esetben, amikor Dup24 mutációra specifikus primerpárt használtunk (B, reprezentatív gélkép, termék nagysága ≈ 1700 bp). A vizsgált egyén mindkét PCR terméke esetén vad szekvenciát találtunk (ábra alsó része, elektroferogram).

7. Megbeszélés

A szérumból történő ACE aktivitás meghatározása a szarkoidózis [120], a Gaucher-kór [121], illetve különböző granulomatózus betegségek [122] diagnosztizálása során egyaránt jelentős információt nyújthat. Az ACE aktivitás a szarkoidózis diagnózisának felállítása és annak monitorozása során potenciális biomarkerként szolgálhat [83]. Az ACE aktivitás meghatározható radioaktívan jelölt szubsztráttal, kolorimetriás és fluorometriás módszerekkel egyaránt, azonban nemrégiben kifejlesztésre került egy gyors, érzékeny fluoreszcens kinetikus esszé, mely egy quenched fluoreszcens szubsztrátot (Abz-FRK(Dnp)P-OH) alkalmazva méri az ACE aktivitását [123]. Munkánk elsődleges céljának megvalósítása során ezt a módszert tovább finomítottuk annak érdekében, hogy az albumin endogén ACE gátló hatását megszüntessük. Leírásra került a méréssel interferáló faktorok köre, továbbá meghatároztuk az optimalizált módszer genotípus függő és független referencia tartományait is.

Az albumin által kiváltott endogén ACE gátló hatás reverzibilis, ebből kifolyólag a gátlás mértékét nagyban befolyásolja a mérés során alkalmazott hígítás mértéke. Tehát a szérum minta megfelelő hígításával a gátló hatás megszüntethető. Kísérleteink során meghatároztuk, hogy a szérum minta legalább 35-szörös kihígításával az ACE-ra kifejtett albumin-mediált gátló hatás szinte teljes mértékben megszüntethető. A 35-szörös szérum hígítás mindhárom ACE *I/D* genotípusnál alkalmazható, ezért az *I/D* genotípus ismerete az aktivitás méréséhez nem szükséges, az eredmények kiértékeléséhez azonban indokolt lehet. Érdemes megjegyezni azonban, hogy a 35-szörös szérum hígítás nem elegendő az ACE gátló gyógyszerek által okozott aktivitáscsökkentő hatás megszüntetéséhez. Ezen betegek ACE aktivitásának diagnosztikai célú meghatározása előtt célszerű a gyógyszeres terápiát ideiglenesen szüneteltetni, vagy az ACE gátló gyógyszert angiotenzin II receptor blokkolóra cserélni.

Annak ellenére, hogy Lieberman és Sastre már 1986-ban felhívta a figyelmet a szérum hígításának fontosságára [124], a jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő ACE aktivitás meghatározásához használható diagnosztikai reagensek gyártói a szérum minta csupán 5-, illetve 10-szeres hígítását javasolják. Lieberman és Sastre kísérleteik során 6-, 12-, 24- és 48-szoros végső hígítást alkalmaztak. Eredményeik alapján arra a meglátásra jutottak, hogy az endogén gátló hatás megszüntetéséhez a szérum minta 48-szoros (8-szoros minta hígítás a mérés előtt és 6-szoros hígítás a meghatározás során) hígítása szükséges. Ez a megállapítás összhangban van az általunk mért eredményekkel, melyek szerint a 24-szeres hígítás

alkalmazásakor az ACE még részben gátlás alatt áll, míg a 35-szörös hígítás esetén a gátló hatás látszólag teljesen megszűnik.

Endogén interferenciáról szóló tanulmányokban leírták, hogy a hemolízis és a bilirubin jelenléte interferenciát okozhat a fluoreszcens kinetikus aktivitásmérés során. Figyelembe véve az ACE aktivitás egyének közti enyhe variabilitását, illetve azt a tényt, hogy egyes szarkoidózisos betegeknél az ACE aktivitás csak kismértékben növekszik, az interferenciából adódó 10%-os ACE aktivitás csökkenés véleményünk szerint szignifikánsnak tekinthető. Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a bilirubin csökkenti az ACE aktivitást spektrofotometriás módszer alkalmazásakor, míg a radionukleotid-alapú meghatározást nem befolyásolja [125]. A bilirubin képes közvetlenül hozzákötődni az ACE-hoz, ezáltal megváltoztatni annak konformációját, melynek következtében befolyásolhatja az ACE endothél sejtekről történő lehasadásának folyamatát [126], és talán az ACE aktivitást is. Hemolízis során a vörösvértestekből nagy mennyiségű hemoglobin szabadul fel. A hemoglobin 415 nm, 540 nm és 570 nm hullámhosszokon erős abszorbanciát mutat [127]. A fluoreszcens kinetikai meghatározás során a fluoreszcencia intenzitást 405 nm-en mérjük, ebből kifolyólag a hemolizált szérum minták esetén a szabad hemoglobin részben elnyelheti az emittált fényt, mely az ACE aktivitás látszólagos csökkenését eredményezheti. Másrészt azonban nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a hemoglobin közvetlen hatást gyakorol az ACE-ra. A lipémia 16 mM triglicerid koncentrációig nem befolyásolja a fluoreszcens ACE aktivitásmérést, tehát az éhgyomri mintavétel nem szükséges a meghatározás előtt. Ezen megállapítások alapján 0,71 g/L hemoglobin, illetve 150 μ M-nál magasabb bilirubin koncentráció esetén a szérum minták további hígítása szükséges annak érdekében, hogy ezen interferáló faktorok lehetséges hatásait kiküszöbölhessük az ACE aktivitás mérés során.

Kétszázegy magyar személy adatai alapján meghatároztuk az ACE aktivitás genotípus függő, és genotípus független referencia tartományait. Tudomásunk szerint, korábban még nem publikáltak ACE aktivitás referencia tartományokat fluoreszcens módszer alapján. A Klinikai és Laboratóriumi Szabványügyi Intézet (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [128] és a Laboratóriumi Medicina Európai Szövetsége (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM) [129] jelenlegi irányelvei szerint a referencia csoportba legalább 120 egyén beválogatása szükséges. Habár a genotípus független referencia csoport esetén teljesül ez a feltétel ($n = 201$), mindhárom genotípus függő csoportban kevesebb egyén van, mely limitáló tényező volt a referencia értékek meghatározása során. A referencia populáció *I/D* genotípus eloszlása (*II* = 19,4%; *ID* = 44,8%; *DD* = 72%) összhangban volt a

korábban publikált kaukázusi csoportok adataival [130]–[132], illetve az ACE aktivitás átlag értékei szintén szignifikánsan különböztek a három genotípus között ($p < 0,0001$). Az általunk meghatározott genotípus függő referencia értékek 7,19 U/L (a *DD* genotípus alsó értékhatára) és 11,25 U/L (az *II* genotípus felső értékhatára) között átfednek egymással. Véleményünk szerint az ACE *I/D* genotípus meghatározása csak abban az esetben szükséges, amennyiben az ACE aktivitás értéke meghaladja a 11,25 U/L-t. A magasabb aktivitás értékkel rendelkező egyéneknél nagy előnyt jelent a genotípus meghatározása és a genotípus függő referencia értékek alkalmazása. Ennek a módszernek az alkalmazása segíthet a genotipizálásból származó költségek racionalizálásában.

A szarkoidózis diagnosztizálása gyakran kihívás a klinikusok számára, hiszen a radiológiai eredmények alátámasztásához szövettani vizsgálatokra lehet szükség [2]. A biopszia vételezéséhez szükséges invazív beavatkozás nem terápiás célú, csupán diagnosztikai jelentőséggel bír, ezért kifejezetten megterhelő az izolált tüdő vagy mediasztinális eltéréssel rendelkező betegek számára. Jelenleg az Amerikai Tüdőgyógyász Társaság (ATS) egyetlen vérteszt vagy biomarker használatát sem javasolja a szarkoidózis diagnózisának felállításához [133]. Azonban egy ilyen megbízható, vérből is meghatározható módszer kifejlesztése érdekében számos lehetséges biomarker került leírásra, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy a szarkoidózis kétséget kizáró diagnózisa akár műtét nélkül is felállítható legyen [134].

Habár a szarkoidózisos betegek és az egészséges egyének közötti ACE aktivitás különbség általában alacsony, a szérumban ACE aktivitás meghatározását diagnosztikai tesztként javasolják [135], [136]. Ennek megfelelően, a szarkoidózisos betegek ACE aktivitásainak átlaga csupán 1,3-szor volt magasabb, mint a kontroll csoport optimalizált fluoreszcens kinetikai módszerrel meghatározott ACE aktivitása. Továbbá megjegyzendő, hogy a keringő ACE aktivitást az ACE gén *I/D* polimorfizmusa is befolyásolja [137]. A genotípus meghatározásával és az ACE aktivitás genotípus függő referencia tartományainak alkalmazásával az ACE aktivitásmérés pontossága tovább növelhető szarkoidózisban.

A korábbiakban igazoltuk, hogy a szérumban ACE és CTO aktivitások kombinálásából származó ún. „kettős szorzat” szarkoidózis esetén magas diagnosztikai pontossággal bír, továbbá a teszt érzékenysége és pozitív prediktív értéke is 90% fölért [115]. A betegek genetikai hátterének feltérképezése még tovább növelheti a pontosságot.

Az ACE gén *I/D* polimorfizmusa nem okoz aminosav változást az expresszált ACE fehérjében, mert a mutáció a gén introni szakaszában található. Az *I* allél jelenléte csökkenti a

keringő ACE aktivitást, mellyel arányosan csökken az ACE fehérje mennyisége is [137]. Ez azonban nem mondható el a Dup24 mutációról, ami egy viszonylag gyakori CTO polimorfizmus. A Dup24 duplikációs mutáció a CHIT1 gén 10-es exonjában található, melynek jelenléte a fehérjeszintézis korai terminálódását okozza. Ennek következtében a szintetizálódott CTO fehérje 29 aminosavval megrövidül és teljesen inaktív lesz. Kísérleteink során vizsgáltuk azt a felvetést, mely szerint az ELISA módszerrel meghatározott keringő CTO mennyiség (nem pedig a polimorfizmus által befolyásolt aktivitás) növeli-e a CTO meghatározások pontosságát szarkoidózisban. Két különböző, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitet alkalmaztunk, melyben az elfogó antitest nem a CTO fehérje katalitikus doménjéhez (a polimorfizmus által érintett terület) kötődik. Egyik ELISA teszt segítségével sem tudtuk kimutatni az inaktív fehérjét, így a keringő CTO koncentrációjának meghatározása annak aktivitása helyett nem javította a teszt diagnosztikai teljesítőképességét.

A Dup24 allél frekvenciája a kontinensek, továbbá az országok között is szignifikáns eltérést mutat. Így például a Dup24 polimorfizmus teljes mértékben hiányzik a Benini Köztársaságban (Afrika) [110], 20%-os gyakorisággal fordul elő a holland populációban (Európa) [111], 23%-os az Egyesült Államokban (Észak-Amerika) [117], 32% a brazil populációban (Dél-Amerika) [138], illetve 58% gyakoriságú a kínai Han populációban (Ázsia) [139]. Kísérleteink során meghatároztuk a Dup24 allél előfordulásának gyakoriságát a magyar populációra vonatkozóan, mely más európai országok eredményeivel összehangban [111], [140] 21%-nak bizonyult. A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy fennáll annak a lehetősége, miszerint a Dup24 allélt hordozó szarkoidózisos betegek vizsgálata során a CTO alapú tesztek fals negatív eredményt adnak. A Dup24 genotipizálás és a genotípus függő CTO aktivitás referencia tartományok alkalmazása jelentős mértékben megnövelheti a CTO diagnosztikai hatékonyságát (a heterozigóták esetén), mellyel jobban alátámasztható a szarkoidózis diagnózisa.

Számos olyan ritka mutáció ismert, mely szintén befolyásolja a szérums CTO aktivitást, azonban ezek a mutációk a Dup24 genotipizálással nem mutathatók ki. A CTO aktivitás teljes hiányát figyelték meg a p.Gly354Arg mutáció esetén [141], továbbá a p.Gly102Ser [111], [117], a p.Glu74Lys [117] vagy a p.Ala442Val [141] mutációk szintén csökkent CTO aktivitással társultak.

Kísérleteink során azonosítottunk egy olyan egészséges fiatal egyént, aki heterozigóta formában hordozza a Dup24 mutációt, azonban szérums mintájából CTO aktivitás nem volt meghatározható. A DNS szekvenálás során megállapítottuk, hogy ez a magyar férfi egy ritka

mutációt hordoz a CHIT1 gén 9-es exonjában, mely szintén inaktív CTO enzim expresszióját eredményezi. Ebben az esetben sikeresen igazoltuk, hogy a Dup24 és Del29-es allélok a vizsgált személy esetében összetett heterozigóta formában vannak jelen, melynek következtében nincs mérhető CTO aktivitás. Del29-es mutációt ez idáig csak a ciprusi populációra jellemző eltérésnek tartották [119], így jelenléte az őshonos magyar populációban különösen érdekes.

Azok a gyakori polimorfizmusok, illetve ritka mutációk, melyek csökkentik vagy megszüntetik a CTO aktivitását, jelentős mértékben befolyásolják a CTO biomarkerként történő alkalmazását a szarkoidózis diagnosztikában. Ezen mutációk hatással vannak a jelenlegi CTO mennyiség meghatározására szolgáló módszerekre, ennél fogva a CTO aktivitásmérést nem helyettesíthetik. Kizárólag a CHIT1 gén genotipizálása nyújthat segítséget abban, hogy a laboratóriumi eredmények félreértelmezését elkerüljük, továbbá a genotipizálás elősegítheti az alacsony allélfrekvenciájú mutációk kimutatását is.

A doktori értekezésben bemutatott új eredmények:

- Kísérleteink során kimutattuk, hogy a szérum albumin által mediált reverzibilis endogén gátlóhatás a szérum legalább 35-szörös hígításával eliminálható.
- Méréseink szerint a fluoreszcens kinetikai ACE aktivitás meghatározást a szérum minta turbiditása nem befolyásolja, továbbá a hemoglobin és a bilirubin által kiváltott interferáló hatás a szérum hígításával megszüntethető.
- Elsőként határoztuk meg az ACE *I/D* genotípus függő és független referencia tartományokat a magyar populációra vonatkozóan.
- Megfigyeléseink alapján a CHIT1 gén Dup24 mutációt hordozó egyéneknél a keringő CTO koncentrációjának meghatározása nem javítja a teszt diagnosztikai teljesítőképességét szarkoidózisban.
- Kimutattuk a CHIT1 gén Del29 mutációjának jelenlétét egy magyar egyénben, mely mutáció ezidáig csak a ciprusi populációban került leírásra. Ez a mutáció tovább nehezíti a CTO meghatározások biomarkerként történő alkalmazását a szarkoidózis diagnosztikában.

8. Összefoglalás

A szarkoidózis egy ismeretlen eredetű granulomatózus megbetegedés, mely leggyakrabban a tüdőt érinti. Diagnosztizálása a radiológiai leletek mellett gyakran invazív mintavételt is igényel, mely kifejezetten megterhelő lehet a betegek számára. Ezért napjainkban egyre nagyobb az igény a megfelelően szenzitív és specifikus szérumbiomarkerek iránt.

A klinikai gyakorlatban jelenleg az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) meghatározása van jelen, melynek aktivitását számos tényező, köztük a szérumbalbumin által kiváltott endogén gátlóhatás, a méréssel interferáló faktorok jelenléte, valamint az ACE gén *I/D* polimorfizmusa is befolyásolhatja. Munkánk során megkíséreltük ezen zavaró tényezőket kiküszöbölni az általunk alkalmazott fluoreszcens ACE aktivitás mérés optimalizálásával. Meghatároztuk, hogy a szérumbminta legalább 35-szörös kihígításával az ACE-ra kifejtett reverzibilis, albumin-mediált gátló hatás megszüntethető. Továbbá vizsgáltuk a szérumbminták minőségét rontó leggyakoribb tényezők hatásait. A lipémia 16 mM triglicerid koncentrációig nem befolyásolta a fluoreszcens ACE aktivitásmérést. Ellenben 0,71 g/L hemoglobinnal, illetve 150 μ M-nál magasabb bilirubin koncentráció az ACE aktivitás 10%-os alámérését eredményezte. Meghatároztuk továbbá az ACE aktivitás magyar populációra vonatkozó genotípus függő és genotípus független referencia tartományait, mellyel még tovább növelhető az ACE aktivitásmérés diagnosztikai haszna.

A szarkoidózis diagnosztikában szintén ígéretes szérumbiomarker a kitotriozidáz (CTO). A korábbiakban igazoltuk, hogy a szérumb ACE és CTO aktivitások kombinálásából származó ún. „kettős szorzat” szarkoidózis esetén magas diagnosztikai pontossággal bír, továbbá a teszt érzékenysége és pozitív prediktív értéke is 90% fölé emelkedett. A CTO aktivitását azonban jelentősen befolyásolja a CHIT1 gén polimorfizmusa. A Dup24 mutáció inaktív CTO fehérjét eredményez. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a CTO mennyiség mérése az aktivitásméréssel szemben növeli-e a CTO meghatározások pontosságát szarkoidózisban, ami azonban nem javította a teszt diagnosztikai teljesítőképességét. Azonosítottuk továbbá a Del29-es mutációt a magyar populációban, melynek jelenléte a CTO aktivitás hiányát okozva további nehézségeket jelent a CTO aktivitás szarkoidózis diagnosztikájában való használatában.

9. Summary

Sarcoidosis is a granulomatous disease of unknown origin that most commonly affects the lungs. In addition to radiological findings, the diagnosis often requires invasive sampling which can be particularly burdensome for patients. Therefore, nowadays there is a growing demand for appropriately sensitive and specific serum biomarkers.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) measurement is currently present in clinical practice, the activity of which may be affected by a number of factors, including endogenous serum albumin-induced inhibition, the presence of interfering factors, and the I/D polymorphism of the ACE gene. During our work, we tried to eliminate these confounding factors by optimizing the fluorescent ACE activity measurement we applied. It was determined that a reversible albumin-mediated inhibitory effect on ACE could be abolished by diluting the serum sample at least 35-fold. We also examined the effects of the most common factors that degrade the quality of serum samples. Lipemia up to a triglyceride concentration of 16 mM did not affect the measurement of fluorescent ACE activity. In contrast, hemoglobin concentrations of 0.71 g/L and bilirubin greater than 150 μ M resulted in a 10% underestimation of ACE activity. We also determined the genotype-dependent and genotype-independent reference ranges of ACE activity for the Hungarian population, which can further increase the accuracy of ACE activity measurement in sarcoidosis diagnostics.

Chitotriosidase (CTO) is also a promising serum biomarker in the diagnosis of sarcoidosis. We have previously demonstrated that the so-called "double product" derived from the combination of ACE and CTO activity has a high diagnostic accuracy for sarcoidosis, in addition sensitivity and positive predictive value are above 90%. However, CTO activity is significantly influenced by the polymorphism of the CHIT1 gene. The Dup24 mutation results in an inactive CTO protein. In our work, we examined whether measuring the amount of CTO increases the accuracy of CTO determinations in sarcoidosis, which, however, did not improve the diagnostic performance of the test. We also identified the presence of Del29 mutation in the Hungarian population, causing lack of CTO activity that raises further difficulties in its use in the laboratory diagnosis of sarcoidosis.

10. Hivatkozások

- [1] R. Jain, D. Yadav, N. Puranik, R. Guleria, and J.-O. Jin, “Sarcoidosis: Causes, Diagnosis, Clinical Features, and Treatments,” *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 4, p. 1081, 2020, doi: 10.3390/jcm9041081.
- [2] U. Costabel and G. W. Hunninghake, “ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders.,” *Eur. Respir. J.*, vol. 14, no. 4, pp. 735–7, Oct. 1999.
- [3] M. Ramos-Casals, S. Retamozo, A. Sisó-Almirall, R. Pérez-Alvarez, L. Pallarés, and P. Brito-Zerón, “Clinically-useful serum biomarkers for diagnosis and prognosis of sarcoidosis,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 15, no. 4, pp. 391–405, 2019, doi: 10.1080/1744666X.2019.1568240.
- [4] B. Rigat, C. Hubert, P. Corvol, and F. Soubrier, “PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1).,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, no. 6, p. 1433, Mar. 1992.
- [5] S. Popević *et al.*, “Verifying Sarcoidosis Activity: Chitotriosidase Versus ACE in Sarcoidosis - A Case-Control Study,” *J. Med. Biochem.*, vol. 35, no. 4, pp. 390–400, 2016, doi: 10.1515/jomb-2016-0017.
- [6] S. J. Cho, M. D. Weiden, and C. G. Lee, “Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD,” *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 14–21, 2014, doi: 10.4168/aaair.2015.7.1.14.
- [7] Jonathan Hutchinson, “Anomalous diseases of skin and fingers: case of livid papillary psoriasis?,” in *Illustrations of Clinical Surgery*, London, J and A Churchill, 1877, pp. 42–43.
- [8] O. P. Sharma, “Definition and history of sarcoidosis,” in *Sarcoidosis*, 2005, pp. 1–12.
- [9] A. B. Alvarez, A. S. Lee, and I. Mira-Avendano, “Etiologies of consecutive series of non-necrotizing granulomas,” *Sarcoidosis Vasc. Diffus. Lung Dis.*, vol. 34, no. 2, pp. 115–121, 2017, doi: 10.36141/svldd.v34i2.5966.
- [10] Y. C. Cozier, J. S. Berman, J. R. Palmer, D. A. Boggs, D. M. Serlin, and L. Rosenberg,

- “Sarcoidosis in black women in the United States: Data from the Black Women’s Health Study,” *Chest*, vol. 139, no. 1, pp. 144–150, 2011, doi: 10.1378/chest.10-0413.
- [11] A. K. Gerke, M. A. Judson, Y. C. Cozier, D. A. Culver, and L. L. Koth, “Disease burden and variability in sarcoidosis,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 14, pp. S421–S428, 2017, doi: 10.1513/AnnalsATS.201707-564OT.
- [12] E. V. Arkema, J. Grunewald, S. Kullberg, A. Eklund, and J. Askling, “Sarcoidosis incidence and prevalence: A nationwide register-based assessment in Sweden,” *Eur. Respir. J.*, vol. 48, no. 6, pp. 1690–1699, 2016, doi: 10.1183/13993003.00477-2016.
- [13] J. M. Reich, “A critical analysis of sarcoidosis incidence assessment,” *Multidiscip. Respir. Med.*, vol. 8, no. 9, pp. 5–8, 2013, doi: 10.1186/2049-6958-8-57.
- [14] M. Mirsaeidi, R. F. Machado, D. Schraufnagel, N. J. Sweiss, and R. P. Baughman, “Racial difference in sarcoidosis mortality in the United States,” *Chest*, vol. 147, no. 2, pp. 438–449, 2015, doi: 10.1378/chest.14-1120.
- [15] T. Morimoto *et al.*, “Epidemiology of sarcoidosis in Japan,” *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 2, pp. 372–379, 2008, doi: 10.1183/09031936.00075307.
- [16] H. Yoon, J. Song, and Y. Kim, “Sarcoidosis in South Korea: Analysis of prevalence and incidence by a nationwide population-based study,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 197, no. MeetingAbstracts, pp. 1–8, 2018.
- [17] R. P. Baughman *et al.*, “Sarcoidosis in America: Analysis based on health care use,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 13, no. 8, pp. 1244–1252, 2016, doi: 10.1513/AnnalsATS.201511-760OC.
- [18] R. L. Soiza, A. I. C. Donaldson, and P. K. Myint, “Vaccine against arteriosclerosis: an update,” *Ther. Adv. Vaccines*, vol. 9, no. 6, pp. 259–261, 2018, doi: 10.1177/https.
- [19] B. A. Rybicki *et al.*, “Familial aggregation of sarcoidosis: A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS),” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 164, no. 11, pp. 2085–2091, 2001, doi: 10.1164/ajrccm.164.11.2106001.
- [20] K. M. Hena, “Sarcoidosis Epidemiology: Race Matters,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. September, pp. 10–14, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.537382.
- [21] N. Soto-Gomez, J. I. Peters, and A. M. Nambiar, “Diagnosis and management of sarcoidosis,” *Am. Fam. Physician*, vol. 93, no. 10, pp. 840–848, 2016.

- [22] P. Ungprasert, J. H. Ryu, and E. L. Matteson, "Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis," *Mayo Clin. Proc. Innov. Qual. Outcomes*, vol. 3, no. 3, pp. 358–375, 2019, doi: 10.1016/j.mayocpiqo.2019.04.006.
- [23] L. Jara-Palomares, C. Caballero-Eraso, C. Gutierrez, A. Donate, and J. Antonio, "Clinical Manifestations of Sarcoidosis," in *Sarcoidosis*, vol. 23, no. 3, InTech, 2013, pp. 176–182.
- [24] D. A. Rao and P. F. Dellaripa, "Extrapulmonary Manifestations of Sarcoidosis," *Rheum Dis Clin North Am*, vol. 39, no. 2, pp. 277–297, 2014, doi: 10.1016/j.rdc.2013.02.007.Extrapulmonary.
- [25] A. Handa, S. Dhooria, I. S. Sehgal, and R. Agarwal, "Primary cavitary sarcoidosis: A case report, systematic review, and proposal of new diagnostic criteria," *Lung India*, vol. 35, no. 1, pp. 41–46, 2018, doi: 10.4103/lungindia.lungindia.
- [26] S. Pasadhika and J. T. Rosenbaum, "Ocular Sarcoidosis," *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 4, pp. 669–683, 2015, doi: 10.1016/j.ccm.2015.08.009.
- [27] H. Yanardag, C. Tetikkurt, M. Bilir, S. Demirci, and A. Iscimen, "Diagnosis of cutaneous sarcoidosis; clinical and the prognostic significance of skin lesions," *Multidiscip. Respir. Med.*, vol. 8, no. 3, p. 1, 2013, doi: 10.1186/2049-6958-8-26.
- [28] L. Requena and C. Requena, "Erythema nodosum," *Dermatol. Online J.*, vol. 8, no. 1, 2002, doi: 10.5070/D34829T6RN.
- [29] K. Damevska, S. Vassileva, K. Drenovska, S. Kostadinova-Kunovska, and V. Mateeva, "Sarcoidosis," in *Atlas of Dermatoses in Pigmented Skin*, Singapore: Springer Singapore, 2021, pp. 469–479.
- [30] R. M. Marchell and M. A. Judson, "Chronic cutaneous lesions of sarcoidosis," *Clin. Dermatol.*, vol. 25, no. 3, pp. 295–302, 2007, doi: 10.1016/j.clindermatol.2007.03.007.
- [31] K. L. MacArthur, F. Forouhar, and G. Y. H. Wu, "Intra-abdominal Complications of Sarcoidosis," *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 109, no. 7, pp. 484–492, 2010, doi: 10.1016/S0929-6646(10)60082-4.
- [32] T. Kiko *et al.*, "A multiple biomarker approach in patients with cardiac sarcoidosis," *Int. Heart J.*, vol. 59, no. 5, pp. 996–1001, 2018, doi: 10.1536/ihj.17-695.
- [33] J. A. Sparks *et al.*, "Osseous sarcoidosis: Clinical characteristics, treatment, and

- outcomes-Experience from a large, academic hospital,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 44, no. 3, pp. 371–379, 2014, doi: 10.1016/j.semarthrit.2014.07.003.
- [34] D. P. Kidd, “Neurosarcoidosis: Clinical manifestations, investigation and treatment,” *Pract. Neurol.*, vol. 20, no. 3, pp. 199–212, 2020, doi: 10.1136/practneurol-2019-002349.
- [35] I. Hilderson, S. Van Laecke, A. Wauters, and J. Donck, “Treatment of renal sarcoidosis: Is there a guideline? Overview of the different treatment options,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 29, no. 10, pp. 1841–1847, 2014, doi: 10.1093/ndt/gft442.
- [36] S. Nagai, T. Handa, Y. Ito, K. Ohta, M. Tamaya, and T. Izumi, “Outcome of Sarcoidosis,” *Clin. Chest Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 565–574, 2008, doi: 10.1016/j.ccm.2008.03.006.
- [37] A. K. Gerke, “Treatment of Sarcoidosis: A Multidisciplinary Approach,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. November, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.545413.
- [38] P. T. Inaoka, M. Shono, M. Kamada, and J. L. Espinoza, “Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1186/s12929-019-0537-6.
- [39] S. Dubrey, S. Shah, T. Hardman, and R. Sharma, “Sarcoidosis: The links between epidemiology and aetiology,” *Postgrad. Med. J.*, vol. 90, no. 1068, pp. 582–589, 2014, doi: 10.1136/postgradmedj-2014-132584.
- [40] H. Cai, M. Cao, F. Meng, and J. Wei, “Pulmonary sarcoid-like granulomatosis induced by aluminum dust: report of a case and literature review.,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 120, no. 17, pp. 1556–60, Sep. 2007.
- [41] U. Werfel *et al.*, “Sarcoid granulomatosis after zirconium exposure with multiple organ involvement [2],” *Eur. Respir. J.*, vol. 12, no. 3, p. 750, 1998, doi: 10.1183/09031936.98.12030750.
- [42] D. Gupta, R. Agarwal, A. N. Aggarwal, and S. K. Jindal, “Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: A meta-analysis,” *Eur. Respir. J.*, vol. 30, no. 3, pp. 508–516, 2007, doi: 10.1183/09031936.00002607.
- [43] A. Dubaniewicz, “Microbial and human heat shock proteins as ‘danger signals’ in sarcoidosis,” *Hum. Immunol.*, vol. 74, no. 12, pp. 1550–1558, 2013, doi:

10.1016/j.humimm.2013.08.275.

- [44] A. Dubaniewicz *et al.*, “Mycobacterium tuberculosis complex and mycobacterial heat shock proteins in lymph node tissue from patients with pulmonary sarcoidosis,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 9, pp. 3448–3451, 2006, doi: 10.1128/JCM.01433-06.
- [45] A. Dubaniewicz, S. Kämpfer, and M. Singh, “Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis,” *Tuberculosis*, vol. 86, no. 1, pp. 60–67, 2006, doi: 10.1016/j.tube.2005.09.004.
- [46] J. Y. Homma *et al.*, “Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis,” *Jpn. J. Exp. Med.*, vol. 48, no. 3, pp. 251–5, Jun. 1978.
- [47] Y. Eishi *et al.*, “Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 198–204, 2002, doi: 10.1128/JCM.40.1.198-204.2002.
- [48] J. L. Werner *et al.*, “Induction of pulmonary granuloma formation by propionibacterium acnes is regulated by MyD88 and Nox2,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 56, no. 1, pp. 121–130, 2017, doi: 10.1165/rcmb.2016-0035OC.
- [49] M. Negi *et al.*, “Localization of Propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium,” *Mod. Pathol.*, vol. 25, no. 9, pp. 1284–1297, 2012, doi: 10.1038/modpathol.2012.80.
- [50] J. Grunewald and A. Eklund, “Sex-specific manifestations of Löfgren’s syndrome,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 175, no. 1, pp. 40–44, 2007, doi: 10.1164/rccm.200608-1197OC.
- [51] D. R. Moller *et al.*, “Genetic, immunologic, and environmental basis of sarcoidosis,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 14, no. 7, pp. S429–S436, 2017, doi: 10.1513/AnnalsATS.201707-565OT.
- [52] A. Fischer *et al.*, “Identification of immune-relevant factors conferring sarcoidosis genetic risk,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 192, no. 6, pp. 727–736, 2015, doi: 10.1164/rccm.201503-0418OC.
- [53] A. Kishore and M. Petrek, “Next-Generation Sequencing Based HLA Typing: Deciphering Immunogenetic Aspects of Sarcoidosis,” *Front. Genet.*, vol. 9, no. October, pp. 1–8, 2018, doi: 10.3389/fgene.2018.00503.

- [54] K. C. Patterson and E. S. Chen, "The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment," *Chest*, vol. 153, no. 6, pp. 1432–1442, 2018, doi: 10.1016/j.chest.2017.11.030.
- [55] W. M. C. Timmermans, J. A. M. van Laar, P. M. van Hagen, and M. C. van Zelm, "Immunopathogenesis of granulomas in chronic autoinflammatory diseases," *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 5, no. 12, p. e118, 2016, doi: 10.1038/cti.2016.75.
- [56] J. R. Miedema, Y. Kaiser, C. E. Broos, M. S. Wijsenbeek, J. Grunewald, and M. Kool, "Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe?," *J. Autoimmun.*, vol. 87, pp. 82–96, 2018, doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.012.
- [57] M. Facco *et al.*, "Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder," *Thorax*, vol. 66, no. 2, pp. 144–150, Feb. 2011, doi: 10.1136/thx.2010.140319.
- [58] C. Taflin *et al.*, "FoxP3⁺ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 2, pp. 497–508, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080580.
- [59] Y. Shoenfeld *et al.*, "The mosaic of autoimmunity: Hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases - 2008," *Isr. Med. Assoc. J.*, vol. 10, no. 1, pp. 8–12, 2008.
- [60] A. A. Starshinova *et al.*, "Sarcoidosis as an Autoimmune Disease," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2019.02933.
- [61] M. Tishler and Y. Shoenfeld, "Anti-heat-shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 26, no. 2, pp. 558–563, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0049-0172(96)80043-6.
- [62] A. Dubaniewicz, "Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis," *Autoimmun. Rev.*, vol. 9, no. 6, pp. 419–424, 2010, doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.015.
- [63] P. Cruz-Tapias, J. Castiblanco, and J.-M. Anaya, "HLA Association with Autoimmune Diseases," in *Autoimmunity: From Bench to Bedside*, Bogota (Columbia): El Rosario University Press, 2013.
- [64] J. Wahlström *et al.*, "Autoimmune T cell responses to antigenic peptides presented by bronchoalveolar lavage cell HLA-DR molecules in sarcoidosis," *Clin. Immunol.*, vol.

- 133, no. 3, pp. 353–363, 2009, doi: 10.1016/j.clim.2009.08.008.
- [65] A. Musaelyan *et al.*, “Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 17, no. 9, pp. 926–934, 2018, doi: 10.1016/j.autrev.2018.04.004.
 - [66] U. Zinchenko *et al.*, “Detection of various autoantibodies in patients with pulmonary sarcoidosis,” in *Sarcoidosis and other granulomatous ILD/DPLD*, 2019, p. PA1380, doi: 10.1183/13993003.congress-2019.PA1380.
 - [67] T. E. Wessendorf, F. Bonella, and U. Costabel, “Diagnosis of Sarcoidosis,” *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 49, no. 1, pp. 54–62, 2015, doi: 10.1007/s12016-015-8475-x.
 - [68] K. W. Thomas and G. W. Hunninghake, “Sarcoidosis,” *JAMA*, vol. 289, no. 24, p. 3300, Jun. 2003, doi: 10.1001/jama.289.24.3300.
 - [69] “Statement on Sarcoidosis,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 160, no. 2, pp. 736–755, Aug. 1999, doi: 10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99.
 - [70] R. L. M. Mostard, M. J. P. G. Van Kroonenburgh, and M. Drent, “The role of the PET scan in the management of sarcoidosis,” *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 19, no. 5, pp. 538–544, 2013, doi: 10.1097/MCP.0b013e328363ed0d.
 - [71] S. Ohshimo, J. Guzman, U. Costabel, and F. Bonella, “Differential diagnosis of granulomatous lung disease: Clues and pitfalls,” *Eur. Respir. Rev.*, vol. 26, no. 145, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1183/16000617.0012-2017.
 - [72] T. Laszlo, “A sarcoidosis patológiája,” *Med. Thorac.*, vol. LXV., pp. 410–412, 2012.
 - [73] G. S. Davis, “The role of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (ebus tbna) in the diagnosis of sarcoidosis,” *Cancer Cytopathol.*, vol. 122, no. 4, pp. 239–240, 2014, doi: 10.1002/cncy.21380.
 - [74] D. N. Mitchell, J. G. Scadding, B. E. Heard, and K. F. W. Hinson, “Sarcoidosis: histopathological definition and clinical diagnosis,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 30, no. 5, pp. 395–408, 1977, doi: 10.1136/jcp.30.5.395.
 - [75] E. D. Crouser *et al.*, “Diagnosis and Detection of Sarcoidosis An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 201, no. 8. American Thoracic Society, pp. E26–E51, 15-Apr-2020, doi: 10.1164/RCCM.202002-0251ST.

- [76] K. Watanabe, “Physiological Manifestation in Pulmonary Sarcoidosis,” *Sarcoidosis*, 2013, doi: 10.5772/55012.
- [77] Chalayer *et al.*, “Sarcoidosis and lymphoma: A comparative study,” *Qjm*, vol. 108, no. 11, pp. 871–878, 2015, doi: 10.1093/qjmed/hcv039.
- [78] S. Mukhopadhyay and A. Gal, “Granulomatous lung disease: an approach to the differential diagnosis,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 134, no. 5, pp. 667–690, 2010, doi: 10.1043/1543-2165-134.5.667.
- [79] J. C. Grutters, J. M. Fellrath, L. Mulder, R. Janssen, J. M. M. Van Den Bosch, and H. Van Velzen-Blad, “Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients with sarcoidosis: A clinical evaluation,” *Chest*, vol. 124, no. 1, pp. 186–195, 2003, doi: 10.1378/chest.124.1.186.
- [80] N. Casanova, T. Zhou, K. S. Knox, and J. G. N. Garcia, “Identifying Novel Biomarkers in Sarcoidosis Using Genome-Based Approaches,” *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 4, pp. 621–630, 2015, doi: 10.1016/j.ccm.2015.08.005.
- [81] H. Tomita *et al.*, “Serum lysozyme levels and clinical features of sarcoidosis,” *Lung*, vol. 177, no. 3, pp. 161–167, 1999, doi: 10.1007/PL00007637.
- [82] S. Grosso *et al.*, “Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and clinical stage in sarcoidosis,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 64, no. 1, pp. 57–62, 2004, doi: 10.1080/00365510410004092.
- [83] A. Chopra, A. Kalkanis, and M. A. Judson, “Biomarkers in sarcoidosis,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1191–1208, Nov. 2016, doi: 10.1080/1744666X.2016.1196135.
- [84] S. Kobak, “Catch the rainbow: Prognostic factor of sarcoidosis,” *Lung India*, vol. 37, no. 5, p. 425, 2020, doi: 10.4103/lungindia.lungindia_380_19.
- [85] W. J. Piotrowski, A. Antczak, J. Marczak, A. Nawrocka, Z. Kurmanowska, and P. Górski, “Eicosanoids in exhaled breath condensate and BAL fluid of patients with sarcoidosis,” *Chest*, vol. 132, no. 2, pp. 589–596, 2007, doi: 10.1378/chest.07-0215.
- [86] G. Ciarleglio *et al.*, “Exhaled carbon monoxide in sarcoidosis,” *Sarcoidosis, Vasc. Diffus. lung Dis. Off. J. WASOG*, vol. 25, no. 1, pp. 46–50, Sep. 2008.
- [87] R. Kraaijvanger, M. Janssen Bonás, A. D. M. Vorselaars, and M. Veltkamp, “Biomarkers

- in the Diagnosis and Prognosis of Sarcoidosis: Current Use and Future Prospects,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01443.
- [88] J. Lieberman, “Elevation of serum angiotension-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis,” *Am. J. Med.*, vol. 59, no. 3, pp. 365–372, 1975, doi: 10.1016/0002-9343(75)90395-2.
- [89] S. P. Kessler, T. M. Rowe, J. B. Gomos, P. M. Kessler, and G. C. Sen, “Physiological non-equivalence of the two isoforms of angiotensin-converting enzyme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 34, pp. 26259–26264, 2000, doi: 10.1074/jbc.M004006200.
- [90] M. K. S. Wong, “Angiotensin Converting Enzymes - ScienceDirect,” *Handb. Horm. Comp. Endocrinol. Basic Clin. Res.*, no. January, pp. 263–265; e29D-1-e29D-4, 2016.
- [91] J. F. Riordan, “Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives,” *Genome Biol.*, vol. 4, no. 8, 2003, doi: 10.1186/gb-2003-4-8-225.
- [92] L. Fang, M. Geng, C. Liu, J. Wang, W. Min, and J. Liu, “Structural and molecular basis of angiotensin-converting enzyme by computational modeling: Insights into the mechanisms of different inhibitors,” *PLoS One*, vol. 14, no. 4, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0215609.
- [93] C. R. Esther *et al.*, “The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by genetargeting in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 10, pp. 2375–2385, 1997, doi: 10.1172/JCI119419.
- [94] R. Natesh, S. L. U. Schwager, E. D. Sturrock, and K. R. Acharya, “Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex,” *Nature*, vol. 421, no. 6922, pp. 551–554, 2003, doi: 10.1038/nature01370.
- [95] V. E. Tikhomirova *et al.*, “ACE phenotyping in human heart,” *PLoS One*, vol. 12, no. 8, pp. 1–20, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181976.
- [96] M. Kamata, J. Hu, H. Shibahara, and H. Nakagawa, “Assay of testicular angiotensin-converting enzyme activity in human spermatozoa,” *Int. J. Androl.*, vol. 24, no. 4, pp. 225–231, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2605.2001.00288.x.
- [97] R. Kumar, K. M. Baker, and J. Pan, *Activation of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure*, Second Edi. Elsevier Inc., 2011.
- [98] J. B. Su, “Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-

- kinin systems,” *JRAAS - J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.*, vol. 15, no. 4, pp. 319–328, 2014, doi: 10.1177/1470320312474854.
- [99] L. Tiret *et al.*, “Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 51, no. 1, pp. 197–205, 1992.
- [100] Z. Rahimi, “ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy,” *J. Nephrothol.*, vol. 1, no. 3, pp. 143–151, 2012, doi: 10.5812/nephrothol.8109.
- [101] A. Csaszar, B. Halmos, T. Palicz, C. Szalai, and L. Romics, “Interpopulation effect of ACE I/D polymorphism on serum concentration of ACE in diagnosis of sarcoidosis [10],” *Lancet*, vol. 350, no. 9076, p. 518, 1997, doi: 10.1016/S0140-6736(05)63108-X.
- [102] G. A. Sagnella, M. J. Rothwell, A. K. Onipinla, P. D. Wicks, D. G. Cook, and F. P. Cappuccio, “A population study of ethnic variations in the angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism: Relationships with gender, hypertension and impaired glucose metabolism,” *J. Hypertens.*, vol. 17, no. 5, pp. 657–664, 1999, doi: 10.1097/00004872-199917050-00009.
- [103] G. S. Stokes, J. C. Monaghan, A. P. Schrader, C. L. Glenn, M. Ryan, and B. J. Morris, “Influence of angiotensin converting enzyme (ACE) genotype on interpretation of diagnostic tests for serum ACE activity,” *Aust. N. Z. J. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 315–318, 1999, doi: 10.1111/j.1445-5994.1999.tb00713.x.
- [104] M. Fagyas *et al.*, “New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: Endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087843.
- [105] M. Fagyas *et al.*, “New perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) II: Albumin suppresses Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity in human,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087844.
- [106] R. G. Boot *et al.*, “The human chitotriosidase gene - Nature of inherited enzyme deficiency,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 40, pp. 25680–25685, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.40.25680.
- [107] E. H. Choi *et al.*, “Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India,” *Genes Immun.*, vol. 2, no. 5, pp. 248–253, 2001, doi: 10.1038/sj.gene.6363767.

- [108] F. Fusetti *et al.*, “Structure of human chitotriosidase: Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 28, pp. 25537–25544, 2002, doi: 10.1074/jbc.M201636200.
- [109] G. H. Renkema *et al.*, “Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 244, no. 2, pp. 279–285, 1997, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00279.x.
- [110] L. Malaguarnera *et al.*, “A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions,” *Genes Immun.*, vol. 4, no. 8, 2003, doi: 10.1038/SJ.GENE.6364025.
- [111] A. Bussink *et al.*, “Common G102S polymorphism in chitotriosidase differentially affects activity towards 4-methylumbelliferyl substrates,” *FEBS J.*, vol. 276, no. 19, 2009, doi: 10.1111/J.1742-4658.2009.07259.X.
- [112] A. K. Carmona, S. L. Schwager, M. A. Juliano, L. Juliano, and E. D. Sturrock, “A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 4, pp. 1971–1976, Nov. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.306.
- [113] K. Lindpaintner *et al.*, “A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 11, pp. 706–11, Mar. 1995.
- [114] C. E. Hollak, S. van Weely, M. H. van Oers, and J. M. Aerts, “Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 3, pp. 1288–92, Mar. 1994, doi: 10.1172/JCI117084.
- [115] A. Enyedi *et al.*, “Combined application of angiotensin converting enzyme and chitotriosidase analysis improves the laboratory diagnosis of sarcoidosis,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 500, pp. 155–162, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.cca.2019.10.010.
- [116] G. Livnat *et al.*, “Duplication in CHIT1 gene and the risk for Aspergillus lung disease in CF patients,” *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 49, no. 1, pp. 21–7, Jan. 2014, doi: 10.1002/ppul.22749.
- [117] M. E. Grace, M. Balwani, I. Nazarenko, A. Prakash-Cheng, and R. J. Desnick, “Type 1 Gaucher disease: null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations-implications for

- diagnosis and therapeutic monitoring.,” *Hum. Mutat.*, vol. 28, no. 9, pp. 866–73, Sep. 2007, doi: 10.1002/humu.20524.
- [118] S. Rodriguez, T. R. Gaunt, and I. N. M. Day, “Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 169, no. 4, pp. 505–514, Feb. 2009, doi: 10.1093/aje/kwn359.
- [119] G. Mavrikiou, P. Petrou, T. Georgiou, and A. Drousiotou, “Chitotriosidase deficiency in the Cypriot population: Identification of a novel deletion in the CHIT1 gene.,” *Clin. Biochem.*, vol. 49, no. 12, pp. 885–9, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.03.013.
- [120] P. S. Bunting, J. P. Szalai, and M. Katic, “Diagnostic aspects of angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis.,” *Clin. Biochem.*, vol. 20, no. 3, pp. 213–9, Jun. 1987.
- [121] J. Lieberman and E. Beutler, “Elevation of Serum Angiotensin-Converting Enzyme in Gaucher’s Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 294, no. 26, pp. 1442–1444, Jun. 1976, doi: 10.1056/NEJM197606242942609.
- [122] J. Lieberman and T. H. Rea, “Serum angiotensin-converting enzyme in leprosy and coccidioidomycosis.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 87, no. 4, pp. 423–5, Oct. 1977.
- [123] M. F. Alves *et al.*, “A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity.,” *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 38, no. 6, pp. 861–8, Jul. 2005, doi: /S0100-879X2005000600007.
- [124] J. Lieberman and A. Sastre, “An angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor in human serum. Increased sensitivity of the serum ACE assay for detecting active sarcoidosis.,” *Chest*, vol. 90, no. 6, pp. 869–75, Dec. 1986.
- [125] A. W. Saxe, M. A. Hollinger, and T. Essam, “Effect of bilirubin on the spectrophotometric and radionuclide assay for serum angiotensin-converting enzyme.,” *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, vol. 51, no. 1, pp. 129–36, Jan. 1986.
- [126] S. M. Danilov *et al.*, “Lysozyme and bilirubin bind to ACE and regulate its conformation and shedding,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 34913, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep34913.
- [127] G. Dimeski, “Interference testing.,” *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 29 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S43-8, Aug. 2008.
- [128] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Defining, Establishing, and*

Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, CLSI document C28-A3c., 3rd Editio. 2010.

- [129] J. Henny *et al.*, “Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories.,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 54, no. 12, pp. 1893–1900, Dec. 2016, doi: 10.1515/cclm-2016-0793.
- [130] H. Biller, G. Zissel, B. Ruprecht, M. Nauck, A. Busse Grawitz, and J. Muller-Quernheim, “Genotype-corrected reference values for serum angiotensin-converting enzyme,” *Eur. Respir. J.*, vol. 28, no. 6, pp. 1085–1091, Dec. 2006, doi: 10.1183/09031936.00050106.
- [131] B. Rigat, C. Hubert, F. Alhenc-Gelas, F. Cambien, P. Corvol, and F. Soubrier, “An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 4, pp. 1343–1346, Oct. 1990, doi: 10.1172/JCI114844.
- [132] P. Sharma, I. Smith, G. Maguire, S. Stewart, J. Shneerson, and M. J. Brown, “Clinical value of ACE genotyping in diagnosis of sarcoidosis,” *Lancet*, vol. 349, no. 9065, pp. 1602–1603, May 1997, doi: 10.1016/S0140-6736(05)61631-5.
- [133] E. D. Crouser *et al.*, “Diagnosis and Detection of Sarcoidosis An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 201, no. 8. American Thoracic Society, pp. E26–E51, Apr-2020, doi: 10.1164/RCCM.202002-0251ST.
- [134] M. A. Judson, “The diagnosis of sarcoidosis,” *Curr. Opin. Pulm. Med.*, p. 1, Jun. 2019, doi: 10.1097/MCP.0000000000000596.
- [135] P. Ungprasert, E. M. Carmona, C. S. Crowson, and E. L. Matteson, “Diagnostic Utility of Angiotensin-Converting Enzyme in Sarcoidosis: A Population-Based Study,” *Lung*, vol. 194, no. 1, pp. 91–95, Feb. 2016, doi: 10.1007/s00408-015-9826-3.
- [136] S. Kahkouee, K. Samadi, A. Alai, A. Abedini, and L. Rezaiian, “Serum ACE Level in Sarcoidosis Patients with Typical and Atypical HRCT Manifestation,” *Polish J. Radiol.*, vol. 81, pp. 458–461, Sep. 2016, doi: 10.12659/PJR.897708.
- [137] M. Fagyas *et al.*, “New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e93719, Jan. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0093719.

- [138] T. Adelino *et al.*, “Biochemical and Molecular Chitotriosidase Profiles in Patients with Gaucher Disease Type 1 in Minas Gerais, Brazil: New Mutation in CHIT1 Gene,” *JIMD Rep.*, vol. 9, 2013, doi: 10.1007/8904_2012_184.
- [139] Y.-H. Chien, J.-H. Chen, and W.-L. Hwu, “Plasma chitotriosidase activity and malaria,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 353, no. 1–2, pp. 215; author reply 217, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.cccn.2004.11.013.
- [140] P. Irún, P. Alfonso, S. Aznarez, P. Giraldo, and M. Pocovi, “Chitotriosidase variants in patients with Gaucher disease. Implications for diagnosis and therapeutic monitoring,” *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 18, 2013, doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.09.006.
- [141] P. Lee, J. Waalen, K. Crain, A. Smargon, and E. Beutler, “Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 39, no. 3, pp. 353–360, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.bcmd.2007.06.013.

Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/132/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csongrádi Alexandra
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csongrádi, A.**, Altörjay, I., Fülöp, G. Á., Enyedi, A., Enyedi, E. E., Hajnal, P., Takács, I., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Chitotriosidase gene polymorphisms and mutations limit the determination of chitotriosidase expression in sarcoidosis.
Clin. Chim. Acta. 513, 50-56, 2021.
IF: 3.786 (2020)
2. **Csongrádi, A.**, Enyedi, A., Takács, I., Végh, T., Mányiné Siket, I., Pólik, Z., Altörjay, I., Balla, J., Balla, G., Édes, I., Kappelmayer, J., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis.
Clin. Chem. Lab. Med. 56 (7), 1117-1125, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2017-0837>
IF: 3.638

További közlemények

3. Soós, B., Fagyas, M., Horváth, Á., Végh, E., Pusztai, A., Czókolyová, M., **Csongrádi, A.**, Hamar, A. B., Pethő, Z., Bodnár, N., Kerekes, G., Hódosi, K., Szekanecz, É., Szamosi, S., Szántó, S., Szűcs, G., Papp, Z., Szekanecz, Z.: Angiotensin Converting Enzyme Activity in Anti-TNF-Treated Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis Patients.
Front. Med. 8, 1-11, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.785744>
IF: 5.091 (2020)





4. Bánhegyi, V., Enyedi, A., Fülöp, G. Á., Oláh, A., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bottyán, K., Lódi, M., **Csongrádi, A.**, Umar, M. A. J., Fagyas, M., Czuriga, D., Édes, I., Pólos, M., Merkely, B., Csanádi, Z., Papp, Z., Szabó, G., Radovits, T., Takács, I., Tóth, A.: Human Tissue Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity Is Regulated by Genetic Polymorphisms, Posttranslational Modifications, Endogenous Inhibitors and Secretion in the Serum, Lungs and Heart.
Cells. 10 (7), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071708>
IF: 6.6 (2020)
5. Enyedi, A., **Csongrádi, A.**, Altorjay, I., Beke, G. L., Váradi, C., Enyedi, E. E., Kiss, D. R., Bányai, E., Kalina, E., Kappelmayer, J., Tóth, A., Papp, Z., Takács, I., Fagyas, M.: Combined application of angiotensin converting enzyme and chitotriosidase analysis improves the laboratory diagnosis of sarcoidosis.
Clin. Chim. Acta. 500, 155-162, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.010>
IF: 3.786
6. Nagy, L., Gödény, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csípő, T., **Csongrádi, A.**, Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,901

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,424**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.04.01.



Tárgyszavak

szarkoidózis diagnosztika

szérum biomarker

angiotenzin-konvertáló enzim

I/D polimorfizmus

kitotriozidáz

Dup24 mutáció

Del29 mutáció

Keywords

sarcoidosis diagnostics

sera biomarker

angiotensin-converting enzyme

I/D polymorphism

chitotriosidase

Dup24 mutation

Del29 mutation

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Fagyas Miklósnak, hogy magas szintű szakmai iránymutatásával támogatta munkámat az évek során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Papp Zoltánnak, hogy megteremtette az eredményes kutatómunkához szükséges biztonságos hátteret a tanszéken.

Hálával tartozom Prof. Dr. Tóth Attilának, aki mindig nagy figyelemmel és érdeklődéssel kísérte munkámat, értékes szakmai tanácsaival mindig átsegített a kísérletes munkával járó nehézségeken.

Köszönöm a Klinikai Fiziológiai Tanszék jelenlegi és volt munkatársainak, hallgatóinak, akik valamilyen formában segítettek munkámat. Külön köszönöm Mányiné Siket Ivettának a laboratóriumi munka során nyújtott felbecsülhetetlen segítségét, valamint Dr. Bódi Beátának, hogy a kezdetektől fogva bátorított, szakmai és baráti támogatást nyújtott. Köszönöm Mártha Lillának és Pólik Zsófiának a tanszéken eltöltött boldog pillanatokot.

Hálával tartozom a DE KK Kardiológiai Intézet, valamint a DE KK Sebészeti Klinika Mellkassebészeti Osztály munkatársainak, Dr. Takács Istvánnak és Dr. Enyedi Attilának, hogy kísérleteinkhez humán mintákat biztosítottak.

Szeretném megköszönni barátaimnak és családomnak biztató szavaikat, mellyel mindig kitartásra buzdítottak. Köszönöm páromnak, Tamásnak kitartó türelmét és odaadó gondoskodását.

Végtelen hálával tartozom Szüleimnek, akik töretlen hitükkel és szeretetükkel végig mellettem álltak és támogattak.

Jelen munkámat nagy szeretettel Szüleimnek ajánlom.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 „Szív és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló in exstense közlemények különlenyomatait tartalmazza: