

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Korai differenciáldiagnosztikai markerek glikoanalitikai azonosítása kapilláris elektroforézissel

Farkas Anna

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	6
2. CÉLKITŰZÉSEK	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1. A glikoziláció fogalma és jelentősége.....	11
3.2. Az N-kapcsolt glikánok biológiai jelentősége	16
3.3. IgG szerkezeti felépítése és N-glikozilációja	21
3.4. IgA szerkezeti felépítése és N-glikozilációs tulajdonságai	23
3.5. A mintavétel és mintagyűjtés N-glikozilációs mintázatot befolyásoló általános nehézségei	25
3.6. A gyulladás általános jellemzése	28
3.7. Az elhízás és cukorbetegség, mint gyulladásos kórképek	32
3.8. Gesztációs Diabétesz Mellitusz.....	35
3.8.1. IgG és IgA glikozilációs módosulásai elhízás, cukorbetegség és várandósság alatt	38
3.9. COPD és tüdőrák gyulladásos komponensei és N-glikozilációs módosulásai	42
3.9.1. COPD gyulladásos komponensei	42
3.9.2. A tüdőrák gyulladásos komponensei	48
3.9.3. COPD, mint a tüdőrák kialakulásának egyik fő kockázati tényezője	54
3.9.4. A COPD és tüdőrák glikomikai jellemzői	56
3.10. Kapilláris elektroforézis, mint biomarker feltáró analitikai módszer a glikomikai kutatásokban.....	58
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	63
4.1. Reagensek	63
4.2. A szobahőmérsékleten történő tárolás N-glikozilációra kifejtett hatását vizsgáló kísérletekhez gyűjtött perifériás vérminták	63
4.3. Szérum minták előkészítése a mintavételtől a centrifugálásig eltelt idő függvényében bekövetkező N-glikánprofil-változás analizisére	64
4.4. Anyai és gyermek szérum minták IgG és IgA glikozilációs analizise.....	65
4.5. Szérum minták előkészítése IgG és IgA N-glikozilációs analizisre	66
4.5.1. IgG tisztítása.....	67
4.5.2. IgA tisztítása.....	69
4.6. A tüdőrák és a COPD glikomikai analizise céljából gyűjtött minták	70
4.7. A szérum és standard glikoprotein minták előkészítése N-glikozilációs eltérések vizsgálatára.....	70
4.8. A kapilláris elektroforezis készülék	72
4.9. Adatok kiértékelése	72
4.10. Statisztikai elemzés	73
5. EREDMÉNYEK.....	75

5.1.	Humán szérumból N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten (24-25°C) történő tárolás során	75
5.2.	Az anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása	85
5.2.1.	Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációjának összehasonlítása.....	85
5.2.2.	Anyai elhízással és gesztációs diabéteszrel szövődött terhesség hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára.....	88
5.2.3.	Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása az utódok szérumból származó IgG N-glikozilációjára	93
5.2.4.	Anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása az anyai szérumból származó IgA N-glikozilációjára	98
5.3.	COPD és tüdőrák N-glikomikai analízise teljes emberi véréből.....	106
5.3.1.	Standard humán szérumból és a szérumban nagy koncentrációban jelen lévő standard fehérjék keverékének összehasonlítása	106
5.3.2.	Tüdőrák, COPD és komorbid betegcsoportok N-glikozilációs analízise és statisztikai elemzése	110
6.	MEGBESZÉLÉS.....	118
6.1.	Humán szérumból N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten történő tárolás során	118
6.2.	Az elhízással és gesztációs diabéteszrel társuló terhesség hatása az anya és gyermeke szérumból izolált IgG N-glikozilációjára.....	120
6.2.1.	Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációs mintázatának alakulása.....	120
6.2.2.	Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára.....	122
6.2.3.	Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása a gyermekek szérumból izolált IgG antitestek N-glikozilációjára	123
6.3.	IgA N-glikozilációs módosulásai elhízás és gesztációs diabétesz hatására	124
6.4.	Szérumból N-glikozilációs profiljának modellezése és az új megközelítés alkalmazása különböző tüdőbetegségek N-glikozilációs analízisében.....	126
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	129
8.	SUMMARY	131
9.	LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK.....	133
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	135
11.	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	157
12.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	159
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	160
14.	FÜGGELÉK	162

Rövidítések jegyzéke

A1AT	–	Alfa-1-antitripszin
ADA	–	Amerikai Diabetes Társaság (American Diabetes Association)
ADCC	–	Antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitás (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)
APTS	–	8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav
Asn	–	Aszparagin
BFS	–	Nem bevont falú szilika kapilláris (Bare Fused-Silica)
BMI	–	Testtömeg-index (Body Mass Index)
CDC	–	Komplementfüggő citotoxicitást (Complement-Dependent-Cytotoxicity)
CE-LIF	–	Lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézis (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescens Detection)
CGE	–	Kapilláris gél elektroforézis (Capillary Gel Electrophoresis)
CRP-	–	C-reaktív fehérje
Cys	–	Cisztein
DC	–	Dendritikus sejt (Dendritic Cell)
ECM	–	Extracelluláris mátrix
EGFR	–	Epidermális növekedés faktor (Epidermal Growth Factor)
ER	–	Endoplazmatikus Retikulum
Fab	–	Antigén-kötő fragmens (Fragment Antigen-Binding)
Fc	–	Kristályosítható fragmens (Fragment Crystallizable)
FFPE	–	Formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)
Gal	–	Galaktóz
GalNAc	–	N-acetil-galaktozamin
GCO	–	Globális Daganatokat Megfigyelő Központ (Global Cancer Observatory)
GDM	–	Terhességi cukorbetegség (Gestational Diabetes Mellitus)
GlcNAc	–	N-acetil-glükózamin
GU	–	Glükózegység(Glucoseunit)
HNW	–	Egészséges normál súlyú (Healthy Normal Weight)
HOB	–	Egészséges elhízott (Healthy Obese)
Hp	–	Haptoglobin

IADPSG	–	Diabeteses Terhességgel Foglalkozó Munkacsoportok Nemzetközi Szövetsége (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group)
IDF	–	Nemzetközi Diabetes Szövetség (International Diabetes Federation)
IgA	–	Immunglobulin A
IgG	–	Immunglobulin G
IL-3	–	Interleukin 3
IL-4	–	Interleukin 4
IL-6	–	Interleukin 6
ILC2	–	2. típusú veleszületett limfoid sejtek (type 2 Innate Lymphoid Cells)
KSH	–	Központi Statisztikai Hivatal
LacNAc	–	N-acetil-laktózin
mAb	–	Monoklonális antitest (monoclonal Antibody)
Man	–	Mannóz
MMP	–	Mátrix metalloproteináz
Ni-IMAC	–	Nickel Immobilized Metal Affinity Chromatography
NK	–	Természetes ölősejt (Natural Killer cells)
NSCLC	–	Nem-kissejtes tüdőrák (Non-Small Cell Lung Cancer)
NWGDM	–	Normál súlyú GDM-mel (Normal Weight with Gestational Diabetes Mellitus)
OGDM	–	Elhízott GDM-mel (Obese with Gestational Diabetes Mellitus)
PAI-1	–	Plazminogén aktivátor inhibitor-1
PNGase F	–	Peptid N-glikanáz F
PTM	–	Poszttranszlációs módosítás (Post-Translational Modification)
ROS	–	Reaktív oxigén gyökök (Reactive Oxigene Species)
SCI	–	Szisztémás krónikus gyulladás (Systemic Chronic Infalmmation)
SD	–	Korrigált empirikus szórás (Standard Deviation)
Ser	–	Szerin
SF/NF arány	–	Sziálsavas és neutrális glikán szerkezetek arány (sialoform/neutral form)
sIgA	–	Szekretoros immunglobulin A
SLe ^x	–	Sziálsavas Lewis x
SPM	–	Standard fehérje-keverék (Standard Protein Mixture)
Tf	–	Transzferrin

Thr	–	Treonin
TNF- α	–	Tumor nekrosis faktor alfa
Treg	–	Regulációs T-sejt
WHO	–	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1. Bevezetés

A glikoziláció a fehérjék legfontosabb poszttranszlációs módosításai közé tartozik. Fontosságát jelzi, hogy az emlősök vérkeringésében lévő fehérjék több, mint 50%-a glikozilált. A szénhidrátok fehérjékhez történő kapcsolódása több száz glikozil-transzferázt, glikozidázt, transzkripciós faktort, transzportereket magába foglaló, összetett biológiai folyamat [1], amely változatos, de specifikus glikánprofilokat eredményez. Mind a genetikai, mind a környezeti tényezők befolyásolhatják a folyamatban részt vevő enzimek és transzporterek szintjét, valamint aktivitását, eredményezve ezzel a glikánszerkezetek megváltozását, amely molekuláris diagnosztikai információkat szolgáltathat.

Bár a glikozilációs módosítások pontos szerepét még mindig nem teljesen értjük, egyre több bizonyíték szolgál arra vonatkozóan, hogy a glikánok a sejtek, szövetek és szervek működésének fiziológiás és patológias folyamatait is befolyásolják. A glikánok jelentőségét jól tükrözi, hogy az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration – FDA) által is jóváhagyott, jelenleg klinikumban alkalmazott tumorbiomarkerek többsége glikoprotein (pl. alfa-fetoprotein májrák, Cancer antigén 125 petefészekrák, karcinoembrionális antigén vastagbélrák, és prosztata specifikus antigén prosztatarák esetén), vagy glikánnal kapcsolatos marker, mint például a CA19-9, más néven szialsavas-Lewis A struktúra, amely gyomor-bélrendszeri és hasnyálmirigyrák markere [2].

A szérumban bekövetkező változások a tumorból szekretált fehérjék következményei lehetnek, de tükrözhetik a szervezet patológias folyamatokra adott válaszait is [3]. Így a szérumban és a specifikus szérumban glikoproteinek glikomikai elemzése hasznos kiegészítő biomarkereket szolgálhat a különböző daganatok jelenléte mellett a szervezetben zajló egyéb patológias folyamatokról is.

A glikozilációs vizsgálatok esetében ezért szükséges egy egységes mintagyűjtési protokoll kialakítása és validálása, amely segítségével könnyebben értékelhetők a különböző kutatóhelyek vizsgálatainak eredményei.

A több helyszínen zajló tanulmányok növekvő népszerűségével szükségessé válik a nehezebben ellenőrizhető és szabványosítható preanalitikai feltételek egységesítése, illetve az N-glikán tartalmat érintő esetleges hatások értékelése, mely segíthet a jövőben a különböző vizsgálatok mintagyűjtési protokolljainak megfelelő optimalizálásában. A különböző mintafeldolgozási és mintagyűjtési eljárások összehasonlítása támogathatja a döntéshozatala

kutatás olyan kérdései esetén, hogy levehetőek-e a minták kellő biztonsággal glikomikai elemzés céljából akkor is, ha a mintavétel és a fagyasztás között huzamosabb idő telik el (például infrastruktúráis okok), vagy az idő olyan kritikus tényező, amely olyan mértékű különbségeket okozhat a kapilláris elektroforézissel végzett mérések eredményében, amely hibaforrásként jelenhet meg azok értékelése során. Egy standardizált eljárás kialakítása hozzájárulhat továbbá a glikozilációs markerek jövőbeni klinikai bevezetésének megkönnyítéséhez.

Munkám során emberi szérumon vizsgáltam a vérvételtől a centrifugálásig, majd a szérum fagyasztásáig eltelt idő N-glikom tartalmát esetlegesen befolyásoló hatását. A kísérletek eredményeinek ismeretében a dolgozat további részében a terhesség alatti elhízásnak és a terhességi diabétesz mellitusznak (Gestational Diabetes Mellitus – GDM) az anyai és gyermek eredetű szérum immunglobulin G (IgG), illetve az anyai szérumból izolált immunglobulin A (IgA) antitestekre gyakorolt hatásának elemzésével, valamint a krónikus obstruktív tüdőbetegség (Chronic Obstructive Pulmonary Disease – COPD), a tüdőrák és a két tüdőbetegség együttes előfordulásának N-glikomikai tanulmányozásával foglalkozom. A felsorolt kórképek közös mozgatórugója a krónikus szisztémás gyulladás, így az azt tükröző IgG és IgA N-glikozilációs mintázatának tanulmányozása értékes biomarkerforrás lehet.

A zsírszövet a legnagyobb endokrin szervként több mint 50 adipokin, kemokin és citokin szekréciójára képes, amellyel befolyásolja az immunrendszer működését [4]. A várandósság ideje alatt az elhízással, illetve a GDM-mel társuló gyulladás jelentősen befolyásolhatja a placenta állapotát és transzportfolyamatait, ezáltal a magzat fejlődését, valamint születés utáni egészségi állapotát [5]. Az anyai IgG már a magzati élet során az anyaméhben, majd születést követően hozzájárul a gyermek védelméhez mindaddig, amíg annak saját antitestjei megjelennek a keringésben [6]. A molekula glikozilációs tulajdonságai befolyásolják annak funkcióját, módosulásai indikátorai lehetnek a szervezetben zajló gyulladásos folyamatoknak [7], melyek az elhízással és GDM-mel társult terhesség során is fennállhatnak. A főként gyulladásos válaszreakciók mérséklőjeként számontartott IgA antitestek az anyatejes táplálás révén bekerülve az újszülött szervezetébe támogatják az immunrendszer megfelelő működését. Az IgG és IgA glikozilációs mintázatának módosulása, ezek tanulmányozása, illetve azonosítása eszköze lehet a terhesség során kialakuló, utódokat is érintő negatív hatások vizsgálatának, valamint azok hatékony kezelésének és megelőzésének.

A hazánkban is népbetegségnek számító COPD az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization – WHO) előrejelzése szerint 2030-ra a harmadik vezető halálozási ok lesz világszerte, míg a tüdőrák a hatodik helyre lép [8]. A tüdőrák magas előfordulása a COPD-vel korábban diagnosztizált betegek körében azt sugallja, hogy közös patomechanizmusai lehetnek a két betegségnek, mint például a korai öregedés a tüdőben, genetikai hajlam a betegségre, közös intracelluláris utak aktiválása, növekedési faktorok fokozott expressziója, gyakori légúti megbetegedések vagy epigenetikai tényezők [9]. Mindkét légzőszervi megbetegedés esetében kulcsfontosságú a terápia hatékonysága szempontjából a korai diagnózis felállítása és a személyre szabott terápia mihamarabbi elkezdése.

2. Célkitűzések

Mivel az általam vizsgált minták egy részének gyűjtése nem debreceni partnertintézet segítségével valósult meg, így a dolgozat első részében célul tűztem ki a glikán-biomarker kutatás szempontjából annak a kulcsfontosságú kérdésnek a megválaszolását, hogy a vérminták levételétől a centrifugálásig és fagyasztásig eltelt idő, mely a mintavételi helyek aktuális humánerőforrás kapacitásaiból adódó eltérések (pl. munkaerőhiány, munkavállalók leterheltsége) miatt is különbözhet, befolyásolhatja-e, és ha igen, akkor milyen mértékben a szérum minták lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézis készülék (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection – CE-LIF) alkalmazásával végzett N-glikomikai analíziseként kapott eredményeket.

Az elhízás olyan krónikus kórállapot, amely a leggyakoribb egészségügyi problémák között szerepel, és egyre több várandós nő is érint. 2019-ben a WHO adatai szerint az elhízás és annak szövődményei a 9. vezető halálok volt globálisan, így szükséges a terhesség alatti elhízás és azzal gyakran társuló GDM utódokra gyakorolt hatásainak mélyreható tanulmányozása. A kutatás során feltételeztem, hogy az anyai elhízás és a GDM olyan változásokat okoz a placentáris transzportfolyamatok minőségében és a két antitest glikozilációjában, amelyek az anyai és utódokból izolált immunglobulinokon egyaránt detektálhatók, így befolyásolhatják a jövő generációjának születéskori (születési súly, ételérzékenység, C-reaktív fehérje szint) és esetleges későbbi életminőségét, valamint egészségügyi állapotát.

Mivel az GDM nagyobb gyakorisággal fordul elő az elhízott várandós nők csoportjában, de nem kizárólag rájuk jellemző kórkép, fontos a GDM anyák minél hamarabbi azonosítása. Így munkám során amellet, hogy bizonyítsam az elhízás és a GDM placentáris transzportfolyamatokat befolyásoló hatását, célom volt a GDM-re jellemző markerek azonosítása.

A COPD és a tüdőrák kialakulásával kapcsolatos kutatások új, molekuláris diagnosztikai értékű, valamint terápiás célpont azonosításához járulhatnak hozzá, amely lehetőséget kínálhat a betegségek hatékonyabb diagnosztizálásának és terápiáinak kifejlesztéséhez. Ezeknek a betegségeknek a növekvő előfordulása miatt egyre nagyobb az igény a nem-invazív diagnosztikai markerek felfedezésére, amelyek megfelelő specifitással és érzékenységgel

képesek előre jelezni a COPD, a tüdőrák, vagy akár a két betegség együttes jelenlétét és prognózisát.

A munkám során célom volt olyan új glikomikai módszer kidolgozása, mellyel lehetővé válhat a szérumban IgG és IgA glikozilációs mintázatváltozásának egyszerű, gyors és költséghatékony vizsgálata, továbbá szérumban minták glikánprofiljának elemzésével a fent említett kórképre jellemző glikobiomarkerek azonosítása. Ez utóbbiak segítségével megjósolhatóvá válhat a COPD kialakulása a különböző rizikócsoporthoz tartozók körében, valamint lehetővé teheti a már COPD-s betegek esetében az esetleges malignus transzformáció korai stádiumú kimutatását.

Mivel az általam vizsgált kórképek jellemzően szoros előfordulást mutatnak, így munkám során fő célom volt a betegségek differenciáldiagnosztikai jelentőségű glikobiomarkereinek feltárása.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A glikoziláció fogalma és jelentősége

Francis Crick 1958-ban a nukleinsavak és fehérjék közötti biológiai információ áramlása alapján megalkotta a molekuláris biológiát alapvetően meghatározó általános érvényű modelljét [10], melyben információáramlás alatt specifikusan azt értjük, hogy az egyik makromolekula monomersorrendje meghatározza egy másik makromolekula monomersorrendjét (DNS->RNS->Fehérje). Az eredeti sémát Crick 1970-ben pontosította, és „centrális dogma”-ként nevezte el [11]. Az általa vázolt koncepció alapja a templát alapú pontosság, mely felveti a molekulák egyik osztályának manipulálásának képességét a másik molekula ismerete alapján; szekvenciahomológiára támaszkodva feltárhatóvá teszi az evolúciós rokonsági viszonyokat és megjósolhatóvá teszi az adott fehérje funkcióját is.

A dogma alapján sokáig feltételezték, hogy csak ezeknek a dogmában leírt molekuláknak a vizsgálata révén magyarázható meg a sejtek, szövetek, szervek, élettani rendszerek és intakt szervezetek felépítése, működése. Az emberi genom szekvenálását követően azonban az azonosított fehérjéket kódoló gének száma az első vizsgálatok alapján alig valamivel több, mint 26 000 gén volt. Tekintettel a *Homo sapiens* fenotípusos összetettségére a *Drosophila melanogaster*, a *Caenorhabditis elegans* vagy a *Saccharomyces cerevisiae*-hez képest, az emberi genom méretének kezdeti becslései jóval nagyobbak voltak (100 000 - 120 000), mint amit Venter és mtsai kimutattak [12]. Az eredmények arra készítették a kutatókat, hogy fontolóra vegyék a genetikailag nem kódolt mechanizmusok jelentőségét a fehérjék funkcionális sokféleségének kialakításában, nevezetesen a ko- és poszttranszlációs módosítások (Post-Translational Modification – PTM) hozzájárulását a biológiai sokféleség kialakulásához [13]. A módosított központi dogma a PTM-eket már a sejtfenotípus kulcsfontosságú mediátoraiként tartalmazza, és ebben a posztgenomikai korszakban a PTM-ek a vizsgálat központi fókuszában állnak.

Az élő szervezetekben a biológiai funkciók megvalósulásáért köztudottan a fehérjék a felelősek, melyek elsődleges szerkezete, vagyis az azokat felépítő aminosavak sorrendje a dezoxiribonukleinsav (DNS) kettős hélixében kódolt. A transzkripció, majd a transzláció folyamata során előállított fehérjék túlnyomó többsége azonban még nem funkcióképes protein. A biológiai működőképesség eléréséhez számos módosításon kell átesnie egy szintetizált fehérjének, melyek közül az egyik leggyakoribb a fehérjék több mint 50%-át érintő glikoziláció

[14]. Ezen mechanizmus révén az adott fehérjekészlet nagyságrendekkel megnövelhető a szénhidrátok kémiai és szerkezeti sokféleségének köszönhetően.

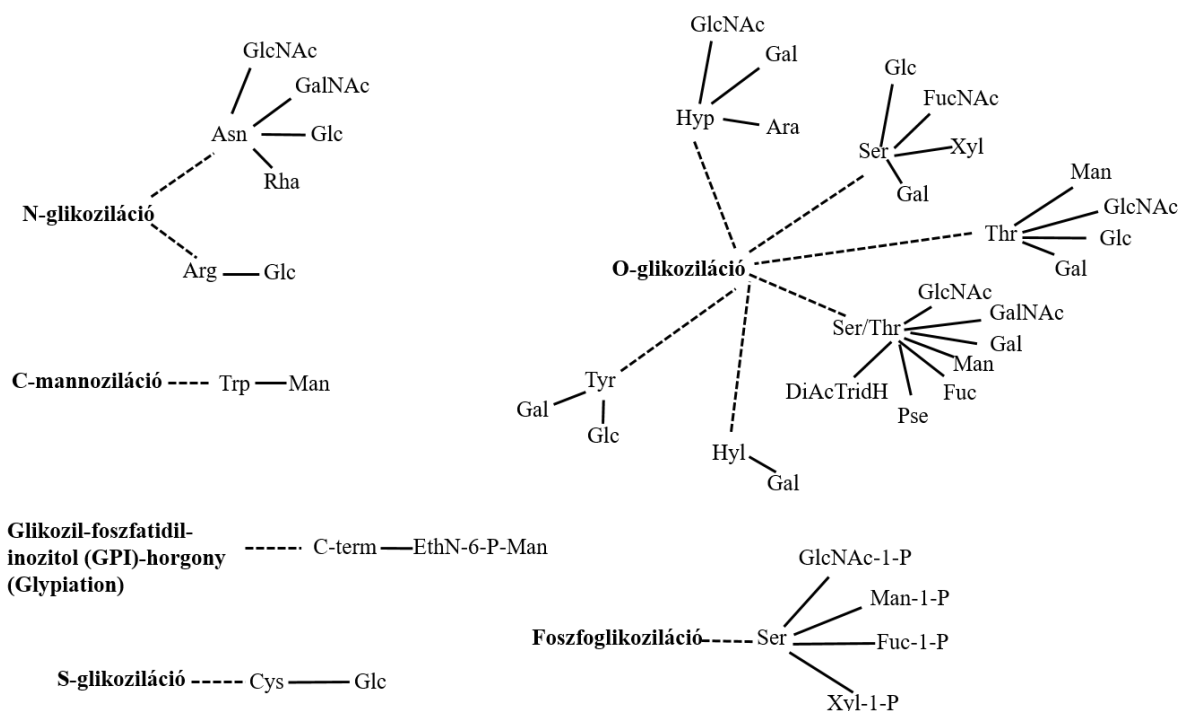
A glikoziláció, amelyet szénhidrátok kovalens kötésekként definiálnak egy aglikon hordozóhoz, a leggyakoribb és legváltozatosabb a természetben megfigyelt PTM-ek sorában [1]. Ahogyan az egyéb ko- és poszttranszlációs módosítások, úgy a glikán egység kötődése is a sejtfunkcióval kapcsolatos információk széles skáláját kódolja a DNS molekulától függetlenül, ezáltal is nagyságrendekkel fokozva a kialakuló biológiai sokféleséget. A módosítások pontos tervrajza ugyanis legjobb tudomásunk szerint nincs rögzítve a DNS-ben, csak az azokat végrehajtó enzimek kódja.

A szénhidrát – aminosav kapcsolat kialakulása, mely ko- és poszttranszlációs enzimatis lépések komplex sorozatát indítja el, különféle biológiai funkciójú, fehérjéhez kötött oligoszacharidok sokaságának kialakulásához vezet, és kulcsfontosságú esemény a glikokonjugátumok szénhidrát egységeinek bioszintézisében. Ezek a reakciók a teljes filogenetikai skálán fellelhetők az archeáktól az eubaktériumokon át egészen az eukariótákig [1]. A glikokonjugátumok módosítása enzimatis glikoziláció útján egy olyan esemény, amely túlmutat a genomon, és olyan tényezők által vezérelt, amelyek sejttípusonként és fajonként, valamint egyedenként is rendkívül eltérőek lehetnek.

Az oligoszacharidok szintézise során az egyik monoszacharid glikozidos hidroxilcsoportja kapcsolódhat a másik monomer bármely hidroxil (vagy egyéb funkciós) csoportjához, kétféle (alfa és béta) anomer konfigurációban. Az összekapcsolódó monomerek számának növekedésével az elágazások lehetősége szintén növeli a diverzitást, amely az oligoszacharid-szekvenciák funkciós csoportokkal, például szulfáttal, metil- vagy acetáttal történő szubsztitúciója további nagyságrendekkel fokozható [15]. Az információhordozó kapacitás tovább növekszik a harmadik dimenzióban, ahol a monoszacharid egységek az őket összekapcsoló kötések mentén elfordulhatnak (Ψ és Φ , valamint ω torziós szögek alakulása) [16]. A fentiekben vázoltak alapján a szénhidrátok nagyságrendekkel több különféle szerkezet kialakítására képesek, mint a nukleotidok, vagy akár a polipeptidek. Ez a hatalmas kódolási kapacitás alkalmassá teheti a szénhidrátokat sejtspecifikus biológiai információk tárolására, mely nagymértékben hozzájárul az élő szervezetek diverzitásának kialakulásához.

A peptidhez kapcsolt oligoszacharidok biogenezésében egyértelműen a cukor-aminosav közötti kötés kialakulása a meghatározó esemény; ez a legtöbb esetben ugyanis definiálja a szénhidrát egységek további jellegét, amely viszont befolyásolja a fehérje számos tulajdonságát. A szakirodalom szénhidrát-peptid kötések lenyűgöző változatosságáról számol be, melyekben tizenhárom különböző monoszacharid és 8 aminosav-típus vesz részt, így legalább 31 cukor-

aminosav-kombináció létezik. Amennyiben figyelembe vesszük a glikozidos kötések ismert anomer konfigurációit is, ez a szám minimum 37-re emelkedik [17]. A foszfoglikozil-kötések és a glikofoszfatidil-inozitol (glycophosphatidyl inositol – GPI) foszfoetanol-amin hidak további figyelembevételével összesen legalább 41 cukor-aminosav kapcsolat fordulhat elő a természetben. A glikopeptid kötések öt, egymástól jól elkülönülő csoportba sorolhatók (1. ábra). Sok esetben több cukor-aminosav kötés típus is előfordulhat ugyanazon fehérjén a rendelkezésre álló enzimatis g  pezett  l, valamint az aminosav szekvenciától és konform  ci  t  l függően [17].



1.   bra: Hat, a természetben eddig azonosított cukor-peptid kötés [1]

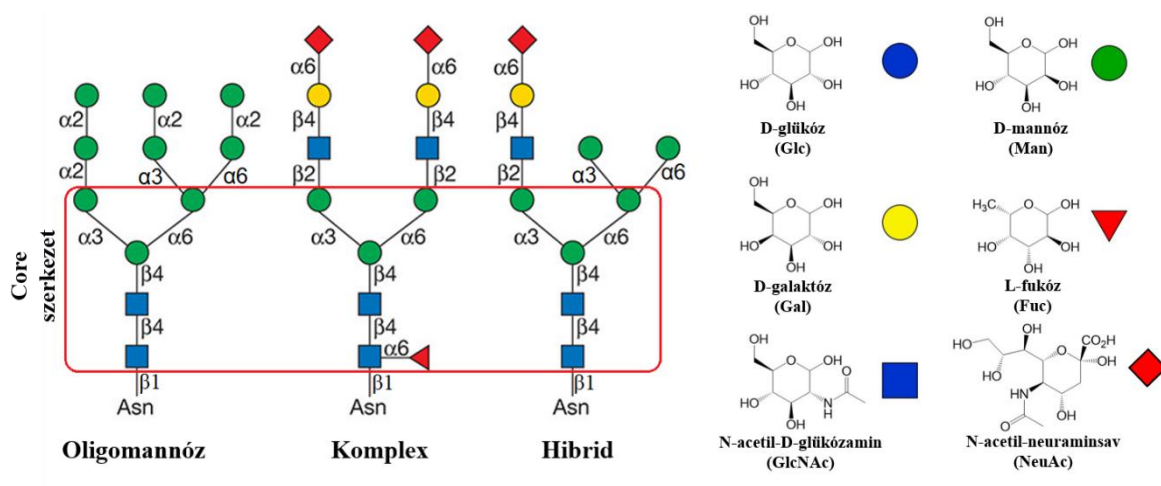
Rövidítések: (Asn) aszparagin; (Arg) arginin; (Hyp) hidroxiprolin; (Ser) szerin; (Thr) treonin; (Hyl) hidroxilizin; (Tyr) tirozin; (Trp) triptof  n; (Cys) cisztein; (C-term) karboxil-terminális aminosav marad  k; (GlcNAc) N-acetil-glükózamin; (GalNAc) N-acetil-galakt  zamin; (Glc) glükóz; (Rha) ramn  z; (Ara) arabin  z; (FucNAc) N-acetil fuk  zamin; (Xyl) xil  z; (Man) mannóz; (Gal) galaktóz; (Fuc) fuk  z; (Pse) pszeudamisav (5,7-diamino- 3,5,7,9-tetradeoxi-L-glicero-L-manno-nonulozonsav); (DiAcTridH) 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxihex  z; (GlcNAc-1-P) N-acetil-glükózamin-1-foszfát; (Man-1-P) mannóz-1-foszfát; (Fuc-1-P) fruktóz-1-foszfát; (Xyl-1-P) xilóz-1-foszfát; (EthN-6-P-Man) a f  h  rje karboxil-terminális csoportjához foszfoetanolaminon keresztül kötött mannóz

A glikoproteinek olyan glikokonjugátumok, amelyekben az oligoszacharid komponens kovalensen kapcsolódik a polipeptid gerinchez, általában N- vagy O-glikozidos kötéseken keresztül. Ezen két fő glikozilációs típus mellett az irodalomban beszámoltak még C-, valamint az igen ritkán előforduló S-típusú glikozilációról is [1].

Az N-glikoziláció folyamata során a glikán kovalensen kapcsolódik egy polipeptidlánc aszparagin (Asn) oldalláncának nitrogén atomján keresztül. Az állati eredetű N-glikánok közös pentaszacharid ún. core struktúrával rendelkeznek, mely összetétele: α -D-Man(1-6)-[α -D-Man(1-3)]- β -D-Man(1-4)- β -D-GlcNAc(1-4)- β -D-GlcNAc(1-N). A core struktúra a redukáló végén elhelyezkedő N-acetil-glükózaminon (GlcNAc) keresztül kapcsolódik β -N-glikozidos kötés kialakítása révén a polipeptidlánc konszenzus szekvenciájában (Asn-X-Ser/Thr ritkán Asn-X-Cys, ahol $X \neq \text{Ser/Thr/Pro}$) lévő Asn aminosav nitrogén atomjához. Ez a motívum kiegészül a *C. elegans* esetében az Asn-X-Ser/Thr-X szekvenciával, ahol a szekvencia végén lévő aminosav a prolin kivételével bármi lehet. Ezen felfedezés alapján lehetséges, hogy a kanonikustól eltérő konszenzusmotívumok is előfordulhatnak a természetben [18]. Ezt a gondolatot erősíti az is, hogy az Asn-X-Ser/Thr szekvenciában a Ser/Thr aminosavak cserélődését jegyezték le Cys-re humán epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor – EGF) esetében [19]. Az N-glikánok a központi közös szerkezethez kapcsolódó monoszacharidok szerint három fő osztályra oszthatók:

- 1) oligomannóz (vagy magas mannóz tartalmú)
- 2) komplex és
- 3) hibrid típus (2. ábra)

Az oligomannóz típusú glikánok esetében a core struktúrához kizárólag mannóz egységek kapcsolódnak, míg a komplex típusú N-kötött glikánokban GlcNAc által kiterjesztett ún. antennákhoz különböző monoszacharidok kapcsolódnak. Hibrid glikánról akkor beszélünk, ha a core struktúra α (1-6) kötött mannóz (Man) egységéhez további Man egységek, míg a α (1-3) kötött Man-hoz egy vagy két GlcNAc monoszacharid, vagy azokon keresztül egyéb cukrok kapcsolódnak.



2. ábra: Magas mannóztartalmú, komplex és hibrid típusú N-glikánok sematikus ábrázolása a monoszacharid egységek szimbólumaival (saját ábra)

Az O-kötött glikánok (O-kapcsolt oligoszacharid) gyakran kapcsolódnak a polipeptidhez N-acetil-galaktozamin (GalNAc) révén a fehérje szerin- vagy treonin oldalláncának hidroxilcsoportjában lévő oxigén atomon keresztül, és core struktúrájuk alapján különböző szerkezeti osztályokba sorolhatók [1].

Habár mind az N-, mind pedig az O-típusú glikoziláció igen fontos jelentőséggel bír a fehérjék megfelelő feltekeredésében, stabilitásában és funkcióinak kialakításában [1], az N-kapcsolt glikánok vizsgálata egyszerűbb kivitelezhetősége miatt szélesebb körben elterjedt. Ennek okaként az N-glikánok felépítését lehet tekinteni. Közös core pentaszacharid szerkezetük miatt ugyanis egyszerű és jól megoldott a szénhidrátláncok enzimatisz felzabadtása a munkám során általam is használt PNGase F enzimmel (vagy akár PNGase A enzimmel is, amely a core struktúra legelső GlcNAc egységéhez $\alpha(1-3)$ kötéssel kapcsolódó fukózzal rendelkező glikánok hasítására is képes). Az O-glikánok ezzel ellentétben nem rendelkeznek egységes core szerkezettel, így azok felzabadtása enzimatisz emésztés révén nem, csak kémia eljárások alkalmazásával lehetséges. Az O-kapcsolt glikánok mérete nagyon eltérő lehet, a redukáló végén egyetlen GalNAc monoszacharidtól kezdve a nagy oligoszacharidokig, amelyek további cukortípusok, köztük galaktóz (Gal), GalNAc, fukóz és szíálsavak (N-acetil-neuraminsav és/vagy N-glikolil-neuraminsav) hozzáadásával komplex glikán motívumokat mutatnak. Ez a jelentős heterogenitás nyolc fő magstruktúrát hozhat létre, melyek további meghosszabbítása nem minden esetben történik meg.

Mivel kutatócsoportunk is az N-kötött szénhidrátmódosítás analízisével foglalkozik, így munkám során ezen oligoszacharidok tanulmányozását tűztem ki célul, illetve a dolgozatom további részében is kizárólag az Asn-kötött (N-) oligoszacharidok szerkezeteinek fontosságát kívánom hangsúlyozni.

3.2. Az N-kapcsolt glikánok biológiai jelentősége

A glikoproteinek cukorrészeinek funkciói igen változatosak, kölcsönhatásba lépnek az extracelluláris tér (Extracellular Matrix - ECM) összetevőivel, beleértve az ECM fehérjét, növekedési faktorokat, receptorokat, enzimeket, sejteket és kórokozókat is [1] [20]. Ezen kölcsönhatások következtében a glikánok különféle folyamatokat szabályoznak, beleértve a sejtek növekedését [21], fejlődését [22] [23], morfogenezisét [24], adhézióját [25], az immunrendszer fejlődését [26], valamint a gazda-patogén kölcsönhatásokat [27] [28]. A glikom, amely egy szervezetben/szövetben/sejtben vagy akár egyetlen glikoproteinen található összes glikán együttese, különféle biológiai folyamatok vagy a sejtállapot változásai során dinamikus módon módosulhat, ezáltal érzékeny indikátora lehet a szervezet aktuális állapotának [29] [30]. A glikánok összetételében vagy mennyiségében bekövetkező változások figyelhetők meg a fejlődés, a tumorgenezis és az áttét-képzés során [31] [32] [33], autoimmun betegségek [34], anyagcserebetegségek, valamint a kórokozók szervezetbe kerülése során [35].

A sejtfiziológia normális és kóros állapotban történő szabályozása mellett a glikánok molekuláris szinten is ellátják funkciójukat. A glikoziláció befolyásolja a fehérjék szerkezeti tulajdonságait szabályozva azok feltekeredését és 3D struktúrájának kialakulását, oldhatóságát, stabilitását, immunogenitását és a szervezetből történő kiürülés (clearance) mértékét [36].

Az N-kapcsolt glikánok közvetlen és közvetett szerepet játszanak az újonnan szintetizált glikoproteinek feltekeredésében és 3D szerkezetének kialakításában, így biztosítják, hogy csak a megfelelően feltekeredő fehérjék legyenek képesek kilépni az endoplazmatikus retikulumból (ER). Az N-glikánok a folyamat során felismerő vagy szortírozó jelekként szolgálnak, kötődnek a lektinkötő chaperonokhoz, a calnexinhez vagy a calreticulinhoz, amelyek elősegítik más ko-chaperonokhoz történő kötődést, támogatva a fehérje megfelelő feltekeredését, majd tovább haladását a Golgi-készülékbe [37]. A rosszul hajtogatott fehérjék az ER-ben maradnak, és aktiválják az ER-asszociált degradációs (Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation – ERAD) útvonalat, hogy megakadályozzák a hibás fehérjék felhalmozódását [38]. A rosszul hajtogatott fehérjék retrográd módon transzlokálódnak a citoszolba, ahol a

proteaszómák lebontják őket. A humán *NGLY1* gén által kódolt citoszolban lokalizált peptid N-glikanáz (PNGase) fontos szerepet játszik a glikoproteinek EARD útvonalon történő lebontásában, deficienciája súlyos rendellenességeket idéz elő (globális fejlődési késés, mozgászavarok, hipotónia, könnytermelődés hiánya). Ezek a megfigyelések egyértelműen bizonyítják a citoszol PNGase funkcionális jelentőségét. Az enzim által előidézett patológias folyamatokért felelős molekuláris mechanizmusok részletei azonban továbbra is csak kevésbé ismertek [39].

A glikánoknak, köztük a fehérjék N-kapcsolt cukor komponenseinek, fontos szerepe van a megszintetizált és feltekeredett fehérje rendeltetési helyére történő szállításában. A fehérjék, lipidek és cukrok lebontásáért felelős lizoszómális hidrolázok például mannóz-6-foszfát motívumot hordoznak, melyet a P-típusú lektinek, a mannóz-6-foszfát receptorok ismernek fel. A lizoszómáknak a lebontó enzimek teljes repertoárjával való ellátottságának fontosságát a normál sejtfolyamatokhoz kiválóan illusztrálja a több, mint 50 különböző monogénis humán lizoszómális raktározási betegség előfordulása. Az enzimek magas mannóztartalmú N-kötött glikánjainak nem megfelelő foszforilációját előidéző GlcNAc-1-foszfotranszferáz deficiencia két különböző humán lizoszómális tárolási betegséget okoz. A Mukolipidózis II (ML II) és a Mukolipidózis III (ML III), azon kevés lizoszómális tárolási rendellenességek közé tartoznak, amelyek a nem lizoszómális fehérjék hibáival kapcsolatosak [40].

A glikánok létfontosságú szerepét jelzi, hogy a glikoziláció veleszületett genetikai hibái (Congenital Disorders of Glycosylation – CDG) gyakran embrionális korban halálosak. Az I-es típusú CDG-ket oligoszacharid szerkezet képződésének rendellenességei okozzák a glikolipid prekursoron, mielőtt a fehérje Asn oldalláncához kapcsolódna, míg a II-es típusú CDG-k a születő glikoprotein N-kapcsolt glikánjának elágazó szerkezeteinek szabályozási hibáival kapcsolatosak [41]. A foszfomannomutáz 2 enzimet kódoló *PMM2* gén mutációja által okozott PMM2-CDG az N-kapcsolt oligoszacharidok abnormális glikozilációjával járó rendellenességek csoportjában a leggyakoribb. Megjelenését tekintve három klinikai szakaszra oszlik: csecsemőkori multirendszer, késői csecsemőkori és gyermekkori ataxia és értelmi fogyatékoság, valamint felnőttkori rokkantság [42]. A PMM2 a Man-6-foszfátot Man-1-foszfáttá alakítja, amely a GDP-(Dol-P-Man) szintézisének prekursora. Ezek a vegyületek az N-glikánok lipidhez kötött prekursorának, a Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol-nak a szintézisében részt vevő mannóz-transzferázok szubsztátjai. A génmutáció típusa befolyásolja a betegség súlyosságát, amely az embrionális halálos defektustól az enyhe kognitív károsodásig terjedhet [43]. A mannóz-6-foszfát izomeráz enzim mutációjához köthető rendellenesség a második leggyakoribb CDG. Az enzim a fruktóz-6-foszfát mannóz-6-foszfáttá történő átalakításáért

felelő. Mivel a mannóz-6-foszfát a mannóz hexokináz általi közvetlen foszforilálásával is előállítható, így a betegség mannóz-étrendkiegészítő alkalmazásával jól kezelhető [44].

Az N-glikánok sokoldalú biológiai és a fehérjékre kifejtett szabályozó szerepét a gyógyszeriparban a hatékony terápiás biológiai készítmények kifejlesztésével összefüggésben alaposan tanulmányozták [45]. A ma kereskedelmi forgalomban lévő monoklonális antitestek (monoclonal Antibody - mAb) döntő többsége az IgG osztályba, pontosabban az IgG1, valamint bizonyos mértékig az IgG2 és IgG4 alosztályokba tartozik. A forgalmazott terápiás mAb-ok kétharmada humán vagy humanizált, és kisebb százalékban kiméra vagy egér eredetű. Az IgG1 molekula a kristályosítható régiójának (fragment crystallizable region – Fc region) C_H2 doménjén az Asn-297 pozícióban konzervált N-glikozilációs helyet tartalmaz, mely hozzájárul a megfelelő negyedleges szerkezet kialakításához, ezáltal befolyásolva az adott molekula antigénkötő képességét, a keringési idejét, a komplementfüggő citotoxicitást (Complement-Dependent Cytotoxicity – CDC), az antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitást (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity – ADCC), valamint a gyulladáscsökkentő hatást egyaránt.

Az Fc fragmentumhoz főként kétantennás, core-fukozilált komplex típusú N-glikánok kapcsolódnak, melyek további GlcNAc, Gal, illetve szíalsav egységekkel egészülhetnek ki, fokozva ezzel a kötőhely struktúráinak heterogenitását. Ez a terminális cukrokban jelentkező heterogenitás funkcionális következményekkel jár, ugyanis befolyásolja az IgG molekulák Fc receptorok, illetve C1q kötését, ezáltal befolyásolva az antitest effektor funkcióit. Az IgG terminális Gal tartalma befolyásolja a CDC aktivitást, de ADCC-aktivitást nem érinti. A rituximab esetében például a terminális Gal tartalom növekedése fokozhatja a CDC aktivitást a megnövekedett antitest-kötés eredményeként a C1q molekulán keresztül, míg a biszekting GlcNAc kapcsolódása a core szerkezet β(1-4) kötött Man egységéhez specifikusan fokozhatja az ADCC aktivitást bármely más N-glikán módosítástól függetlenül [46]. Megnövekedett ADCC aktivitásról számoltak be továbbá α(1-6) fukozil-transzferáz gén knock out kínai hörcsög petefészek (Chinese Hamster Ovary – CHO) sejtvonalban előállított rituximab esetében is [47], továbbá mellrákban szenvedő nőktől származó teljes vér analízise során afukozilezett trastuzumab fokozott ADCC kiváltó hatását írták le [48]. Ma már ismeretes, hogy az GlcNAc hozzáadása a növekvő oligoszacharid lánchoz viszonylag korai esemény a Golgi készülékben, és ennek a cukor egységnek a jelenléte gátolja a fukóz későbbi hozzáadását a core struktúra első GlcNAc-jához [49]. A core fukóz hiánya eredményezi az IgG1 antitest fokozott kötési affinitását az FcγRIIIa receptorhoz, amelynek következtében megnő a természetes ölősejtek (Natural Killer cell – NK) által közvetített ADCC funkció hatékonysága. Mindezek

fényében úgy tűnik, hogy a fukóz hiánya, és nem a biszekting GlcNAc *per se* jelenléte eredményezi a megnövekedett ADCC aktivitást [50].

A szíalsavak negatív töltésük következtében kivételes helyet foglalnak el a cukrok, mint funkciót szabályozó molekulák körében. A negatív töltés jelentősen hozzájárul a szialilált sejtek és fehérjék biofizikai tulajdonságaihoz és funkciójához azáltal, hogy „tapadásgátló” módosításnak tekinthetők, bár specifikus receptorok ligandumaiként is működhet (Siglec-ek, szelektinek számára).

Az eritrociták, csakúgy, mint a vaszkuláris endotélium lumenális felülete, erősen szialilált [51]. A kettő közötti taszító kölcsönhatás megakadályozza az eritrociták vaszkuláris endotéliumhoz történő tapadását, ezáltal biztosítja az eritrociták számára a vérkeringésben való áramlást [1].

A szialiláció negatív töltése miatt elengedhetetlen a korai embrionális fejlődés során is. Az uridin-difoszfát-GlcNAc (UDP-GlcNAc) 2 epimerázt kódoló *Gne* gén deléciója, amely a szíalsav bioszintézis sebességkorlátozó enzimjét kódolja, az embrió korai halálát okozza [52]. A *Gne*-hiány korai letalitása a sejt-sejt adhézió és a sejt-migráció megzavarásának is köszönhető. A szíalsav, eltérően más cukroktól, gyakran képezhet homo-oligo/polimereket, mint például a disíalsav (diSia), oligoszíalsav (oligoSia) és poliszíalsav (polySia) [53], melyek főként a központi idegrendszer sejtjeinek felületén megjelenő glikokálira jellemző szerkezetek. Többek között az idegsejt adhéziós molekulák (Neural Cell Adhesion Molecule – NCAM), a szinaptikus sejtadhéziós molekulák (Synaptic Cell Adhesion Molecule-1 – SynCAM-1), a neuropilin-2 (NRP-2), a 7-es típusú C-C kemokin receptor (CCR7), az E-szelektin ligandum-1 molekulák jellegzetes glikozilációs módosításai [54].

A szialiláció elengedhetetlen az őssejt-pluripotencia kialakításához és fenntartásához is. Wang és mtsai. szignifikáns változást számoltak be a fehérje szialilációs szintjében a differenciálódás során, magasabb ST6GAL1 szialiltranszferáz szinttel a differenciálatlan humán pluripotens őssejtekben, mint a nem pluripotens sejtekben [55].

Az epiteliális-mezenchimális átmenetet (Epithelial–Mesenchymal Transition – EMT) indukcióját követően megváltozott szialilációs mintázat figyelhető meg a sejtek felszínén, amelyek lehetővé teszik a rákos sejtek számára az elsődleges daganatoktól történő elszakadást, az extracelluláris mátrixba történő behatolást, és áttétek képezését a távoli szervekben [56]. A fehérjék szialilációjának megváltozásáról hipoxiás körülmények között szintén beszámoltak [57] [58].

A fent leírtakból is jól látszik ugyan, hogy a szíalsavak szerepe rendkívül sokrétű és számos folyamatban kritikusak, tanulmányozásukat több akadály is nehezíti. A szíalsavak savas

oldatban fragilisek és könnyen leszakadhatnak mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI) vagy pozitív ion módú elektropray ionizációs tömegspektrometria (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry – ESI-MS) alkalmazása során. Ennek megakadályozására különböző kémiai derivatizációs eljárásokat találhatunk a szakirodalomban, mint például a metil észterifikáció[59].

A glikán redukáló végének fluoreszcens jelölését a szíalsavak stabilizálása nélkül széles körben alkalmazzák kapilláris elektroforézissel vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) történő elemzések alkalmával. Amikor a peptid N-glikanáz F (PNGase F) felszabadítja az N-glikánokat a glikoproteinekről, a felszabadított glikánok redukáló végén aktív alditol található, amely egy primer aminnal redukatív aminálással jelölhető meg. A jelölési reakció egy kétlépéses folyamat, amelynek első lépésében a fluorofór primer aminja reagál a cukor nyitott gyűrűs formájával és 1 vízmolekula kilépésével Schiff-bázis képződik. Savas körülmények között a kialakult imin protonálódik, így iminium ion képződik. A stabil fluorofór-cukor kapcsolat kialakításához az iminium iont redukálni kell, melyhez redukálószerként leggyakrabban nátrium-cianoborohidridet (NaBH_3CN) alkalmaznak [60].

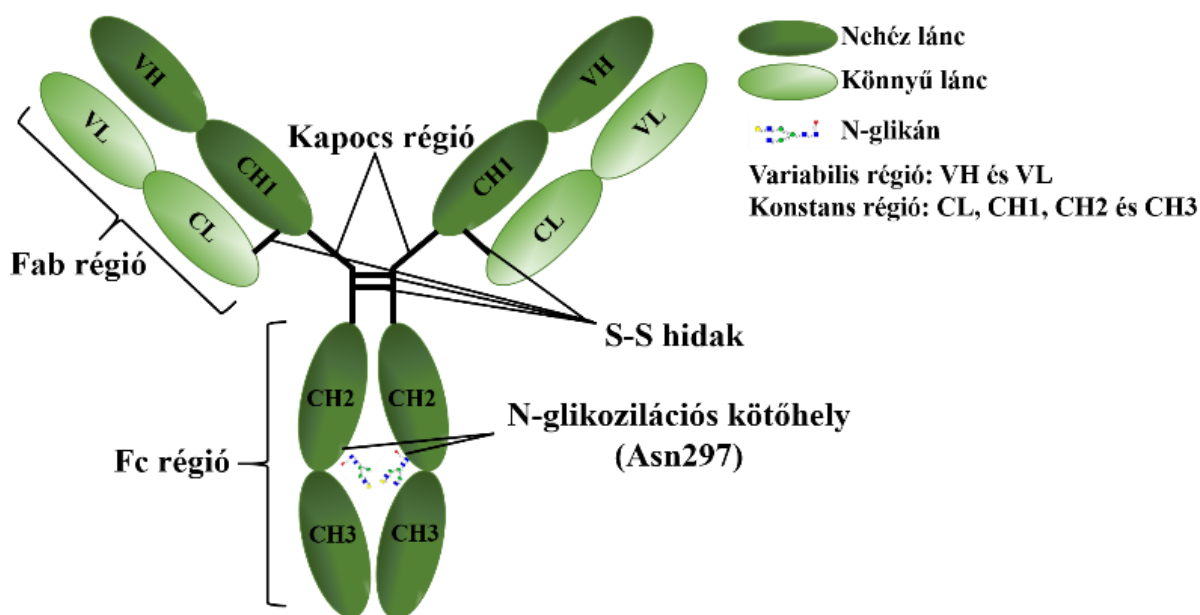
Kimutatták továbbá, hogy a szíalsavak elveszhetnek, ha magas hőmérsékletnek ($>28^\circ\text{C}$) vannak kitéve [61] [62]. A jelölési módszereket ennek megfelelően próbálják optimalizálni. Az irodalomban fellelhetőek olyan eljárások, ahol 37°C overnight jelölést alkalmaztak [63] [64] és olyan is, ahol 65°C -on 2-4 órán keresztül végezték a glikánok jelölését. Egyes mérési adatok szerint a valamivel alacsonyabb hőmérséklet (60°C) csökkenti a szíalsavak sav által katalizált vesztesét a jelölést követő 2 órán belül [59].

A minták deszialilálása a fent említett „problémák” miatt így egy gyakran alkalmazott módszer az elektroforetikus elválasztások előtt annak érdekében, hogy a kapott elektroferogramot egyrészt egyszerűsítsék, másrészt azért, hogy a reprodukálhatóságot növeljék [65]. A szíalsavak kontrollálatlan vesztesével ugyanis olyan struktúrák arányának fals növekedését detektálhatjuk, amelyek egy része eredetileg valójában szíalsavval terminált volt. Így főként a bonyolult biológiai minták esetében célszerű a minták deszaililációja azok glikomikai analízise előtt.

3.3. IgG szerkezeti felépítése és N-glikozilációja

A humán immunglobulinok a glikoproteinek egy különleges osztályát képviselik, melyek alapvető szerepet töltenek be a specifikus immunválasz létrejöttében. Funkcionális specificitásuk egyes becslések szerint 10^7 különböző antitest szekvencián alapul [66].

Az antitestek heterotetramer típusú, alapvetően két nehéz- (H-lánc) és két könnyű láncból (L-lánc) felépülő fehérjék, mely láncokat diszulfid hidak kapcsolnak össze kialakítva a jellegzetes „Y” molekulaformát [67]. Az emberi ellenanyagok a nehéz láncok izotípusa alapján (α , δ , ϵ , γ és μ) IgA, IgD, IgE, IgG és IgM alosztályokba sorolhatók. A könnyű láncoknak két izotípusa ismert, a λ és a κ [68], melyek aránya ember esetén 70:30 [69]. Mind a nehéz- (55 és 70 kDa között), mind pedig a könnyű láncok (kb. 24 kDa) feloszthatók variabilis (V), illetve konstans (C) doménekre. A teljes könnyű lánc és a nehéz lánc V_H és C_{H1} doménje az Fab (antigén-kötő frangmens), míg a nehéz láncok C-terminális doménjei (C_{H2} és C_{H3} , valamint IgE és IgM esetében a C_{H4} domén is) az effektor funkciók közvetítéséért felelős Fc régió kialakításában vesznek részt. A könnyű és nehéz láncok variabilis régióin belül 4, viszonylag konzervált aminosavszekvenciát mutató váz-szekvenciák (Framework-Region – FR), valamint 3, nagyfokú változatossággal jellemezhető hipervariábilis régió (Complementary-Determinind Region – CDR) helyezkedik el, melyek együttesen alakítják ki az epitópot felismerni, és azt nagy fajlagossággal kötni képes antigén-kötőhelyet [70]. Az ellenanyagok Fc és az Fab régiói α , δ , és γ nehéz láncok esetén egy, a molekula többi részével homológiát nem mutató, rugalmas ún. kapocs régió keresztül kapcsolódnak, mely a diszulfid hidaknak is helyet ad. Az IgM és IgE izotípusú antitestek lényegesen alacsonyabb flexibilitással jellemezhetők a kapocs régió hiánya miatt [71].



3. ábra: IgG antitest szerkezete a konzervált N-glikozilációs kötőhely megjelölésével (saját ábra)

Valamennyi antitest glikoprotein (O- és N-kapcsolt glikánok egyaránt előfordulhatnak izotípustól függően), nehéz láncuk konstans régiójához kapcsolódó N-kötött szénhidrát lánc a moláris tömeg 2-3%-át adja az IgG esetében, míg a több glikozilációs hellyel rendelkező antitesteknél is legfeljebb csak 12-14%-át jelenti a molekula teljes moláris tömegének (pl.: IgM és IgE esetében). Az antitestek könnyű láncai szintén hordozhatnak glikán struktúrát [71].

A szérum glikoproteinek közül N-glikozilációs szempontból az antitestek 75%-át adó IgG, amely könnyű lánc szerkezete alapján további 4 alosztályra osztható (IgG1, IgG2, IgG3 és IgG4), a legtanulmányozottabb fehérje glikozilációs szempontból [72]. Minden egyes IgG molekula C_H2 doménje tartalmaz egy konzervált N-glikán kötőhelyet, a nehéz lánc Asn-297 pozícióban lévő aminosavhoz kovalensen kapcsolódik egy-egy, döntően core-fukozilált kétantennás, komplex típusú N-glikán szerkezet [71]. Az IgG ellenanyagok N-glikán szerkezetei galaktozilációs fokukat illetően lehetnek agalaktoziláltak (G0), mono- (G1), valamint bigalaktoziláltak (G2). A szialiláció mértéke jellemzően igen alacsony, a profil kb. 10-15%-át alkotják. A szialilációhoz hasonlóan a biszekting GlcNAc jelenléte az IgG N-glikáinak csak kis részére, hozzávetőlegesen 10-15%-ukra jellemző [73]. Az Fc régióval ellentétben az IgG Fab régiója nem hordoz konzervált N-glikozilációs helyet, a molekulák egy jelentős része azonban az Fab variábilis részén akár több pozícióban is glikozilált lehet [73], és főként magasan szialilált, komplex típusú szintén kétantennás szerkezetek, valamint magas

mannóztartalmú N-glikánok jelenlétéről számoltak be az Fab régió glikozilációs elemzésének eredményeként [74].

Bár az IgG glikom egyénenként bizonyos időintervallumon belül stabilitást mutat [75], szénhidrátszerkezetének összetételét befolyásolja az életkor [76] [77], a nem és nemi hormonok összetétele [78], és érzékenyen reagál a szervezet homeosztázisának felborulására, így számos betegség esetén jelentős glikozilációs változásokról számoltak be az évek során [73].

A gyulladás a szervezet természetes válaszütemakciója az őt ért külső vagy belső eredetű káros hatások eliminálására, mely során számos változás figyelhető meg az adott szervezetben mind lokálisan, mind pedig szisztémásan [79].

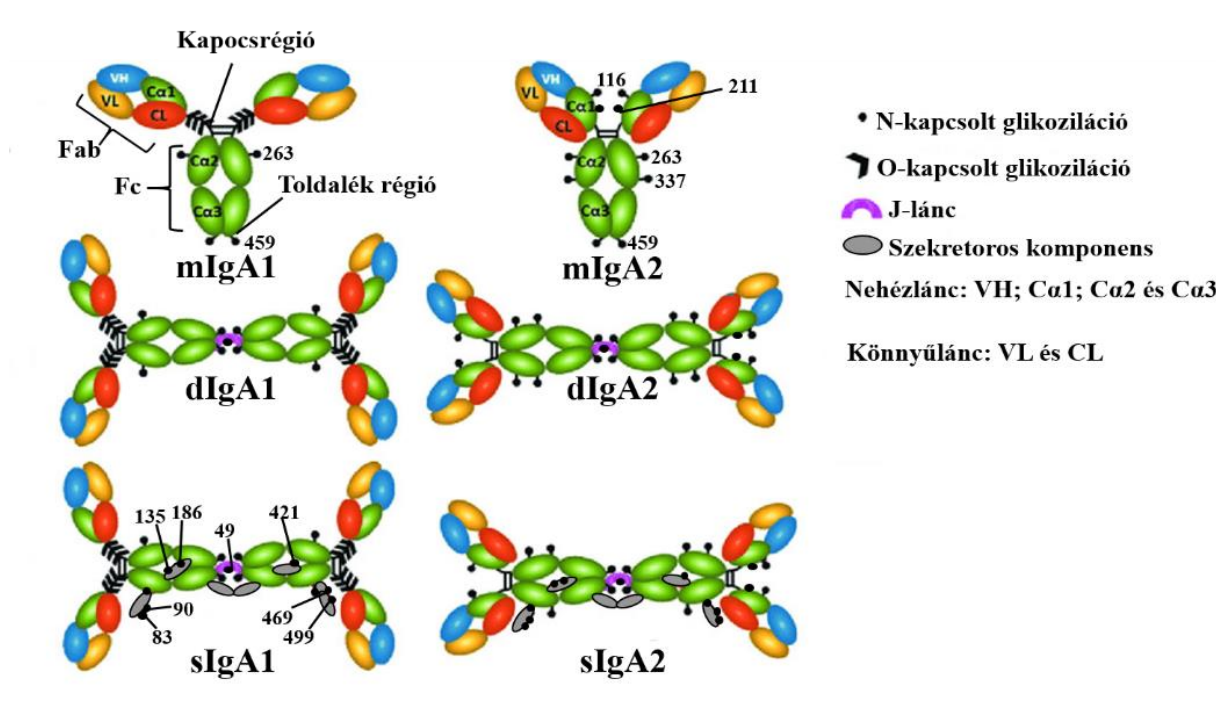
Az IgG molekulák a gyulladásos folyamatok szereplői. N-glikozilációval történő poszttranszlációs módosításuk fontos a szerkezeti integritásuk szempontjából, és döntő szerepet játszanak a komplementrendszer aktiválásában [80], az Fc receptorokkal való kölcsönhatásban [81] és az antitest-függő sejt által közvetített citotoxicitási reakcióban [50]. A már említett konzervált N-glikozilációs helyhez kötődő cukorstruktúrák összetétele nagyban befolyásolja a molekula ezen effektor funkcióit. Az Fc régió glikánjainak eltávolítása a molekulára jellemző 3D struktúra elvesztéséhez vezet, az antitest nem képes az Fc receptorhoz és a C1q-hoz kötődni, így sem a komplement rendszer aktiválására és a CDC, sem az ADCC folyamatok beindítására nem képes.

3.4. IgA szerkezeti felépítése és N-glikozilációs tulajdonságai

Az IgG antitestekkel ellentétben az IgA-ról és a molekula glikozilációjának az effektor funkciókra esetlegesen kifejtett hatásairól jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. Az IgA a szekrétaumokban legnagyobb arányban előforduló immunglobin izotípusnak tekinthető [82], az emberi vérben pedig a második legnagyobb koncentrációban (3-7 mg/mL) keringő ellenanyag az IgG-t követően, így az immunhomeosztázisban betöltött jelentős szerepe feltételezhető.

Az IgA antitestek 2 alosztályát különböztük el, az IgA1 és az IgA2 izotípusokat, melyek szerkezeti felépítése főként a nehézláncok összekötő régiójának hosszában és glikozilációjában tér el egymástól. Mindkét típus monomer és dimer formában is előfordul, az alosztályok eltérő arányban vannak jelen a vérkeringésben és a különböző szekrétaumokban (tracheabronchiális váladék, anyatej, nyál, könny, orrnyák, gasztrointesztinális szekrétaumok). Míg az emberi vérkeringésben a teljes IgA 90%-át az IgA1 alosztály teszi ki, mely jelentős része monomer formában van jelen, addig az externális szekrétaumokat illetően a két típus aránya jelentős

eltéréseket mutat a test különböző pontjain [83], és főként szekretált formája figyelhető meg. Az IgA dimer formája kiegészül az antitesteket az Fc régiójuknál összekötő, és azokhoz diszulfid hidakkal kapcsolódó, ciszteinben gazdag J-lánccal, mely 1 N-glikozilációs kötőhelyet tartalmaz az Asn-49 pozícióban. Az IgA szekretoros formája (sIgA), amely a transzcitózisnak nevezett folyamat során az epitelsejteken keresztül kerül a szekrétrumokba, az antitestek Fc régiójához, valamint a J-lánchoz kapcsolódó szekretoros komponenssel (Secretory Component – SC) is kiegészül. A szekretoros komponens 7 N-kapcsolt glikánkötő hellyel rendelkezik. A két IgA izotípus felépítése a glikozilációs helyek megjelölésével a 4. ábrán látható.



4. ábra: IgA szerkezetének sematikus ábrázolása a glikán-kötőhelyek megjelölésével Lopez és mtsai. nyomán [84]

mIgA1 és mIgA2 az IgA monomer formáit, a dIgA1 és dIgA2 a dimer, míg az sIgA1 és sIgA2 az antitestek szekretoros formáját reprezentálják. Szekretoros komponens ([P01833](#)) glikozilációs helyei az UniProt adatbázisból származnak [85].

Bár korábbi tanulmányok azt sugallták, hogy a szérumban IgA elsődleges funkciója az antigének eltávolítása gyulladásos válaszreakciók generálása nélkül, mára egyre több bizonyíték utal arra, hogy egyaránt képes aktiválni a komplement rendszert, fagocitózist és ADCC válaszreakciót [86] kiváltani. A közvetített immunválasz nagymértékben függ a molekulaformától, ugyanis míg az sIgA a szekrétrumok egyik fő denfender molekulájaként véd

a fertőző patogénekekkel és toxinokkal szemben [87], addig a monomer forma főként az inflammatorikus szignálok gyengítése révén mérsékli az IgG antitestek által generált válaszreakciók szisztémás hatásait, hozzájárulva ezzel a szervezet belső egyensúlyának fenntartásához. Immunkomplexben az IgA a keringés fő antitestjéhez, az IgG-hez hasonlóan ADCC válaszreakciót indukál, valamint elősegíti a patogének fagocitózisát, polimer formában aktiválhatja a komplement rendszer lektin-függő útvonalát [88].

Az IgA esetében is alosztály-függő válaszreakcióról beszélhetünk, amely valószínűleg a két IgA alosztály glikozilációjában való különbségekből is adódhat. Az IgA1 főként antiinflammatorikus hatást fejt ki, feltehetően a magasabb fokú szialilációjának köszönhetően [89]. Az IgA Fc régióiban lévő aszparaginhoz kapcsolt oligoszacharidok effektor funkcióját befolyásoló hatása azonban még nem teljesen tisztázott. Mattu és mtsai. szerint az IgA1 egyik N-glikánja sem kulcsfontosságú az Fc α RI-IgA1 kapcsolat kialakulása szempontjából [90], ugyanakkor Carayannopoulos és mtsai. szerint az Asn-263 mutációja glutaminra csökkenti a molekula receptorhoz való kötési affinitását [91].

Az N-kapcsolt glikánok az IgA1 esetében a molekula teljes tömegének 6-7%-át, míg az IgA2 esetében a 8-10%-át teszik ki [92]. Az IgG molekulákkal ellentétben, ahol valamennyi altípus nehéz láncként egy konzervált N-glikán kötőhelyet hordoz, az IgA1 és IgA2 a glikozilációs helyek tekintetében is eltérést mutat. Az IgA1 két N-glikán kötőhelyet hordoz a C α 2 domén Asn-263 pozíciójában, illetve a toldalék régió Asn-459-es pozíciójában.

Az IgA1 emellett 9 O-glikozilációs kötőhellyel is rendelkezik a konstans és a variabilis régiók összekötő szakaszán. Az IgA2m(1) altípus 4 N-glikozilációs hellyel rendelkezik (Asn-116; Asn-263; Asn-337; Asn-459), míg az IgA2m(2) plusz 1 N-glikozilációs helyet hordoz az Asn-211 pozícióban [93].

3.5. A mintavétel és mintagyűjtés N-glikozilációs mintázatot befolyásoló általános nehézségei

A glikomikai elemzésre szánt minták esetében nincs olyan egységes mintakezelési protokoll, melyet a minták gyűjtésétől egészen azok tárolásáig és feldolgozásáig követni szükséges. A laboratóriumi vizsgálatok és a klinikai kutatások így nagyban eltérhetnek a preanalitikai szakaszban, beleértve a vizsgálat igénylését, a biológiai minták előkészítését, tárolását és a laboratóriumba történő szállítás körülményeit [94] [95]. Ezek a változók a kutatási adatok és eredmények populációnkénti és személyenkénti változásának forrásai lehetnek, azaz

a kísérletek során is tapasztalt eltérések nem minden esetben valódi biológiai variancia következményei.

A vérnek, mint biológiai mintának az előkészítési fázisában a preanalitikai változói közé tartozik például a vérvételi cső típusa, elő- és utócentrifugálás körülményei, a hosszútávú tárolási hőmérséklet és az időtartam egyaránt. A preanalitikai eltérések különböző módon fordulhatnak elő, függően a biológiai minta típusáról és az alkalmazandó vizsgálati módszertől [96]. Éppen ezért fontos mélyrehatóan tanulmányozni és kezelni azokat a preanalitikai eltéréseket okozó tényezőket, melyek hatással lehetnek a kutatási eredményekre, így befolyásolva és megnehezítve a kapott adatok szélesebb tudományos körben történő összehasonlítását, és releváns következtetések levonását.

Az irodalomban számos olyan közlemény található, melyekben a véráramban keringő glikoproteinek N-glikozilációs változásáról számolnak be különböző betegségek kapcsán [97], így a vérmintákból származó N-glikánprofil-analízis diagnosztikai célokra történő felhasználása nagy jelentőségűvé válhat a jövőben mind az alapvető orvosbiológiai, mind az alkalmazott klinikai kutatásokban.

Glikozilációs szempontból a legintenzívebben tanulmányozott területek egyike a rosszindulatú daganatos megbetegedések, ennek ellenére a klinikai diagnosztikában a szabályzó szervezetek által a hétköznapi gyakorlatban is alkalmazható, jóváhagyott glikobiomarker még nincs ebben a betegcsoportban [98]. A szóban forgó ko-, illetve poszttranszlációs módosulás biomarkerként történő sikeres klinikai alkalmazhatóságának egyelőre korlátot szab a validálásukhoz szükséges nagy betegcsoportok ellenőrzésének és a megfelelő, gyors, hatékony, valamint nagy teljesítményű elemzési technológiáknak a hiánya. Bár a glikomikai kutatásokban alkalmazott analitikai módszerek meglehetősen jól kidolgozottak, a teljes rutin laboratóriumi munkafolyamatokba való integrálásuk még folyamatban van. A módszerek fejlesztése és validálása során több tényezőt is figyelembe kell venni a jó elemzési hatékonyság, felbontás, pontosság, nagy áteresztőképesség és robusztusság elérése érdekében. Egy korábbi, 1008 önkéntes bevonásával készült tanulmány a glikánprofilok nagy egyéni variabilitásáról számolt be [99]. Ez a tény is azt bizonyítja, hogy szükség van a megfelelő minta-előkészítési protokollok, glikoanalitikai eszközök egységesítésére a szénhidrátprofil és összetétel elemzéséhez, valamint azok esetleges változásainak értékeléséhez.

A vérmintákban jelen lévő enzimek hatására változhat a minták N-glikán összetétele [100] [101] [102]. Az enzimaktivitást ugyanakkor számos további tényező befolyásolhatja, például a hőmérséklet, a pH és a szubsztrátok koncentrációja.

A minták (idő előtti) bomlásától történő minél hatékonyabb védekezés érdekében azok kezelésének fontosságáról a véralapú proteomikai [103] [104] [105] és a metabolomikai [106] [107] tanulmányok korábban már beszámoltak, melyekhez hasonló értékelésre lenne szükség a glikomika esetében is.

Erre tettek kísérletet Dedova és mtsai. úttörő munkájukban, amelyben a preanalitikai feltételeknek a minták glikánszerkezeteire, valamint a glikán alapú petefészekrák biomarkerre, a GLYCOV pontozásos alapú rendszerre gyakorolt hatásáról számoltak be [108]. A szerzők többek között a tárolási hőmérséklet és a feldolgozási idő hatásait vizsgálták 10 egészséges önkéntes szérumban, valamint plazma glikánprofiljára a minták deszialilációja után. Fontos azonban megjegyezni, hogy a szialilált struktúrák gyakran fontos biológiai információkat tartalmaznak [1], amelyek elveszhetnek, ha a mintákat deszialialjuk. Ventham és mtsai. tanulmányozták a különböző mintavételi csövek és feldolgozási módszerek hatását a teljes szérumban N-glikánprofiljára, és megállapították, hogy a vizsgált tényezők minimális, statisztikailag nem szignifikáns eltéréseket okoztak a vizsgálatba bevont egyének mintái között [109]. Cadamuro munkatársaival ugyanerre a következtetésre jutott; a centrifugálási körülmények nem változtattak a tanulmányukban vizsgált analit összetételén [110]. Döncző és mtsai. formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded – FFPE) szövetszövetek tanulmányozása során a fixálás és a mintavétel közt eltelt idő hatását vizsgálva szövetspecifikus N-glikozilációs módosulást figyeltek meg [111].

Nemrégiben egy kutatócsoport az $\alpha(2-6)$ kapcsolt szíálsav egységeknek a komplex N-glikánokhoz történő kapcsolásáért felelős ST6Gal1 gén B-sejt-specifikus ablációja révén feltárta, hogy az IgG szialiláció a véráram extracelluláris környezetében a B-sejt szekréciós útvonaltól függetlenül is bekövetkezik. Azt is felfedezték, hogy a szekretált szíálsav transzferáz enzimet a máj központi vénáit bélelő sejtek termelik, és hogy az IgG szialilációt a szérumban lokalizált nukleotidcukor donor CMP-szíálsav hajtja, amely legalább részben a degranuláló vérlemezkékből származik [112].

Ezek a megfigyelések a vérben keringő és szövetekben is jelen lévő glikozilációs enzimekre utalnak, melyek a minták levétele után is aktívak maradhatnak [111] [112], így további részletes vizsgálatok szükségesek annak feltárására, hogy a mintavétel és a minta fixálása/fagyasztása közt eltelt idő milyen hatást gyakorolhat annak N-glikozilációs tulajdonságaira.

3.6. A gyulladás általános jellemzése

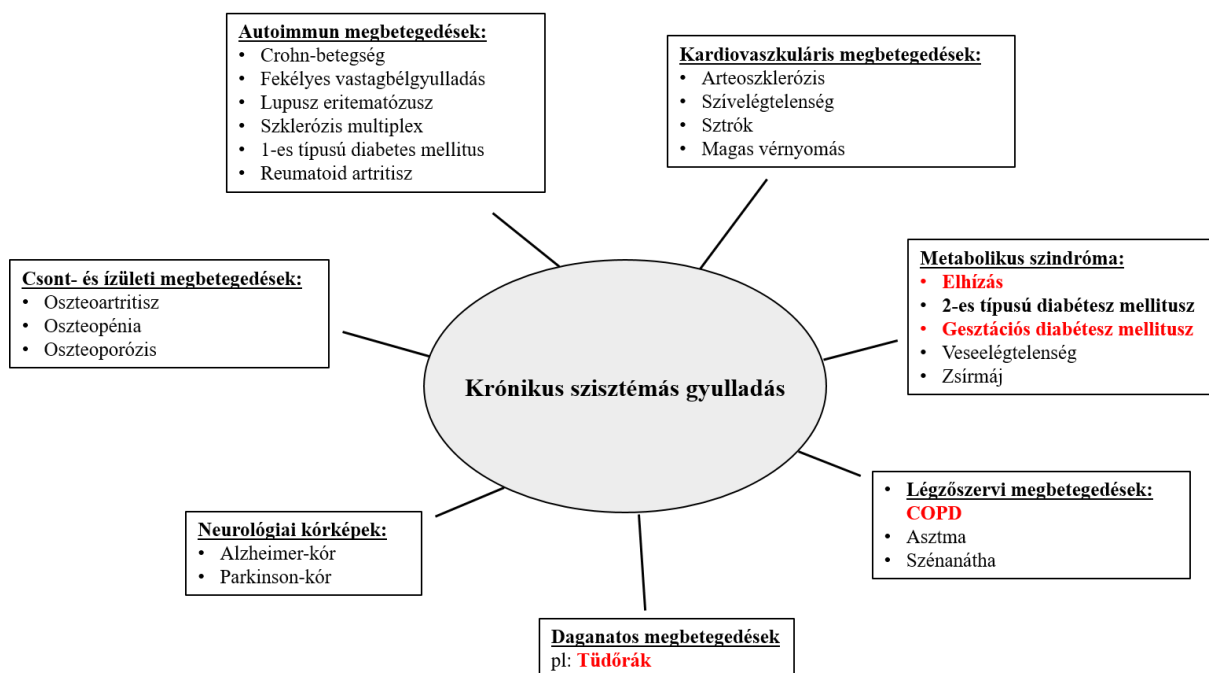
A gyulladás a szervezet egészsége szempontjából létfontosságú védekező mechanizmus, mely az immunrendszer ingerekre adott válaszaként írható le. A folyamat célja a káros ingerek elhatárolása és eltávolítása révén a szöveti integritás helyreállítása. A pír (rubor), duzzanatot (tumor), a szövetek helyi hőmérsékletemelkedését (calor) és a fájdalmat (dolor), mint jellemző lokális tüneteket Aulus Cornelius Celsus már az ókorban lejegyezte. Galenus az időszámításunk utáni 2. században a tüneteggyütest kiegészítette az érintett terület diszfunkciójával (functio laesa) [69].

Időbeli és térbeli lefolyását a kiváltó és helyreállító mechanizmusok egymáshoz való viszonya határozza meg, így megkülönböztetünk lokális és szisztémás, akut (heveny) és krónikus (idült) gyulladást. A gyulladás folyamatai a kiváltó tényezőtől (fertőzés vagy szöveti sérülés) függően eltérhetnek [113], végső kimenetelét jelentősen befolyásolja a kiváltó inger mértéke, valamint a szervezet veleszületett és adaptív immunrendszere.

Bár a gyulladás a kiváltó ingerek leküzdése és a belső homeosztázis helyreállítása szempontjából nélkülözhetetlen folyamat, az orvostudomány felismerte az immunrendszer és a gyulladásos folyamatok szerepét számos olyan, a mai modern kor vezető mortalitási és morbiditási mutatóival rendelkező betegség kialakulásában és fenntartásában is, melyek fertőzéssel vagy szöveti sérüléssel nem hozhatók összefüggésbe. Maga a gyulladás sejtek, enzimrendszerek és bioaktív molekulák bonyolult együttműködésének eredménye. Az elmúlt években ugyan jelentős előrelépés történt azoknak a sejtes és molekuláris eseményeknek a megismerésében és megértésében, amelyek a fertőzés és a szöveti károsodás hatására kialakuló akut válaszban játszanak szerepet, valamint részben ismertek azok az események is, amelyek a helyi krónikus gyulladásához vezetnek. Azonban továbbra is lényegesen kevesebb ismerettel rendelkezünk az olyan alacsony szintű, szisztémás krónikus gyulladás (Systemic Chronic Inflammation – SCI) okairól és mechanizmusairól, mint amelyek egyes betegségekben, például cukorbetegségben vagy elhízásban is tapasztalhatóak [114]. Úgy tűnik, hogy ezek az SCI állapotok a klasszikus értelemben vett kiváltó okoktól eltérően (fertőzés és szöveti károsodás) a szövetek hibás működéséhez kapcsolódnak [114].

Az SCI perzisztáló, gyakran klinikai tüneteket rövid távon nem okozó állapot, amely hosszú ideig történő fennállása révén fejt ki a sejteket, szöveteket és szerveket károsító hatását. Az általa vezérelt és kiváltott károsodások klinikai következményei igen sokrétűek és súlyosak lehetnek, számos kórképet foglalnak magukba a metabolikus szindrómától kezdve a szív- és érrendszeri megbetegedéseken és neurológiai kórképeken át egészen a daganatos

elváltozásokig (5. ábra). A WHO adatai szerint ezek a krónikus gyulladásos megbetegedések világszerte a halálozási okok több mint 60%-ért voltak felelősek 2019-ben [115].



5. ábra: Krónikus szisztémás gyulladás (SCI) által vezérelt károsodások hatására kialakuló leggyakoribb megbetegedések (saját ábra)

Az ábrán piros színnel tüntettem fel az általam vizsgált kórképeket.

Kiváltó okai között számos tényezőt feltételeznek, úgy mint a krónikus fertőzések, egészségtelen életmód, szociális és kulturális komponensek, pszichés stressz, ipari tevékenységből származó szennyezők. Egyre népszerűbb az a nézet is, amely az SCI fő kiváltó okaként az egyedfejlődés korai szakaszában elszenvedett káros (anyai vagy még a fogantatást megelőzően apai eredetű) hatásokat tekinti, melyek az intrauterin élet során hatnak az utódok immunrendszerének fejlődésére. A modell szerint az anyai gyulladás a várandósság ideje alatt a magzat genetikai kódjában olyan epigenetikai módosulásokat idéz elő, melyek következtében a születendő gyermek fokozott kockázattal rendelkezik az SCI-re és az azzal összefüggő betegségek kialakulására élete korai és késői szakaszában egyaránt, így biztosított az SCI generációk közötti áramlásának lehetősége [116].

A sejthalál szintén elősegítheti az SCI kialakulását ún. endogén sérülés/veszély-asszociált molekuláris mintázatok (Damage Associated Molecular Pattern – DAMP) felszabadításával, amelyek aktiválják a dendritikus sejteket (Dendritic Cell – DC), makrofágokat és a veleszületett

immunrendszer egyéb őrzősejtjeit. Az aktivált sejtek által felszabadított citokinek fokozzák a gyulladásos mediátorok termelését, koordinálják a szöveti és a szisztémás immunválaszokat elősegítve a regenerációt. A gyulladásos válasz hatékony szabályozásának elmulasztása azonban hosszan tartó immunválaszt eredményezhet, ami tartós szövetkárosodáshoz és végső soron krónikus gyulladásos betegség kialakulásához vezethet.

A nekroptózis a legjobban jellemzett ún. szabályozott sejthalál forma az apoptózis után. A nekroptózist számos specifikus receptor által elindított jelátviteli útvonal kiválthatja, köztük a Z-nukleinsavkötő protein 1 (Z-DNA Binding Protein 1 – ZBP1), az interferon receptorok (Interferon Receptor – IFNR), a tumor nekrozis faktor receptor (Tumor Necrosis Factor Receptor – TNFR) és a Toll-like receptorok (Toll-like Receptor – TLR) által indított szignalizáció. A folyamat kulcsmolekulái a receptor kölcsönható fehérje kináz 1 és 3 (Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1 – RIPK1, RIPK3), valamint a kevert eredetű kináz domén-szerű pszeudokináz (Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase – MLKL). Számos tanulmány kimutatta, hogy a RIPK1 és a RIPK3 komplexet (nekroszómát) alkot. Az MLKL oligomerizálódik és a plazmamembránba transzlokálódik, RIPK1/RIPK3/MLKL komplexet képezve, amely nekroptózist indukál [117].

Piroptózis a nekroptózis és apoptózis egyes morfológiai jellemzőivel egyaránt rendelkező szabályozott sejthalál forma, mely 2 útvonalon indulhat el: 1) kaszpáz-1 függő klasszikus út; 2) kaszpáz-4/5 függő nem-klasszikus út. A klasszikus út a mintázatfelismerő receptrok (Pattern Recognition Receptor – PRR) stimulációja esetén aktiválódik, míg a nem-klasszikus út aktiválása esetén a kaszpáz 4/5 közvetlenül kapcsolódik a Gram-baktériumok sejtfalában lévő lipopoliszacharid lipid A komponenséhez [117]. Az aktivált kaszpázok hasítják a Gasdermin fehérjecsaldba tartozó Gasdermin D (GSDMD) fehérjét, melynek N-terminális lipofil része a sejtmembránba transzlokálódva pórust formál, ezzel idézve elő a sejt piroptotikus halálát. A kaszpáz-1 IL-18 és IL-1 β tovább fokozza a lokális immunválaszt [118].

A ferroptózis a sejthalál reaktív oxigén gyököktől (Reactive Oxygen Species – ROS) függő formája, amely a vas túlzott felhalmozódásával és lipidek peroxidációjával, valamint a vas homeosztázisának és a lipid-peroxidáció anyagcsere szabályozásában részt vevő specifikus gének megváltozott expressziójával jár [119].

Számos mitokondriális alkotóelem és anyagcsere termék DAMP-ként működhet, és a citoszolba vagy az extracelluláris térbe kerülése esetén elősegítheti a gyulladás kialakulását, fokozódását. A mitokondriális DAMP-ok által kiváltott gyulladásos utak patogének lehetnek, mivel lehetővé teszik fertőző és daganatos betegségek kialakulását vagy progresszióját. A mitokondriális külső membrán permeabilizáció (Mitochondrial Outer Membrane

Permeabilization – MOMP) során, amelyet a proapoptotikus a BCL-2-asszociált X, az apoptózis szabályozó (BAX) és a BCL-2 antagonista/killer 1 (BAK1) fehérjék által formált póruskomplex indít el, a citokróm c transzlokálódik a mitokondriális intermembrán térből a citoszolba. Ez egy apoptotikus peptidáz-aktiváló faktor 1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1 – APAF1) és kaszpáz-9 tartalmú komplex, az apoptozóma összeszerelését eredményezi, amely kaszpáz-3 aktiválása révén apoptotikus sejthalált idéz elő. Fiziológias körülmények között a MOMP-ot aktívan megakadályozzák a BCL-2 fehérjecsalád antiapoptotikus tagjai, beleértve magát a BCL-2-t, valamint a BCL-2-szerű protein 1-et (BCL-2L1; legismertebb nevén BCL-XL) és az mieloid sejt leukémia 1 fehérjét (Myeloid Cell Leukemia 1 – MCL-1) [120].

A mitokondrium a szabályozott sejthalál nekrotikus formáját is szabályozza, melyet mitokondriális permeabilizáció által vezérelt nekrozisnak nevezünk [120]. A mitokondriális permeabilitás átmenet (Mitochondrial Permeability Transition – MPT) olyan jelenség, amely hirtelen kis molekulatömegű oldott anyagok (molekulatömeg legfeljebb 1500 Da) átáramlását okozza az általában átjárhatatlan belső mitokondriális membránon. Az MPT-t egy szupramolekuláris komplex, az úgynevezett mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (Mitochondrial Permeability Transition Pore complex – MPTP) közvetíti, amely a belső és külső mitokondriális membránok határfelületén áll össze, kapcsolatot létesítve a sejt citoszolja és a mitokondriális mátrix között [121]. Az MPT kiváltói közé tartozik a ROS felhalmozódása mellett a Ca^{2+} felhalmozódása a mitokondrium mátrixában, mely az MPTP nyitását eredményezi. A pórus nyitásának egyik fontos következménye az APT szintézis leállása a H^+ beáramlás miatti membránpotenciál különbség elvesztésének köszönhetően. Pórusméretének köszönhetően az MPTP megnyitása a kofaktorok és ionok újra felosztásával, beleértve a felhalmozódott Ca^{2+} felszabadulását, egyensúlyi állapotot is eredményezi. Ez nem csak a mitokondriumok és a citoszol közötti metabolikus gradiensek felborulásához, hanem a víz beáramlásához is vezet, ami egyidejűleg a mitokondriumok duzzadását eredményezi mindaddig, míg végül a külső membrán is felszakad [122].

A mitokondriális diszfunkció következtében felszabaduló különféle mitokondriális komponensek és anyagcsere termékek I-es típusú interferonok (IL-6, IL-18, IFN β 1, TNF) expressziójának és szekréciójának fokozásával, antigénprezentáló sejtek ATP mediált kemotaxisával és aktiválásával, valamint neutrofilek és $\gamma\delta$ T-sejtek aktiválásával gyulladásos reakciókat váltanak ki és fokoznak [120].

Annak ellenére, hogy jól megalapozott bizonyítékok vannak egyes betegségek kialakulása és az SCI megléte között (IL-1 β ; C-reaktív fehérje (C-reaktive protein – CRP), tumor nekrozis

faktor alfa (TNF- α) és egyéb gyulladásos markerek fokozott expressziója), jelenleg nincs általánosan elfogadott biomarker az egészségkárosító krónikus gyulladás jelenlétének bizonyítására, ugyanis nem minden gyulladásos marker szintje emelkedik meg minden esetben [116].

3.7. Az elhízás és cukorbetegség, mint gyulladásos kórképek

Az elhízás incidenciája az elmúlt években rohamosan növekedett világméretű egészségügyi problémát jelentve. A Központi Statisztikai Hivatal (KSH) adataiból jól látható, hogy ez a növekvő tendencia Magyarországon is megfigyelhető. Míg 2009-ben a felnőtt női lakosság 48,8%-a volt túlsúlyos vagy elhízott, addig ez a szám 2019. évre elérte az 51,9%-ot. A férfiak esetében még ennél is jelentősebb növekedés figyelhető meg, a 2009-ben mért 59,4% értékhez képest 10 évvel később már a férfiak 65,3%-ára jellemző valamilyen mértékű testsúly felesleg [123]. A túltápláltság és az ezzel párosuló csökkent testmozgás által előidézett testsúlygyarapodás éppúgy növekvő tendenciát mutat a gyermekek, mint a serdülőkorban lévő fiatalok körében. A WHO adatai szerint 2020-ban közel 39 millió 5 év alatti gyermek volt elhízott világszerte [124].

A zsírszövetre korábban csak energiaraktárként gondoltak, majd az első adipokin génjének illetve receptorainak felfedezésével, melyek mind a központi idegrendszerben, mind pedig a perifériás szövetekben fellelhetők, nyilvánvalóvá vált, hogy immun-endokrin szervként jelentősen befolyásolja a szervezet egészének működését [125] [126] [127].

Mára már köztudott, hogy az elhízás krónikus, alacsony szintű, szisztémás gyulladásal társulhat [128], mely során az adipociták maguk is változást mutatnak. Az általuk termelt és szekretált proinflammatorikus citokinek, úgymint a TNF- α , az interleukin-6 (IL-6) és a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), valamint a gyulladáscsökkentő adipokinek, például az adiponektin, szabályozatlan termelése figyelhető meg [129] [130]. Ily módon az elhízás, főként a zsigeri elhízás fokozhatja az egyéb krónikus megbetegedések kialakulásának hajlamát a klinikai tüneteket nem okozó ún. szubklinikai gyulladáson keresztül [131].

A gyulladást kiváltó ingerekről és a pontos mechanizmusról azonban a mai napig megoszlanak a vélemények. Hotamisligil és mtsai. szerint maga a túltápláltság vezet az adipociták ER stresszéhez, és ezáltal az inflammatórikus kaszkád aktiválásához az ER-ben

felhalmozódó, hibásan feltekeredett fehérjéken, mint kiváltó ingeren keresztül [132]. Egy másik elmélet a hipertrófiás (sejtméret növekedés) zsírsejtek csökkent oxigénellátásával együtt járó hipoxiát tekinti a gyulladásos folyamatok fő kiváltó tényezőjének annak ellenére, hogy az emberi zsírszövetet alkotó adipocitáknak csak igen kis hányada haladja meg a 100 μm átmérőt, az oxigén diffúziós távolsága pedig 100-200 μm [133]. Ezt az ellentmondást hangsúlyozza az is, hogy Hosogai és mtsai. a kis és nagyméretű zsírsejtek hipoxiás állapotáról is beszámoltak [134]. Surmi vizsgálatainak során arra a megállapításra jutott, hogy a zsírsejtek trigliceridekkel való telítése következtében infiltrálódó és felhalmozódó makrofágok felelősek az inflammatorikus folyamatok elindulásáért [135].

Függetlenül a vélt kiváltó okoktól, elhízás során szöveti szinten olyan detektálható változások következnek be, amelyek mind a folyamatosan fennálló gyulladásos folyamatok irányába tolják az immunrendszer működését, ezáltal felborítva a szervezet belső egyensúlyát [136].

Míg a normál, funkcióját ellátni képes zsírszövet gyulladáscsökkentő és gyulladásgátló mediátorok és immunsejtek kiegyensúlyozott rendszeréből áll, amely a normál zsírraktárak fenntartása mellett endokrin funkciókat is ellát, biztosítva a szisztémás inzulinhatást az egész test egészséges anyagcseréjének fenntartása érdekében, addig a túltápláltság hatására kialakuló elhízásban a zsírsejtek hipertrófiája, mitokondriális diszfunkció, valamint a szövetben oxidatív és ER stressz figyelhető meg. Ezen folyamatok a gyulladásos adipokinek fokozott szekréciójával és a zsírsejtek apoptózisával együtt a szervezet belső egyensúlyának felborulásáért tehető felelőssé [137].

A zsírszövet homeosztázisának fenntartásában kulcsfontosságú szerepet játszanak a sovány zsírszövetben jelen lévő eozinofil granulociták, amelyek IL-4 és IL-13 termelésükön keresztül hozzájárulnak a szöveti antiinflammatorikus immunsejtek fejlődéséhez és fenntartásához.

A regulatorikus T-sejtek (Treg) fiziológiai körülmények között megtalálhatók a zsírszövetben, és hozzávetőlegesen a zsírszöveti CD4⁺ rezidens T-sejtek 50%-át alkotják [138]. A zsigeri zsírszövetben a Treg fokozott IL-10 termelést mutat.

Az IL-33 amellet, hogy a vizszerális zsírszövet Treg sejtjeinek fejlődésében és fenntartásában jelentős szerepet játszó citokin, hozzájárul az elhízásban tapasztalt inzulin rezisztencia javításához a 2. típusú veleszületett limfoid sejtek (type 2 Innate Lymphoid Cells - ILC2) antiinflammatorikus citokin termelésének serkentésével, valamint az M2 polarizált makrofágok populációjának zsírszöveti fenntartásával. Han és mtsai. sovány egerekből származó zsírszöveti Treg sejteken magasabb IL-33 receptor-szintet (ST2) detektáltak, mint az elhízott egerek esetében, az IL-33 kezelés pedig csökkentette a zsírszöveti gyulladást és

javította az egerek inzulinérzékenységét mindamellet, hogy helyreállt az IL-1 receptor-szerű 1 (IL1RL1)-pozitív (más néven ST2) Treg populáció is [139].

A sovány zsírszövet adipocitái önmaguk is képesek IL-10, valamint IL-33 termelésére, ezáltal hozzájárulva a Treg fenotípusos stabil zsírszövet fenntartásához. A felszabaduló IL-10 jelentős része azonban nem zsírsejt-eredetű, fő forrását főként a zsírszövet sztrómavaszkuláris régiójában fellelhető sejtek jelentik.

A zsírszöveti leukociták fő populációját a makrofágok alkotják, melyek proinflammatorikus, M1 polarizáltságú, valamint a helyreállító mechanizmusokban részt vevő és antiinflammatorikus hatással bíró M2 fenotípusú makrofágokra oszthatók [140]. A sovány zsírszövetben jelen lévő eozinofil sejtek és Treg sejtek által szekretált IL-4, IL-13 valamint IL-10 a szöveti makrofágok differenciálódását az M2 fenotípus irányába tolja [141] [138], ezáltal sovány zsírszövetben az antiinflammatorikus, alternatív módon aktivált M2, valamint a döntően proinflammatorikus citokineket szekretáló M1 makrofágok aránya 4:1 [142]. Az adipociták, makrofágok és zsírszöveti endotélsejtek által expresszált IL-33 az ILC2 sejtek IL-5 és IL-13 termelését serkentve járul hozzá az eozinofil granulociták és M2 típusú makrofágok szöveti akkumulációjához [142].

Elhízás esetén jelentősen megváltozik a zsírszövet sztrómavaszkuláris frakciójának összetétele, csökken az antiinflammatorikus Treg és segítő, ún. 2-es típusú T-helper sejtek (Th2) száma, és nő a proinflammatorikus 1-es típusú T-helper sejtek (Th1) és CD8+ T-sejtek mennyisége. Az M2 és M1 makrofágok arányában szintén változás figyelhető meg az M1 típusú sejtek javára [143]. A proinflammatorikus M1 makrofágok zsírszöveti felhalmozódása az elhízás egyik meghatározó komponense, és jelentősen hozzájárul az elhízás által indukált szisztémás gyulladás és inzulin rezisztencia kialakulásához [144].

A leptin, melynek szérumszintje gyorsan követi a tápanyagbevitelt, stimulálja olyan gyulladások keltő molekulák szintézisét, mint az IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , illetve hozzájárul a ROS képződéséhez, így a lokális gyulladásos folyamatok kialakulásához egyaránt. Úgy tűnik, hogy a leptinnek szerepe van a zsírszöveti sejtes összetételének fenntartásában, szintjének emelkedése ugyanis megelőzi a Th1 sejtek szintjének növekedését, amelyet aztán a Th2 és Treg sejtek mennyiségi csökkenése követ. Az adiponektin a leptin mellett a legismertebb adipokin, amely a leptinnel ellentétben antiinflammatorikus mediátorok sorának expresszióját szabályozza (fokozza az IL-10, IL-1 receptor antagonistát és csökkenti a gamma-interferon (IFN γ), IL-12, fő hisztokompatibilitási komplex II (Major Histocompatibility Complex II - MHCII), CD80; CD86 expresszióját).

Elhízás során a zsírszövetben az NK sejtek felhalmozódását is megfigyelték, melyek IFN γ termelésük révén az elhízásban tapasztalt gyulladásos folyamatok további szabályozó sejtjei, ugyanis az NK sejtek NK1.1 antitest általi depletálásuk csökkenti az M1 makrofágok magas zsírtartalmú étrend hatására történő zsírszöveti felhalmozódását [145]. A helyileg megemelkedett Th1 CD4 $^{+}$ sejtek által szekretált IFN γ hozzájárul a makrofágok M1 irányú fejlődéséhez.

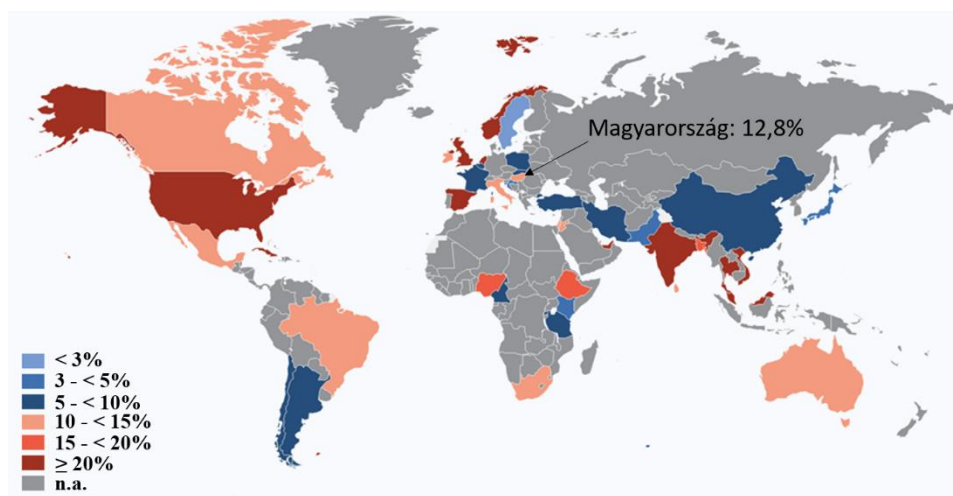
3.8. Gesztációs Diabétesz Mellitusz

A GDM a várandósság ideje alatt manifesztálódó és először ezalatt az időszak alatt felismert szénhidrátanyagcsere-zavar [146], amely a leggyakrabban felmerülő komplikáció a terhesség során, és amelynek a legjelentősebb rizikótényezője a fogantatás előtti anyai túlsúly/elhízás.

Az elhízás egyre növekvő előfordulását figyelembe véve így nem meglepő, hogy a diagnosztizált GDM esetek száma is növekvő tendenciát mutat világszerte [147]. Az előfordulási gyakoriságok országok közötti összehasonlítása nehézkes. Ez köszönhető a nem egységes diagnosztikai kritériumrendszernek, illetve az adott ország/régió etnikai összetettségének [148]. Hazai előfordulására vonatkozó pontos adat regiszter hiányában ugyan nem áll rendelkezésünkre, de az elmúlt évek során született regionális vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a GDM hazánkban is egyre növekvő esetszámban fordul elő [149]. Még 2011-ben Kun és mtsai. a WHO kritériumrendszere szerint 8,7%-os előfordulást írtak le; a Diabeteses Terhességgel Foglalkozó Munkacsoportok Nemzetközi Szövetsége (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group – IADPSG) rendszere szerint ugyanazon populációt vizsgálva már 16,6% volt a GDM előfordulási gyakorisága [150]. A két diagnosztikus kritériumrendszer ezen két eltérő prevalencia értéke egy egységesen alkalmazható és pontos biomarker azonosítását sürgeti. A GDM hazai prevalenciája 2021-ben az Nemzetközi Diabetes Szövetség (International Diabetes Federation – IDF) adatai szerint 12,8% volt [151].

Magyarországon az Emberi Erőforrások Minisztériuma – Egészségügyért Felelős Államtitkárság Egészségügyi Szakmai Kollégiumának irányelvei alapján a WHO korábbi ajánlásának megfelelően történik a várandós asszonyok GDM szűrése, miszerint az éhomi vércukorérték vénás plazmában mérve $\geq 5,6$ mmol/l, a 75 grammos szájon át történő terheléses vércukorvizsgálat (Oral Glucose Tolerance Test – OGTT) elvégzése után mért kétórás érték $\geq 7,8$ mmol/l [152].

Az IDF által 2021-ben publikált GDM prevalencia értékeket a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra: 2021-ben a GDM prevalenciája világszerte az IDF adatai szerint [153]

A GDM rövid és hosszú távú negatív következményekkel jár mind az utódokra, mind az anyákra nézve egyaránt, így szűrése kiemelkedően fontos. A rövid távú nemkívánatos következmények közé tartozik a születendő gyermek esetében a makroszómia (magzati túlnövekedés), az újszülöttkori alacsony vércukorszint, az újszülöttkori sárgaság, az anya esetében a preeclampsia (terhességi toxémiaként is ismert komplex, terhesség-specifikus, több szervet érintő kórkép), a koraszülés és a császármetszés. Hosszú távú szövődményei lehetnek az elhízás, a kóros glükóz tolerancia és a cukorbetegség serdülőkori vagy korai felnőttkori megjelenése.

A szűrést minden, a várandósság 24-28. hetében lévő nőre kiterjesztették hazánkban is. Az OGTT tesztet azonban a terhességi cukorbetegség kialakulására nézve fokozott kockázattal rendelkezők körében már a terhesség 16-18. hete között elvégzik, melyet negatív eredmény esetén megismételnek a 24-28. hét között. GDM kialakulása szempontjából fokozott kockázatot jelent az anyai túlsúly, anyai életkor, magas kalóriatartalmú étrend, terhességet megelőző inzulinrezisztencia, rendszeres alkoholfogyasztás, diabétesz előfordulása elsőfokú rokonok között, korábbi terhességből született makroszómias gyermek, illetve a nem kaukázusi rasszhoz való tartozás [148].

A megfelelő magzati fejlődés biztosítása érdekében az emelkedett anyai vércukorszint és az inzulin érzékenység csökkenése a terhesség során normális jelenségek. Ez köszönhető a terhesség során a vérben megemelkedett koncentrációban keringő progeszteron, ösztrogén és a humán placentáris laktogén (hPL), valamint egyéb, a terhesség fenntartásában szerepet játszó

hormonnak, melyek diabetogén hatásait a hasnyálmirigy β -sejtjei fokozott inzulinszekrécióval próbálják kompenzálni [154].

Kontrainzuláris hatást a GDM kialakulására hajlamosító, már a várandósságot megelőző és a dolgozat előző fejezetében tárgyalt SCI mechanizmusok tovább erősítik.

Mivel azonban a GDM a negatív eredményű szűrést követően is bármikor kialakulhat a terhesség során, kockázati tényezőinek prediktív értéke pedig meglehetősen csekély, így számos várandós nő esetében a GDM nem kerül felismerésre és kezelésre [155]. Ennek köszönhetően egyre nagyobb az igény a GDM specifikus biomarkerek azonosítására, melyek közül a szérumfehérjéket, például adiponektint, inzulint, CRP-t és glikozilált fibronektint széles körben tanulmányozták [156] [157] [158], miközben a glikált hemoglobin (HbA1c) diagnosztikai használhatóságát is vizsgálták [159]. A gyulladásos mediátorok, többek között a TNF- α és IL-6 fokozott szekrécióját figyelték meg a terhesség korai szakaszában, melyet a harmadik trimeszterben inzulinrezisztencia megjelenése kísért, így a proinflammatorikus citokineknek és kemokineknek feltehetően kulcsfontosságú szerepe lehet a GDM kialakulásában [160]. Az elmúlt néhány évben mindezek mellett számos további ígéretes biomarkerről számoltak be [161] [162], melyek közül a legígéretesebb fehérje biomarkereket a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Potenciális fehérje biomarkerek GDM-ben [162] [163]

Potenciális biomarker	Típus	Potenciális biomarker	Típus	Potenciális biomarker	Típus
adiponektin	citokin	afamin	glikoprotein	CRP	egyéb
kemerin		hCG		nefatin-1	
fetuin		CD59		PPAP-A	
leptin		SHBG		RBP-4	
omentin		afamin			
IL-6		hCG			
TNF- α		kisspeptin			

hCG – humán chorionális gonadotropin (human Chorionic Gonadotropin); CD59 – reaktív lízis gátlója (MIRL); SHBG- szexuálhormonkötő globulin (sex hormone-binding globulin); PAPP-A - terhességgel összefüggő plazma fehérje A (placental associated plasma protein A); RBP4—RBP4—retinol-kötő fehérje 4 (retinol-binding protein 4)

A zsírszövetben tapasztaltakhoz hasonlóan a terhesség alatti elhízás és a GDM a makrofágok, granulociták és T-limfociták méhlepénybe való beszűrődését indukálhatja. Ilyen körülmények között az M2 makrofágok fenotípusváltása figyelhető meg. A GDM placenta főleg gyulladásos citokineket (IL-6; TNF- α ; IL-1 β és IL8), valamint monocita kemoattraktáns fehérje-1 molekulát (Monocyte Chemoattractant Protein 1 – MCP-1) termelő M1 fenotípusú makrofágokat tartalmaz [164]. Klinikai vizsgálat során kimutatták a gyulladásos és gyulladásgátló mediátorok arányának megváltozását, beleértve a gyulladásgátló IL-10 és adiponektin alacsonyabb szérumszintjét, a gyulladást elősegítő TNF- α és IL-6, INF- γ , IL-2, IL-18; IL-8, valamint számos inflammatórikus adipokinek, például kemerin, leptin, omentin, visfatin, zsírsavkötő fehérje 4 (fatty acid-binding protein 4 – FABP-4) és kisspeptin szérumszintjének emelkedését [165] [166] [167] [168] [163].

3.8.1. IgG és IgA glikozilációs módosulásai elhízás, cukorbetegség és várandósság alatt

A humán IgG glikozilációs módosulásai hatékony indikátorai a szervezetben zajló gyulladásos folyamatoknak. Perkovic és mtsai. korábban már leírták, hogy az IgG N-glikozilációs profilja és a magas testtömeg-index (Body Mass Index – BMI) alakulása között kapcsolat áll fenn. Munkájuk eredményeként a galaktozilált struktúrák BMI-függő csökkenését a gyulladásos folyamatok meglétével társították [169]. Mivel a proinflammatorikus IgG valószínűleg hozzájárul például az elhízásban tapasztalt gyulladásos

állapot kialakulásához és fenntartásához, melynek szisztémás hatásai között a hasnyálmirigy β -sejtjeinek pusztulása és inzulin rezisztencia kialakulása is szerepel, így az IgG glikozilációs módosulása nemcsak a már kialakult állapotot tükrözheti, de fontos szerepet játszhat a cukorbetegség patofiziológiájában is [170].

Az IgG glikozilációs módosulásáról számoltak be 2-es típusú cukorbetegség tanulmányozásának eredményeként is, ahol a galaktoziláció, a szialiláció és core-fukoziláció csökkenését, valamint a core-fukozilált biszekting struktúrák arányának növekedését tapasztalták [170]. A leírt változások összhangban állnak korábbi, szintén gyulladásos folyamatokkal társuló betegségek során azonosított módosulásokkal [76] [171], köztük olyan állapotokkal, amelyek kockázati tényezők a 2-es típusú cukorbetegség és akár a GDM kialakulása szempontjából, úgymint az életkor [172] és a zsigeri elhízás [173].

Az elhízással kapcsolatos társbetegségek és szövődményeik jelentősége a terhesség során még fontosabbá válnak [174]. Az elhízott anya anyagcseréjében és immunológiai státuszában bekövetkező változások hatással lehetnek az újszülöttek fejlődő immunrendszerére az anya és a gyermek közötti intenzív kölcsönhatás miatt. Az elhízás okozta krónikus gyulladás összefüggésbe hozható a terhes nők méhlepényének túlzott gyulladásos válaszával, makrofágok és gyulladást elősegítő mediátorok felhalmozódásával [175]. A magas BMI a terhesség során potenciális kockázati tényező a GDM kialakulása szempontjából, amely tartósan káros hatással lehet mind az anya szülést követő (2-es típusú cukorbetegség, kardiovaszkuláris megbetegedések, tartós elhízás), mind pedig az utód egészségi állapotára.

Egyre több tény utal arra, hogy a terhesség alatti elhízás önmagában is negatívan érinti az utódok fejlődését az intrauterin programozás révén. Azok a mögöttes mechanizmusok azonban, amelyek megmagyarázzák az esetleges összefüggést az anyai elhízás és az olyan, utódokat érintő problémák között, mint pl. a magas születési súly, inzulinrezisztencia, illetve az élet későbbi szakaszában előforduló krónikus kórképek (allergia, asztma, ekcéma, nekrotizáló enterokolitis) kialakulása, még nem teljesen tisztázottak.

A zsigeri elhízás következtében tapasztalható „low-grade inflammation” az IgG glikozilációs módosulásain is jól detektálható változásokat idéznek elő [176]. Ezek, a glikozilációjukban módosult, ezáltal proinflammatorikus szignálokat továbbító antitestek negatív hatást gyakorolhatnak az utódokra, bennük is elindítva bizonyos gyulladásos mechanizmusokat.

Pekelharing és mtsai. már 1988-ban közzétett tanulmányukban leírták, hogy terhesség során az IgG glikán összetételében jelentős módosulás figyelhető meg. A fehérjék galaktóz tartalma átlag 13%-os, míg a szialásvartartalmuk átlag 44%-os növekedést mutatott a nem várandós

egészséges kontroll nőkkal összevetve [177]. Ezek a változások mind az IgG antiinflammatorikus hatásait erősítik. Az IgG az egyetlen immunglobulin-osztály, amely specifikus receptorok révén átjuthat a placentán keresztül a magzatba, ezáltal képes nagymértékben befolyásolni az újszülött immunrendszerének fejlődését. Az anyai IgG protektív és immunmoduláló szerepét posztnatálisan, az anyatejes táplálás révén továbbra is kifejti [178] [179]. Mivel az újszülöttek immunrendszerének fejlődésében az anyai IgG rendkívüli jelentőséggel bír, az agalaktózilált IgG placentán keresztüli átjutása nagy valószínűséggel nem jár biológiai előnnyel a magzat számára, Williams, P. J és mtsai. ugyanis anyai és újszülött IgG glikozilációjának összehasonlítása során G0 glikoformák mennyiségének jelentős csökkenését tapasztalták az újszülöttek köldökszinór eredetű szérumból mintáiban az anyákéhoz képest [180].

Az egészséges, szövődményektől mentes terhességből született gyermekek és az anyák IgG N-glikozilációját vizsgáló korábbi tanulmányok eredményei azonban nem egységesek. Williams és Kibe köldökszinórvérből és anyai szérumból izolált IgG teljes glikozilációjának vizsgálatakor a köldökszinórvérből izolált IgG galaktózilációjának szignifikáns emelkedését tapasztalták [180] [181] az anyai eredetű molekulákkal összevetve. Einarsdottir vizsgálatai során nem talált szignifikáns eltérést az anyai és gyermek IgG Fc régióján lévő N-glikán struktúrák szialilációjában [182]. Meg kell említenünk, hogy az eredmények különbözősége származhat a vizsgálatok módszertanából. A korábbi vizsgálatok ugyanis teljes IgG glikozilációjára irányultak, melyhez hozzájárulnak a Fab régió esetleges glikán szerkezetei is. Az anya-gyermek párok IgG szialiláltságának mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF-MS) alkalmazásával végzett vizsgálata során a gyermek IgG antitestjeinek alacsonyabb szialiláltságáról számoltak be a közelmúltban [183].

Kapilláris elektroforézissel végzett N-glikozilációs vizsgálatok során Ruhaak és mtsai. érdekes módon az IgG antitestekkel ellentétben nem találtak összefüggést az IgA glikozilációs módosulásai és az életkor változása között. Egyetlen monoszialilált kétantennás glikán szerkezet esetében tapasztaltak növekedést a kor előrehaladtával, mely ellentmond az IgG esetében tapasztalt változásoknak, ahol a galaktóziláció csökkenését társítják az életkor növekedéséhez. Vizsgálataik során eltérést tapasztaltak a nemek között, viszont az IgG molekulával ellentétben nem tudtak összefüggést kimutatni az IgA N-glikozilációja és a HDL szérumszintje, a BMI mértéke, az inzulinszint, vagy a trigliceridek szérumszintje között [184].

Irodalmi adatok támasztják alá továbbá azt a tényt, hogy az utódok gyomor-bél rendszerének mikrobiomja (mikrobiom = az emberi szervezetben élő kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok ökológiai közössége) és az anyai mikrobiom között szoros kapcsolat áll fenn, mely kialakításában nemcsak a szülőcsatornán keresztül lezajló szülésnek, de az anyatejes táplálásnak is igen fontos szerepe van [185]. Mivel az IgA az anyatej fő immunoglobulinja, így felmerül annak a lehetősége, hogy ez a fehérje a dolgozat korábbi pontjaiban (3.7 és 3.8) említett patológiás esetekben glikozilációs eltéréseket mutathat, ezáltal hozzájárulva az utódok bélflóra-összetételének alakulásához, immunrendszerük fejlődéséhez és hosszú távú életminőségük alakulásához.

A szakirodalomi állásfoglalás a várandósság és a szérum IgA N-glikozilációnak változásait illetően sem egységes. A szérum IgA1 molekulák mindkét kötőhelyén megfigyelhető N-glikoziláció módosulásáról számolt be Bondt és mtsai. a terhesség során. A Ca² domén esetében a biszekting szerkezetek arányának emelkedése és a szialiláció fokozódása, a toldalék régió Asn-469 pozíció glikánjaira pedig a biszekting struktúrák arányának növekedése mellett a core-fukoziláció csökkenése jellemző [186]. Ezek a terhességgel összefüggő N-glikozilációs változások bár eltérő mértékben, de reumatoid arthritisben (RA) szenvedő betegek terhessége során is megfigyelhetők. A glikozilációs módosulás, valamint a betegség állapotának javulása, illetve fellángolása között azonban nem találtak összefüggést [187]. Ezek a módosulások utalhatnak arra, hogy az IgA N-glikozilációjának valamilyen módon szerepe lehet a terhesség fenntartásában.

Ezzel szemben Ruhaak és mtsai. vizsgálataik során azt állapították meg, hogy az IgA N-glikozilációját a terhesség nem befolyásolja, viszont megváltozott plazma, valamint IgG, és alfa-1-antitripszin (A1AT) glikozilációs profilokat figyeltek meg LCGE-LIF alkalmazásával, melyek feltehetően hozzájárulhatnak az anyai immunszuppresszióhoz, illetve egyéb, eddig feltáratlan biológiai funkciókkal is rendelkezhetnek. Plazma szinten a szialilált bi-, tri- és tetra antennás szerkezetek arányának növekedését, valamint a monoszialilált szerkezetek csökkenését tapasztalták. Az A1AT esetében két triantennás bi-, valamint triszialilált szerkezet arányában figyeltek meg növekedést a terhesség során [188].

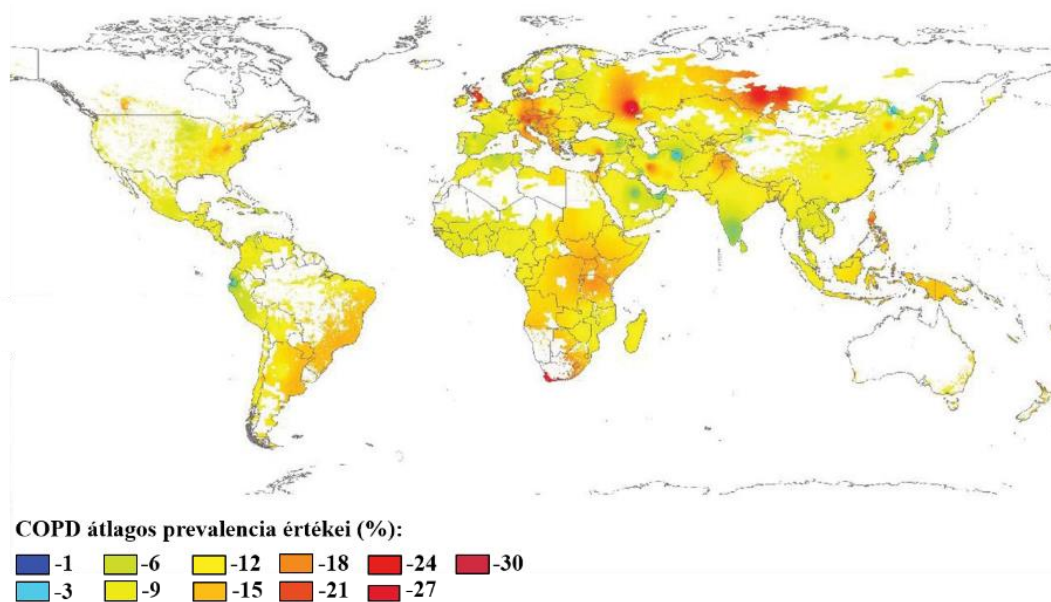
3.9. COPD és tüdőrák gyulladásos komponensei és N-glikozilációs módosulásai

3.9.1. COPD gyulladásos komponensei

A COPD egy igen gyakori, megelőzhető és kezelhető betegség, amelyet légúti és/vagy alveoláris rendellenességek miatt kialakuló tartós légzőszervi tünetek és a légáramlás korlátozottsága jellemezik [189].

A betegség előfordulási gyakorisága változó, és bár a világ számos pontján csökken mind az előfordulási gyakorisága, mind pedig a mortalitása [190], ezzel ellenkező trend figyelhető meg Latin Amerikában, Óceánia térségében és Európa számos pontján [191]. Magyarország is a növekvő tendenciát mutató országok közé tartozik. Hazánkban 2000-ben közel 49 000 regisztrált COPD-s beteg szerepelt a KSH adatbázisában, számuk 10 évvel később már elérte 147 000 főt, amely 2020-ra majd 194 000-re emelkedett [192]. Az előfordulási gyakoriság mellett sajnos a mortalitási mutatók is emelkednek, 2015-2016 években Magyarország nemcsak európai, hanem világviszonylatban is vezető volt a COPD-hez köthető halálesetek számát tekintve Kirgizisztán és az USA mellett [191].

Az ischaemiás szívbetegség és a sztrók után a 3. vezető halálóki tényező világszerte a COPD, amely a WHO adatai szerint az összes halálozás 6%-áért volt felelős 2019-ben. Blanco és mtsai. térinformatikai eszközök segítségével elkészítették a COPD prevalenciájának globális térképét (7. ábra), amely tartalmazza a valós adatok nélküli területeket is. A becsült világméretű COPD átlagos prevalencia 13,1% volt, a következő területi megoszlással: Európa, 12,4%; Afrika, 13,9%; Amerika, 13,2%; Ázsia, 13,5% és Óceánia, 11,6% [193].



7. ábra: Fordított távolsággal súlyozott (Inverse Distance Weighted - IDW) interpolációs módszerrel meghatározott COPD átlagos prevalencia értékek [193]

A COPD kialakulása szempontjából számos kockázati tényezővel kell számolnunk, melyek közül a legfontosabb a dohányzás. A dohányzók 15-20%-a esetében alakul ki klinikai tünetekkel járó COPD életük során [194], a betegség súlyossága és lefolyása tekintetében a dohányzási szokás (dohányzás kezdete és csomagév) prognosztikus jelentőségű [195]. A hosszú dohányfüstnek való kitettség okozta gyulladást és szöveti károsodást a káros szenvedély felhagyása sem mérsékli (≥ 15 csomagév) [195]. Az egyéb rizikótényezők között szerepelnek egyes foglalkozások, ahol a munkavégzés során belélegzett károsító anyagok a betegség kialakulását idézhetik elő. A fejlődő országokban még a mai napig hagyományosan alkalmazott főzési és fűtési szokások szintén hozzájárulhatnak a légúti obstrukció kialakulásához. A COPD fiatalkori formája az $\alpha 1$ AT hiányához köthető [196].

A COPD diagnózisának felállítása spirometriai (légzésfunkció) méréssel az ún. Tiffeneau-index (FEV_1/FVC) alapján történik, a Globális Kezdeményezés a Krónikus Obstruktív Légúti Betegségért szervezet (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD) irányelvei alapján. Amennyiben az erőltetett kilégzés első másodperce (Forced Expiratory Volume – FEV_1) alatt kilélegzett levegő és az erőltetett vitálkapacitás (Forced Vital Capacity – FVC) hányadosa $<0,70$, megállapítható a légúti obstrukció fennállása, a stádiumbesorolás a FEV_1 értéktől való eltérés szerint történik. $FEV_1 \geq 80\%$ érték esetén GOLD I. (tünetmentes vagy enyhe tünetes); $50\% \leq FEV_1 \leq 80\%$ között GOLD II (enyhe panaszos); $30\% \leq FEV_1 \leq 50\%$ súlyos

GOLD III; FEV1≤30% esetén a beteg a nagyon súlyos, GOLD IV stádiumba kerül besorolásra [196].

2. táblázat: A tüdő területén tapasztalt patológiás elváltozások COPD esetén [197]

I. Proximális (porcos) légutak (trachea és 2mm-nél nagyobb átmérőjű hörgők)
Gyulladásos komponensek: makrofágok ↑; CD8+ T-limfociták ↑; kevés neutrofil és eozinofil sejt (neutrofilek száma a betegség progressziójával nő)
Szerkezeti elváltozások: Nyálkahártya alatti hörgőmirigy megnagyobbodása és kehelysejt metaplázia (túlzott nyálkaképződést vagy krónikus hörghurutot eredményez). Epitéliális laphámsejtek metapláziája; ciliáris diszfunkció, a simaizom és a kötőszöveti sejtek hipertrofiája.
II. Perifériás légutak (nem porcos, 2mm-nél kisebb átmérőjű hörgők)
Gyulladásos komponensek: makrofágok ↑; T-limfociták ↑ (CD8+ > CD 4+); B-limfociták ↑; limfoid follikulusok ↑; fibroblasztok ↑, kevés neutrofil és eozinofil sejt
Szerkezeti elváltozások: Laphám metaplázia, kehelysejtek kóros kiterjedése a perifériás légutakban; Luminalis és gyulladásos váladék megjelenése és fokozódása; Peribronchiális fibrózis és légúti szűkület fokozódása a betegség előrehaladtával
III. Tüdőszövet (respiratórikus bronchiolusok és alveolusok)
Gyulladásos komponensek: makrofágok ↑; CD8+ T-limfociták ↑
Szerkezeti elváltozások: Az alveoláris fal pusztulása a hám- és az endothelsejtek elvesztése miatt. A légterek kóros megnagyobbodása a terminális bronchiolusoktól távolabb → emphysema kialakulása. Mikroszkópos emphysemás elváltozások: <i>Centrilobuláris (centriacináris) emphysema:</i> a respiratórikus bronchusok kitágulása és elpusztulása (általában a dohányzó egyéneket érinti és főleg a felső zónákban fordul elő). <i>Panacinaris emphysema:</i> az alveoláris zsákok, valamint a respiratórikus bronchusok elpusztulása (általában A1AT-hiányra jellemző emphysema típus). A mikroszkópikus változások emphysemás bulla kialakulásához vezetnek, amely 1 cm-nél nagyobb átmérőjű emphysemás légterként definiálható.

IV. Pulmonáris érrendszer
Gyulladásos komponensek: makrofágok ↑; T-limfociták ↑
Szerkezeti elváltozások: <i>Korai elváltozások:</i> az intima megvastagodása és az endothelsejtek diszfunkciója. <i>Késői változások:</i> a vaszkuláris simaizomzat hipertrófiája kollagén lerakódása, kapillárisok pusztulása, pulmonális hipertónia és jobb szívfél elégtelenség (cor pulmonale) kialakulása

A tüdő károsodását COPD esetén az oxidatív stressz (mind a dohányzásból adódó exogén, mind belső, endogén folyamatok által kiváltott), a gyulladásos citokinek felszabadulása, a megnövekedett proteáz aktivitás (a proteáz-anti-proteáz egyensúly felborulása) és az autoantitestek jelenléte egyaránt okozhatja [198]. A tüdőszövetbe beszűrődő immunsejtek az általuk termelt gyulladásos mediátorok és destruktív enzimek felszabadításával a tüdő progresszív pusztulásában és ezáltal a COPD kialakulásában központi szerepet játszanak [199]. A COPD-ben jelentkező krónikus gyulladást, melynek mértéke a betegség súlyosságával növekszik, a neutrofil granulociták, a makrofágok, a B-sejtek, limfoid aggregátumok és CD8+ T-sejtek felhalmozódása jellemzi [200] [201]. A tüdőben tapasztalható, a légúti légáramlás korlátozódásához vezető fő patológiás elváltozásokat a 2. táblázat összefoglalóan tartalmazza [197].

A neutrofil granulociták kulcsfontosságú gyulladásos sejtek a COPD patogenezisében. Fő forrásai a szerin proteázoknak, köztük a neutrofil elasztázoknak (Neutrophil Elastase – NE), a mátrix metalloproteinázoknak (Matrix metalloproteinase – MMP), valamint a mieloperoxidáz (Mieloperoxidase – MPO) enzimeknek, amelyek mindegyike hozzájárul az alveoláris falpusztuláshoz [202] [203].

A makrofágok számának növekedése figyelhető meg továbbá a légutakban, a bronchoalveoláris mosófolyadékban (Bronchoalveolar Lavage Fluid – BALF), az alveoláris területeken és a COPD-s betegek indukált köpetében. Ezek a makrofágok számos olyan gyulladásos mediátort termelnek, amelyek a COPD kialakulásában és a gyulladás fenntartásában szerepet játszanak, mint például az IL-1 β , a TNF- α , az IL-8, a MCP-1, a ROS és az MMP-ok [204]. A gyulladásos mediátorokon túl a transzformáló növekedési faktor- β 1 (Transforming Growth Factor-Beta 1 – TGF- β 1) az ephiteliális-mesenchimális szöveti tranzíció fontos eleme azáltal, hogy fokozza az ECM komponensek szekrécióját, valamint a légúti simaizomsejtek differenciálódását [205]. A makrofág eredetű proteinázok szintén hozzájárulnak a szöveti destrukció kialakulásához [206].

Az eozinofil granulocitáknak a COPD kialakulásában és a gyulladás fenntartásában betöltött szerepe az aszthmával ellentétben kevésbé ismert, viszont a COPD egy jól elkülönülő alcsoportját képviselhetik az emelkedett eozinofil granulocitákkal jellemezhető betegek. A köpetben és a BALF-ban az eozinofilek megnövekedett száma COPD-ben összefüggésbe hozható a kortikoszteroid-kezelésre adott jó klinikai válaszkészséggel [207].

A hízósejtek szerepe eddig ugyan főként az aszthma kialakulásában igazolt, egy nemrégiben megjelent tanulmányban azonban a megnövekedett számukról számoltak be centrilobuláris emphysemás betegek hörgőinek nyálkahártyájában, tüdőparenchima szövetében és simaizomzat területén egyaránt, így ezen eredmények alapján a hízósejteknek a COPD-hez vezető szöveti destrukcióban betöltött szerepe szintén feltételezhető [208].

CD8⁺ T-limfociták számának jelentős fokozódása figyelhető meg a CD4⁺ T-sejtekkel szemben, melyek a COPD kialakulásához közvetlenül is hozzájárulnak citotoxicitásuk révén. Szövetkárosító hatásuk a makrofágok aktiválásán keresztül közvetlenül is érvényesül. A T-sejtek számának növekedése az egészséges, légúti obstrukcióval még nem rendelkező dohányzók tüdőparenchimájában szintén megfigyelhető, amely a dohányzás káros hatásaira hívja fel a figyelmet [199]. Emellett az aktivált CD4⁺ T-sejtek száma is megnövekszik a kislégutak területén dohányzó súlyos COPD-s betegek esetében [209]. A T-sejtek mellett a nyirokcsomókban a B-sejtek számának növekedéséről is beszámoltak előrehaladott COPD-ben. A tüdő limfocita populációjában fontos változás továbbá a Treg sejtek számának jelentős csökkenése [199].

A COPD diagnózisának felállítása alapvetően továbbra is a spirometriai mérésen alapszik a módszer számos korlátozó tulajdonsága ellenére. Ezek között felsorolható, hogy az alapellátásban nem alkalmazzák széles körben, egyesek számára kihívást jelenthet a kapott eredmények értelmezése (nem szakorvosok számára), továbbá a tüdőfunkció csökkenése még azelőtt elkezdődik, hogy a betegség spirometriai méréssel is feltárható klinikai tünetekkel járna.

Bár az elmúlt években jelentős előrelépés történt a COPD biomarkerek feltárása terén, jelenleg nincs olyan, kellően specifikus, valamint szenzitív marker, amely az alapellátásban könnyen alkalmazható, képes a betegség korai szakaszában történő felismerésére és a különböző fenotípusok kimutatására, osztályozására [210]. A folyamatosan növekvő szakirodalmat tanulmányozva az olvasó a különböző forrásokból (szérum/plazma, tüdőszövet; BALF, indukált köpet, kilélegzett levegő) származó potenciális markerekkel találkozhat. Mivel azonban a vér napjaink legelterjedtebb biomarkerforrása, mely a beteg részéről minimális kockázatot jelent a mintagyűjtés során, így munkám során én is a véralapú lehetséges

biomarkerek feltárását céloztam meg. A COPD felismerésére alkalmas ígéretes biomarkereket, melyek a perifériás keringésből könnyen detektálhatóak az alábbiakban röviden ismertetem.

YKL-40: Más néven kitináz-3-szerű-1 (Chitinase 3 Like 1 - CHI3L1) vagy humán porc glikoprotein-39 (Human Cartilage glycoprotein 39 - HC-gp39) egy 40 kDa heparin-, kitin- és kollagénekötő, filogenetikailag erősen konzervált glikoprotein. Az YKL-40-et humán embrionális és magzati sejtek, daganathoz kapcsolódó makrofágok, a késői differenciálódási állapotban lévő makrofágok, aktivált neutrofilek, ízületi kondrociták, differenciált vaszkuláris simaizomsejtek és fibroblasztoszerű szinoviális sejtek egyaránt expresszálják [211]. Az YKL-40 kemoattraktánsként működik az endotélsejtek számára [212], serkenti azok migrációját, valamint elősegíti a vaszkuláris simaizomsejtek migrációját és adhézióját, ami a fehérjének az angiogenezisben betöltött szerepére utal [213]. Az YKL-40 szérumszintje megemelkedik COPD-s betegekben [214], mely akut exacerbációk során kifejezettebb a stabil COPD-hez képest [215].

Felületaktív fehérje D (Surfactant Protein D - SP-D): Az SP-D-t elsősorban a II-es típusú alveoláris sejtek, valamint a klubsejtek termelik [216], de a keringésben is kimutatható. Szérumszintje pozitív összefüggést mutat a COPD progressziójával, továbbá koncentrációjának emelkedése alkalmas lehet az exacerbáció korai előrejelzésére [217].

sRAGE (solubilis receptora az előrehaladott glikációs végtermékeknek): Keveset tudunk az sRAGE pontos funkciójáról, azonban alacsonyabb szérum szintjei összefüggésbe hozhatók a krónikus betegségek, például a cukorbetegség [218], az érelmeszesedés [219], a koszorúér-betegség [218], és COPD kockázatának növekedésével [220]. Az sRAGE egyes proinflammatorikus, előrehaladott glikációs végtermékekkel (AGE) pozitívan [221], míg más proinflammatorikus markerekkel, például a CRP-vel, a fibrinogénnel és a fehérvérsejtszámmal negatívan korrelál [222]. A COPD-s betegek sRAGE szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb értéket mutat összevetve a dohányzó és nem dohányzó csoporttal [223], illetve ígéretes biomarkere az emphysema kialakulásának [224].

CC16: A nem csillós Clara sejtek választják ki, amelyek túlnyomórészt a hörgőkben találhatók [225]. A CC16 immunszuppresszánsként működik, és védelmet nyújt az oxidatív stressz és a karcinogenezis ellen. A szérumszintje emelkedik a füst, klór és lipopoliszacharidok akut expozíciója után, azonban CC16 szintje csökken a COPD-ben szenvedő egyéneknél. Egy kutatás során a vizsgálat ideje alatt is dohányzó GOLD II és III stádiumú betegek alacsonyabb CC16 szintjéről számoltak be, összehasonlítva ugyanazon GOLD stádiumú, de már nem dohányzó társaikkal. Ez az összefüggés a GOLD IV osztályba tartozók esetében már nem állt

fenn, így megállapítható, hogy a CC16 csak gyenge korrelációt mutat a betegség súlyosságával a korábbi dohányosok esetében [226].

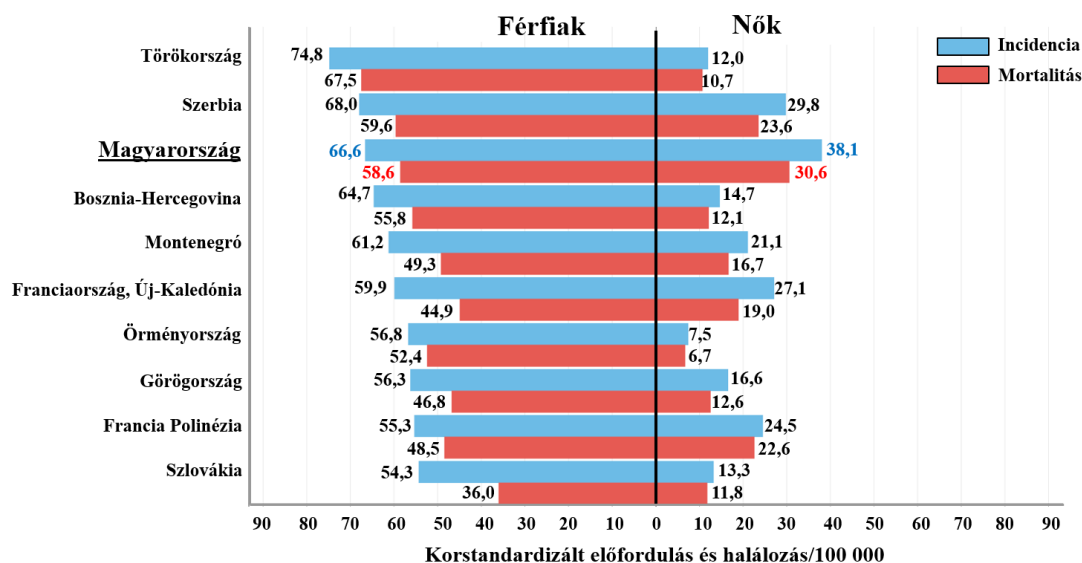
CCL18 (Chemokine [C-C motif] ligand 18): A tüdő monocitái és DC sejtjei által termelt fehérje, melynek emelkedett szérumszintjéről számoltak be COPD-s betegekben nem dohányzó és dohányzó kontroll csoportokhoz viszonyítva egyaránt [227].

Fetuin-A: A fetuin-A egy máj eredetű fehérje, amely a szisztémás gyulladások gátlójaként szolgál. A fetuin-A alacsonyabb szérumszintjéről számoltak be COPD esetén egészséges dohányzó kontrollhoz viszonyítva, így alkalmas lehet a COPD kialakulása szempontjából fokozott kockázattal rendelkezők kiemelésére és nyomonkövetésére. A fehérje szérumszintje negatívan korrelál a betegség súlyosságával. Minas és mtsai. nyomonkövetéses vizsgálat során az első exacerbációig eltelt idő és a kiindulási fetuin-A szérumszint között pozitív összefüggést figyelt meg [228].

3.9.2. A tüdőrák gyulladásos komponensei

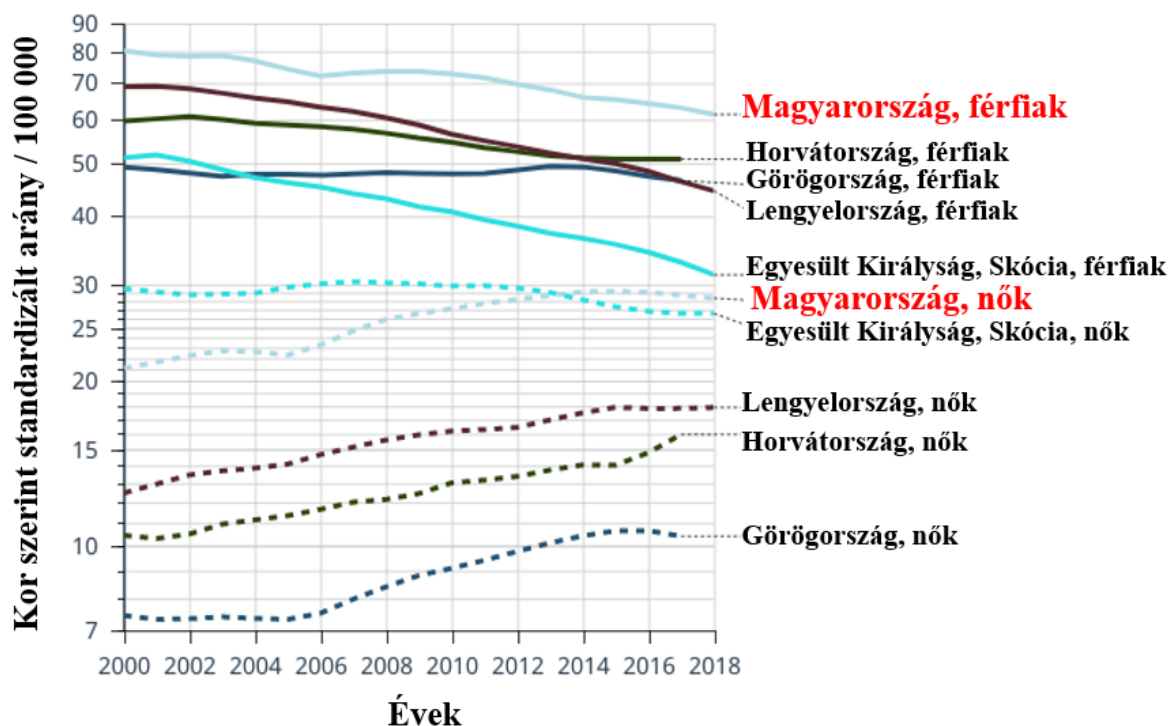
A tüődaganatok esetében a betegek 5 éves túlélési aránya igen alacsony, 19 % körüli érték [229] [230]. Férfiak körében a 2. leggyakoribb daganatos megbetegedés a prosztatrákot követően, a nőknél pedig a 3. leggyakoribb ráktípus a mellrák és a kolorektális daganatok után. A WHO adatai szerint 2020-ban globálisan 2,21 millió új tüdőrákos esetet regisztráltak [231], melyek közül a legtöbb eset arányaiban hazánkban fordult elő.

Sajnos Magyarország az éves tüdőrák előfordulási statisztikák élén áll mind európai, mind pedig világviszonylatban a nemzetközi jelentések szerint 50,1/100 000 korstandardizált előfordulási aránnyal (100 000 főre vetítve). Hazánkat Szerbia (47,3/100 000) és Új-Kaledónia (42,9/100 000) követi. A Globális Daganatokat Megfigyelő Központ (Global Cancer Observatory – GCO) adatai alapján megállapítható, hogy nemcsak az előfordulás, de a tüdőrákhoz köthető halálesetek számában is kimagaslóan rosszak a hazai adatok (8. ábra).



8. ábra: Tüdőrák becsült életkor szerint standardizált előfordulási és halálozási arányai 2020-ban (saját ábra a GCO adatai alapján)

2020-ban Magyarországon (42,2/100 000) volt a legmagasabb a tüdőrák okozta halálozási arány, hazánkat Szerbia (40,0/100 000), Francia Polinézia (36/100 000) és Törökország (35,9/100 000) követte. Férfiak tekintetében Törökország (67,5/100 000) és Szerbia (59,6/100 000) után a 3. helyen állunk (58,6/100 000) a halálozási statisztikában. A nők tüdőrákhoz köthető halálos eseteiben sajnos vezetők vagyunk (30,6/100 000). A képzeletbeli dobogó 2. helyén Dánia (25,2/100 000), 3. helyén pedig Szerbia áll (23,6/100 000). A rossz adatok ellenére bizakodásra adhat okot, hogy a tüdőrák halálozási adatai a nemzetközi trendet követve kis mértékben ugyan, de fokozatosan csökkennek a férfiak körében (9. ábra). Míg 2000-ben a 100 000 főre vetített korstandardizált halálozási ráta 80,1 volt, addig 2010-re ez az érték 73,3-ra csökkent, 2018-ban 61,6/100 000 és 2020-ban pedig már 58,6/100 000 volt. A nők esetében az elmúlt néhány évben stagnálás, illetve kismértékű növekedés figyelhető meg. 2000-ben 21,2/100 000, 10 évvel később 27,2/100 000 volt a tüdőrák halálozási aránya a nők körében. Ez az érték 2018-ra tovább növekedett 28,2/100 000 értékre, majd 2020-ban elérte a világviszonylatban is legmagasabbnak számító 30,6/100 000-et (GCO adatai).



9. ábra: A nemek közötti korstandardizált halálozási arány 100 000 főre vetített értékének alakulása 2000. és 2018. között a tüdőrákhoz köthető 5 legnagyobb korstandardizált halálozási aránnyal rendelkező országban (saját ábra a GCO adatai alapján)

Az elmúlt néhány évtizedben egyre nagyobb teret hódított az a nézet, mely szerint a tumor nem egyszerűen csak genetikai állományának instabilitásával és korlátlan szaporodóképességgel jellemezhető sejtek tömege, hanem működésében bonyolult, komplex szövet, melyet a kórosan osztódó sejteken kívül az azok túlélését és a tumor progresszióját elősegítő kötőszöveti és immunsejtek alkotnak [232]. A daganat túlélését segítő mikrokörnyezet egyik legfontosabb jellemzője a gyulladás, mely gyakran maga iniciálja a kóros sejtosztódást, míg más esetekben a daganat kialakulásának kezdeti lépései során lép fel [233]. A gyulladás és daganatok kialakulása közti esetleges összefüggés nem újkeletű gondolat. A hipotézis első megfogalmazása Rudolf Virchow német patológus nevéhez fűződik, aki leukocitákat figyelt meg a kimetszett tumorokban [234].

A veleszületett és az adaptív immunrendszer egyaránt fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában, és bár a gyulladásos válaszreakció önmagában nem okoz daganatos sejtburjánzást, az általa létrehozott és hosszabb távon fenntartott, inflammatórikus sejtekben és mediátorokban gazdag milió nagyban hozzájárulhat a szöveti károsodáshoz,

valamint a folyamatok során termelődő ROS a sztróma sejtek DNS károsodását, és a DNS-hibajavító mechanizmusok elégtelen működését eredményezhetik [235].

A neoplázia kulcstényezőjét a tumor progressziójának szempontjából a tumor mikroörnyezetnek (Tumor Microenvironment – TME) az a változatos leukocita populáció jelenti, amely makrofágokat, CD8⁺ és CD4⁺ limfocitákat, NK sejteket, neutrofileket és DC sejteket foglal magába. Ezek a sejtek képesek különféle citokineket, kemokineket, citotoxikus mediátorokat, például ROS-t, MMP-eket, valamint TNF α -t és interferonokat is termelni [236]. A gyulladásos sejtek által felszabadított számos mediátor közvetlenül vagy közvetve az immunválasz jelentős elnyomásához vezethet, amely fontos tényezője a daganat immunrendszert kikerülő fennmaradásának [237]. A fibroblasztok a normál kötőszövet alkotóelemei, melyek dohányfüstnek való kitettség hatására proinflammatorikus mediátorok (prostaglandin-E2, IL-8, IL-6, MCP-1) termelésével hozzájárulnak az elnyújtott gyulladásos válaszreakcióhoz és ezáltal a tumor kialakulásához.

A tumor sztrómában az egyik legdominánsabb komponens a tumor asszociált fibroblasztok (Cancer-Associated Fibroblast – CAF) populációja. A CAF-ok aktivációja nagymértékben függ a TME ingerektől, mint például a lokális hipoxiától, az oxidatív stressztől, valamint a szomszédos daganatsejtekből és a beszűrődő immunsejtekből felszabaduló növekedési faktoroktól. Alapvetően a TGF- β , az EGF, a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (Platelet-Derived Growth Factors – PDGF) és a fibroblaszt növekedési faktor 2 (Fibroblast Growth Factor 2 – FGF2) a fibroblasztok toborzásának és aktiválásának kulcsfontosságú szabályozói. Az aktivált CAF-ok metabolikusan aktívabbak és fontos szerepet játszanak a tumorba infiltrálódó immunsejtek daganatellenes aktivitásában [238]. Önmaguk is számos növekedési faktort és proinflammatorikus citokint termelhetnek, köztük TGF- β , a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), IL-6 és a CXC-kemokin ligandumot (CXCL12), hogy elősegítse az angiogenezist és immunszuppresszív sejteket toborozzon a TME-be. A CAF-ok az E-cadherin downregulálásával és a vimentin upregulálásával indukálják az EMT-t, valamint modulálja a metasztázishoz kapcsolódó MMP-2 és VEGF gének expresszióját *in vitro* és *in vivo* egyaránt. A CAF-ok fokozzák a tüdőrák sejtek metasztatikus potenciálját az IL-6 szekretálásával, ami ezt követően aktiválja a JAK2/STAT3 jelátviteli útvonalat [239]. A TME-ben CAF-ok közelében a tumor-asszociált makrofágok (Tumor-Associated Macrophages – TAM) a legnagyobb mennyiségben előforduló immunsejtek, ami a két sejtípus közti szoros kölcsönhatásra utal [240]. A CAF-ok elősegítik a monociták TME-be történő migrációját és M2 irányú polarizációját [238].

A TAM-ok közül az M1 irányba polarizált sejtek hatásos immunsejtekként gátolják a tumor növekedését, szöveti jelenlétük nem-kissejtes tüdőrák (Non-Small Cell Lung Cancer – NSCLC) esetében a betegek szempontjából jobb prognózissal társul. Mindazonáltal a legelterjedtebb fenotípust a daganatos mikroköznyezetben az M2 irányba polarizált makrofágok jelentik, amelyek elősegítik a tumor növekedését, az angiogenezist, segítik az inváziót és metasztázisok kialakulását [241]. Az immunrendszeri sejtek közül NSCLC-ben megfigyelték továbbá a neutrofil granulociták szöveti beáramlását, mely az M2 makrofágokhoz hasonlóan szintén rossz prognózist jelent a betegség kimenetele szempontjából. A neutrofilek proinflammatorikus citokinek, proteázok és ROS felszabadításával járnlak hozzá a DNS károsodásához, tumorsejtek proliferációjához, valamint a mátrix lebontása és angiogenezis fokozása révén a metasztatikus képesség fokozásához.

Fiziológiás körülmények között a csontvelői a multipotens hematopoietikus őssejtek (Hematopoietic Stem Cell – HSC) különböző progenitor sejtek részhalmazává differenciálódnak. A mieloid progenitor sejtekből végül monocita eredetű DC-k, makrofágok, és a granulociták alakulnak ki. Ezzel szemben daganatok körülmények között a TME által termelt faktorok következtében a granulocita és monocita progenitor sejtek nem képes differenciálódni, ami éretlen heterogén sejtek, mieloid-eredetű szuppresszor sejtek (Myeloid-Derived Suppressor Cell – MDSC) populációját eredményezi [242]. Az MDSC-k proliferációját leginkább a tumor eredetű növekedési faktorok hajtják, amelyek közé tartozik a granulocita-makrofág kolóniasztimuláló faktor (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – GM-CSF), a granulocita kolóniasztimuláló faktor (Granulocyte Colony-Stimulating Factor – G-CSF), a makrofág kolóniasztimuláló faktor (Macrophage Colony-Stimulating Factor – M-CSF), a VEGF és az IL-6 [243]. Az MDSC sejteknek két csoportját különbztetjük sejtfelszíni molekuláik alapján. Jelenleg a humán polimorfonukleáris MDSC-ke (Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell – PMN-MDSC) CD11b + CD14-CD15+ CD66b+ sejtekként, a humán mononukleáris MDSC-ke (Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell – M-MDSC) pedig CD11b+ CD14+ HLA-DR-/alacsony és CD15- sejtekként definiálják. Az MDSC-k populációját főként PMN-MDSC-k képezik és ennek a típusnak a felhalmozódása figyelhető meg elsősorban a TME-ben [244]. A PMN-MDSC-ke a daganatokhoz elsősorban a CXCL1, 5, 6, 8 és 12). A M-MDSC sejteket a metasztatikus daganatok az általuk termelt kemokinek, elsősorban CCL2 és CCL5 révén vonzzák [245]. Az MDSC-k immunsuppresszor hatásukat a CD4+ és CD8+ T-sejt aktivitásának és a sejtciklus gátlásával fejtik ki [246]. A PMN-MDSC-k elsősorban ROS és argináz I-et (ARG1) használnak az immunsuppresszió közvetítésére, míg az M-MDSC által

közvetített gátlás leginkább a nitrogén-monoxid (NO) és a szupresszív citokinek, az IL-10 és a TGF- β expressziójával valósul meg [244].

Bár a tumor-asszociált neutrofilek (Tumor Associated Neutrophil – TAN) vizsgálatára összpontosító tanulmányok száma jelenleg limitált, egyre több bizonyíték utal arra, hogy a TME jelentőségteljes komponensei, és a TAM-okhoz hasonlóan dagantellenes N1, vagy protumorigén N2 fenotípusúak is lehetnek [247]. A TGF- β a neutrofil polarizációjának egyik fő modulátora egerekben. TGF- β aktivitás blokkolása fokozza az N1 neutrofilek citotoxikussá válását a tumorsejtekkel szemben és aktiválják a CD8+ T sejteket [248]. A tumorsejteken kívül a TME sejtei is képesek szabályozni a neutrofil aktivitást. A gyomorrák mesenchimális őssejtek által termelt IL-6 gyomorrák esetén meghatározza például a neutrofil N2 polarizációját, szabályozza a kemotaxist, a túlélést, az aktiválódást és a működést az IL-6–STAT3–ERK1/2 jelátviteli kaszkádon keresztül [249].

A tumoros környezetbe infiltrálódó limfociták a gazdaszervezet tumorantigénekkal szembeni immunitásának szintjét jelzik. CD8+ T-limfociták sztrómális jelenlétének kedvező prognosztikai jelentőségéről számos tanulmány beszámolt [250] [251]. CD4+ T-limfociták sztrómális jelenlétének fokozódása szintén független prognosztikai tényezőnek tekinthető és pozitívan korrelál a betegek túlélési esélyeinek növekedésével [250]. Mivel a Treg-sejtek elnyomják a gazdaszervezet immunválaszait, így feltehetően elősegítik a tumor növekedését. Szintjük pozitív korrelációt mutatott a ciklooxygenáz-2 (COX-2) expressziós szintjével NSCLC daganatokban, és a daganat fokozott kiújulásával társul. NSCLC-ben az epiteliális és sztrómális B-limfociták megnövekedett száma korrelál a betegek túlélésével. A jobb daganatellenes immunrendszeri fellépés a DC sejtek szöveti jelenlététől és működésétől, mint hivatásos antigénprezentáló sejtektől egyaránt függ. Az érett DC sejtek számának növekedése NSCLC betegek esetében jobb klinikai kimenetellel társul. Ezzel szemben a szöveti hízósejtek lokális koncentrációjának emelkedése a betegek számára kedvezőtlen prognosztikus tényező [252].

Bár a különböző típusú szolid tumorok esetében változó összetételű immuninfiltrátumok jelenléte régóta igazolt, ahogy a fent leírtakból is jól látszik, ezeknek az összetevőknek a prognosztikai értéke még mindig vitatott.

Ezért szükséges olyan diagnosztikus (betegség meglétét jelző) és prediktív (terápiás válaszadókészséget tükröző), valamint prognosztikus (a betegség kórlefolyásának jóslatára szolgáló) biomarkerek felfedezése, melyek segítik az egyésségügyi szakembereket a diagnosztikus és terápiás döntéshozatalban.

3.9.3. COPD, mint a tüdőrák kialakulásának egyik fő kockázati tényezője

Mivel számos gyulladásos betegségről kiderült az elmúlt években, hogy hajlamosít a daganatok kialakulására [253] [254], így lehetséges, hogy a COPD-ben jelen lévő krónikus gyulladás a tüdőrák egyik fő kiváltó tényezője. Ezt sugallja az a megfigyelés is, miszerint a tüdőt érintő rosszindulatú daganatok akár ötször nagyobb valószínűséggel fordulhatnak elő olyan dohányzó betegek körében, akik légúti obstrukcióval rendelkeznek (pl. COPD esetében), mint a normál tüdőfunkciójú páciensek esetében [255].

Mind a COPD-re, mind pedig a tüdőrákra jellemző magas mortalitási ráta a korai stádiumbeli tünetmentességgel és a megfelelő megkülönböztető diagnosztikai eszközök hiányával indokolható. A COPD diagnosztizálása kizárólag a tünetek és a spirometriai adatok alapján történik ($FEV_1/FVC < 0,70$ hörgőtágító alkalmazását követően) [256], így a betegség megállapítása általában már csak a tünetek jelentkezését követően, a betegség előrehaladott stádiumában történik meg [257].

A tüdőrák esetében a biopszia ugyan képes megkülönböztetni a malignus és benignus elváltozásokat egymástól, amelyekre a képalkotó technikák nem alkalmasak, de az eljárás invazivitása miatt a beteg szempontjából számos kockázattal jár, beleértve a fertőzések lehetőségét, tüdőgyulladást, légmell kialakulását, műtét utáni vérzések jelentkezését [258]. A biopszia további hátrányaként említi a szakirodalom a metasztázis kialakulásának lehetőségét, a biopszia során ugyanis a véráramba kerülő sejtek a primer daganattól távoli áttét képződését indukálhatják [259]. A biopszia mellett, azt kiegészítve diagnosztikus értékű lehet a kevésbé invazív mintavétel révén gyűjtött vérminták glikomikai elemzése.

A COPD egyik fő kiváltó tényezőjeként számon tartott dohányzás a kialakult betegségek kevesebb, mint feléért tehető felelőssé, éppen ezért nagy jelentőségű lehet a környezet hajlamosító tényezői mellett a genetikai és epigenetikai faktoroknak a betegségek kialakulásában játszott szerepének a tanulmányozása. De Torres és mtsai. szakrendelőkbe utalt és akár 5 évig követett 2507 COPD-s beteg bevonásával végzett vizsgálata a tüdőrák meglehetősen magas prevalenciájára mutatott rá (16/1000 személyév) a normál dohányosok (1–1,5/1000 személyév) adataihoz képest. A tüdőrák előfordulása magasabb volt az idősebb betegek esetében és meglepő módon a GOLD I és II stádiumbesorolású járóbetegek körében. A COPD-s betegek körében leggyakrabban előforduló ráktípus a laphámsejtes karcinóma volt [260].

A COPD és a tüdőrák közötti szoros kapcsolat azt sugallja, hogy azok a betegek, akik ezen betegségekben szenvednek, egyformán érzékenyek lehetnek a dohányzás egészségkárosító

hatásaira valamilyen közös genetikai vagy epigenetikai tényezőnek köszönhetően. A közös hajlamosító tulajdonságokon kívül a két betegség gyakori közös előfordulása arra enged következtetni, hogy a COPD következtében a tüdőben kialakuló rendellenességek különösen kedvezhetnek a tüdőrák kialakulásának, de tükrözhetik a immunrendszer fokozott gyulladásos válaszreakciójának és a tüdőráknak a kapcsolatát is [261].

A COPD és a tüdőrák közötti összefüggésekkel kapcsolatos kutatások számos új, molekuláris diagnosztikai értékű, valamint terápiás célpont azonosításához járulhatnak hozzá, amelyek utat mutathatnak a betegségek hatékonyabb terápiáinak kifejlesztéséhez a jövőben. Mivel a WHO előrejelzései szerint ezeknek a betegségeknek a növekvő gyakoriságára számíthatunk, így egyre nagyobb igény mutatkozik a nem-invazív diagnosztikai eszközök fejlesztésére, amelyek megfelelő specifitással és érzékenységgel képesek előre jelezni a COPD, a tüdőrák vagy akár a két betegség együttes jelenlétét és prognózisát.

Az emberi vér az egyik leggyakrabban használt biológiai minta a különböző egészségügyi és kóros állapotok diagnosztizálására viszonylag könnyű hozzáférhetősége és komplexitása miatt. Napjainkban az emberi vér a szérum glikobiomarkerek azonosítására irányuló kutatások körében is egyre nagyobb népszerűségnek örvend, mivel a molekuláris diagnosztikai markerek gazdag forrásaként szolgál a gyulladásos és rosszindulatú betegségekben, beleértve a tüdőbetegségeket is [262] [263].

A tüdő rosszindulatú daganatos betegségeinek diagnosztizálásával és kezelésével kapcsolatos legtöbb irányelv nem javasol semmilyen szérum biomarkert, egyes európai és ázsiai országokban végeznek szérum biomarker vizsgálatokat, köztük hazánkban is. Bár a potenciális marker klinikai hasznossága további vizsgálatokat igényel, a specifikus szérum biomarkerek esetleg hasznosak lehetnek a tüdőrák differenciáldiagnosztizálásában, különösen akkor, ha kombinációban alkalmazzák őket, és ha szöveti diagnózis nem lehetséges. Ezen kívül számos szérum biomarkerről kimutatták, hogy független prognosztikai információt szolgáltatnak diagnosztizált tüdőrákban szenvedő betegek esetében. Azonban a tüdőrák azon stádiumára, ahol a legsürgetőbb lenne egy új prognosztikai biomarker bevezetése, azaz az I. stádium azonosítására, egyiket sem validálták.

A tüdőrákra javasolt többféle szérum biomarker közül a legrészletesebben a neuron-specifikus enolázt (NSE), a progasztrin-felszabadító peptidet (proGRP), a karcinoembrionális antigént (CEA), a laphámsejtes karcinóma antigént (SCCA) és a CYFRA 21-1-et vizsgálták. Ezen biomarkerek egyike sem specifikus azonban a tüdőrákra, sem a tüdőrák egy adott szövettani formájára, bár az NSE-t és a ProGRP-t elsősorban az SCLC termeli, míg a CYFRA 21-1-et és az SCCA-t elsősorban az NSCLC, különösen a laphámsejtek képezik [264].

Mindazonáltal a felsorolt szérumfehérjék alkalmazása kiegészítve a potenciális glikán biomarkerekkel megnövelhetik a korai stádiumú tüdőrák diagnosztizálásának esélyét.

3.9.4. A COPD és tüdőrák glikomikai jellemzői

Korábban Váradi és mtsai. különböző gyulladásos tüdőbetegségekkel és tüdőrákkal diagnosztizált páciensek szérum mintáiból izolált haptoglobin (Hp) core- és antenna-fukozilációs változásainak fontosságára hívta fel a figyelmet. A kutatócsoport megállapította, hogy a COPD-s és tüdőgyulladásos betegek fehérjéinek teljes fukozilációs szintjében tapasztalt kismértékű csökkenés a kontroll csoporthoz képest az antenna-fukoziláció jelentős csökkenésének és a core-fukoziláció enyhe növekedésének az eredménye. A szerzők a haptoglobinon a core- és az antenna-fukozilált tetra-antennás glikánjainak (FA4G4 és A4FG4) emelkedett mennyiségét is megfigyelték tüdőrákos és COPD-s betegcsoportok összehasonlításakor [265].

Ito és mtsai. eredményei új megvilágításba helyezik a COPD diagnosztizálására alkalmas, glikozilációs változásokon alapuló biomarker kutatást. A disztális légutakban, az alveolusokban és a vérkeringésben egyaránt megtalálható, tüdő-specifikus SP-D N-glikánjainak MALDI-QIT-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Quadrupole Ion Trap-Time Of Flight – MALDI-QIT-TOF) készülékkel végzett analízise során megállapította, hogy a fehérje core- és antenna-fukozilációs szintje egyaránt jelentősen megemelkedett COPD-s betegekben a kontrollokhöz képest [266]. Pavić és mtsai. rámutattak arra, hogy a plazmafehérjék N-glikán szerkezeteinek komplexitása összefüggésben áll a COPD-vel, tükrözve a betegség súlyosságát. A 198 COPD-s és 143 egészséges alany bevonásával végzett, a plazmafehérjék és IgG N-glikozilációs változására irányuló vizsgálat során szignifikáns csökkenést tapasztaltak az alacsony elágazású, illetve a monogalaktozilált szerkezetek arányában plazma teljes N-glikom tanulmányozásakor. A COPD-s betegek mintáiból izolált IgG esetében szintén jelentősen csökkent galaktoziláció volt megfigyelhető [267].

Az A1AT megnövekedett szérum koncentrációjáról számos daganatos megbetegedés esetében számoltak, beleértve a tüdő-, prosztat- és emlőrákot, de egyes jóindulatú tüdőbetegségeknél is megemelkedhet az A1AT-szint [268]. Liang és mtsai. ennek kapcsán lektin-microarray alkalmazásával vizsgálták az A1AT glikozilációs módosulásait különböző légzőszervi betegségek esetén és megállapították, hogy a szérum A1AT specifikus glikozilációs változásai fontosak lehetnek a tüdőrák-biomarkereinek felfedezésében. Fontos eredményeik

közé tartozik, hogy az A1AT olyan glikozilációs tulajdonságai alapján, mint a fehérje galaktozilációja, fukozilációja és poli-LacNAc tartalma, sikeresen el tudták különíteni egymástól a hisztológiailag eltérő daganattípusokat (adenokarcinóma, laphámsejtes karcinóma és kissejtes tüdőrák), valamint az olyan, nem daganatos tüdőbetegségeket, mint a tüdőgyulladás, a jóindulatú pulmonális nodulus és a gümőkóros mellhártyagyulladás [269]. Ezért a szérumban A1AT specifikus glikozilációs változásai fontosak lehetnek a tüdőrák-biomarkereinek azonosításában. Arnold és mtsai. a szialosav Lewis^x (SLe^x), az egyantennás glikánok és a magasan szialilált glikánok arányának növekedését, valamint a core-fukozilált kétantennás szerkezetek csökkenését észlelték teljes szérumban glikozilációs vizsgálataik során.

A Hp specifikus tisztítását követően a fehérje N-glikozilációjában a szérumhoz hasonló változásokat figyeltek meg. A tanulmány a SLe^x szerkezet lényegesen magasabb szintjét azonosította a laphámsejtes karcinóma esetében ($p=0,006$) összehasonlítva az adenokarcinómával. Az izolált Hp vizsgálatával kimutatták továbbá, hogy a szérumban glikozilációjában azonosított változásokat nem kizárólag a Hp szérumkoncentrációjának növekedése okozta. A tapasztalt változásokat részben a glikoformák populációjában bekövetkezett eltolódás idézte elő [270].

Az NSCLC-vel diagnosztizált betegek plazmafehérjéinek megváltozott N-glikánprofilja a rákdiagnózis hatékony támogató eszköze lehet. Deszialilált $\alpha(1-6)$ core-fukozilált kétantennás (NGA2F, NG1A2F, A NA2F) és $\alpha(1-6)$ core-fukozilált biszekting kétantennás (NGA2FB, NA2FB) szerkezetek arányának csökkenését, valamint az $\alpha(1-3)$ fukozilált biszekting triantennás N-glikán (NA3FB) mennyiségének növekedését figyelték meg plazma minták glikán tartalmának deszialilálását követően, NSCLC-vel diagnosztizált betegekben. A betegség előrehaladtával a viszonylag alacsony NA2/NA2F-értékkel rendelkező NSCLC-s betegek hároméves túlélése jobb volt, mint a magas NA2F-értékkel rendelkező betegeké [271], így a két szerkezet aránya prognosztikus értékű lehet a betegek túlélési esélyeinek szempontjából.

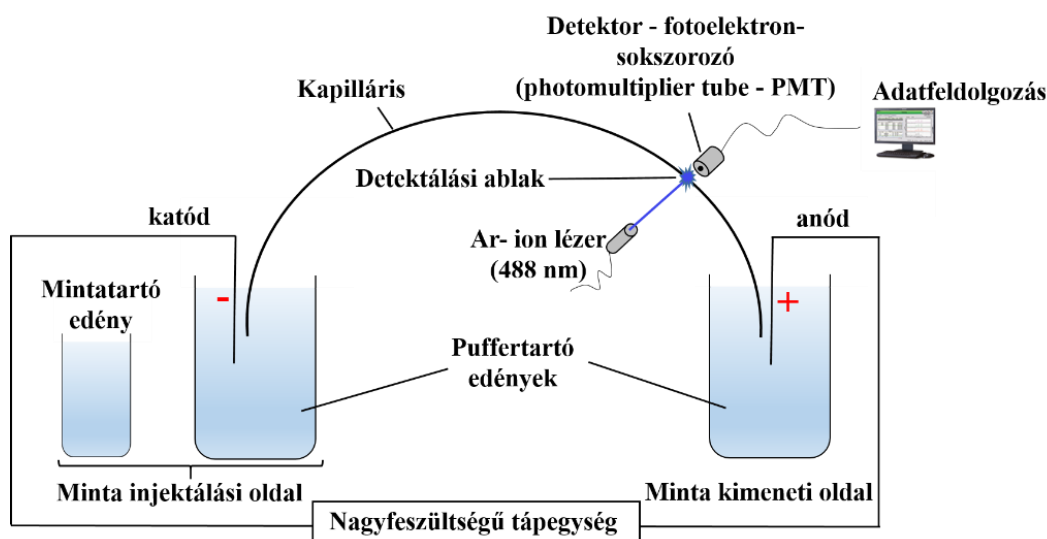
A szérumban proteom nagy dinamikus tartománya azonban megnehezíti a betegségspecifikus markerek azonosítását, különösen az alacsony koncentrációtartományban jelenlévő fehérjék szintjén [66]. Ruhaak és mtsai. az emberi plazmát és annak 4 különböző frakcióját (IgG és IgG mentes plazma; ProteoMiner kit alkalmazásával dúsított közepes és kis koncentrációjú fehérjék, valamint a főként magas koncentrációjú fehérjéket tartalmazó frakció) tanulmányozta annak megállapítása érdekében, hogy a különböző fehérjedúsítási eljárások javíthatják-e a glikán alapú biomarkerek felfedezésének érzékenységét és specifitását NSCLC esetében. A vizsgálat során 4-4 különböző glikán szerkezet mutatott eltérést a teljes plazma és az IgG szintjén. A többi tanulmányozott frakció glikozilációs mintázata alapján nem lehetett elkülöníteni az

adenokarcinómás és a kontroll csoport tagjait, tehát a különböző bonyolult és időigényes fehérjedúsítási eljárások tüdőrák esetében nem növelték a glikobiomarker kutatás hatékonyságát [272], és hatékonyabbnak bizonyult a teljes szérum/plazma N-glikozilációs módosulásának tanulmányozása.

3.10. Kapilláris elektroforézis, mint biomarker feltáró analitikai módszer a glikomikai kutatásokban

A glikánok olyan jellemzői egy adott aglikon hordozónak, melyek másodlagos géntermékként a nem-templát vezérelt bioszintézisüknek köszönhetően szignifikánsan különböznek mind a nukleinsavaktól, mind pedig a fehérjéktől. Változásaik gyakran társulnak különböző patológias állapotokhoz, a kongenitális fejlődési rendellenességtől kezdve a gyulladásos megbetegedéseken át a daganatos elváltozásokig. Mivel a fehérjék glikánprofiljának kialakulásáért egymással szorosan együttműködő enzimek sokasága felelős, melyek expresszióját és aktivitását számos tényező befolyásolhatja, így a glikomikai kutatások új lehetőségek tárházát jelentik a biomarkerek felfedezése terén. A szénhidrátok biomarkerként történő klinikai alkalmazhatóságának azonban jelenleg gátat szab a vizsgálatukra alkalmas analitikai műszerek bonyolult karbantartása és szakképzett munkaerőigénye, valamint a vizsgálatához szükséges hosszú analízisidő. A modern kapilláris elektroforézis készülékekkel végzett glikozilációs analízis a berendezés automatizálhatósága és viszonylag könnyű kezelhetősége révén kiválóan alkalmazható módszer a kutatásban, ugyanakkor a klinikumban is kivitelezhető diagnosztikai eljárás lehetőségével kecsegtet.

A készülék rendkívül egyszerű, sematikus felépítését a 10. ábra mutatja, melynek fő alkotó elemei a mintatartó és puffertartó edények, elválasztó kapilláris, elektródok, nagyfeszültségű tápegység, detektor és a vezérlésre, valamint az adatok gyűjtésére és tárolására szolgáló számítógép.



10. ábra: CE-LIF készülék fordított polaritású működési módjának vázlatos ábrázolása (saját ábra)

A mintakomponensek elválasztása során alkalmazott szilika kapilláris effektív hossza általában 10-100 cm, belső átmérője 20-100 μm között változik [273]. A minta kapillárisba juttatása (injektálás) történhet nyomás, elektromos tér vagy vákuum alkalmazásával [274]. A minta komponensei az alkalmazott elektromos térerősség hatására az előzőleg a kapillárisba juttatott elválasztó közegben töltésüknek megfelelően elmozdulnak, és töltés/hidrodinamikai térfogatuk függvényében vándorolnak [275]. A berendezés által biztosított magas feszültség (akár 30 kV) nagyfelbontású és gyors elválasztást tesz lehetővé alacsony Joule-hő fejlődése mellett a kis kapillárisátmérőnek [276], valamint a modern készülékekbe épített hőszabályozó egységnek köszönhetően, amely 15-65 $^{\circ}\text{C}$ között képes szabályozni a kapilláris, és benne az elválasztó közeg hőmérsékletét. A módszer rendkívül alacsony anyagigényét jelzi, hogy az injektált minta térfogata a femtolitertől nanoliterig terjedő tartományba esik, az általam is alkalmazott lézerrel indukált fluoreszcencia észleléssel az analit fmol mennyisége is kimutatható.

A kapilláris elektroforetikus rendszerekben jelen lévő elektroosmotikus áramlás (Electroosmotic flow – EOF) a szolvatált kationok által kialakított nettó anyagáramlás az anódtól a katód irányába. A jelenség a szilika kapilláris belső falán kialakuló SiO^- csoportoknak köszönhető, mely ionokhoz csoportosuló kationok elektromos erőter hatására a katód irányába vándorolva sodorják magukkal az oldat részecskéit. Az EOF szabályozása számos módon lehetséges (elektromos erőter, hőmérséklet, pufferkoncentráció stb.), de leggyakrabban az oldat pH-jának, az alkalmazott elválasztási feszültségnek, valamint a hőmérsékletnek a

módosításával szabályozzák. Az elektroosmotikus áramlás stabilitása fontos az analízis reprodukálhatósága szempontjából, mértéke pH=4 felett válik jelentőssé [277].

A szénhidrátoknak a polipeptid láncról történő felszabadítására számos módszert dolgoztak ki az évek során, amelyek közül az intakt N-kapcsolt glikánok vizsgálatához leggyakrabban a szénhidrátokat PNGase F enzimmel történő specifikus emésztéssel hasítják le a fehérjékről. A PNGase F hasítja az összes aszparaginhoz kötött komplex, hibrid, valamint magas mannóztartalmú oligoszacharidot, kivéve azokat, amelyek core $\alpha(1-3)$ kapcsolt fukózt tartalmaznak. Egyéb N-glikozidázok és endo- β -N-acetil-glükózaminidázok is elérhetőek az N-kapcsolt glikánok fehérjékről történő felszabadításához, melyek közül a peptid N-glikanáz A (PNGase A) hasonló szubsztrátspecifitással rendelkezik, mint a PNGase F, azzal a különbséggel, hogy képes core $\alpha(1-3)$ kapcsolt fukózt tartalmazó N-kapcsolt oligoszacharidokat is felszabadítani. A PNGase F enzim működéséhez szükséges optimális pH-értéke 7 és 9 között van, de az enzim aktív pH 5 és 7 között is [278]. Hidrazinolízis alkalmazható N-, valamint O-glikánok felszabadítására egyaránt, bár a módszernek van néhány jelentős hátránya, mint például a vízmentes hidrazin használatának szükségessége, amely rendkívül mérgező és robbanásveszélyes vegyszer [59].

A szénhidrátok kapilláris elektroforézissel történő analízisét nehezíti, hogy a szacharidok többsége nem rendelkezik töltéssel, (kivéve a savas cukrokat tartalmazó glikánokat, például N-acetil-neuraminsav, glükuronsav vagy iduronsav, melyek negatív töltést hordoznak), továbbá az tény, hogy a szénhidrát molekulák kromofór csoportokat sem tartalmaznak, így nem dektálhatók UV-tartományban történő abszorbancia méréssel [59]. Ennek megfelelően a glikánok elválasztására és optikai detektorokkal történő jellemzésére sokféle származékképzési stratégiát fejlesztettek ki és a szénhidrátokat fluorofór ágensekkel jelölik. Mivel a legtöbb fluorofór töltéssel rendelkezik, ez előnyt jelent a CE alkalmazhatósága szempontjából, biztosítva a jelölt szénhidrát számára az elektromos térben történő vándorláshoz szükséges töltést. A 3 negatív töltéssel rendelkező 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát (APTS; gerjesztés hullámhossz: 488 nm; emissziós hullámhossz: 520 nm) fluoreszcens festékkel történő redukatív amináláson alapuló glikánjelölés a kapilláris elektroforézis készülékkel történő elválasztásokhoz az egyik leggyakrabban alkalmazott származékképzési eljárás, melynek köszönhetően a jelölt glikánok kimutathatósági tartománya a femtomoláris tartományba esik. A kis mintaigény így jelentősen növeli a módszer diagnosztikus értékét.

A redukatív aminálás alapú jelölési megközelítés másik nagy előnye, hogy a glikán-fluorofór kötési arány 1:1, ami lehetővé teszi a fluoreszcencia alapján történő mennyiségi meghatározást is [59]. A glikánok kapilláris elektroforetikus analízise során a gázkromatográfiában

alkalmazott Kovats-retenciós indexhez [280] hasonlóan, ismeretlen analitsúcsok azonosítására a migrációs idejüket egy lineáris, $\alpha(1-4)$ kapcsolt glükóz egységeket tartalmazó polimer komponenseinek migrációs idejéhez hasonlítjuk. A lineáris oligomerben lévő monomerek számát GU (glükóz unit) értékekben fejezzük ki [281]. Az elmúlt években számos kezdeményezés valósult meg a glikán szerkezetek adatbázisokban történő rendszerezésére, melyek megkönnyítik a szerkezeti azonosítást. Ilyen például a Consortium for Functional Glycomics (CFG), a Glycosciences.de, a Bakteriális (BCSDB) és a Növényi & Gomba (PFCSDb) szénhidrátszerkezeti adatbázisok összevonásával kelezkező Carbohydrate Structural Database (CSDB) és a GlycoStore adatbázisok. A korábban rendkívül időigényes GU érték kézi kiszámítását mára felváltotta a beépített adatbázist is tartalmazó szoftver használata [282].

Bár a kapilláris elektroforézis rendkívül hatékony elválasztási technikának bizonyul a fehérjék szénhidrát módosulásainak vizsgálata során, az analitok pontos szerkezeti meghatározásához kötés- és monoszacharid specifikus exoglikozidáz alapú emésztésre szintén szükség lehet. A módszer egyik nagy előnye, hogy azonos számú és összetételű szénhidrát építőelemekből álló eltérő kötési és pozicionális izomerek azonosítására egyaránt alkalmas. A glikánszekvenálásnak nevezett eljárás során az alkalmazott specifikus exoglikozidáz enzimek hatására képződő termékek migrációs ideje és GU értéke az adott cukor struktúra összetételének függvényében változik. A változást a minták enzimmel történő kezelése előtti és utáni kapilláris elektroforetikus analízis profilkülönbségével detektáljuk.

A kapilláris elektroforézis egyre nagyobb hangsúlyt kap a glikobiológiai kutatásokban mind a betegség-specifikus biomarkerek azonosítására és fiziológias változásokra (például terhesség, öregedés) irányuló vizsgálatok, mind pedig a bioterápiás készítmények monitorozása során. Schwedler és mtsai. humán szérumban minták N-glikán összetételét exoglikozidáz emésztésnek alávetve, valamint glikoproteinekből származó standard könyvtár segítségével határozta meg. Munkájuk eredményeként 32 deszialilált N-glikán szerkezetet azonosítottak az egészséges kontroll, míg 34 struktúrát a 3. és 4. stádiumú epitelialis petefészekrákban szenvedő betegektől gyűjtött mintákban. Szignifikáns növekedést találtak továbbá az N-glikán szerkezetek elágazásában, az antennáris és core-fukoziláció mértékében, míg szignifikáns csökkenést az 5 mannózt tartalmazó szerkezetek arányában a kontroll csoporttal összevetve [65]. Jie Chen és mtsai. kapilláris elektroforézis (DNA Sequencer-Assisted Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis - DSA-FACE) készülékkel sikeresen azonosítottak humán szérumban mintákban könnyűlánc-mieloma, IgG-mieloma és IgA-mieloma differenciál diagnosztizálására

alkalmas N-glikán szerkezeteket [283]. Teljes szérum kapilláris elektroforézissel végzett N-glikozilációs analízisével elkülöníthető továbbá a kontroll, frissen diagnosztizált kezeletlen, kezelés alatt álló és remisszióban lévő mieloma multiplex betegek csoportjai egymástól [63].

A különböző sejttípusokból származó fehérjék különböző N-glikánokat hordozhatnak és mivel mind az epigenetikai, mind a környezeti tényezők jelentősen befolyásolják a glikozil-transzferázok és glikozidázok expresszióját és aktivitását [284], így a sejtfelszíni glikoproteinek glikánösszetétele, valamint a teljes sejt glikozilációs „ujjlenyomata” tükrözheti az adott sejt fejlődési állapotát, valamint szöveteredetét egyaránt. Az FFPE szövetmetszetek glikomikai elemzése nagymértékben hozzájárulhat a szövetek glikozilációs mintázatával kapcsolatos eddigi csekély ismereteink bővüléséhez, elősegítve ezzel a biomarkerkutatás fejlődését. A CE előnyeinek kiaknázásával ezt a tényt felismerve Dönczö és mtsai. FFPE minták N-glikozilációs mintázatának analízisét lehetővé tevő eljárást fejlesztett ki [285].

Egyre inkább úgy tűnik, hogy a fehérjék és sejtek N-glikozilációjának tanulmányozása kiemelkedően fontos ahhoz, hogy megérthessük a különböző emberi megbetegségek lefolyását, és ezzel párhuzamosan hozzájárul a különböző bioterápiás szerek biztonságosságának és hatékonyságának biztosításához. A CE gyorsaságának és érzékenységének köszönhetően kiválóan használható a glikánok megbízható minőségi és mennyiségi meghatározására, így a módszer nemcsak a biomarkerek felfedezésében, de a bioterápiás fehérjekészítmények minőségellenőrzésében is egyre nagyobb teret nyer [286] [287].

4. Anyagok és módszerek

4.1. Reagenssek

A kísérletekhez felhasznált standard IgA, Hp, A1AT és transferrin (Tf) a Molecular Innovations (Novi, MI, USA) cégtől került beszerzésre míg a standard humán szérum és IgG a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől került megvásárlásra. A standard glikoproteinek mindegyike a forgalmazók adatai szerint $\geq 95\%$ tisztasággal volt jellemezhető. A fehérjék denaturálásához felhasznált nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) a VWR (Radnor, PA, USA) cégtől, a fehérjék szolubilizálására használt RIPA lízispuffert (Radio-Immuno-Precipitation Assay) a Merck (Darmstadt, Germany) cégtől vásároltam. A fehérjék aszparagin-kötött glikán struktúráinak enzimatisz szabadításához PNGase F enzimet az Asparia Glycomics (San Sebastián, Spain) cég szolgáltatta. A glikoproteinek felszabadított glikántartalmának analíziséhez használt Fast Glycan Labeling and Analysis Kitet SCIEX cégtől (Brea, CA, USA) szereztem be. A Kit tartalmazta a glikán struktúrák fluoreszcens jelöléséhez szükséges 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavat (APTS), a mintatisztításhoz használt mágneses gyöngyöket, a mérések során standardként alkalmazott maltooligoszacharid létrát és maltózt, valamint az HR-NCHO és NCHO elválasztó puffert. A minták glikánstruktúráinak pontosabb meghatározásához használt kötésspecifikus exoglikozidázok: *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz, *Canavalia ensiformis* galaktozidáz és hexózáminidáz a ProZyme (Hayward, CA, USA) cégtől került beszerzésre. Az acetonitril, nátrium-cianoborohidrid (1 M-os, tetrahidrofurános oldat), glicerín, ditiotreitol (DTT), ammonium acetát (AmAc), nátrium-foszfát (NaH_2PO_4) és imidazol a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől került megvásárlásra. A nátrium-kloridot (NaCl) a MOLAR CHEMICAL Kft-től (Halásztelek, Magyarország) vásároltam. Az IgG szérum mintákból történő tisztításához alkalmazott Protein G mikoraffinitás oszlopokat és a puffereket, valamint az IgA specifikus kifogásához használt Ni-IMAC oszlopokat a PhyNexus (San Jose, CA, USA) cégtől vásároltuk.

4.2. A szobahőmérsékleten történő tárolás N-glikozilációra kifejtett hatását vizsgáló kísérletekhez gyűjtött perifériás vérminták

A szobahőmérsékleten történő tárolás a szérum N-glikánprofiljára kifejtett hatásának vizsgálatára a klinikumban hagyományosan alkalmazott szérum vérvételi csövet alkalmaztam,

a referencia N-glikánprofil adó mintát az előírásoknak megfelelően kezeltem. Nyolc egészséges fiatal önkéntestől származó vénás vér véralvadás aktivátorral (SiO_2) és szeparátor géllal ellátott Vacutainer vérvételi csőbe került levételre. A vérvételi csöveket a Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) cégtől szereztem be. A vizsgálatban részt vevő alanyok sorából 3 személy szérum mintáit az előkísérletek során a vizsgálati paraméterek beállításához használtam, míg a kísérletbe bevont valamennyi alany mintáit poolozást (minták azonos mennyiség összekeverése) követően ismét feldolgoztam és analizáltam kapilláris elektroforézis készülék segítségével.

A vérvételt követően minden minta esetében szükséges a minta és a cső falán lévő SiO_2 alapos elegyítése a csövek 2-3 alkalommal történő vertikális megfordításával. A kontroll időpont mintáját a vérvétel után 30 percig állni hagytam szobahőmérsékleten ($24\text{--}25^\circ\text{C}$), majd 4°C hőmérsékleten 20 percig ($2690 \times g$) centrifugáltam. Ez az idő szükséges a véralvadási folyamat lejátszódásához, amely átlagosan 60 percről 30 percre gyorsul fel a SiO_2 -al porlasztással bevont falú vérvételi csövekben. Minden további mintát még azok centrifugálása előtt állni hagytam szobahőmérsékleten a vérvételtől számítva 90; 150 és 270 percig. A levett teljes vérmintákat $2690 \times g$ alkalmazásával centrifugáltam 20 percig 4°C hőmérsékletre állítva a centrifuga termosztátját. Az így kapott szérum frakciókat azok egyenlő részekre történő osztását (aliquotolás) követően -20°C -on tároltam további felhasználásukig.

4.3. Szérum minták előkészítése a mintavételtől a centrifugálásig eltelt idő függvényében bekövetkező N-glikánprofil-változás analízisére

A 4.2 pontban leírtak szerint kapott szérum minták $2 \mu\text{L}$ -ét $10 \mu\text{L}$ térfogatra hígítottam HPLC tisztaságú vízzel, majd glikoprotein tartalmukat $5 \mu\text{L}$ denaturáló oldat ($0,375\%$ NP-40, $12,75\%$ glicerin, $0,625\%$ SDS és $12,5 \text{ mM}$ DTT) hozzáadásával hőmérséklet gradienst alkalmazva denaturáltam és redukáltam. A denaturálási lépés során a termosztát hőmérsékletét $5^\circ\text{C}/\text{perc}$ fűtési sebességet beállítva 30°C -ról 80°C -ra emeltem [288]. A fehérjék aszparagin aminosavaihoz N-glikozidos kötéssel kapcsolt cukorstruktúráit enzimatis emésztés révén, $1 \mu\text{L}$ PNGase F (200 mU) és $19 \mu\text{L}$ HPLC tisztaságú víz hozzáadásával szabadítottam fel a minták egyéni mintaelőkészítése során. A poolozott szérum minták esetében $16,7 \text{ mM}$ ammónium-acetát ($\text{pH } 6,9$) puffer oldatot alkalmaztam az N-glikánok enzimatis felszabadításakor. A mintákat 50°C -on 1 órán keresztül inkubáltam, majd 1 percig jégre helyezve hűtöttem, fehérje tartalmukat $70 \mu\text{L}$ jéghideg acetonitril hozzáadásával kicsaptam. Ezt

követően a kapott precipitátumot és felülúszót, amely a felszabadított N-glikánokat tartalmazta, centrifugálással szétválasztottam (11 290 x g, 10 perc) egymástól. A felülúszót vákuum centrifuga (SpeedVac, Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA) segítségével beszáritottam, a cukorkomponenseket a 4.7 pontban bemutatott fluoreszcens jelölőoldattal jelöltem egy éjszakán át 37°C-on nyitott kupak mellett, beszáradásig [289]. A mágneses gyöngyökkel történő tisztítási lépést követően a mintákat a 4.7 pontban leírtak szerint kezeltem.

4.4. Anyai és gyermek szérum minták IgG és IgA glikozilációs analízise

A glikozilációs analízisre szánt mintákat a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársai bocsátották a rendelkezésemre, a minták gyűjtése a 172/2018-SZTE számú etikai engedélynek megfelelően történt. A résztvevők toborzása során a kutatásból történő kizáró okként határoztuk meg azokat a tényezőket, amelyek a túlsúlyon/elhízáson kívül fokozott kockázatot jelentenek a GDM kialakulására, illetve azokat, amelyek befolyásolhatják a glikánprofil. A kutatás során tejminták gyűjtésére is sor került a szérum mellett, és azokból nemcsak glikozilációs, hanem zsírsav analízis is történt a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem munkatársainak közreműködésével, így a mintavételi kritériumok összehangolását követően kizártuk az alanyokat a kutatásból ha:

- 1) az anya 1-es típusú diabétesz mellituszban szenvedett vagy
- 2) az anya valamilyen különleges étrendet követett
- 3) az anya és/vagy gyermek esetében genetikai rendellenességre derült fény
- 4) ikerterhesség és
- 5) császármetszéssel történő szülés [290].

A vérminták a szülést követő 12. héten kerültek levételre. A 3. táblázatban részletezett csoportok kialakítása során az anyai BMI értéket, valamint a GDM meglétét vettük figyelembe. $BMI \geq 30$ esetén az alanyok az elhízott, míg $BMI \leq 30$ érték esetén a normál testsúlyú csoportokba kerültek. Ennek megfelelően az alábbi csoportokat alakítottuk ki:

1. Normál testsúlyú anya GDM nélkül – HNW (Healthy Normal Weight)
2. Elhízott anya GDM nélkül – HOB (Healthy Obese)

3. Normál testsúlyú anya GDM-mel – NWGDM (Normal Weight with Gestational Diabetes Mellitus)
4. Elhízott anya GDM-mel – OGDM (Obese with Gestational Diabetes Mellitus)

Minden csoport 15 mintát tartalmazott, melyeket N-glikozilációs analízisük előtt pooloztam. A bevont alanyok részletes betegadatait a 3. táblázat tartalmazza. A csoportok anyáitól származó szérumból affinitás kromatográfiával tisztítottam az IgG és az IgA, a gyermekek szérumból pedig az IgG antitesteket.

3. táblázat: Kutatásba bevont anya-gyermek párok részletes adatai

Vizsgálati csoport	Anyák átlagéletkora (átlag év $\pm$ SD)	BMI (átlag $\pm$ SD)	Derék/Csípő arány (átlag $\pm$ SD)	Kihordás ideje (átlag hét $\pm$ SD)
HNW	26,47 $\pm$ 4,98	22,75 $\pm$ 1,21	0,82 $\pm$ 0,08	38,94 $\pm$ 1,91
HOB	26,20 $\pm$ 5,27	31,36 $\pm$ 1,43	0,87 $\pm$ 0,07	37,96 $\pm$ 1,41
NWGDM	27,87 $\pm$ 5,19	23,07 $\pm$ 1,83	0,84 $\pm$ 0,08	38,59 $\pm$ 0,88
OGDM	30,73 $\pm$ 7,21	32,49 $\pm$ 2,15	0,85 $\pm$ 0,05	39,96 $\pm$ 1,66

Az egyes adatok átlag $\pm$ SD (Standard Deviation, korrigált empirikus szórás) értékben kerültek feltüntetésre.

4.5. Szérumból minták előkészítése IgG és IgA N-glikozilációs analízisre

Az IgG mintákból történő specifikus kifogásához 40 μ L térfogatú Protein G, az IgA kifogásához 40 μ L térfogatú Ni-IMAC (Nickel Immobilized Metal Affinity Chromatography) kromatográfiás mikrooszlopokat (PhyNexus, San Jose, CA, USA) alkalmaztam. A félig automatizált IgG és IgA kifogási lépést a PhyNexus Inc. által a rendelkezésemre bocsátott PumpControl 2 szoftver és az általa vezérelt, szintén a cégtől kapott E4 XLS+ típusú elektronikus pipettával végeztem. A fehérje tisztítási lépéseket IgG esetében Mesko és mtsai. [291] által publikált eljárásnak a rendelkezésre álló mintamennyiségre történő optimalizálásával valósítottam meg.

IgA szérumból történő tisztításához Mészáros és mtsai. [292] által kidolgozott eljárást alkalmaztam, annak módosítását követően. A tisztítása során módosítottam az egyes pufferek összetételén, az alkalmazott szérumból, valamint puffer mennyiségeken és az oszlopokon történő folyadékáramlás paraméterein. A mikrooszlopok kondicionálása, valamint funkcionálása során

egyaránt imidazol mentes puffert alkalmaztam az eredeti (0,02 M NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; 0,05 M imidazol, pH 7,4) puffer helyett, mivel az IgA kifogásához alkalmazott Z(IgA1) már imidazolt tartalmazó pufferben (0,02 M Na₂HPO₄, 0,5 M NaCl, 0,5M imidazol) volt. Emellett csökkentettem a mosási lépések során használandó 500 µL puffermennyiséget 400 µL-re, a szükséges mintamennyiséget pedig 200 µL szérumból sikeresen csökkentettem 100 µL-re. Az eluált IgA antitesteket a teljes puffercsere érdekében a 10 kDa szűrőre történő átvitel követően 100 µL víz helyett 50 µL- vízzel mostam. A fehérjék denaturálását követően 29 µL 20 mM NaHCO₃ puffer (pH 7,0) helyett 49 µL NaHCO₃ puffer (pH 7,0) emésztő pufferben oldottam be 1 µL PNGase F enzimet, hogy a szűrő teljes felületét be tudjam borítani ezzel is elősegítve a fehérjékhez kötött glikánok minél hatékonyabb felszabadítását.

Az IgA specifikus megkötéséhez szükséges N-terminálisan 10 His-Tag-et tartalmazó Z(IgA1) affibody molekulákat a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet munkatársaitól kaptam további felhasználásra.

4.5.1. IgG tisztítása

Alkalmazott anyagok, oldatok:

Mikrooszlop: 1000+ PhyTip columns with Protein G

Maximális oszloptérfogat: 1000 µL

Protein G gyanta térfogat: 40 µL

Pufferek:

- 1) 5 x töménységű Felkötő/Mosó puffer I. (Puffer A): 50 mM NaH₂PO₄, 0,7 M NaCl (pH 7,4)
- 2) Mosó puffer II. (Puffer P): 140 mM NaCl
- 3) Eluáló puffer: frissen készített 10% ecetsav (pH 2,5)

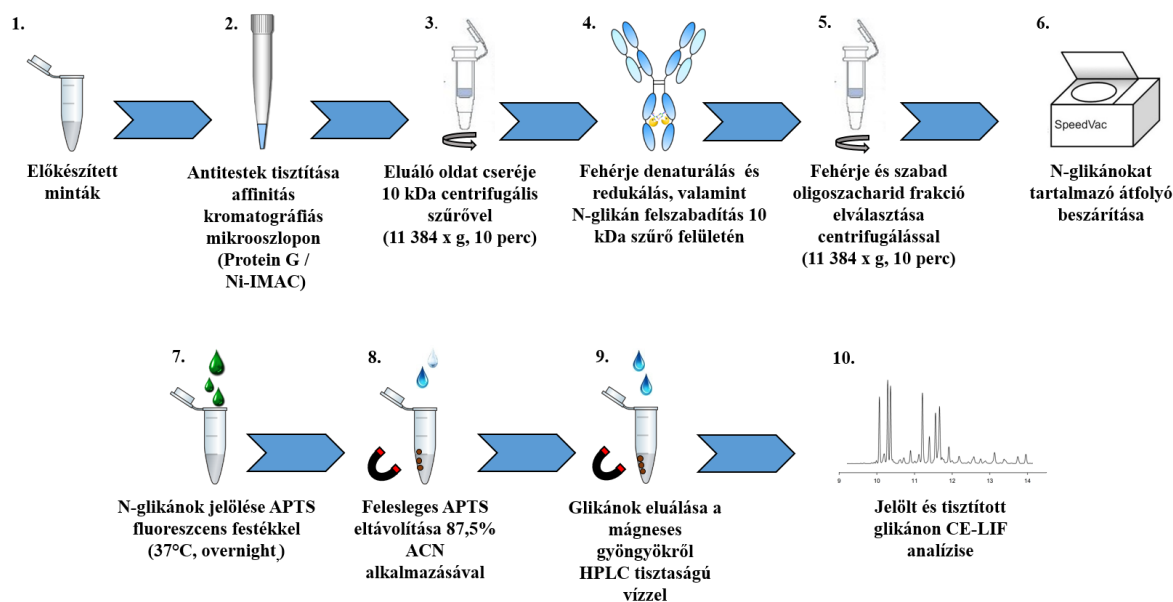
Az IgG szelektív kifogása során használt Felkötő/Mosó puffer I. (Puffer A), valamint a Mosó puffer II. (Puffer P) oldatok a PhyNexus által forgalmazott „Box of 96 PhyTip® columns (1 ml volume) containing 40 µl of Protein A affinity resin per column” csomag részét képezték.

A minták előkészítése a következők szerint történt:

A szérum minták 220 μL térfogatához azonos mennyiségű 1x töménységűre hígított Puffer A Felkötő/Mosó puffert adtam, majd a minták és a puffer keverékéből alapos vortexelést követően 400 μL került felvitelre az oszlopokra hegyenként azok 200 μL Puffer A oldattal történő előkészítése után. Az IgG felkötését követően 200 μL Puffer P pufferrel mostam a tölteteket, majd a felkötött antitesteket frissen készített 200 μL 10 % ecetsavval mostam le.

Mivel az eluáló puffer erősen savas kémhatású, így a töltetokről leoldott mintákat puffercsere és térfogatcsökkentés céljából 10 kDa centrifugális szűrőt tartalmazó mikrocentrifuga csőbe vittem át. Az ecetsavat 11 384 x g-vel 10 percig történő centrifugálással távolítottam el. Az esetlegesen a szűrőn maradó ecetsav eltávolítása érdekében 50 μL HPLC tisztaságú vizet adtam a szűrőhöz, majd 11 384 x g-vel ismét centrifugáltam azokat 10 percig. A fehérjék denaturálását a szűrő felületén végeztem 10 μL víz és 4 μL denaturáló oldat (400 mM DTT, 5% SDS) hozzáadásával (80°C; 10 perc). A termosztátban történő párolgás elkerülése érdekében az inkubálások során a mikrocentrifuga csövek tetejét minden esetben parafilmmeel vontam be. A denaturáló oldat centrifugálással történő eltávolítása után mostam a szűrő felületét 30 μL vízzel 11 384 x g-t alkalmazva 10 percig. A 10 kDa szűrőt áthelyeztem tiszta mikrocentrifuga csőbe, majd a felületén lévő denaturált és redukált fehérjék N-glikán tartalmát 49 μL 20 mM NaHCO_3 (pH 7,0) puffert és 1 μL PNGase F enzimet (200 mU) alkalmazva 37°C-on egy éjszakán át (overnight) történő inkubálással szabadítottam fel.

A felszabadított glikánokat lemostam a szűrőről 30 μL HPLC tisztaságú vízzel és 11 384 x g-vel 10 percig történő centrifugálással, majd vákuum centrifuga (Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA) alkalmazásával beszáritottam a szénhidrátot tartalmazó átfolyót. A bepárolt N-glikánokat 6 μL 20 mM APTS (15% ecetsavban feloldva) és 2 μL 1 M NaBH_3CN oldat (tetrahidrofuránban oldva) elegyével jelöltem meg 37°C-on 1 éjszakán át történő inkubálással. A jelölést követően a mintákat a kapilláris elektroforézissel történő analízisig a 4.7 pontban leírtak szerint kezeltem. Az antitestek kifogásának és a fehérjék glikozilációs analízisének leegyszerűsített lépéseit a 11. ábra mutatja.



11. ábra: Antitestek biológiai mintákból affinitás kromatográfia alkalmazásával történő tisztításának és glikozilációs vizsgálatának lépései

4.5.2. IgA tisztítása

Alkalmazott anyagok, oldatok:

Mikrooszlop: Ni-IMAC PhyTip columns

Maximális oszloptérfogat: 1000 μ L

Ni-IMAC gyanta térfogat: 40 μ L

Pufferek:

- 1) Z(IgA1) kötő puffer (Puffer A): 20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl (pH 7,4)
- 2) IgA kötő és mosó puffer (Puffer B): 50 mM imidazol, 20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl (pH 7,4)
- 3) Eluáló puffer (Puffer C): 20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 500 mM imidazol (pH 2,5)

A szérum minták 100 μ L térfogatához 900 μ L Puffer B IgA kötő és mosó puffert adtam. Az oszlopokat 400 μ L Puffer A oldattal előzetesen kondicionáltam, majd funkcionáltam Puffer A oldatban oldott 1 mL végtérfogatú 1 mg/mL végkoncentrációjú 10 His-tag Z(IgA1) oszlophoz történő immobilizálásával. Az affibody felkötését követően kétszer mostam a tölteteket 400 μ L Puffer B oldattal. Az IgA Z(IgA1) affibody-hoz történő kikötése után ismét mostam a nem specifikusan kötődött molekulák eltávolítása érdekében a mikrooszlopokat kétszer 500 μ L Puffer

B oldattal, majd eluáltam az oszlopokról a Z(IgA1)-IgA komplexet 200 μ L Puffer C alkalmazásával. A mintákat a továbbiakban a 4.5.1 pontban leírt mintaelőkészítési lépések szerint kezeltem, melyet egyszerűsítve a 11. ábra mutat be.

4.6. A tüdőrák és a COPD glikomikai analízise céljából gyűjtött minták

A kontroll, tüdőrákban, COPD-ben, valamint a két betegségben együttesen szenvedő (komorbid), vizsgálatba bevont alanyok szérum mintái közül vizsgálati csoportonként 100-100 darab került kiválasztásra, melyeket csoportonként pooloztam. Az egyes csoportokon belül a nemek aránya, valamint a résztvevők átlag életkora a 4. táblázatban foglaltak szerint alakult.

A minták gyűjtése a 23580-1/2015/EKU (0180/15) számon nyilvántartott etikai engedélyben foglaltaknak megfelelően a Miskolci Semmelweis Kórház és Egyetemi Oktatókórház (MISEK) Pulmonológia Osztályának munkatársai segítségével valósult meg.

A vizsgálatból kizártam azokat a pácienseket, akik egyéb tüdőbetegségben szenvedtek és azokat, akik esetében a tüdőrák, mint áttét jelentkezett. Kizártam továbbá a különböző autoimmun megbetegedéssel diagnosztizált pácienseket és a kábítószer-függő alanyokat.

4. táblázat: Az egyes vizsgálati csoportok adatai

Vizsgálati csoport	Nemek arány (férfi/nő)	Átlagéletkor $\pm$ SD (év)
Kontroll	61% / 39%	56,04 $\pm$ 14,46
COPD	52% / 48%	66,20 $\pm$ 9,68
Tüdőrák	64% / 34%	64,42 $\pm$ 9,05
COPD + Tüdőrák (Komorbid)	72% / 28%	65,19 $\pm$ 8,38

4.7. A szérum és standard glikoprotein minták előkészítése N-glikozilációs eltérések vizsgálatára

A fehérje standardok felhasználásával 10 mg/mL törzsoldatokat készítettem, melyekből a fehérjék méréseihez 10 -10 μ L térfogatot használtam fel. A standard fehérjekeveréket, mely az általam vizsgálni kívánt fehérjéket a fiziológias koncentrációtartományukon belül tartalmazta, az 5. táblázatban foglaltak szerint készítettem el. A humán szérum N-glikozilációs profiljának modellezésére megalkotott standard fehérje-keverék (Standard Protein Mixture – SPM) létrehozásához felhasznált minden glikoprotein oldat kiindulási koncentrációja 10 mg/mL volt az IgG kivételével, amely törzsoldata 50 mg/mL koncentrációban tartalmazta a fehérjét.

5. táblázat: Haptoglobin (Hp)-, transferrin (Tf)-, alfa-1-antitripszin (A1AT)-, IgA- és IgG fehérjék referencia koncentrációtartományai egészséges felnőtt ember szérumban [293]

Fehérje	Fiziológias koncentrációtartomány	Célkoncentráció a standard fehérje-keverékben
Hp	0,3-2,0 mg/mL	2,0 mg/mL
Tf	2,0-3,6 mg/mL	3,0 mg/mL
A1AT	0,9-2,0 mg/mL	1,0 mg/mL
IgA	0,7-4,0 mg/mL	2,1 mg/mL
IgG	7-16 mg/mL	7,0 mg/mL

A táblázat „Célkoncentráció a standard keverékben” nevű oszlopában feltüntetett értékek a fehérjék koncentrációit jelzik a szérumban glikozilációs profiljának modellezésre létrehozott standard fehérje-keverékben.

Az egyes glikoproteinek végső koncentrációját a standard fehérje-keverékben kísérleti úton határoztam meg, mely során a fehérjék koncentrációját a keverékben belül mindaddig módosítottam, amíg annak N-glikánprofilja hasonlóvá nem vált az emberi szérumban N-glikozilációs mintázatához. Az alkalmazott glikoproteinek tisztaságát azok glikozilációs analízise előtt SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével ellenőriztem, melyhez 10-20% Tris-Glicin előöntött géleket (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) használtam a gyártó utasításainak megfelelően.

A szérumban minták vizsgálatához minden esetben 2 µL szérumban 8 µL HPLC tisztaságú víz hozzáadásával hígítottam, fehérjetartalmukat 65°C-on 10 percig denaturáltam és redukáltam 5 µL előre elkészített denaturáló oldat hozzáadásával [60 µL 1x töménységűre hígított RIPA puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,25% nátrium-deoxikolat, 1% NP-40 és 1 mM EDTA), 10 µL 5% SDS és 10 µL 100 mM DTT]. A fehérjék N-kötött cukorstruktúráit enzimatisz emésztéssel, 1 µL PNGase F (200 mU) enzim és 50 µL víz hozzáadásával szabadítottam fel. A komplex glikán struktúrák hőmérséklet és pH-érzékeny α(2-3,6,8,9) kötött szialinsav egységeinek eltávolítása céljából a reakcióelegyhez 1 µL *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz (1 U) enzimet is adtam, majd a mintákat az enzimekkel 50°C-on 1 órában át inkubáltam. A mintákat ezt követően jégre helyezve 1 percig hűtöttem, majd fehérjéit 120 µL jéghideg acetonitril hozzáadásával kicsaptam. A kicsapott fehérjéket a cukor komponensektől 11 290 x

g centrifugális erő alkalmazásával választottam el. A centrifugálást 5 percig végeztem. A vizsgálni kívánt glikánokat tartalmazó felülúszót ezt követően vákuumcentrifuga segítségével beszárítottam, majd fluoreszcens jelölőoldat hozzáadásával [4 μ L 40 mM APTS (20% ecetsavban oldva), 2 μ L NaBH₃CN (1 M tetrahidrofuranban oldva) és 4 μ L 20% ecetsav] megjelöltem. A jelölési lépést 50°C-on 1 órán keresztül zárt kupakkal, majd a mintatartók kupakjainak felnyitását követően további 1 órán át 55°C-on [289] beszáradásig végeztem. A jelölt mintákat ezt követően mágneses gyöngyök alkalmazásával tisztítottam meg a feleslegben alkalmazott fluorofór jelölő ágenstől. Ezen tisztítási lépés során a mintákhoz acetonitril került hozzáadásra annak érdekében, hogy az oldatban a 87,5% acetonitril koncentrációt elérjem, mely végkoncentráció a cukrok mágneses gyöngyökhöz történő kötődésének ideális koncentrációja [294]. A glikánokat a gyöngyökről HPLC tisztaságú vízzel eluáltam, majd vagy azonnal kapilláris elektroforézissel analizáltam, vagy későbbi mérés céljából -20°C-on tároltam.

4.8. A kapilláris elektroforezis készülék

A kapilláris elektroforetikus mérések kivitelezéséhez lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott PA800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készüléket használtam. A detektáláshoz a mintákban lévő APTS festéket Ar-ion lézer által kibocsátott 488 nm hullámhosszúságú fénnel gerjesztettem, a festék által emittált fényt emissziós filter segítségével (520 nm) gyűjtöttem. Az elválasztások során 50 cm effektív hosszúságú (60 cm teljes hosszúságú), 50 μ m belső átmérőjű nem bevont falú úgynevezett BFS (Bare Fused Silica) kapillárist használtam. A kapillárisokat HR-NCHO (pH 4,75) vagy NCHO (pH 4,75) elválasztó gél pufferekkel töltöttem fel, melyekbe a mintát HR-NCHO gél esetén elektrokinetikusan, NCHO gél esetén pedig nyomás alkalmazásával injektáltam. A készüléket az elválasztások során fordított polaritás üzemmódban (katód az injektálási oldalon, anód a detektálási oldalon) használtam. A mérések során alkalmazott elválasztási körülmények minden esetben feltüntetésre kerültek az elektroferogramok alatt.

4.9. Adatok kiértékelése

Az adatok gyűjtésére és feldolgozására a 32Karat (10.1 verzió) szoftvercsomagot (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) használtam. A mérések eredményeiként kapott elektroferogramok csúcsai a glükóz egység (GU) értékeik alapján hozzárendelhetők az egyes

glikánstruktúrákhoz. A GU értékek a minta csúcsainak, valamint a mintákhoz futtatott maltooligoszacharid létra glükóz oligomerjeinek migrációs ideje alapján számíthatók ki. A mérés során belső standardként APTS jelölt maltózt is injektáltam a mintákkal együtt. A GU értékek kiszámítását a GUcal szoftverrel végeztem (www.gucal.hu) [295]. Az N-glikán struktúrák csúcsokhoz rendelését a szoftver beépített adatbázisának felhasználásával, irodalmi adatok alapján és külső adatbázisban történő keresés révén végeztem (www.glycostore.org). A vizsgált minták N-glikán tartalmának azonosítása során az elektroferogramok azon csúcsait tekintettem N-glikán szerkezetnek, amelyek átlagos relatív csúcsalatti területszázaléka elérte a minimum 1% (területszázalék $\geq 1\%$) értéket. Az elválasztott komponensek normalizált csúcsalatti területének százalékos értékeit a PeakFit v4.12 szoftverrel (SeaSolve Software Inc., San Jose, CA, USA) számoltam ki.

4.10. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzése során a PeakFit szoftver alkalmazásával kapott adatok átlagértékeit és azok standard hibáit határoztam meg, melyek átlag $\pm$ SD-ként vannak feltüntetve a bemutatásra kerülő táblázatokban, diagrammokon és a szövegben egyaránt. Statisztikai analízist GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; 8.0.1 verzió) szoftverrel azon szerkezetek esetében végeztem, amelyek átlagos csúcsalatti területszázaléka legalább egy vizsgálati csoport esetében elérte az 1% küszöbértéket.

Az adatok eloszlásának vizsgálatához minden esetben Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztam.

A szobahőmérsékleten eltelt időnek a minta N-glikán kompozíciójára kifejtett hatásának vizsgálata során, mivel nem minden csúcs mutatott normál eloszlást, Friedman próbát alkalmaztam [296], Dunn *post hoc* tesztjével kiegészítve [297]. A minták N-glikán szerkezeteinek szíálsav/neutrális arányának alakulását Friedman próbával és Dunn tesztjével vizsgáltam. A poolozott minták esetében a 150 percig tárolt minta szíálsav/neutrális szerkezeteinek elemzésekor tapasztalt szórásnövekedés miatt ROUT aoutlier analízist végeztem (Q=1%).

Az anyai és gyermek szérum IgG és IgA immunglobulinok N-glikozilációs analízise során Kruskal-Wallis tesztet végeztem, mely után a csoportok közti eltérés vizsgálatára Dunn tesztjét alkalmaztam. A minták N-glikán szerkezeteinek szíálsav/neutrális arányának alakulását az adatok normál eloszlása esetén egyszempontos varianciánálízissel (One way ANOVA) és Tukey tesztel, ellenkező esetben Dunn tesztjével vizsgáltam.

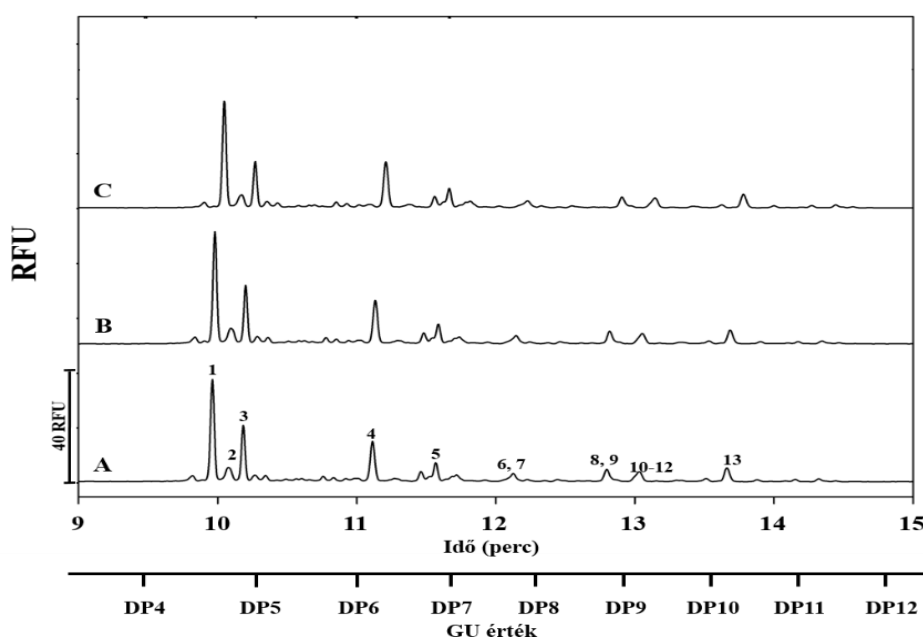
A kontroll, COPD, tüdőrák és a két betegség együttes előfordulásában szenvedő betegektől származó minták esetében Kruskal-Wallis tesztet végeztem.. A vizsgálati csoportok közötti eltérés meghatározásához Dunn tesztjét alkalmaztam *post hoc* analízisként [298].

A statisztikai elemzés során a különbségeket $p \leq 0,05$ érték esetén tekintettem szignifikánsnak, melyet az ábrákon * jelöl az alábbiak szerint: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

5. Eredmények

5.1. Humán szérum N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten (24-25°C) történő tárolás során

A kísérletekhez felhasznált minták a dolgozat 4.2, 4.3, valamint 4.8 pontjai szerint kerültek feldolgozásra. Mivel a szialsavak számos biológiai folyamatban kiemelkedő szerepet játszanak [299], így e kísérletem során különös figyelmet fordítottam a komplex glikán szerkezetek szialsav tartalmának megőrzésére. A munka jelen szakaszában célom az volt, hogy megfigyeljem a szobahőmérséklet hatását a szérum minták neutrális, valamint szialsavat tartalmazó N-glikán szerkezeteire az eltelt idő függvényében. Az egyéni méréseket 3 mintán végeztem. Az egyes időpontokhoz tartozó reprezentatív elektroferogramokat a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra: Humán szérum APTS jelölt N-glikánprofiljának alakulása a mintavételtől a centrifugálásig eltelt idő hatására

A) 30 perc (kontroll); B) 90 perc; C) 270 perc a centrifugálásig szobahőmérsékleten. Az elválasztás körülményei: 50 cm effektív hosszúságú (60 cm teljes hossz) BFS kapilláris 50 μ m belső átmérővel; NCHO elválasztó puffer; Az elválasztási hőmérséklet: 25°C; Feszültség: 30 kV (fordított polaritás módban – katód az injektálási oldalon); Injektálási sorrend: 1)

mintainjektálás: 1 psi nyomással 5 másodpercig, 2) maltóz injektálás: 1 psi nyomással 5 másodpercig.

A szérumból minták glikozilációs analízise során 13 fő (legalább 1% területszázalékot elérő) N-kapcsolt glikán szerkezetet azonosítottam, melyek esetleges csúcsarány eltéréseit vizsgáltam. A minták elemzése során azt tapasztaltam, hogy a szobahőmérsékleten történő tárolásnak minimális hatása volt a szérumból teljes N-glikánprofiljára. Mivel főként a szialosavak struktúrák arányának alakulása volt az érdeklődésem középpontjában, így ezen struktúráknak (SF - sialoform) a neutrális szerkezetekhez (NF – neutral form) való viszonyát értékeltem (SF/NF ratio). A kiértékelte adatok szerint az idő előrehaladtával a szialilált szerkezetek aránya ugyan kismértékű, de folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott. A kontroll minta esetében ez az arány $3,40 \pm 0,12$, míg a 90 perces és 270 perces időpontok esetében $3,26 \pm 0,38$, valamint $3,32 \pm 1,29$ volt. A 150 perces szobahőmérsékleten tárolt szérumból minta (elektroferogram nem került ábrázolásra) esetében a szialiláltság mértékének tendenciális csökkenését tapasztaltam ($1,89 \pm 0,20$), amely érdekes módon a 270 perces tárolt minta esetében megnőtt. A SF/NF arányok alakulását statisztikai elemzésnek alávetve azonban nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a csoportok között. A struktúrák részletes adatait a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: Humán szérumból azonosított N-glikán szerkezetek és azok százalékos arányának alakulása (átlag $\pm$ SD) a mintavételtől a centrifugálásig szobahőmérsékleten eltelt idő hatására

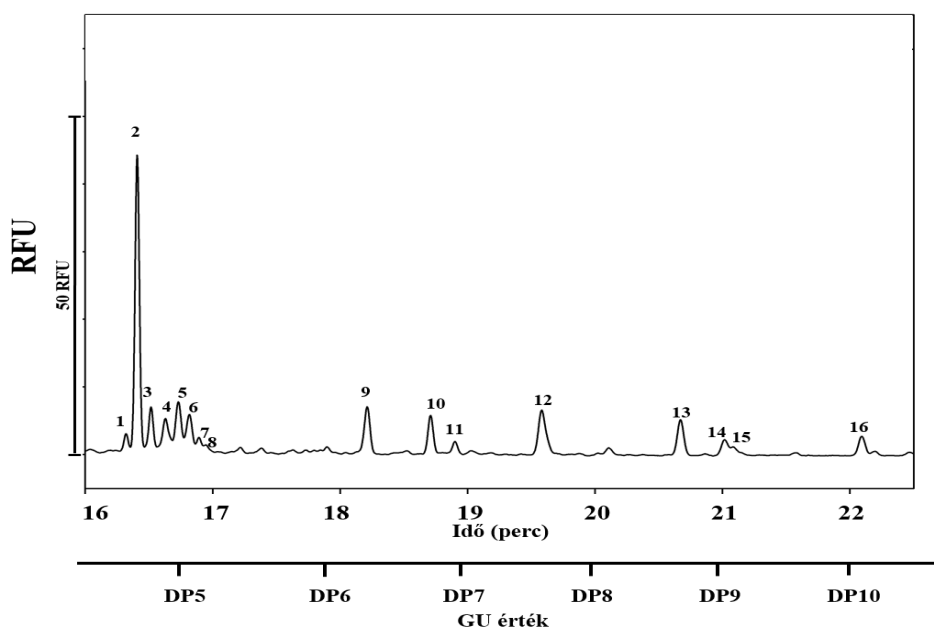
Csúcs szám	N-glikán struktúra	Kontroll (30 perc) Terület % (átlag $\pm$ SD)	90 perc Terület % (átlag $\pm$ SD)	150 perc Terület % (átlag $\pm$ SD)	270 perc Terület % (átlag $\pm$ SD)
1	A2G2S2	$31,51 \pm 1,04$	$31,28 \pm 1,98$	$25,74 \pm 1,23$	$31,17 \pm 5,97$
2	A2BG2S2 M3	$7,67 \pm 0,16$	$7,06 \pm 0,71$	$4,78 \pm 0,55$	$5,73 \pm 1,65$
3	FA2BG2S2	$16,27 \pm 0,38$	$15,38 \pm 0,83$	$9,60 \pm 1,36$	$12,26 \pm 4,43$
4	A2G2S1	$15,44 \pm 0,40$	$16,25 \pm 1,06$	$19,20 \pm 0,76$	$19,28 \pm 3,31$
5	FA2G2[3]S1	$6,37 \pm 0,17$	$6,43 \pm 0,31$	$6,01 \pm 0,29$	$6,62 \pm 0,31$
6	M6	$4,05 \pm 0,15$	$4,28 \pm 0,19$	$6,71 \pm 0,15$	$4,28 \pm 1,76$
7	FA2				
8	FA2[6]G1	$4,94 \pm 0,23$	$5,14 \pm 0,46$	$8,39 \pm 0,43$	$5,67 \pm 2,03$
9	M7	$1,62 \pm 0,15$	$1,53 \pm 0,06$	$1,39 \pm 0,49$	$0,98 \pm 0,43$
10	FA2[3]G1	$2,23 \pm 0,39$	$2,35 \pm 0,23$	$3,41 \pm 0,25$	$1,42 \pm 0,60$
11	FA2B[6]G1	$3,82 \pm 0,23$	$3,89 \pm 0,46$	$5,77 \pm 0,69$	$5,11 \pm 1,78$
12	M8				

13	FA2G2	$6,09 \pm 0,23$	$6,41 \pm 0,76$	$9,00 \pm 0,70$	$7,50 \pm 2,39$
----	-------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

A csúcsok számozása a 12. ábrának megfelelően került feltüntetésre.

A minták szialsavtartalmának változása bár nem volt statisztikailag szignifikáns, mégis a 150 és 270 percig szobahőmérsékleten tárolt minták esetében észleltek miatt a továbbiakban azt vizsgáltam, hogy vajon egyedi esetről van-e szó, vagy ez az anomália több minta vizsgálata során is felmerül.

Az esetleges egyéni eltérések figyelembevétele céljából 8 egészséges önkéntes szérum mintájának poolozásával kapott glikánprofil alakulását tanulmányoztam, mely kísérlet eredményeit a továbbiakban ismertetem. A kísérletek során AmAc (16,7 mM, pH 6,9) oldatot alkalmaztam az N-glikánok fehérjékről történő enzimatis felszabadítása során pufferként, méréseimet a nagyobb felbontást biztosító HR-NCHO elválasztó pufferben végeztem, referencia elektroferogramot a 13. ábra reprezentálja. A mérési adatok kiértékelése során 16 glikán szerkezetet azonosítottam, melyhez a Mészáros és mtsai. [300] által publikált eredmények szolgáltak alapul.

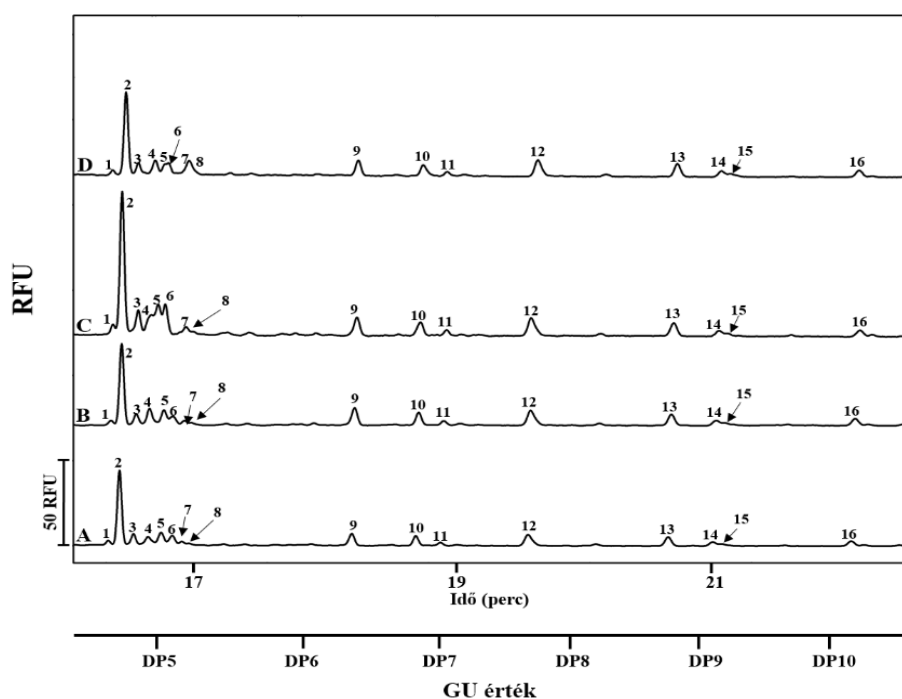


13. ábra: Kontroll humán szérum referencia N-glikánprofilja. A minta centrifugálása és fagyasztása a dolgozat 4.2 pontjának megfelelően történt

Elválasztás körülményei: 50 cm effektív hosszúságú (60 cm teljes hossz) BFS kapillaris 50 μ m belső átmérővel; HR-NCHO elválasztó gél puffer; Az elválasztási hőmérséklet: 30 ° C; Feszültség: 30 kV (fordított polaritás módban); Injektálási sorrend: 1) 5 psi nyomással 5 másodpercig víz előinjektálás, 2) 1 kV feszültséggel 1 másodpercig mintainjektálás és 3) 1 kV feszültséget 1 másodpercig alkalmazva maltóz belső standard injektálás.

A 13. ábra elektroferogramján GU 5,25 értékig többszörösen szialilált glikán struktúrákat azonosítottam. Az alacsony szíalsavtartalmú szerkezetek GU 6,4 és 7,06 között, a neutrális szerkezetek pedig GU 7,73, valamint 10,23 között figyelhetők meg. Az egyes időpontokhoz tartozó minták mérési elektroferogramjait a 14. ábra, kiértékelt adatait a 7. táblázat tartalmazza. Az adatok kiértékelését követően összevettem az egyes időpontokhoz tartozó minták esetében a szíalsavas, illetve neutrális struktúrák arányának alakulását. A kontroll időpont esetében, amely hasonlóan az előző mérésekhez 30 percig volt tárolva szobahőmérsékleten centrifugálás előtt, ez az arányszám $3,73 \pm 0,33$ volt. Ahogy egyre hosszabb ideig tároltam a szérum mintákat hűtés nélkül a centrifugálásig, a szíalsavas csúcsok aránya csökkenő tendenciát mutatott, a 90 perces időpont esetében $3,35 \pm 0,46$, a 270 perces tárolt minta esetében pedig $3,07 \pm 0,18$. Az egyéni variancia kiküszöbölésére irányuló poolozott minták elemzése során a 150 perces tárolt szérum minták esetében a kontrollt is meghaladó szíalsavarány növekedést tapasztaltam. A 150

perces időponthoz tartozó minták esetében ugyanis a terminális szialsavat tartalmazó szerkezetek aránya a neutrális struktúrákhoz viszonyítva $7,48 \pm 2,02$ értéket mutatott, amely azonban Friedman teszt során nem bizonyult szignifikáns növekedésnek a kontrollhoz képest ($p=0,1708$). A növekedés mértéke a 90 perces ($p=0,0115$) és a 270 perces ($p<0,0001$) mintákkal összevetve is szignifikánsnak bizonyult. A szialsavas és neutrális szerkezetek aránya azonban nem mutatott szignifikáns eltérést sem a kontroll és 90 perces ($p>0,9999$), sem a kontroll és a 270 perces ($p=0,1057$), sem pedig a 90 és 270 perces ($p=0,8648$) minták esetében. A 150 percig tárolt mintához tartozó emelkedett szórásértékek miatt az adatokat Rout outlier elemzésnek vettem alá, mely során nem tapasztaltam az adatsorból kiugró értékeket. A szérumból vett minták N-glikozilációs mintázatának alakulását a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra: Humán szérumból vett APTS jelölt N-glikánprofiljának alakulása a mintavételtől a centrifugálásig eltelt idő hatására

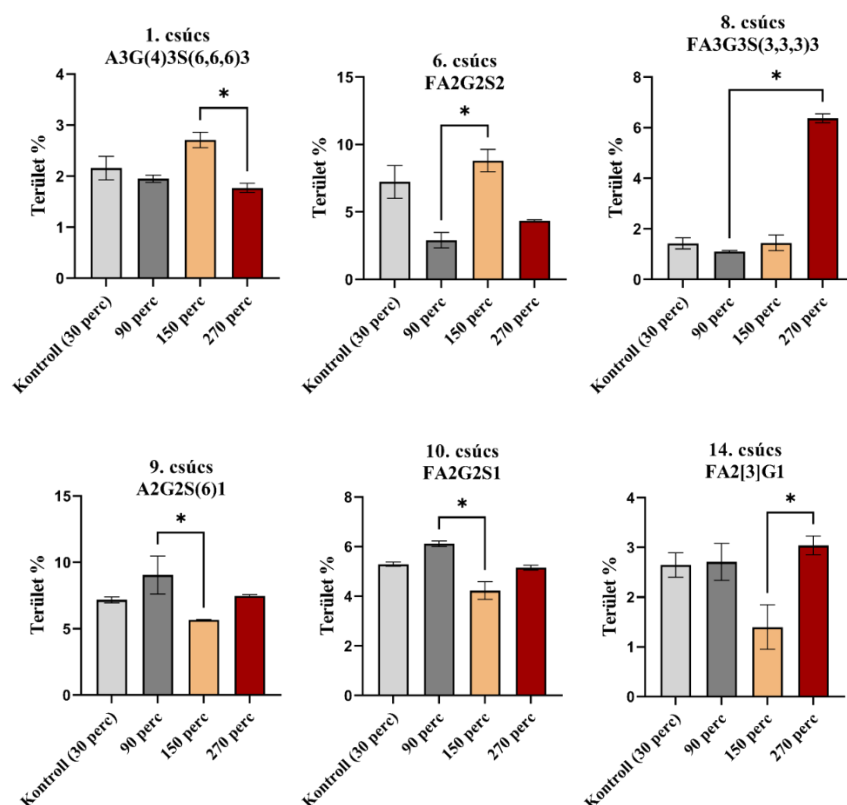
A) 30 perc (kontroll); B) 90 perc; C) 150 perc és D) 270 perc a centrifugálásig szobahőmérsékleten.

7. táblázat: Emberi szérum minták N-glikán szerkezeteinek alakulása szobahőmérsékleten történő tárolás hatására

Csúcsszám	N-glikán stuktúra	GU érték	Kontroll	90 perc	150 perc	270 perc
			Terület % (átlag ± SD)	Terület % (átlag ± SD)	Terület % (átlag ± SD)	Terület % (átlag ± SD)
1	A3G(4)3S(6,6,6)3	4,73 ± 0,05	2,16 ± 0,23	1,95 ± 0,07	2,71 ± 0,15	1,77 ± 0,09
2	A2G(4)2S(6,6)2	4,8 ± 0,04	33,58 ± 0,65	31,56 ± 1,86	37,04 ± 2,28	30,56 ± 0,50
3	FA3G3S(6,6,6)3	4,89 ± 0,05	5,45 ± 0,10	5,02 ± 0,40	6,85 ± 0,87	4,82 ± 0,16
4	A2G(4)2S(3,3)2	4,98 ± 0,04	5,50 ± 0,11	7,16 ± 0,15	7,48 ± 1,02	6,58 ± 0,11
5	A2BG2S2	5,05 ± 0,05	7,43 ± 0,14	8,22 ± 0,32	8,89 ± 1,75	3,67 ± 0,07
6	FA2G2S2	5,1 ± 0,05	7,23 ± 1,22	2,91 ± 0,57	8,8 ± 0,82	4,34 ± 0,08
7	F(6)A2BG(4)2S(3,6)2	5,21 ± 0,05	2,05 ± 0,36	2,02 ± 0,13	2,72 ± 0,43	3,21 ± 0,22
8	FA3G3S(3,3,3)3	5,25 ± 0,05	1,42 ± 0,22	1,1 ± 0,05	1,45 ± 0,31	6,37 ± 0,17
9	A2G2S(6)1	6,4 ± 0,05	7,17 ± 0,22	9,04 ± 1,43	5,66 ± 0,02	7,46 ± 0,11
10	FA2G2S1	6,87 ± 0,04	5,29 ± 0,09	6,11 ± 0,12	4,23 ± 0,35	5,15 ± 0,10
11	FA2BG2S1,M5	7,06 ± 0,05	1,88 ± 0,06	2,18 ± 0,13	1,9 ± 0,21	1,93 ± 0,01
12	FA2, M6	7,73 ± 0,02	7,87 ± 0,89	8,63 ± 1,07	4,64 ± 1,86	9,00 ± 0,32
13	FA2[6]G1, M7	8,82 ± 0,02	5,25 ± 0,49	6,02 ± 0,73	3,26 ± 1,28	6,61 ± 0,33
14	FA2[3]G1	9,16 ± 0,03	2,65 ± 0,25	2,71 ± 0,37	1,4 ± 0,45	3,04 ± 0,19
15	FA2B [6]G1, M8	9,23 ± 0,02	1,42 ± 0,04	1,53 ± 0,22	0,8 ± 0,18	1,69 ± 0,09
16	FA2G2	10,23 ± 0,03	3,64 ± 0,04	3,84 ± 0,28	2,17 ± 0,16	3,80 ± 0,18

A csúcsszámok a 13. ábra szerint vannak feltüntetve.

A kapott eredmények jobb megértése érdekében statisztikai analízist végeztem a relatív csúcsalatti területszázalék értékek felhasználásával. A mintaszámra, valamint az adatok nem-normál eloszlására való tekintettel Friedman próbát alkalmaztam Dunn *post hoc* tesztjével kiegészítve. A kapott eredményeket a 15. ábra reprezentálja, amelyen a statisztikai szempontból szignifikáns eltéréseket a csillag (*) jelöli. A statisztikai elemzés részletes eredményét a 8. táblázat tartalmazza.



15. ábra: Szobahőmérsékleten történő tárolás hatása az emberi szérum minták N-glikozilációjára

A statisztikailag szignifikáns eltérések az alábbiak szerint kerültek feltüntetésre: * $p < 0,05$

A szérum első csúcsa esetében (A3G(4)3S(6,6,6)) szignifikáns eltérést figyeltem meg a 150 ($2,71\% \pm 0,15$) és 270 ($1,77\% \pm 0,09$) perces tárolt minták között a csúcs százalékos területében ($p=0,0266$). Ezen két időpont esetében szignifikáns csúcsarány növekedés volt megfigyelhető a 270 perces időpont javára, továbbá a 14. csúcsot adó FA2[3]G1 szerkezet esetében is jelentős növekedést tapasztaltam (150 perc: $1,4\% \pm 0,45$; 270 perc: $3,0\% \pm 0,19$; $p=0,0266$). A 270 perces időpontot vizsgálva tekintélyes növekedést tapasztaltam a 90 perces tárolt szérum

mintával összehasonlítva (270 perc: $6,37\% \pm 0,17$; 90 perc: $1,42\% \pm 0,22$; $p=0,0266$) a 8. számú csúcsok esetében. Az időpontokhoz tartozó mérési adatok elemzése során további három aszparagin-kötött glikán szerkezetnél kaptam még szignifikáns eltérést. A 9., valamint a 10. csúcsot adó A2G2S(6)1 (90 perc: $9,04\% \pm 1,43$; 150 perc: $5,66\% \pm 0,02$; $p=0,0266$) és FA2G2S1 (90 perc: $6,11\% \pm 0,12$; 150 perc: $4,23\% \pm 0,35$; $p=0,0266$) szerkezetek esetében idővel csökkenés volt tapasztalható a 90 és a 150 percig tárolt minták között. Az elektroferogramon 6. számmal feltüntetett FA2G2S2 szerkezet esetében érdekes csúcsaránynövekedést tapasztaltam a 90 és 150 percig szobahőmérsékleten tárolt szérumban minták között azok N-glikozilációs analízise során (90 perc: $2,91\% \pm 0,57$; 150 perc: $8,8 \pm 0,82$; $p=0,0266$). A statisztikai elemzés során kapott p értékeket a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: Szobahőmérsékleten történő tárolás hatásának Friedman teszttel és Dunn *post hoc* analízissel végzett statisztikai elemzésének eredménye az emberi szérum minták N-glikozilációjára

	Kontroll vs. 90 perc	Kontroll vs. 150 perc	Kontroll vs. 270 perc	90 perc vs. 150 perc	90 perc vs. 270 perc	150 perc vs. 270 perc
1. csúcs A3G(4)3S(6,6,6)3	>0,9999	>0,9999	0,3467	0,3467	>0,9999	0,0266
2. csúcs A2G(4)2S(6,6)2	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3467	>0,9999	0,0685
3. csúcs FA3G3S(6,6,6)3	0,6831	>0,9999	>0,9999	0,0685	>0,9999	0,1611
4. csúcs A2G(4)2S(3,3)2	0,1611	0,1611	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
5. csúcs A2BG2S2	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,1611	0,1611
6. csúcs FA2G2S2	0,3467	>0,9999	>0,9999	0,0266	>0,9999	0,3467
7. csúcs F(6)A2BG(4)2S(3,6)2	>0,9999	0,6831	0,3467	0,3467	0,1611	>0,9999
8. csúcs FA3G3S(3,3,3)3	>0,9999	>0,9999	0,6831	0,6831	0,0266	>0,9999
9. csúcs A2G2S(6)1	0,3467	>0,9999	>0,9999	0,0266	>0,9999	0,3467
10. csúcs FA2G2S1	>0,9999	0,3467	>0,9999	0,0266	0,3467	>0,9999
11. csúcs FA2BG2S1;M5	0,1611	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
12. csúcs FA2, M6	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,1611	>0,9999	0,1611
13. csúcs FA2[6]G1; M7	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3467	>0,9999	0,0685
14. csúcs FA2[3]G1	>0,9999	>0,9999	0,6831	0,6831	>0,9999	0,0266

15. csúcs FA2B [6]G1; M8	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3467	>0,9999	0,0685
16. csúcs FA2G2	>0,9999	0,6831	>0,9999	0,3467	>0,9999	0,1611

*A csoportok közötti eltérést a kapott p érték függvényében tekintetem a szignifikánsnak az alábbiak szerint: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szignifikáns különbségeket jelző p értékeket piros színnel jelöltem.*

5.2. Az anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása

5.2.1. Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációjának összehasonlítása

A PhD munkám második szakaszában az anya és gyermek szérumból Protein G affinitás kromatográfiás mikrooszlopok alkalmazásával tisztított IgG antitestek N-glikozilációs módosulásait tanulmányoztam, mely során meghatároztam az anyai és a gyermek szérum mintákban lévő IgG antitestek N-glikán struktúráit. Az adatok elemzésekor kizárólag az elektroferogramok azon csúcsaihoz rendeltem irodalmi adatok és adatbázisban történő keresést követően N-glikán szerkezetet a csúcsok GU-értékei alapján, amelyek relatív területszázalék értéke a kontroll csoporthoz tartozó minták esetében elérték a legalább 1% értéket.

A normál testsúlyú anyák, illetve gyermekeik szérum mintáiból tisztított IgG glikoproteinekről nyert N-glikánprofilt a 16. ábra I. része a mutatja.

Az egészséges normál testsúlyú (kontroll) édesanyák csoportjából izolált IgG antitestek N-glikozilációjának vizsgálata során 14 olyan szerkezetet sikerült azonosítanom, amelyek megfeleltek az általam korábban meghatározott és fent leírt kritériumnak (átlagos relatív területszázalék $\geq 1\%$). Ugyezen feltételnek a gyermekek szérum mintáinak IgG-eredetű glikánprofilját vizsgálva 13 csúcs felelt meg. Az általam vizsgált 4 csoport IgG glikozilációjának vizsgálati eredményeit a dolgozat 5.2.2, valamint 5.2.3 pontjában mutatom be. Az azonosított csúcsokhoz tartozó N-glikán struktúrák, a csúcsok számolt GU-értékei, valamint a mintatípus, amelyben azonosítottam az adott szerkezetet a 9. táblázatban kerülnek bemutatásra..

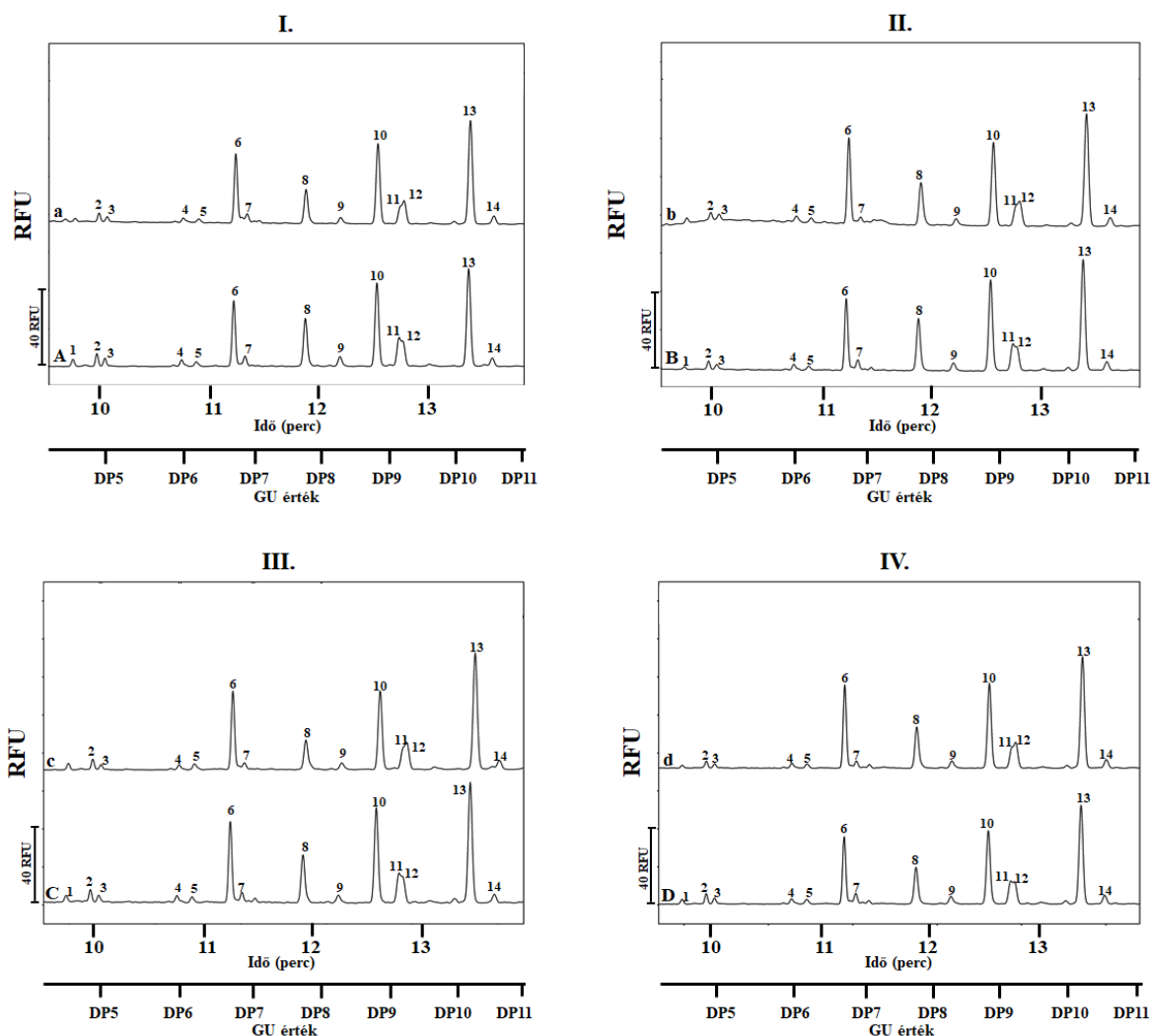
9. táblázat: Anya és gyermek szérum mintákból tisztított IgG azonosított glikán szerkezetei és a struktúrákhoz tartozó GU értékek átlag $\pm$ SD)

Csúcsszám	N-glikán struktúra	GU	Mintatípus
1	A2G2S2	4,62 $\pm$ 0,01	anya szérum
2	FA2G2S2	4,90 $\pm$ 0,01	anya és gyermek szérum
3	FA2BG2S2	5,00 $\pm$ 0,01	anya és gyermek szérum
4	FA2(3)G1S1	5,98 $\pm$ 0,02	anya és gyermek szérum
5	A2G2S1	6,19 $\pm$ 0,02	anya és gyermek szérum

6	FA2G2S1	$6,71 \pm 0,02$	anya és gyermek szérum
7	FA2BG2S1	$6,87 \pm 0,02$	anya és gyermek szérum
8	FA2	$7,77 \pm 0,03$	anya és gyermek szérum
9	FA2B	$8,29 \pm 0,03$	anya és gyermek szérum
10	FA2 [6]G1	$8,85 \pm 0,03$	anya és gyermek szérum
11	FA2 [3]G1	$9,18 \pm 0,03$	anya és gyermek szérum
12	FA2B [6]G1	$9,23 \pm 0,03$	anya és gyermek szérum
13	FA2G2	$10,22 \pm 0,04$	anya és gyermek szérum
14	FA2BG2	$10,57 \pm 0,04$	anya és gyermek szérum

Az azonosítás során a legalább 1% területtel rendelkező csúcsokat vettem figyelembe. A táblázat számozása megfelel a 16. ábrán feltüntetett számozásnak.

Az IgG N-glikán szerkezeteinek meghatározásakor az IgG aszparagin-kötött 14 glikán szerkezetéből 7 terminális szíálsavval rendelkezik az édesanyák esetében. A gyermekek esetében az anyáknál 1. csúcsként megjelölt és A2G2S2 struktúraként azonosított csúcs relatív területszázalék értéke nem érte el az 1%-ot, így ezt a struktúrát a további analízis során nem vettem figyelembe, ebből adódóan a gyermekek szíálsavval terminált N-glikán szerkezeteinek száma 6. A struktúrák területeinek százalékos megoszlását a dolgozat későbbi pontjaiban részletesen ismertetem. Az anya-gyermek párok reprezentatív mérési elektroferogramjait a 16. ábra mutatja.



16. ábra: Anyai és gyermek szérum minták IgG tartalmának N-glikozilációja

Elválasztás körülményei megegyeztek a 7. ábra alatt leírt mérési körülményekkel. I. HNW anyák (A) csoportja és gyermekeik (a); II. HOB anyák (B) és gyermekei (b); III. NWGDM anyák (C) és gyermekeik (c); IV. OGDM anyák (D) és gyermekeik (d)

Az egyes szerkezetekhez tartozó relatív területszázalék értékek meghatározását követően összevettem az anyai és a hozzájuk tartozó gyermekek csoportjainak szérum mintáiból izolált IgG N-glikán szerkezetek szialiláltságának alakulását annak érdekében, hogy megvizsgáljam az anya és gyermeke közötti glikozilációs hasonlóságot. A szíalsavas-neutrális szerkezetek arányának összehasonlítása során az egészséges, normál testsúlyú anyák és gyermekeik (HNW anyák SF/NF=0,33 ± 0,01; HNW anyák gyermeke SF/NF=0,30 ± 0,03; p=0,026); valamint az egészséges, de túlsúllyal küzdő anyák és gyermekeik között (HOB anyák SF/NF=0,29 ± 0,02; HOB anyák gyermekei SF/NF=0,34 ± 0,02; p=0,0087) találtam statisztikailag szignifikáns

eltérést. A terhesség során GDM-mel diagnosztizált édesanyák és gyermekeik között függetlenül az anyák BMI státuszától, nem tapasztaltam szignifikáns eltérést az IgG N-glikozilációjának szialilációját vizsgálva. Az SF/NF arány az NWGDM csoportban az anyák esetében $0,33 \pm 0,02$, a gyermekek esetében pedig $0,33 \pm 0,00$ értéknek adódott ($p=0,3939$). Az OGDM csoportban az édesanyák ($0,32 \pm 0,02$) és gyermekeik ($0,30 \pm 0,01$) esetében is alacsonyabb értéket kaptam, mint az NWGDM csoport értékei. A szerkezetek arányának statisztikai összehasonlítása az OGDM gyermekek és édesanyáik között nem adott szignifikáns eltérést ($p=0,1797$). Az egyes csoportok anyai és gyermek mintáihoz tartozó részletes szerkezeti adatokat a dolgozat további, 5.2.2 és 0 pontjaiban részletesen is bemutatom.

5.2.2. Anyai elhízással és gesztációs diabétesszel szövődött terhesség hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára

A szérum minták IgG tartalmának N-glikozilációs vizsgálatában a szerkezetmeghatározás után a következő lépés a különböző vizsgálati csoportok mérési adataink összevetése volt. Az édesanyák csoportjainak kiértékelt csúcsalatti területszázalék értékeit a 10. táblázat tartalmazza részletesen.

10. táblázat: Anyai szérum minták IgG fehérje-eredetű N-glikán szerkezetei és a struktúrák relatív csúcsalatti területének %-os megoszlása (átlag $\pm$ SD)

Csúcsszám	N-glikán struktúra	HNW anyák (Terület % átlag $\pm$ SD)	HOB anyák (Terület % átlag $\pm$ SD)	NWGDM anyák (Terület % átlag $\pm$ SD)	OGDM anyák (Terület % átlag $\pm$ SD)
1	A2G2S2	$1,46 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,16$	$0,79 \pm 0,22$
2	FA2G2S2	$2,43 \pm 0,06$	$1,59 \pm 0,17$	$2,27 \pm 0,10$	$1,91 \pm 0,28$
3	FA2BG2S2	$1,61 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,24$	$1,41 \pm 0,14$	$1,19 \pm 0,17$
4	FA2(3)G1S1	$1,45 \pm 0,12$	$1,48 \pm 0,55$	$1,27 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,01$
5	A2G2S1	$1,12 \pm 0,07$	$1,20 \pm 0,49$	$1,31 \pm 0,21$	$1,03 \pm 0,15$
6	FA2G2S1	$14,20 \pm 0,16$	$14,10 \pm 0,45$	$15,14 \pm 0,31$	$15,51 \pm 0,21$
7	FA2BG2S1	$2,30 \pm 0,09$	$2,46 \pm 0,36$	$2,39 \pm 0,27$	$2,59 \pm 0,07$
8	FA2	$12,02 \pm 0,29$	$12,45 \pm 0,25$	$10,44 \pm 0,27$	$10,32 \pm 0,30$
9	FA2B	$2,56 \pm 0,07$	$2,22 \pm 0,26$	$1,78 \pm 0,18$	$2,16 \pm 0,07$
10	FA2[6]G1	$20,27 \pm 0,39$	$21,41 \pm 0,57$	$20,96 \pm 0,25$	$20,41 \pm 0,32$
11	FA2[3]G1	$6,86 \pm 0,35$	$6,23 \pm 0,19$	$6,30 \pm 0,19$	$6,36 \pm 0,55$
12	FA2B[6]G1	$6,26 \pm 0,26$	$5,89 \pm 0,16$	$5,57 \pm 0,29$	$5,72 \pm 0,44$
13	FA2G2	$25,30 \pm 0,32$	$26,99 \pm 0,92$	$27,75 \pm 0,34$	$28,32 \pm 0,09$

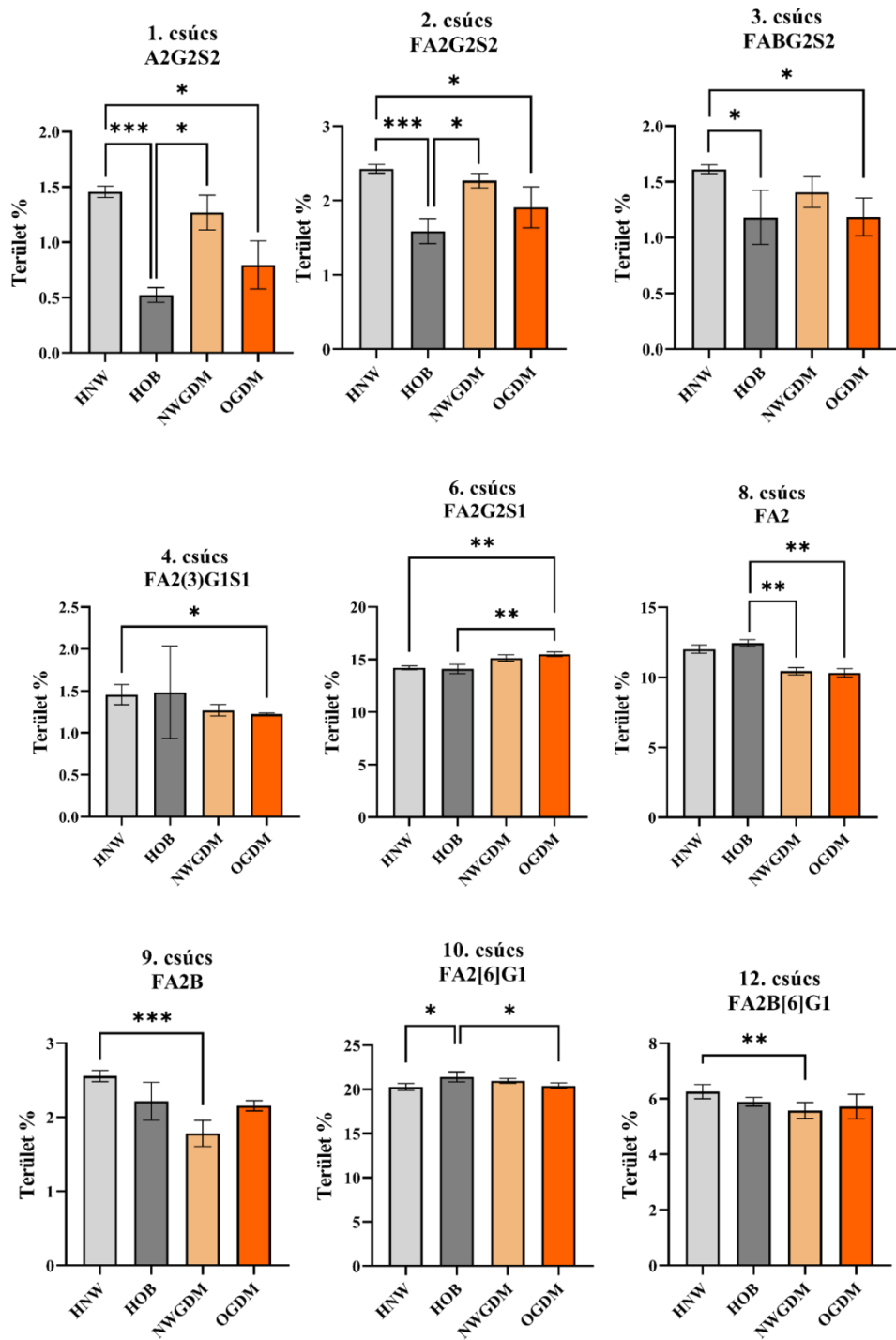
14	FA2BG2	$2,15 \pm 0,03$	$2,28 \pm 0,09$	$2,15 \pm 0,14$	$2,48 \pm 0,09$
----	--------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

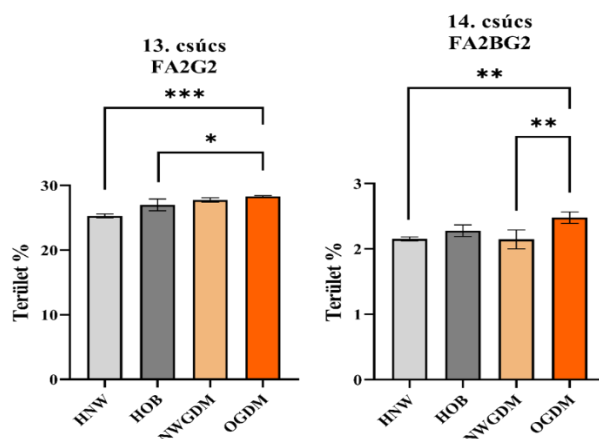
A csúcscsúszamok a 15. ábrával összhangban lettek feltüntetve.

Mivel korábbi kutatásokban a szialsavas szerkezetek arányának csökkenését vagy hiányát, valamint a galaktoziláció alacsony szintjét az IgG proinflammatorikus aktivitásának esetleges fokozódásával társították az FcγR receptorhoz, a C1q-hoz, valamint a dendritikus sejt specifikus intercelluláris adhéziós molekulához (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin; DC-SIGN) történő fokozott kötődés következményeként [301] [302], ezért megvizsgáltam ezen adatok alakulását az egyes csoportokban.

A szialsavas struktúrák aránya a neutrális szerkezetekkel összevetve a kontroll (HNW) és a normál testsúlyú GDM anyák (NWGDM) csoportjában is azonos volt. A HNW csoportnál $0,33 \pm 0,01$, az NWGDM csoport esetében pedig $0,33 \pm 0,02$ értéknek adódott. Az arányszám minimális csökkenést mutatott elhízott anyák (HOB), illetve az elhízott és GDM meglétével diagnosztizált anyák (OGDM) esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva. A SF/NF arány az OGDM csoportban $0,32 \pm 0,02$ értéket, míg a HOB csoportban $0,29 \pm 0,02$ értékeket adott. Az adatok Kruskal-Wallis teszttel végzett statisztikai elemzése során csak a HOB és NWGDM csoportok között tapasztaltam szignifikáns eltérést ($p=0,0197$). Az elemzés során a HNW csoport nem mutatott szignifikáns eltérést sem a HOB ($p=0,2699$), sem az NWGDM ($p>0,9999$), sem pedig az OGDM ($p>0,9999$) csoportok között. Emellett nem volt szignifikáns különbség az OGDM és HOB ($p=0,2727$), sem pedig az OGDM és NWGDM ($p>0,9999$) vonatkozásában sem..

A szialsavval terminált szerkezetek arányának vizsgálata után a PeakFit program segítségével számolt, az egyes csúcsokhoz tartozó relatív területszázalék adatokat statisztikai elemzésnek vetettem alá, mely elemzés eredményét a 17. ábra szemlélteti.





17. ábra: Szignifikáns eltérést mutató anyai szérumból izolált IgG N-glikán szerkezetek

A statisztikailag szignifikáns eltérések az alábbiak szerint kerültek feltüntetésre: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Az adatok elemzésére Kruskal-Wallis tesztet, majd Dunn's *post hoc* analízist alkalmaztam, melynek eredményeként a 14 N-glikán szerkezet közül 3 kivétellel (5., 7. és 13. csúcsok) valamennyi szerkezet szignifikáns eltérést mutatott az egyes csoportok között.

Az adatok elemzése során szignifikáns különbséget tapasztaltam a HNW ($1,46 \pm 0,05$) és a HOB ($0,52 \pm 0,07$) ($p=0,0003$), valamint a HNW ($1,46 \pm 0,05$) és az OGDM ($0,79 \pm 0,22$) ($p=0,0314$) csoportok A2G2S2 szerkezeteihez tartozó csúcsok átlagos csúcsalatti területszázalék értékében. Ugyanezen szerkezet szignifikáns eltérést mutatott a HOB ($0,52 \pm 0,07$) és az NWGDM ($1,27 \pm 0,16$) csoportokat összehasonlítva ($p=0,228$). Hasonló eltéréseket tapasztaltam az elektroferogramok 2. csúcsának (FA2G2S2) területszázalék változásait illetően is. A HNW ($2,43 \pm 0,06$) és HOB ($1,59 \pm 0,17$) csoportok ($p=0,0006$), a HNW ($2,43 \pm 0,06$) és OGDM ($1,91 \pm 0,28$) ($p=0,0291$) csoportok, továbbá a HOB ($1,59 \pm 0,17$) és NWGDM ($2,27 \pm 0,10$) ($p=0,0261$) csoportok eredményeit összevetve is szignifikáns eltéréseket figyeltem meg. A 3. csúcsot jelentő core-fukozilált kétantennás bigalaktozilált biszialisilált biszekting FA2BG2S2 szerkezet vonatkozásában statisztikailag jelentős eltérést kaptam a HNW ($1,61 \pm 0,04$) és HOB ($1,18 \pm 0,24$) ($p=0,0238$), valamint a HNW ($1,61 \pm 0,04$) és az OGDM ($1,19 \pm 0,17$) ($p=0,0140$) csoportok összehasonlításával. Az anyai szérumból izolált IgG glikoproteinek FA2(3)G1S1 (4. csúcs) szerkezetében csak a HNW ($1,45 \pm 0,12$) és az OGDM ($1,22 \pm 0,01$) csoport eredményei tértek el szignifikánsan ($p=0,0193$). Az OGDM ($15,51 \pm 0,21$) csoport FA2G2S1 szerkezetét vizsgálva szignifikáns területszázalék növekedést figyeltem meg a HNW ($14,20 \pm 0,16$) ($p=0,0088$) és a HOB ($14,10 \pm 0,45$)

($p=0,0018$) csoportok azonos struktúráival összehasonlítva. Az anyai IgG molekulák FA2 aszparagin kötött glikán struktúrája esetében jelentős területszázalék csökkenést tapasztaltam az NWGD ($10,44 \pm 0,27$) ($p=0,0098$) és az OGDM ($10,32 \pm 0,30$) ($p=0,0015$) csoportok tekintetében a HOB ($12,45 \pm 0,25$) csoporthoz képest. Az NWGDM ($1,78 \pm 0,189$) csoport core-fukozilált kétantennás agalaktozilált biszekting FA2B szerkezetének átlagos csúcsalatti területszázaléka szintén szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll HNW ($2,56 \pm 0,07$) csoporthoz képest ($p=0,0003$). A minták kapilláris elektroforetikus mérésének eredményeként kapott elektroferogramok 10. csúcsát jelentő, FA2[6]G1 N-glikán struktúra a HOB vizsgálati csoport esetében mutatta a legnagyobb értéket ($21,41 \pm 0,57$), a HNW ($20,27 \pm 0,39$) ($p=0,0133$) és az OGDM ($20,41 \pm 0,32$) ($p=0,0440$) csoportok statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak az elhízott édesanyák csoportjához viszonyítva. A core-fukozilált kétantennás monogalaktozilált bisecting FA2B[6]G1 szerkezet esetében a HNW ($6,26 \pm 0,26$) és az NWGDM ($5,57 \pm 0,29$) csoportok között tapasztaltam szignifikáns eltérést ($p=0,0098$). A HNW és az OGDM csoportok az FA2G2 (HNW: $25,30 \pm 0,32$; OGDM: $28,32 \pm 0,09$; $p=0,0002$), valamint az FA2BG2 esetében is jelentős eltérést mutattak (HNW: $2,15 \pm 0,03$; OGDM: $2,48 \pm 0,09$; $p=0,0030$). Az FA2G2 a HOB ($26,99 \pm 0,92$) és az OGDM ($28,32 \pm 0,09$) ($p=0,0340$), az FA2BG2 N-glikán struktúrák pedig az NWGDM ($2,15 \pm 0,14$) és az OGDM ($2,48 \pm 0,09$) csoportok között mutattak további szignifikáns eltérést ($p=0,0054$). Az elemzés során kapott p értékeket a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: IgG N-glikozilációs mintázat összevetése Kruskal-Wallis tesztet követően Dunn's többszörös összehasonlítással anyai szérum mintákban

	HNW vs. HOB	HNW vs. NWGDM	HNW vs. OGDM	HOB vs. NWGDM	HOB vs. OGDM	NWGDM vs. OGDM
1. csúcs A2G2S2	0,0003	>0,9999	0,0314	0,0228	>0,9999	0,7527
2. csúcs FA2G2S2	0,0006	>0,9999	0,0291	0,0261	>0,9999	0,4858
3. csúcs FA2BG2S2	0,0238	0,7383	0,014	0,9609	>0,9999	0,6918
4. csúcs FA2(3)G1S1	>0,9999	0,3854	0,0193	>0,9999	0,5815	>0,9999
5. csúcs A2G2S1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2463
6. csúcs FA2G2S1	>0,9999	0,2008	0,0088	0,0722	0,0018	>0,9999

7. csúcs FA2BG2S1	>0,9999	>0,9999	0,1851	>0,9999	>0,9999	0,7527
8. csúcs FA2	>0,9999	0,2597	0,0729	0,0098	0,0015	>0,9999
9. csúcs FA2B	0,3925	0,0003	0,2971	0,1292	>0,9999	0,1797
10 csúcs FA2 [6]G1	0,0133	0,0956	>0,9999	>0,9999	0,044	0,2727
11. csúcs FA2 [3]G1	0,0634	0,0999	0,6809	>0,9999	>0,9999	>0,9999
12. csúcs FA2B [6]G1	0,7622	0,0098	0,0935	0,532	>0,9999	>0,9999
13. csúcs FA2G2	0,6921	0,0914	0,0002	>0,9999	0,034	0,3666
14.csúcs FA2BG2	0,6376	>0,9999	0,003	>0,9999	0,3015	0,0054

A táblázatban a szignifikáns eltéréseket jelentő *p* értékek piros színnel kerültek feltüntetésre.

5.2.3. Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása az utódok szérumból származó IgG N-glikozilációjára

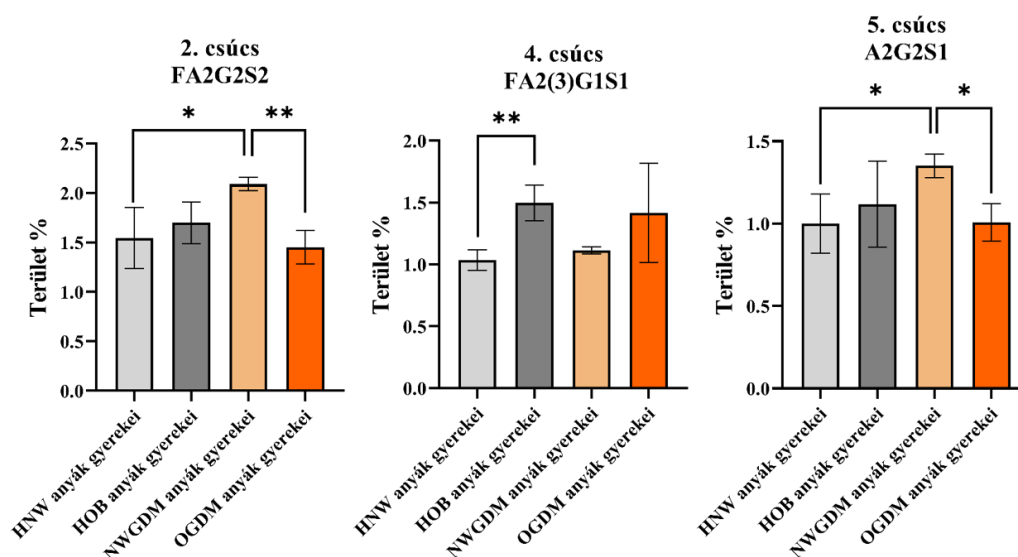
A vizsgálati csoportok édesanyjaitól született gyermekek véréből izolált IgG N-glikozilációs vizsgálata során 13 olyan csúcsot azonosítottam, melyek relatív területszázalék értéke elérte a legalább 1% értéket. A csúcsokhoz tartozó struktúrákat, melyek számozása megegyezik a 16. ábra számozásával, valamint azok százalékos megoszlását az egyes vizsgálati csoportokban a 12. táblázat tartalmazza.

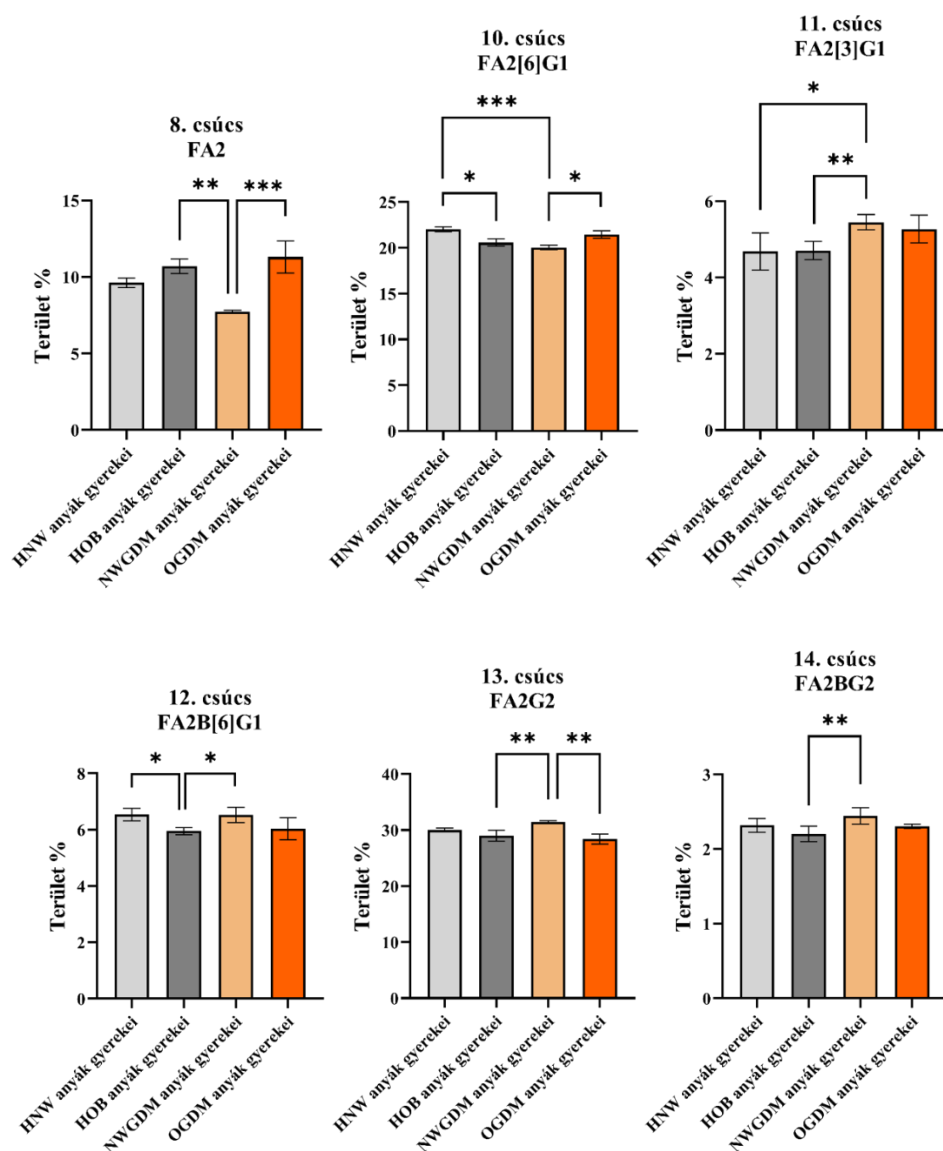
Az elektroferogramok kiértékelt területszázalék adatait statisztikai elemzésnek vettem alá, melyhez Kruskal-Wallis tesztet, majd Dunn's *post hoc* analízist alkalmaztam. A statisztikai analízis eredményét a 18. ábra szemlélteti, ahol az adatok szintén átlag $\pm$ SD értékben vannak feltüntetve. Az statisztikai elemzés eredményeként kapott *p* értékek a 13. táblázatban kerültek feltüntetésre.

12. táblázat: Utódok szérumból tisztított IgG antitestek N-glikán szerkezetei és azok százalékos megoszlása (átlag $\pm$ SD)

Csúcsszám	N-glikán struktúra	HNW anyák gyermekei (Terület % átlag $\pm$ SD)	HOB anyák gyermekei (Terület % átlag $\pm$ SD)	NWGDM anyák gyermekei (Terület % átlag $\pm$ SD)	OGDM anyák gyermekei (Terület % átlag $\pm$ SD)
2	FA2G2S2	1,55 $\pm$ 0,31	1,70 $\pm$ 0,21	2,09 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,17
3	FA2BG2S2	1,01 $\pm$ 0,31	1,45 $\pm$ 0,24	1,11 $\pm$ 0,09	1,53 $\pm$ 0,73
4	FA2(3)G1S1	1,04 $\pm$ 0,08	1,50 $\pm$ 0,14	1,11 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,40
5	A2G2S1	1,00 $\pm$ 0,18	1,12 $\pm$ 0,26	1,35 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,11
6	FA2G2S1	16,28 $\pm$ 0,19	17,39 $\pm$ 0,58	17,28 $\pm$ 0,17	15,94 $\pm$ 2,04
7	FA2BG2S1	2,08 $\pm$ 0,66	1,96 $\pm$ 0,60	1,74 $\pm$ 0,09	1,91 $\pm$ 0,44
8	FA2	9,62 $\pm$ 0,32	10,69 $\pm$ 0,47	7,73 $\pm$ 0,09	11,30 $\pm$ 1,05
9	FA2B	1,85 $\pm$ 0,20	1,77 $\pm$ 0,26	1,70 $\pm$ 0,12	2,00 $\pm$ 0,28
10	FA2[6]G1	22,03 $\pm$ 0,28	20,57 $\pm$ 0,39	20,02 $\pm$ 0,25	21,44 $\pm$ 0,41
11	FA2[3]G1	4,69 $\pm$ 0,49	4,71 $\pm$ 0,24	5,45 $\pm$ 0,20	5,27 $\pm$ 0,37
12	FA2B[6]G1	6,54 $\pm$ 0,22	5,95 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,27	6,03 $\pm$ 0,40
13	FA2G2	30,02 $\pm$ 0,37	28,98 $\pm$ 0,96	31,45 $\pm$ 0,23	28,40 $\pm$ 0,91
14	FA2BG2	2,32 $\pm$ 0,09	2,20 $\pm$ 0,11	2,45 $\pm$ 0,11	2,31 $\pm$ 0,03

A csúcsok számozása a 16. ábra szerint került feltüntetésre.





18. ábra: Statisztikai elemzést követően szignifikáns eltérést mutató, az utódok szérumból tisztított IgG antitestek aszparagin kötött glikán szerkezetei

A gyermekek IgG molekuláihoz N-glikozidos kötéssel kapcsolt, terminálisan szíálsavat tartalmazó komplex cukorstruktúrák közül 3 szerkezet mutatott szignifikáns eltérést a négy csoportot összehasonlítva. Az FA2G2S2 szerkezetként azonosított 2. csúcs esetében az NWGDM csoport gyermekei ($2,09 \pm 0,07$) és a kontroll (HNW) csoport ($1,55 \pm 0,31$) ($p=0,0115$), valamint az NWGDM és az OGDM csoport ($1,45 \pm 0,17$) ($p=0,0042$) között jelentős eltérést figyeltem meg. Szignifikáns eltérést tapasztaltam továbbá a 4. csúcs FA2(3)G1S1 értékelése során a HNW ($1,04 \pm 0,08$) és az elhízott édesanyák gyermekeinek

(HOB) csoportja ($1,42 \pm 0,40$) ($p=0,0076$) között. A harmadik szíalsavas szerkezet, amely még statisztikailag jelentős eltérést mutatott a csoportok valamelyike között, az elektroferogramok 5. csúcsa, amelyet az A2G2S1 glikán szerkezetként azonosítottam. A szerkezet a HNW ($1,00 \pm 0,18$) és az NWGD ($1,35 \pm 0,07$) ($p=0,0225$), valamint az NWGDM ($1,35 \pm 0,07$) és az OGDM ($1,01 \pm 0,11$) ($p=0,0173$) csoportokat összevetve adott szignifikáns eltérés. Az NWGD csoport gyermekeinek core-fukozilált kétantennás agalaktozilált FA2 szerkezete ($7,73 \pm 0,09$) igen jelentős területszázalék csökkenést mutatott a HOB ($10,69 \pm 0,47$) ($p=0,0036$) és az OGDM ($11,30 \pm 1,05$) ($p=0,0005$) csoporttal összevetve. Az FA2[6]G1 analízise során szignifikáns területszázalék csökkenést tapasztaltam a HNW csoporthoz ($22,03 \pm 0,28$) viszonyítva a HOB ($20,57 \pm 0,39$) ($p=0,0151$) és az NWGDM csoportoktól ($20,02 \pm 0,25$) ($p=0,0003$) született gyermekek esetében. Ugyanezen struktúra vonatkozásában ugyan kisebb mértékű, de szignifikáns növekedést tapasztaltam a relatív területszázalék értéket illetően az OGDM ($21,44 \pm 0,41$) csoportban az NWGDM csoporthoz ($20,02 \pm 0,25$) ($p=0,0256$) képest. Az FA2[3]G1 N-glikán szerkezetként azonosított 11. csúcs statisztikai elemzése során az NWGD csoport ($5,45 \pm 0,20$) esetében szignifikáns területszázalék növekedés tapasztaltam a HNW ($4,69 \pm 0,49$) ($p=0,0197$) és a HOB csoporthoz ($4,71 \pm 0,24$) ($p=0,0049$) képest is. Az elhízott édesanyáktól született gyermekek csoportja ($5,95 \pm 0,13$) esetében a core-fukozilált kétantennás monogalaktozilált biszekting FA2B[6]G1 aszparagin-kötött glikán szerkezet területszázalék értéke az elektroferogramok kiértékelését és elemzését követően szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll HNW ($6,54 \pm 0,22$) ($p=0,0330$), illetve az NWGDM csoport ($6,52 \pm 0,27$) ($p=0,0225$) gyermekeinek eredményeivel összehasonlítva. Az NWGD anyák gyermekeinek ($31,45 \pm 0,23$) vonatkozásában továbbá az FA2G2 szerkezet tekintetében figyeltem meg statisztikailag jelentős csúcsalatti területszázalék növekedést a HOB ($28,98 \pm 0,96$) ($p=0,0057$) és az OGDM ($28,40 \pm 0,91$) ($p=0,0010$) adataihoz képest, az FA2BG2 struktúra adatainak elemzésekor pedig a HOB csoporthoz ($2,20 \pm 0,11$) viszonyítva figyeltem meg azonos irányú változást az NWGDM csoport ($2,45 \pm 0,11$) ($p=0,0010$) esetében.

13. táblázat: A gyermekek szérum mintáiból izolált IgG N-glikozilációs mintázatának összevetése Kruskal-Wallis tesztet követően Dunn's többszörös összehasonlítással

	HNW vs. HOB	HNW vs. NWGDM	HNW vs. OGDM	HOB vs. NWGDM	HOB vs. OGDM	NWGDM vs. OGDM
2. csúcs FA2G2S2	>0,9999	0,0115	>0,9999	0,1829	>0,9999	0,0042
3. csúcs FA2BG2S2	0,1485	>0,9999	>0,9999	0,4751	>0,9999	>0,9999
4. csúcs FA2(3)G1S1	0,0076	0,9907	0,1485	0,3972	>0,9999	>0,9999
5. csúcs A2G2S1	>0,9999	0,0225	>0,9999	0,4347	>0,9999	0,0173
6. csúcs FA2G2S1	0,1074	0,1649	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
7. csúcs FA2BG2S1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
8. csúcs FA2	0,3003	0,8499	0,0858	0,0036	>0,9999	0,0005
9. csúcs FA2B	>0,9999	0,9907	>0,9999	>0,9999	0,2474	0,1335
10. csúcs FA2 [6]G1	0,0151	0,0003	>0,9999	>0,9999	0,4347	0,0256
11. csúcs FA2 [3]G1	>0,9999	0,0197	0,2474	0,0049	0,0858	>0,9999
12. csúcs FA2B [6]G1	0,033	>0,9999	0,224	0,0225	>0,9999	0,1649
13. csúcs FA2G2	0,7249	0,4751	0,2727	0,0057	>0,9999	0,001
14.csúcs FA2BG2	0,5185	0,2474	>0,9999	0,001	0,3623	0,3623

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szignifikáns eltéréseket jelentő p értékeke piros színnel kiemelésre kerültek.

A gyermekek IgG N-glikozilációs profiljának analízisekor a szíalsavas szerkezetek alakulása szempontjából azt tapasztaltam, hogy a kontroll csoport $0,30 \pm 0,03$ értékéhez képest mind az elhízott anyák gyermekei ($0,34 \pm 0,02$), mind pedig a normál testsúllyal rendelkező NWGDM anyáktól született gyermekek ($0,33 \pm 0,00$) esetében kismértékű növekedést mutattak. A komorbid OGDM csoportban a HNW csoporttal megegyező arányszámot, $0,30 \pm$

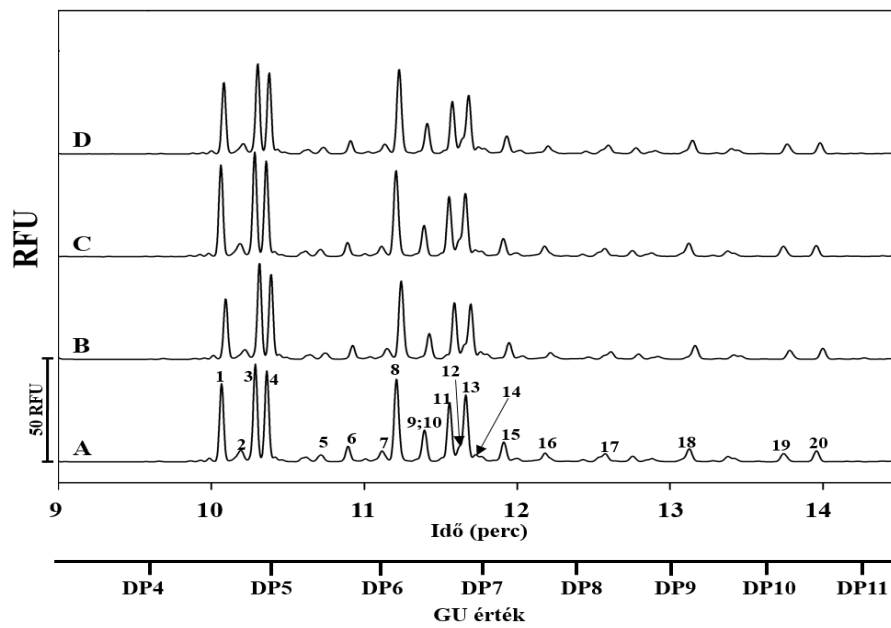
0,01 értéket kaptam. Az adatok statisztikai elemzése során azt tapasztaltam, hogy a szialósav szerkezetek aránya szignifikánsan magasabb volt a HOB anyáktól született gyermekek csoportjában a kontroll ($p=0,0423$) és az OGDM anyák gyermekeihez viszonyítva ($p=0,0225$) is. A két GDM-mel diagnosztizált anyai csoport gyermekei között szintén jelentős eltérést tapasztaltam, az OGDM gyermekek szignifikánsan alacsonyabb szialilációs fokkal jellemezhetőek az NWGDM anyák gyermekeihez képest ($p=0,033$). A HNW és NWGD ($p=0,0607$), valamint HNW és OGDM ($p>0,9999$) csoportok között nem volt szignifikáns eltérés, ahogyan a HOB és NWGDM ($p>0,9999$) csoportok között sem..

5.2.4. Anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása az anyai szérumból származó IgA N-glikozilációjára

Munkám következő szakaszában olyan anyai szérum minták IgA tartalmának N-glikozilációs módosulását tanulmányoztam, amelyek esetében a terhesség elhízással és GDM-mel társult.

A szérumból az IgA antitesteket a Pannon Egyetem munkatársai által (Prof. Dr. Vonderviszt Ferencnek és Dr. Jankovics Hajnalka, Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Veszprém) kifejlesztett Z(IgA1) affibody molekula segítségével tisztítottam [292], melyeket előzetesen Ni-IMAC affinitás mikrooszlopokhoz rögzítettem a dolgozat 4.5.2 pontjában leírtaknak megfelelően. A szérum mintákból nyert antitestek N-glikozilációs módosulásait a komplex cukorstruktúrák fehérjéről történő enzimatis emésztését és APTS fluoreszcens festékkel történő jelölését követően kapilláris elektroforézis készülék alkalmazásával analizáltam a dolgozat 4.8 pontjában leírtak szerint. A minták kapilláris elektroforetikus analízisének eredményeként kapott IgA N-glikozilációs profilt a 19. ábrán mutatom be.

A csoportok adatainak elemzésekor első lépésként meghatároztam az elektroferogramok csúcsainak relatív csúcsalatti területszázalék értékeit. A további adatelemzést kizárólag azokkal a csúcsokkal folytattam, amelyek említett értéke elérte a minimum 1%-ot. A leírt kritériumnak megfelelő 19 csúcshoz, melyeket a 19. ábrán is jelöltem, ezt követően azok GU értékei, valamint adatbázisban történő keresés és irodalmi adatok alapján rendeltem hozzá a 20 N-glikán struktúrát (a 9-es és 10-es struktúrák komigráltak). A meghatározott szerkezeteket, valamint az azokhoz tartozó területszázalék értékeket vizsgálati csoportok szerint a 14. táblázat tartalmazza.



19. ábra: Poolozott anyai szérum mintából Z(IgA1) affibody segítségével tisztított IgA fehérjék APTS jelölt reprezentatív N-glikánprofiljai

Az elválasztás körülményei megegyeznek a 12. ábra aláírásában feltüntetett körülményekkel. A) HNW anyák; B) HOB anyák; C) NWGDM anyák; D) OGDM anyák

14. táblázat: Anyai szérumból tisztított IgA antitestek N-glikán szerkezetei és azok százalékos megoszlása (átlag ± SD)

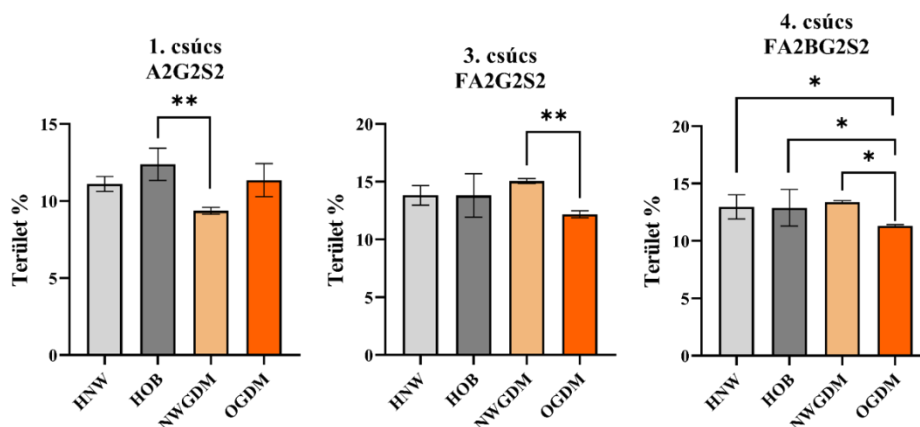
Csúcs száma	N-glikán struktúra	GU érték	HNW (Terület % átlag ± SD)	HOB (Terület % átlag ± SD)	NWGDM (Terület % átlag ± SD)	OGDM (Terület % átlag ± SD)
1	A2G2S2	4,62 ± 0,01	11,10 ± 0,47	12,38 ± 1,05	9,36 ± 0,23	11,36 ± 1,07
2	A2BG2S2	4,78 ± 0,01	2,15 ± 0,26	2,29 ± 0,25	2,10 ± 0,14	2,14 ± 0,16
3	FA2G2S2	4,90 ± 0,01	13,82 ± 0,85	13,80 ± 1,88	15,05 ± 0,22	12,17 ± 0,30
4	FA2BG2S2	4,99 ± 0,01	12,98 ± 1,05	12,90 ± 1,60	13,40 ± 0,12	11,31 ± 0,11
5	A2[6]G1S1	5,49 ± 0,01	1,13 ± 0,09	1,09 ± 0,10	1,17 ± 0,10	1,20 ± 0,07
6	A2[3]G1S1	5,73 ± 0,01	2,34 ± 0,15	2,03 ± 0,09	2,29 ± 0,05	2,14 ± 0,05
7	A[6]	6,05 ± 0,01	1,97 ± 0,12	1,68 ± 0,09	2,37 ± 0,27	1,72 ± 0,18
8	A[3]	6,19 ± 0,01	13,57 ± 0,65	13,58 ± 0,75	13,88 ± 0,09	15,23 ± 0,07
9;10	FA1[6] + A2BG2S1	6,46 ± 0,01	5,17 ± 0,25	4,84 ± 0,20	4,57 ± 0,18	5,37 ± 0,36
11	A2	6,71 ± 0,01	9,35 ± 0,26	9,10 ± 0,21	9,76 ± 0,11	8,17 ± 0,16
12	M5	6,81 ± 0,01	1,84 ± 0,09	2,04 ± 0,41	2,27 ± 0,35	2,55 ± 0,42
13	A1G1[6]	6,87 ± 0,01	11,08 ± 0,35	10,21 ± 0,48	9,95 ± 0,41	9,46 ± 0,45
14	A1G1[3]	6,97 ± 0,01	1,04 ± 0,06	0,98 ± 0,12	1,26 ± 0,08	1,02 ± 0,08
15	FA2	7,27 ± 0,01	3,36 ± 0,08	3,01 ± 0,39	3,04 ± 0,39	4,01 ± 0,85
16	M7b	7,71 ± 0,01	1,45 ± 0,09	1,78 ± 0,43	1,14 ± 0,11	1,72 ± 0,23
17	FA1[3]G1	8,34 ± 0,01	1,37 ± 0,14	1,41 ± 0,33	1,37 ± 0,13	2,12 ± 0,41
18	A2G2	9,23 ± 0,01	2,37 ± 0,27	2,53 ± 0,68	2,68 ± 0,29	3,29 ± 0,54
19	FA2G2	10,22 ± 0,01	1,79 ± 0,11	2,24 ± 0,55	2,03 ± 0,08	2,58 ± 0,11
20	FA2BG2	10,56 ± 0,01	2,13 ± 0,18	2,12 ± 0,44	2,31 ± 0,10	2,45 ± 0,22

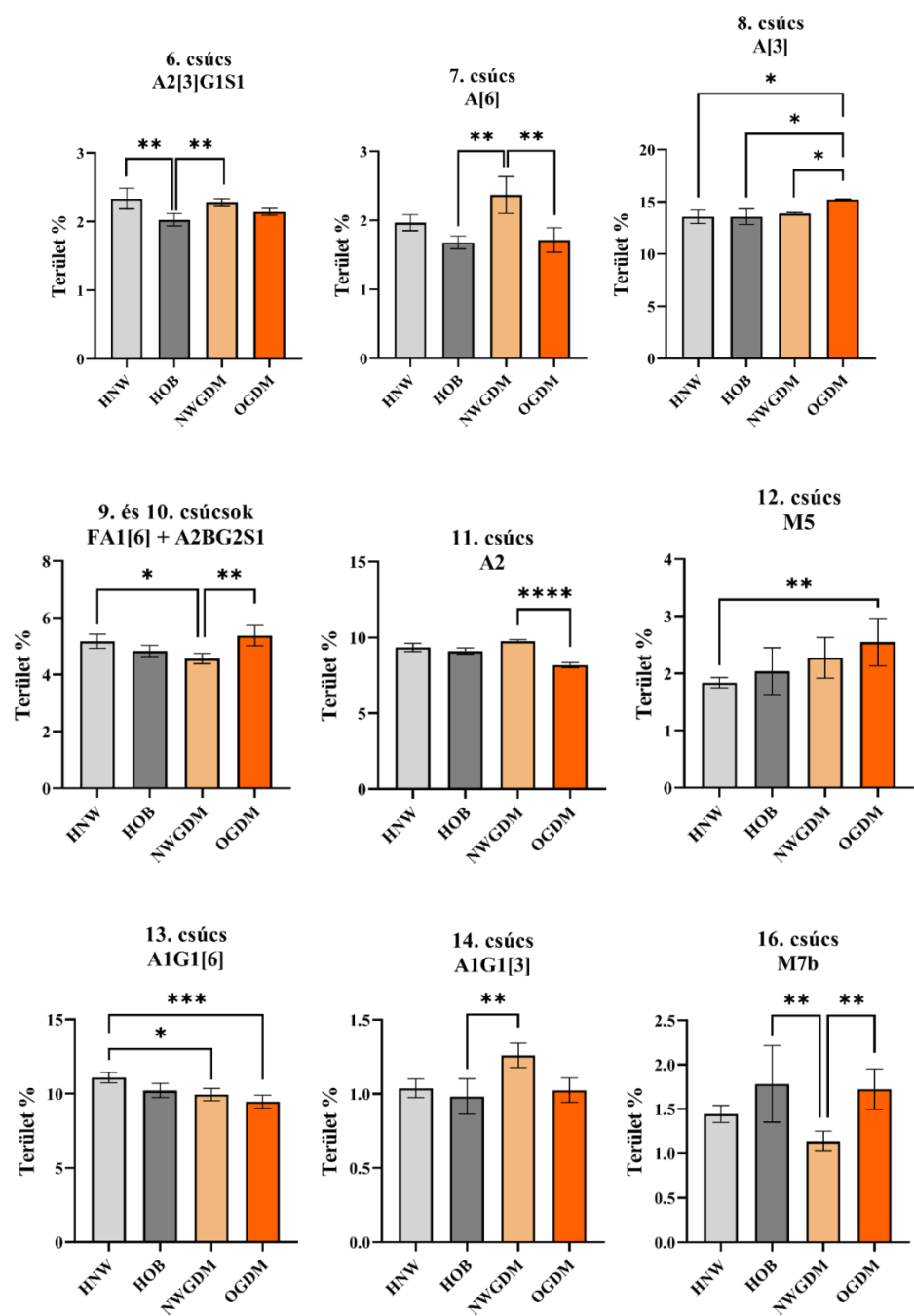
A csúcsok számozása a 19. ábrának megfelelően szerepel a táblázatban.

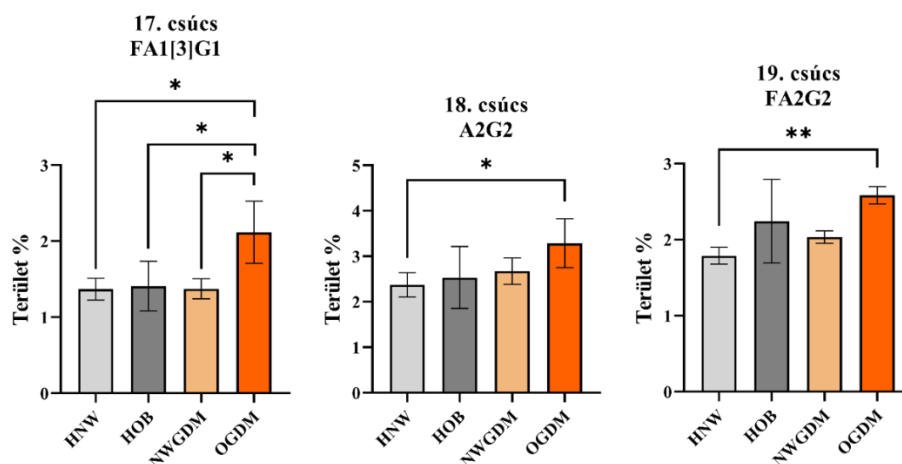
A kapilláris elektroforetikus mérések kiértékelésének eredményeként kapott relatív területszázalék értéket felhasználva a csoportok közötti statisztikailag szignifikáns eltérések meghatározására Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam, majd Dunn's *post hoc* analízist végeztem. A statisztikai analízis eredményét a 20. ábra és a 15. táblázat mutatja, amelyben az adatokat az előzőekkel összhangban átlag $\pm$ SD értékben adtam meg. Amint az ábrán is látható, a szérum eredetű IgA antitest pool N-glikán szerkezeteinek jelentős része, a 20 struktúra közül 15, statisztikai szempontból szignifikáns eltérést mutatott legalább két összehasonlított csoport között.

Az elektroferogram 1. csúcsának megfelelő A2G2S2 N-glikán szerkezet szignifikáns eltérést mutatott a HOB ($12,38 \pm 1,05$), illetve az NWGDM ($9,36 \pm 0,23$) ($p=0,0012$) csoportok átlagos relatív csúcsalatti területszázalékának összehasonlítása során. Az FA2G2S2 szerkezet esetében az NWGDM ($15,05 \pm 0,22$) és az OGDM ($12,17 \pm 0,30$) ($p=0,0057$) csoportok mutattak jelentős eltérést. Az FA2BG2S2 szerkezet alapján az OGDM ($11,31 \pm 0,11$) csoport a HNW ($12,98 \pm 1,05$; $p=0,0291$), a HOB ($12,90 \pm 1,60$; $p=0,0423$), valamint az NWGD ($13,40 \pm 0,12$; $p=0,0291$) csoportoktól egyaránt elkülöníthető. Az elhízott anyák csoportja ($2,03 \pm 0,09$) az elektroferogramok 6. csúcsához tartozó A2[3]G1S1 struktúra vonatkozásában a normál testsúllyal rendelkező édesanyák ($2,34 \pm 0,15$; $p=0,0042$), illetve a normál testsúlyuk ellenére is GDM-ben szenvedők csoportjaitól ($2,29 \pm 0,05$; $p=0,0057$) tért el jelentősen. Az agalaktozilált monoantennás A[6] szerkezetként azonosított 7. csúcs relatív területszázalék értéke szignifikáns növekedést mutatott az NWGD ($2,37 \pm 0,27$) csoport esetében a HOB ($1,68 \pm 0,09$; $p=0,0014$) és az OGDM ($1,72 \pm 0,18$; $p=0,0036$) csoportokkal összevetve. A core pentaszacharid szerkezet $\alpha(1-3)$ kötással kapcsolt mannóz egységéhez β -glikozidos kötással kapcsolódó N-acetil-glükózamin révén létrejövő A[3] monoantennás szerkezet az ODGM csoport ($15,23 \pm 0,07$) esetében mutatott szignifikáns eltérést a HNW ($13,57 \pm 0,65$; $p=0,0132$), a HOB ($13,58 \pm 0,75$; $p=0,0291$), valamint az NWGDM ($13,88 \pm 0,09$; $p=0,0197$) csoportokhoz képest egyaránt. A szérumból tisztított IgA antitestek FA1[6] és A2BG2S1 N-glikán szerkezetének csúcsalatti területszázalék értékei az NWGD ($4,57 \pm 0,18$) csoport esetében jelentős csökkenést mutattak a HNW ($5,17 \pm 0,25$; $p=0,0291$) és az OGDM ($5,37 \pm 0,36$; $p=0,0012$) csoportokhoz képest, míg az OGDM ($8,17 \pm 0,16$) csoport vonatkozásában statisztikailag igen jelentős területszázalék csökkenést tapasztaltam az NWGDM ($9,76 \pm 0,11$; $p<0,0001$) csoporttal összehasonlítva az A2 struktúrához tartozó adatokat kiértékelve. A magas mannóztartalmú szerkezetek közé tartozó M5 N-glikán esetében a kontroll ($1,84 \pm 0,09$) és az OGDM ($2,55 \pm 0,42$; $p=0,0027$) csoportok között észleltem jelentősebb eltérést. Az IgA antitestekről endoglikozidázzal emésztett, majd fluorofór ágenssel jelölt és kapilláris

elektroforézis készülékkel analizált N-kötött monogalaktozilált oligoszacharidok közül az A1G1[6] szerkezet esetében szignifikáns területszázalék csökkenést tapasztaltam az NWGDM ($9,95 \pm 0,41$; $p=0,0423$) és az OGDM ($9,46 \pm 0,45$; $p=0,0006$) csoportok esetében a kontrollhoz ($11,08 \pm 0,35$) viszonyítva. A szintén monogalaktozilált A1G1[3] szerkezet területszázalék értékében jelentős növekedést figyeltem meg az NWGDM ($1,26 \pm 0,08$) csoport esetében az elhízott édesanyák ($0,98 \pm 0,12$; $p=0,0027$) csoportjához képest. A szintén magas mannóztartalmú glikánok közé sorolandó M7b szerkezet az NWGD ($1,14 \pm 0,11$) csoport esetében mutatott jelentős csökkenést a HOB ($1,78 \pm 0,43$; $p=0,0076$) és az OGDM ($1,72 \pm 0,23$; $p=0,0027$) csoportok adataihoz képest. Az elektroferogramok 17. csúcsaként megjelölt, core-fukozilált monogalaktozilált N-glikánként azonosított FA1[3]G1 szerkezethez tartozó területszázalék értékek statisztikai elemzése során szignifikáns növekedést tapasztaltam az ODGM ($2,12 \pm 0,41$) csoportban a HNW ($1,37 \pm 0,14$; $p=0,0225$), a HOB ($1,41 \pm 0,33$; $p=0,0423$), valamint az NWGDM ($1,37 \pm 0,13$; $p=0,0225$) csoportokhoz képest. A kétantennás bigalaktozilált (A2G2), valamint a core-fukozilált kétantennás bigalaktozilált (FA2G2) szerkezet esetében is a kontroll ($2,37 \pm 0,27$; $1,79 \pm 0,11$) adatához képest szignifikáns növekedést figyeltem meg az OGDM ($3,29 \pm 0,54$; $p=0,0197$ és $2,58 \pm 0,11$; $p=0,0065$) csoportban.







20. ábra: Anyai szérumból Ni-IMAC mikrooszlopokhoz rögzített Z(IgA1)affibody alkalmazásával tisztított IgA immunglobulinok statisztikailag szignifikáns eltérést mutató N-glikán struktúrái

A statisztikailag szignifikáns eltérések a dolgozat 4.10 pontja szerint kerültek feltüntetésre.

15. táblázat: IgA N-glikozilációs mintázat összevetése Kruskal-Wallis tesztet követően Dunn-féle többszörös összehasonlítással

	HNW vs. HOB	HNW vs. NWGDM	HNW vs. OGDM	HOB vs. NWGDM	HOB vs. OGDM	NWGDM vs. OGDM
1. csúcs A2G2S2	>0,9999	0,0682	>0,9999	0,0012	>0,9999	0,0607
2. csúcs A2BG2S2	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7249	>0,9999	>0,9999
3. csúcs FA2G2S2	>0,9999	0,8499	0,3972	>0,9999	0,1649	0,0057
4. csúcs FA2BG2S2	>0,9999	>0,9999	0,0291	>0,9999	0,0423	0,0291
5. csúcs A2[6]G1S1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3301	>0,9999
6. csúcs A2[3]G1S1	0,0042	>0,9999	0,1485	0,0057	>0,9999	0,1829
7. csúcs A[6]	0,3003	0,5185	0,5185	0,0014	>0,9999	0,0036
8. csúcs A[3]	>0,9999	>0,9999	0,0132	>0,9999	0,0291	0,0197
9. és 10. csúcs FA1[6] + A2BG2S1	>0,9999	0,0291	>0,9999	0,8499	0,1485	0,0012

11. csúcs A2	>0,9999	0,3972	0,0607	0,0607	0,3972	<0,0001
12. csúcs M5	0,4347	0,1074	0,0027	>0,9999	0,5185	>0,9999
13. csúcs A1G1[6]	0,1485	0,0423	0,0006	>0,9999	0,6148	>0,9999
14. csúcs A1G1[3]	>0,9999	0,0961	>0,9999	0,0027	>0,9999	0,0607
15. csúcs FA2	0,6681	0,3003	>0,9999	>0,9999	0,5185	0,224
16. csúcs M7b	>0,9999	0,224	0,9183	0,0076	>0,9999	0,0027
17. csúcs FA1[3]G1	>0,9999	>0,9999	0,0225	>0,9999	0,0423	0,0225
18. csúcs A2G2	>0,9999	>0,9999	0,0197	>0,9999	0,224	0,3972
19. csúcs FA2G2	0,4347	0,6148	0,0065	>0,9999	0,8499	0,6148
20. csúcs FA2BG2	>0,9999	0,9907	0,1198	>0,9999	0,6148	>0,9999

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szignifikáns eltéréseket jelentő p értékek piros színnel kiemelésre kerültek.

Az SF/NF arány a HNW csoport esetében $1,66 \pm 0,11$; a HOB esetében $1,71 \pm 0,29$, az NWGDM esetében $1,67 \pm 0,06$, míg az OGDM esetében $1,54 \pm 0,13$ értéknek adódott. A szíálsavas és neutrális szerkezetek arányának statisztikai összehasonlítására Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam. Az elemzés során nem találtam szignifikáns különbséget a csoportok között. Mivel a 9. és 10. szerkezeteket tartalmazó csúcsok 1-1 szíálsavas és neutrális N-glikánt tartalmaznak, a szerkezetekhez külön-külön tartozó pontos területszázalék értékeket pedig nem tudtam biztonsággal elkülöníteni egymástól, így a csoportok szíálsavas-neutrális szerkezeteinek összevetésekor a 9. és 10. szerkezeteket tartalmazó csúcsok területszázalék értékeit a továbbiakban nem vettem figyelembe az elemzés során.

5.3. COPD és tüdőrák N-glikomikai analízise teljes emberi vérszérumból

5.3.1. Standard humán szérum és a szérumban nagy koncentrációban jelen lévő standard fehérjék keverékének összehasonlítása

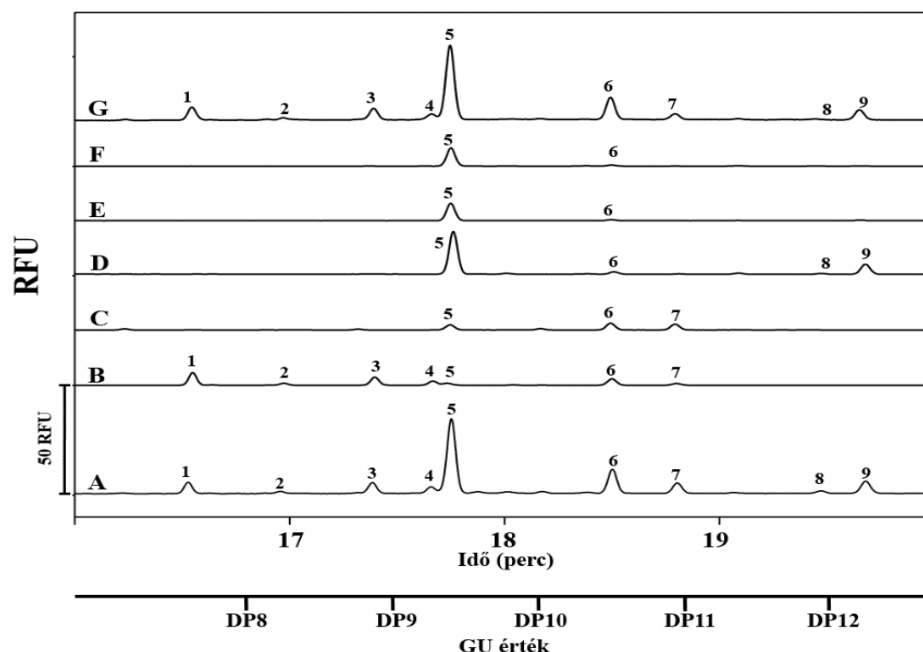
Az emberi vér az egyik leggyakrabban használt biológiai minta típus a különböző betegségek diagnosztizálására. Bár a vérvétel invazív beavatkozásnak számít és bizonyos körülmények között nehézkes a gyűjtése kutatási célokra, mégis relatíve könnyű hozzáférhetősége és rendkívüli komplexitása miatt gazdag molekuláris forrásként szolgál a különböző gyulladásos és rosszindulatú daganatos megbetegedések diagnosztikai markereinek azonosításához, beleértve a tüdőbetegségeket is [262] [254]. A különböző szövet- és sejttípusok eltérő fehérje glikoformákat expresszálhatnak fiziológiás és patológias körülmények között, melyek a keringésbe kerülve diagnosztikai jelentőségűek lehetnek. A tumordiagnosztika területén az ilyen glikoproteinek igen vonzó biomarker célpontnak tűnhetnek specificitásuk miatt annak ellenére, hogy ezen fehérjék várhatóan a pg/mL koncentrációtartományban lesznek fellelhetők a keringésben [66], ezért a kellően érzékeny módszerek kidolgozására nagy hangsúlyt kell fektetni, melyek mind az idő, mind az anyag, mind pedig a mintaigényt nagymértékben növelhetik.

Bár a szérumban nagy koncentrációban előforduló fehérjék depletálásával nagyobb eséllyel tárhatnánk fel a kis koncentrációjú, potenciális biomarkereket, számos tanulmány számol be arról, hogy az ismert szérumkomponensek és az akut fázis fehérjék szintén hordozhatnak diagnosztikai szempontból releváns információt [303], nem beszélve a teljes szérum/plazma analíziséről [63]. A különböző fehérjéknek a szérumból glikozilációs analízis céljára történő specifikus tisztítása ráadásul jelentős idő- és költségigényes eljárásokkal valósítható meg, melyek mintaigénye a szérum közvetlen analíziséhez viszonyítva is nagy. Elég csak a dolgozatomban fentebb bemutatott immunglobulinok analízisére kifejlesztett módszerre gondolni, ahol ráadásul olyan fehérjék specifikus tisztítása valósult meg párhuzamos mérések esetén 100 (IgA), illetve 200 μ L szérumból kiindulva, amelyek a szérumban nagy koncentrációban fordulnak elő, hiszen az IgG átlagos koncentrációja egészséges embert tekintve 7-16 mg/mL, míg az IgA 0,7-4 mg/mL. Ettől alacsonyabb koncentrációban előforduló fehérjék tisztításához ettől csak nagyobb mintaigénnyel kell kalkulálnunk a vizsgálat tervezésekor, főként egy olyan többközpontú vizsgálat esetén, amelyben ugyanattól az alanytól származó mintán több vizsgálatot is el kell végeznünk. Így az ettől kisebb

koncentrációtartományban előforduló fehérjék glikozilációs vizsgálata szignifikánsan növelheti a gyűjtendő vérminta mennyiségét is.

A fent vázolt okok miatt tanulmányoztam a vérben nagy mennyiségben előforduló 5, úgynevezett „high abundant” glikoprotein (IgG és IgA, Tf, Hp és A1AT) N-glikozilációját, majd ezek fiziológiás koncentrációtartományon belüli összekeverésével modellezni kívántam a humán szérum teljes N-glikánprofilját. Az így létrehozott modellben az egyes komponensek az 5. táblázatban feltüntetett értékeknek megfelelően voltak jelen. A szílsavak fragilis tulajdonságával kapcsolatban felmerülő reprodukálhatósági problémákat (pH- és hőmérséklet érzékenység) azok enzimatisz eltávolításával küszöböltem ki a modell szérum, a standard szérum, és a kutatás későbbi szakaszában tanulmányozott kontroll, COPD, tüdőrák és komorbid betegminták esetében.

A humán standard szérum, az 5 kiválasztott fehérje, valamint a létrehozott standard fehérje modell (SPM) deszialilált N-glikánprofiljainak reprezentatív elektroferogramjait az 21. ábra mutatja. A méréseket 3 párhuzamos mintával végeztem. A szérum és az SPM mintákból enzimatisz úton felszabadított 9 glikán struktúrát határoztam meg. A struktúrák azonosítása során azokat a csúcsokat tekintettem relevánsnak, amelyek relatív csúcsterülete $\geq 1\%$ -nak adódott. A hasonlóságot jól reprezentálja, hogy a Sigma Aldrich cégtől vásárolt standard emberi szérum (felső elektroferogram) és a standard fehérje keverék (SPM, alsó elektroferogram) esetében is ugyanaz a 9 fő N-glikán struktúra figyelhető meg hasonló eloszlásban. A megfelelő struktúrákat az 5 vizsgált glikoprotein (középső elektroferogramok) közül legalább egy esetében megtaláltam. Az azonosított struktúrákat a hozzájuk tartozó GU-értékekkel és relatív százalékos megoszlással a 16. táblázat tartalmazza.



21. ábra: Humán standard szérumban, a szérumban nagy koncentrációban jelen lévő öt vizsgált glikoprotein (IgG; IgA; haptoglobulin; alfa-1-antitripszin; transferrin), illetve az SPM és a standard humán szérumból szialidáz enzimmel deszialilált, APTS-jelölt N-glikánprofiljainak CE-LIF elektroferogramjai

Az elektroferogramok sorrendje alulról felfelé: A) SPM; B) IgG; C) IgA; D) Hp, E) A1AT; F) Tf és G) standard humán szérumból. Az elválasztás körülményei megegyeztek az 13. ábra szövegében leírtakkal.

Az elektroferogramok alapján elmondható, hogy az 1–4-es csúcsok (FA2, FA2B, FA2(6)G1, FA2(3)G1) az IgG-ből származnak, míg az 5-ös (A2G2) és a 6-os (FA2G2) csúcsok mind az 5 tanulmányozott fehérjén megtalálhatók. A 7-es (FA2BG2) csúcs az IgG-ből és az IgA-ból egyaránt eredeztethető, míg a három antennával rendelkező struktúrák, azaz a 8. (A3G3) és a 9. csúcs (FA3G3) forrása feltehetően a Hp fehérje.

16. táblázat: Standard human szérum és SPM minták azonosított N-glikánjai

Csúcs szám	N-glikán struktúra	Humán szérum		SPM	
		GU érték $\pm$ SD	Relatív csúcsalatti terület % $\pm$ SD	GU érték $\pm$ SD	Relatív csúcsalatti terület % $\pm$ SD
1	FA2	7,73 $\pm$ 0,02	8,49 $\pm$ 0,25	7,74 $\pm$ 0,02	6,59 $\pm$ 0,20
2	FA2B	8,27 $\pm$ 0,02	2,10 $\pm$ 0,06	8,28 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,04
3	FA2(6)G1	8,81 $\pm$ 0,03	7,55 $\pm$ 0,23	8,81 $\pm$ 0,03	6,72 $\pm$ 0,20
4	FA2(3)G1	9,15 $\pm$ 0,03	4,70 $\pm$ 0,14	9,16 $\pm$ 0,03	4,67 $\pm$ 0,14
5	A2G2	9,26 $\pm$ 0,03	49,24 $\pm$ 1,48	9,27 $\pm$ 0,03	47,87 $\pm$ 1,44
6	FA2G2	10,20 $\pm$ 0,03	15,30 $\pm$ 0,46	10,22 $\pm$ 0,03	15,70 $\pm$ 0,47
7	FA2BG2	10,59 $\pm$ 0,03	4,37 $\pm$ 0,13	10,60 $\pm$ 0,03	6,99 $\pm$ 0,21
8	A3G3	11,43 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,03	11,44 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,05
9	FA3G3	11,69 $\pm$ 0,04	7,14 $\pm$ 0,21	11,71 $\pm$ 0,04	8,51 $\pm$ 0,26

A csúcsok számozása a 21. ábrának megfelelően került feltüntetésre.

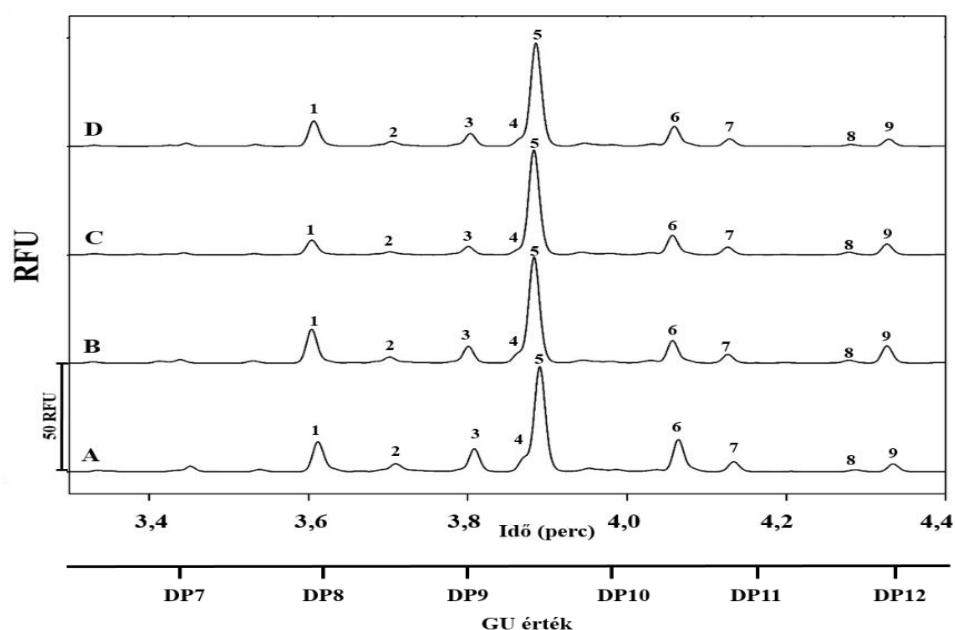
Amint az a 21. ábra elektroferogramjain megfigyelhető, az emberi szérum és az SPM egyes csúcsainak relatív csúcsterületeiben kismértékű különbségek figyelhetők meg, amelyeket számszerűen a 16. táblázat is felsorol. Meg kell jegyezni azonban, hogy az SPM-hez választott öt fehérje az emberi szérum glikozilált fehérjeinek kb. 85%-ának felel meg, ezért első közelítésként úgy ítélt meg, hogy a megfigyelt kisebb különbségeket az alacsonyabb koncentrációjú szérum glikoproteinek (low abundant proteins) fennmaradó ~15%-a okozhatta[304].

Az itt leírt eredmények alapján elmondható, hogy a humán szérumban jelen lévő 5 nagy koncentrációjú glikoprotein glikozilációs változásai jó közelítéssel tanulmányozhatóak anélkül, hogy azokat idő- és költségigényes, bonyolult eljárásokkal specifikusan (pl.: immunoaffinitás módszerrel) kifognánk a mintából vizsgálati céllal, így a munkám további részében ezt a megközelítést alkalmaztam a COPD, tüdőrák és a két betegség együttes előfordulására esetlegesen jellemző glikobiomarkerek vizsgálata során.

5.3.2. Tüdőrák, COPD és komorbid betegcsoportok N-glikozilációs analízise és statisztikai elemzése

A munkám következő szakaszában egészséges kontroll, COPD-ben, tüdőrákban, valamint a két kórképben együtt szenvedő betegek szérum mintáinak N-glikozilációs profiljait hasonlítottam össze. Az N-glikánok elválasztását 20 cm effektív hosszúságú (30 cm teljes hossz) BFS kapillárisban végeztem, mivel az alkalmazott rövidebb elválasztó kapilláris az analízisidő szignifikáns csökkentését eredményezte azonos számú detektált csúcs mellett.

A betegcsoportok vizsgálata során a standard szérumhoz, valamint a SPM mintához hasonlóan 9 fő ($\geq 1\%$ csúcs alatti terület) glikán struktúrát sikerült azonosítanom a minták glikánprofiljának stabilitását növelő deszialilálási lépést követően a csúcsokhoz tartozó GU értékek alapján. Az azonosított struktúrák részletes adatait a 17. táblázat tartalmazza, a minták APTS jelölt N-glikánprofiljait a 22. ábra mutatja, amelyen szereplő elektroferogramokat a kontroll csoport 5. számmal jelölt A2G2 csúcsára normalizálva ábrázoltam. Mivel ez a szerkezet volt az egyetlen, amely nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést (kontroll vs. COPD $p=0,0552$; kontroll vs. tüdőrák $p>0,999$; kontroll vs. komorbid $p=0,4202$; COPD vs. tüdőrák $p=0,1412$; COPD vs. komorbid $p>0,9999$; tüdőrák vs. komorbid $p=0,8462$) az adatok statisztikai elemzése során, ezért ez az ábrázolásmód szemlélteti legjobban a vizsgálati csoportok között tapasztalt glikozilációs változásokat. Az statisztikai elemzéshez tartozó p értékeket a 18. táblázatban mutatom be részletesen.



22. ábra: Humán szérumból származó deszialilált, APTS jelölt N-glikánok elektroforetikus elválasztással kapott profiljai A) Kontroll; B) Tüdőrák; C) COPD; D) Komorbid

Az elválasztás körülményei a kapilláris hosszától eltekintve, amely jelen elválasztások során 20 cm effektív hosszúság volt, megegyeztek a standard minták mérési körülményeivel (21. ábra), illetve a 13. ábra szövegében leírtakkal.

Amint azt a 22. ábra is mutatja, jelentős csúcsarány eltolódások figyelhetők meg a betegcsoportok N-glikozilációs profiljaiban a kontroll csoporttal összehasonlítva. Az egyes struktúrákhoz tartozó relatív csúcsalatti terület % értékeket a hozzájuk tartozó korrigált empirikus szórás értékekkel (SD) együtt a 17. táblázatban tüntettem fel.

A szérum glikoproteinek glikozilációjában a struktúrák részletes vizsgálata során a kontrollhoz képest növekedést figyeltek meg korábban azok elágazásának mértékét (Branching Degree – BD) illetően patológiás körülmények között [270]. Mivel az elágazás mértékének meghatározása szíálsavak nélkül is diagnosztikus jelentőséggel bírhat, ezért a szérum minták deszialilált glikán szerkezeteinek relatív százalékos eloszlásának felhasználásával meghatároztam a kontroll, COPD, tüdőrák, valamint a komorbid csoportok mintáiban az antennáris elágazás mértékét az alábbiak szerint:

Antennáris elágazás mértéke = Háromantennás glikán struktúra (%) / Összes glikán struktúra (%)

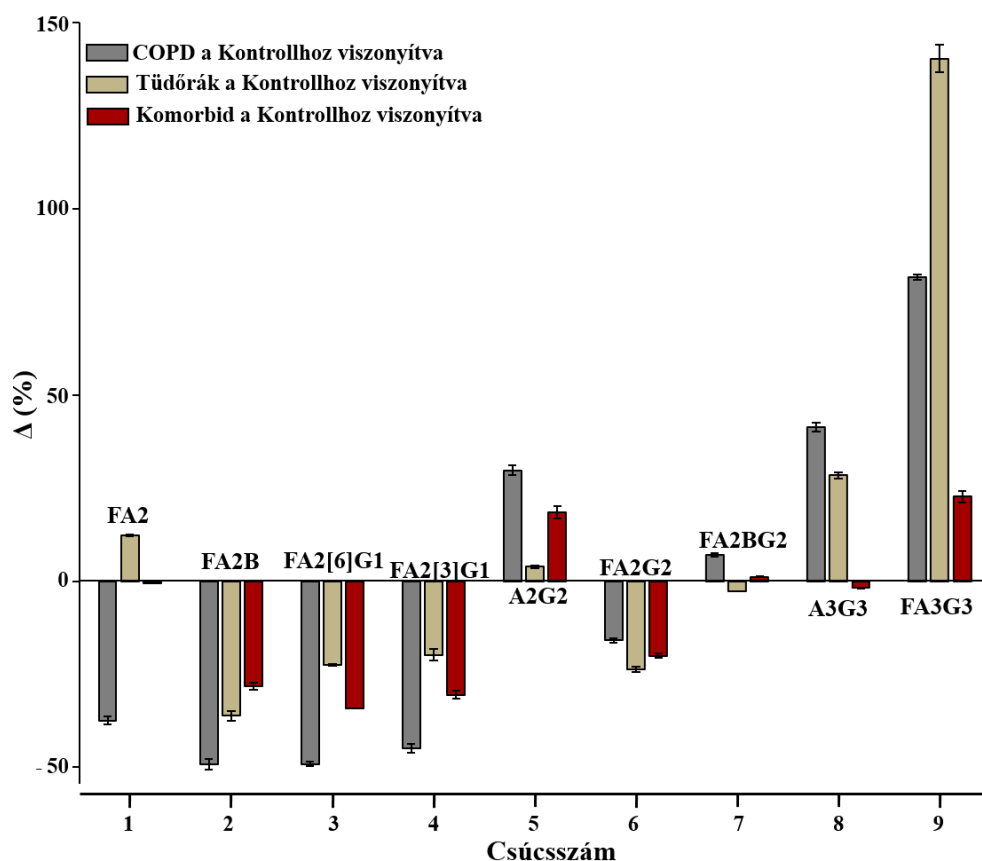
Az antennáris elágazás mértékének vizsgálata során valamennyi vizsgált betegcsoportban növekedést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva. A COPD betegek körében a háromantennás szerkezetek aránya (0,07) bár jelentős, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést mutatott a kontroll (0,04) csoporttal ($p=0,2492$), valamint a komorbid csoport 0,05 ($p>0,9999$) értékével összehasonlítva. A COPD és a tüdőrák (0,09) közti különbség szintén nem volt szignifikáns ($p>0,9999$). Bár mindegyik csoport értéke növekedett a kontrollhoz képest, a legjelentősebb növekedést a tüdőrák (0,09) csoport vonatkozásában figyeltem meg, a két csoport közti különbség statisztikailag is szignifikáns volt ($p=0,0134$). A növekedést a komorbid csoport esetében főként az FA3G3 struktúra kismértékű, míg a COPD és a tüdőrák csoport esetében ugyanezen glikán szerkezet jelentős csúcsarány növekedése, illetve a mintában jelen

lévő valamennyi mono-, valamint bigalaktozilált struktúra eltérő mértékű változása a kontroll csoport arányaihoz viszonyítva idézi elő.

A 17. táblázatban szerepel a vizsgált betegcsoportok azonosított csúcsainak változása %-os értékben kifejezve a kontroll csoport azonos struktúráihoz viszonyítva. A táblázat ezen 3 oszlopában szereplő értékeket a dolgozat 23. ábráján szemléltetem, ahol az Y tengely a kontroll csoport csúcsaihoz viszonyított változást mutatja % értékben kifejezve, míg az X tengelyen a mintákban azonosított aszparagin kötött oligoszacharid struktúrák láthatók.

17. táblázat: Kontroll, COPD, tüdőrák és komorbid csoportok szérumból azonosított N-glikán szerkezetei és a struktúrák relatív csúcsalatti területének %-os megoszlása (átlag $\pm$ SD), valamint a csúcsok egyenkénti %-os terület változásai a kontrollhoz viszonyítva

Csúcsszám	N-glikán struktúra	Kontroll	COPD	Tüdőrák	Komorbid		COPD a Kontrollhoz viszonyítva	Tüdőrák a Kontrollhoz viszonyítva	Komorbid a Kontrollhoz viszonyítva
1	FA2	13,39 $\pm$ 0,37	8,37 $\pm$ 0,08	15,04 $\pm$ 0,39	13,31 $\pm$ 0,37		-37,47 $\pm$ 1,12	+12,33 $\pm$ 0,22	-0,60 $\pm$ 0,01
2	FA2B	4,39 $\pm$ 0,13	2,23 $\pm$ 0,01	2,80 $\pm$ 0,03	3,15 $\pm$ 0,05		-49,18 $\pm$ 1,34	-36,19 $\pm$ 1,30	-28,22 $\pm$ 1,05
3	FA2[6]G1	9,47 $\pm$ 0,28	4,82 $\pm$ 0,08	7,34 $\pm$ 0,19	6,23 $\pm$ 0,18		-49,09 $\pm$ 0,63	-22,49 $\pm$ 0,26	-34,21 $\pm$ 0,03
4	FA2[3]G1	6,34 $\pm$ 0,22	3,49 $\pm$ 0,05	5,08 $\pm$ 0,08	4,40 $\pm$ 0,08		-44,92 $\pm$ 1,20	-19,84 $\pm$ 1,52	-30,57 $\pm$ 1,10
5	A2G2	45,10 $\pm$ 2,93	58,50 $\pm$ 3,19	46,83 $\pm$ 2,88	53,42 $\pm$ 2,71		+29,77 $\pm$ 1,34	+3,85 $\pm$ 0,35	+18,52 $\pm$ 1,69
6	FA2G2	12,93 $\pm$ 0,26	10,87 $\pm$ 0,29	9,87 $\pm$ 0,30	10,34 $\pm$ 0,28		-15,94 $\pm$ 0,58	-23,68 $\pm$ 0,79	-20,04 $\pm$ 0,56
7	FA2BG2	4,13 $\pm$ 0,06	4,42 $\pm$ 0,09	4,02 $\pm$ 0,06	4,18 $\pm$ 0,06		+7,02 $\pm$ 0,45	-2,66 $\pm$ 0,03	+1,21 $\pm$ 0,04
8	A3G3	1,09 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,02	1,40 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,00		+41,28 $\pm$ 1,19	+28,44 $\pm$ 0,82	-1,83 $\pm$ 0,14
9	FA3G3	3,17 $\pm$ 0,05	5,76 $\pm$ 0,11	7,62 $\pm$ 0,24	3,89 $\pm$ 0,11		+81,70 $\pm$ 0,69	+140,34 $\pm$ 3,73	+22,70 $\pm$ 1,53



23. ábra: Betegcsoportok szérum mintáiban azonosított, deszialilált N-glikán struktúráinak terület százalékos változása (átlag ± SD) az egészséges kontroll csoport azonos csúcsaihoz viszonyítva

Érdekes ellentétes változás figyelhető meg az FA2 struktúra (1. csúcs) relatív csúcsterület % értékében, amely így potenciális molekuláris marker lehet, és amely segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD (-37,47% ± 1,12) a tüdőráktól (+12,33% ± 0,22), illetve mindkét tüdőbetegség elkülöníthető a struktúra vizsgálatával az egészséges kontroll csoporttól. A kontroll csoportot a 23. ábra Y tengelyének $\Delta\% = 0$ értékénél meghúzott zérus vonal jelképezi. A komorbid betegcsoport relatív csúcsterület % értéke ugyanezen FA2 csúcs esetében csak kismértékben csökkent a kontroll csoporthoz képest (-0,60% ± 0,01). A relatív csúcsterület negatív %-os változása figyelhető meg a core-fukozilált kétantennás agalaktozilált biszekting FA2B (2. csúcs), valamint a core-fukozilált kétantennás monogalaktozilált FA2[6]G1 (3. csúcs) és FA2[3]G1 (4. csúcs) vonatkozásában a kontroll csoporthoz viszonyítva a COPD (FA2B: -49,18 ± 1,34; FA2[6]G1: -49,09 ± 0,63; és FA2[3]G1: -44,92 ± 1,20), a tüdőrák (FA2B: -36,19 ± 1,30; FA2[6]G1: -22,49 ± 0,26; FA2[3]G1: -19,84 ± 1,52), valamint a komorbid (FA2B: -

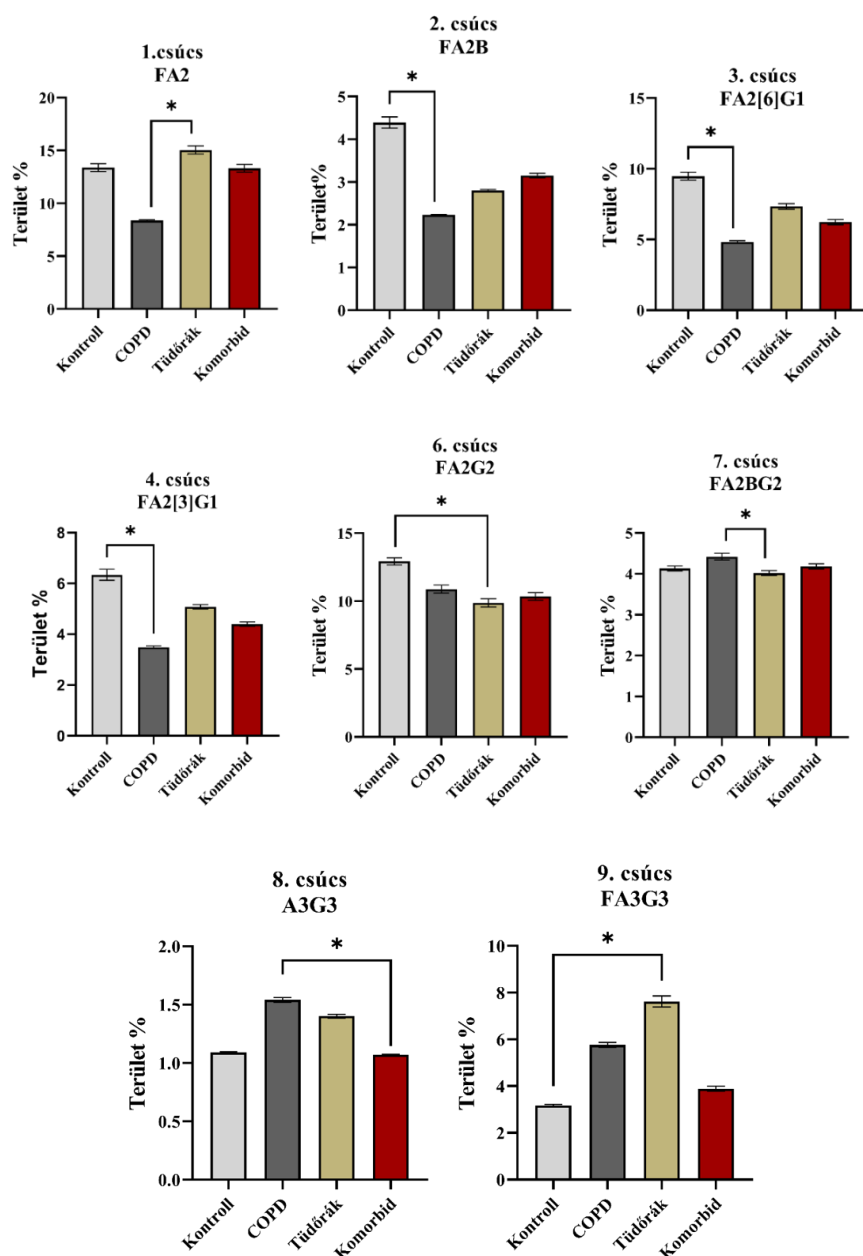
28,22 $\pm$ 1,05; FA2[6]G1: -34,21 $\pm$ 0,03; FA2[3]G1: -30,57 $\pm$ 1,10) csoportban egyaránt. A 6. csúcs esetében, amely megfelel a core-fukozilált kétantennás bigalaktozilált FA2G2 struktúrának, bár kisebb mértékű, de szintén negatív változás figyelhető meg mindhárom vizsgált csoportban a kontrollhoz viszonyítva (COPD: -15,94 $\pm$ 0,58; tüdőrák: -23,68 $\pm$ 0,79; komorbid: -20,04 $\pm$ 0,56). Ezen 4 glikán szerkezetet vizsgálva szintén elkülöníthetők a betegségcsoportok a kontroll csoporttól.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy SPM modell és standard szérum analízise alapján (21. ábra) az 1–4 csúcsok valószínűleg IgG eredetűek.

A legnagyobb relatív csúcsterület-növekedés (+140,34% $\pm$ 3,73) a tüdőrákban szenvedő betegek alkotta csoportban volt megfigyelhető a core-fukozilált háromantennás trigalaktozilált FA3G3 (9. csúcs) szerkezet esetében az egészséges kontrollhoz képest. Ugyanez a szerkezet +81,70% $\pm$ 0,69 eltérést mutatott a COPD és csak +22,70% $\pm$ 1,53 változást a komorbid betegeknél. Szintén figyelemre méltó növekedést tapasztaltam a COPD-s betegek A3G3 csúcsának területszázalék változásában (+41,28% $\pm$ 1,19) és a tüdőrákos csoportban egyaránt (+28,44% $\pm$ 0,82), míg ezeknél jóval kisebb és ellentétes irányú, negatív változás volt megfigyelhető a komorbid betegek adatainak elemzése során (-1,83% $\pm$ 0,14). Ez a két core-fukozilált háromantennás szerkezet az SPM és szérum analízis alapján feltételezhetően a Hp akut-fázis fehérjéből származik.

Az A2G2 szerkezet (5. csúcs) bár a későbbi statisztikai elemzés során nem bizonyult szignifikánsan eltérőnek a csoportok között, az elsőként alkalmazott adatelemzési eljárásban pozitívan változott minden betegségcsoport esetében a kontrollhoz képest. Az 5. (A2G2) és 6. (FA2G2) számú csúcsok láthatóan mind az öt tanulmányozott fehérjéről származhatnak az SPM modellben és következésképpen a szérum mintákban is igen nagy arányban járulhatnak hozzá ezen csúcsok %-os értékeinek alakulásához. A legstabilabb glikán szerkezetnek az FA2BG2 (7. csúcs) tekinthető ezen elemzési módszer szerint, amely kevesebb, mint 10% -os változást mutatott az összes betegségcsoportban a kontrollhoz képest (COPD: +7,02% $\pm$ 0,45; tüdőrák: -2,66% $\pm$ 0,03 és komorbid: +1,21% $\pm$ 0,04). A rendelkezésre álló adatok alapján úgy ítéltam meg, hogy ez a csúcs az IgG-és IgA immunglobulinokról származhat.

A kontroll, COPD, tüdőrák és ezen két betegségben egyszerre szenvedő betegektől származó szérum minták esetében Kruskal-Wallis tesztet végeztem, majd Dunn's *post hoc* analízis alkalmazásával vizsgáltam meg a csoportok átlagos csúcsalatti terület százalékában megfigyelt eltéréseket. A statisztikailag szignifikáns eltérést mutató glikán struktúrák eredményét a dolgozat 24. ábrája tartalmazza. A szignifikáns eltéréseket csillaggal (*) jelöltem az ábrákon.



24. ábra: Kontroll, COPD, tüdőrák és komorbid csoportok szérumban előforduló, szignifikáns eltéréseket mutató deszialilált N-glikán szerkezetek

A statisztikailag szignifikáns eltérések az alábbiak szerint kerültek feltüntetésre: * $p < 0,05$.

A szérumban FA2 struktúra esetében szignifikáns eltérést figyeltem meg a COPD ($8,37 \pm 0,08$) és tüdőrákban ($15,04 \pm 0,39$) szenvedő betegek között ($p=0,0134$). A COPD betegcsoportban az FA2B csúcs terület százalékában szignifikáns csökkenés adódott a kontroll csoporthoz viszonyítva ($4,39 \pm 0,13$; $2,23 \pm 0,01$; $p=0,0134$). További csökkenést detektáltam a kontroll csoporthoz képest az FA2[6]G1 ($9,47 \pm 0,28$; $4,82 \pm 0,08$; $p=0,0134$), valamint az FA2[3]G1 ($6,34 \pm 0,22$; $3,49 \pm 0,05$; $p=0,0134$) N-glikán szerkezetek analízise során is. A kontroll csoport

és tüdőrákban szenvedő betegek által alkotott csoport FA2G2, valamint FA3G3 struktúrájában szintén szignifikáns eltérést tapasztaltam. A core-fukozilált kétantennás bigalaktozilált glikán struktúra (FA2G2) átlagos csúcs alatti terület százaléka a tüdőrákban szenvedők csoportja esetében szignifikáns csökkenést ($12,93 \pm 0,26$; $9,87 \pm 0,30$; $p=0,0194$), míg a core-fukozilált trigalaktozilált struktúra (FA3G3) aránya jelentős mértékű emelkedést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva ($3,17 \pm 0,05$; $7,62 \pm 0,24$; $p=0,0134$). A csúcs alatti terület százalékos változásának vizsgálata során legstabilabbnak megítélt FA2BG2 struktúra a statisztikai elemzés során szignifikáns eltérést mutatott a COPD és a tüdőrák csoportok összehasonlításakor és csökkenés volt megfigyelhető a daganatos betegeket vizsgálva ($4,42 \pm 0,09$; $4,02 \pm 0,06$; $p=0,0194$). Az A2G2 N-glikán struktúra volt az egyetlen olyan, humán szérumban detektált neutrális cukor szerkezet, amely a csoportok között nem mutatott szignifikáns eltérést.

18. táblázat: Kontroll, COPD, tüdőrák és komorbid betegektől származó emberi szérum N-glikozilációs mintázatának összevetése Kruskal-Wallis tesztet követően Dunn's többszörös összehasonlítással

	Kontroll vs. COPD	Kontroll vs. Tüdőrák	Kontroll vs. Komorbid	COPD vs. Tüdőrák	COPD vs. Komorbid	Tüdőrák vs. Komorbid
1. csúcs FA2	0,5366	>0,9999	>0,9999	0,0134	>0,9999	0,5366
2. csúcs FA2B	0,0134	0,2492	>0,9999	>0,9999	0,2492	>0,9999
3. csúcs FA2[6]G 1	0,0134	>0,9999	0,2492	0,2492	>0,9999	>0,9999
4. csúcs FA2[3]G 1	0,0134	>0,9999	0,2492	0,2492	>0,9999	>0,9999
5. csúcs A2G2	0,0552	>0,9999	0,4202	0,1412	>0,9999	0,8462
6. csúcs FA2G2	>0,9999	0,0194	0,2492	0,4202	>0,9999	>0,9999
7. csúcs FA2BG2	0,4202	>0,9999	>0,9999	0,0194	>0,9999	0,6775
8. csúcs A3G3	0,2492	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0134	0,2492
9. csúcs FA3G3	0,2492	0,0134	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2492

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szignifikáns különbségeket jelző p értékeket piros színnel jelöltem.

6. Megbeszélés

6.1. Humán szérum N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten történő tárolás során

A kísérletek előanalitikai összetevői, legyenek azok akár mintavétel, előkészítés, tárolás vagy laboratóriumba történő szállítás, mind hozzájárulhatnak a kutatási adatok, eredmények és értelmezés látszólagos változékonyságához. Az N-glikom egyéni változékonysága tekintetében a mintagyűjtési idő és állapot (pl. tárolási hőmérséklet és idő), valamint a minta előkészítése során fellépő tényezők nagy jelentőséggel bírhatnak, ezért kísérleteim központi kérdése az volt, hogy a teljes vér szobahőmérsékleten történő tárolása befolyásolja-e a centrifugálással kapott szérum minták globális N-glikánprofilját.

Ezidáig legjobb tudomásom szerint egyetlen olyan átfogó vizsgálatot végeztek, amely során mélyrehatóan tanulmányozták az egyes vérvételi, mintakezelési és tárolási körülmények hatását a szérum és a plazma minták N-glikánprofiljára. Dedova és mtsai. hozzám hasonlóan nem tapasztaltak szignifikáns eltérést a kontroll és az egyes időpontok mintáinak N-glikozilációs profilja között sem CE-LIF, sem MALDI-TOF-MS alkalmazásával. Meg kell azonban jegyezni, hogy a patológiás és fiziológiás folyamatokban egyaránt fontos szerepet játszó terminális szíálsavakat a kutatócsoport eltávolította a kapilláris elektroforetikus analízis előtt [108]. Így az a kérdés, hogy a mintát érő különböző hatások, főként a hőmérséklet, a centrifugálásig, illetve fagyasztásig eltelt idő, hogyan hatnak ezen szerkezetek alakulására, továbbra is megválaszolatlan maradt. Ezért vizsgálataim során az esetleges glikozilációs változásokon belül főként a szíálsavas struktúrák módosulása, valamint azok neutrális szerkezetekhez viszonyított arányának esetleges csökkenése foglalkoztatott.

A munka első részében 3 egészséges önkéntestől származó szérum minta teljes N-glikán tartalmának szobahőmérséklet hatására bekövetkező változását vizsgáltam kapilláris elektroforézissel, mely során 13 fő (legalább 1% területszázalékot elérő) N-kötött glikán szerkezetet azonosítottam. Az elektroferogramok kiértékelésével kapott adatok szerint a szíálsavval terminált szerkezetek aránya a várakozásoknak megfelelően bár nem szignifikáns, de kismértékű, folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott a szobahőmérsékleten való tárolási idő növekedésével egészen a 150 perces mintáig. Ezt követően azonban a 270 perces minta esetében az SF/NF arány növekedett és megközelítette a kiindulási értéket.

Az egyéni eltérések kiküszöbölése érdekében, amely az egyéni méréseknél tapasztalt 150 perces időpont esetében megfigyelt szialsav csökkenést, majd a következő időpontra az értéknek a kiindulási értékhez való közeledését okozhatta, 8 egészséges önkéntes szérum mintájának poolozásával kapott glikánprofil alakulását tanulmányoztam. A poolozott mintákban 16 olyan aszparagin-kötött glikán szerkezetet sikerült azonosítanom, amely relatív csúcsalatti területszázalék értéke elérte az 1%-ot.

A minták szobahőmérsékleten (24-25°C) töltött idejének növekedésével a szialsavas csúcsok aránya itt is csökkenő tendenciát mutatott, azonban a 150 percig tárolt szérum esetében a kontroll mintát is meghaladó SF/NF arány növekedést tapasztaltam. A növekedés mértéke szignifikáns volt a 90 perces és a 270 perces minták adataihoz képest.

A minták statisztikai elemzése során a 16 azonosított csúcsból 6 esetében tapasztaltam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban ezen eltérések egyike sem a kontroll időpont és valamelyik egyéb vizsgált időpont között fordult elő. A jelentős változások minden esetben a kontrolltól eltérő időpontok között voltak megfigyelhetőek.

Konklúzió:

A vérvételtől a centrifugálásig, majd a szérum minták fagyasztásáig eltelt idő függvényében dinamikus változást tapasztaltam az SF/NF arány tekintetében. A jelenség magyarázatául több tényező is szolgálhat:

- 1) a szérumban szabad szialsav-transzferázok lépnek működésbe
- 2) limfociták és eritrociták felszínéről szabaddá váló glikán szerkezetek eltolják a kezdeti SF/NF arányt
- 3) esetleges gyenge hemolízis következtében az intracelluláris organelumokból felszabaduló N-glikánok jelennek meg a szérumban idővel, melyeket később a szabad exoglikozidázok degradálnak [108].

Ezek a jelenségek mind felelősek lehetnek az idő előrehaladtával tapasztalt szialsavas-neutrális szerkezetek arányváltozásaiért.

Ezért a preanalitikai tényezők hatásaitól mentes glikánprofil tanulmányozása érdekében célszerűnek tartom a mintákat a lehető legrövidebb időn belül centrifugálni, szeparálni a szérumot a vér alakos elemeitől és további glikozilációs elemzésig fagyasztva tárolni. Amennyiben ez nem történik meg, a kapott eredmény nem minden időpontban tükrözi a vérvételkori aktuális glikozilációs állapotot.

Mindazonáltal eredményeim arra utalnak, hogy a teljes vérminta centrifugálásig szobahőmérsékleten történő tárolásának nincs jelentős hatása a szérumban N-glikom alakulására a vizsgálati csoportokon belüli szórás növelésén túl, abban az esetben, ha a jelen dolgozatban szimulált mintakezelési hiba (hosszabb idejű tárolás szobahőmérsékleten centrifugálás előtt) a vizsgálatra gyűjtött minták jelentős részénél nem fordul elő. A dolgozatban vizsgált körülmények által előidézhető szórásnövekedés kiküszöbölésére megoldást jelenthet a minták poolozása abban az esetben, ha a betegadatok egyénenkénti elemzése és összehasonlítása nem célunk. A poolozás ugyanis a szórás csökkentése mellett jelentősen csökkenti a mintafeldolgozás idő- és költségigényeit, ezzel párhuzamosan pedig kiemeli az adott csoportra leginkább jellemző glikozilációs tulajdonságokat.

A munkám eredményeként kijelenthető, hogy a vizsgált körülmények között a szérumban N-glikom viszonylag stabil biomarkerforrásnak tekinthető.

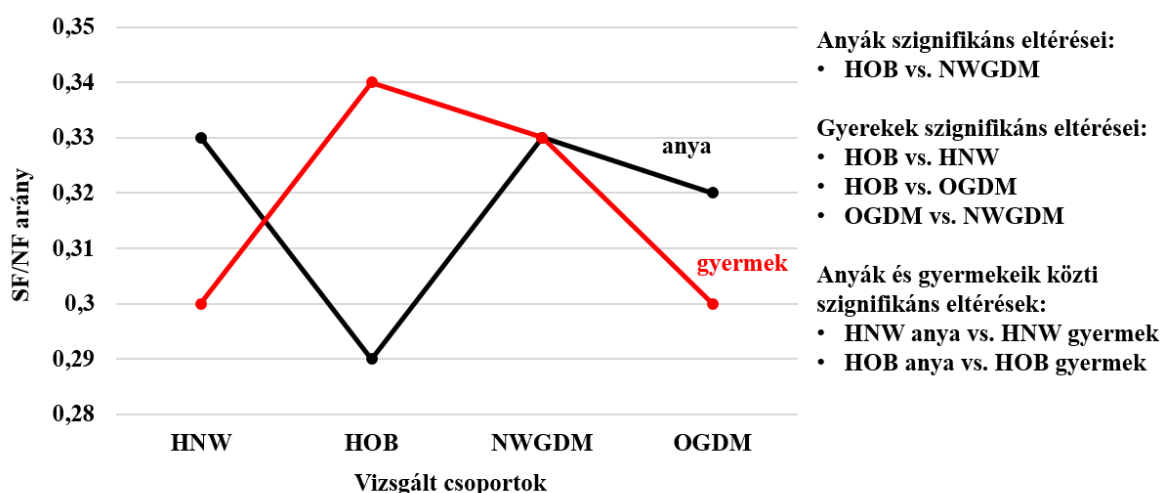
6.2. Az elhízással és gesztációs diabétesszel társuló terhesség hatása az anya és gyermeke szérumban izolált IgG N-glikozilációjára

Az IgG az egyetlen olyan antitest-osztály, amely képes átmenni a méhlepény szövettani rétegein a szinciciotrofoblasztokon expresszáldó újszülöttkori Fc receptorhoz kötődve. Az IgG transzplacentáris átjutása a magzatba ezért egy olyan fontos mechanizmus, mely biztosítja a csecsemő védelmét, míg annak immunrendszere éretlen és kevésbé hatékony.

A molekula 21 napos féléletidejének köszönhetően hosszú ideig, akár 6 hónapig is detektálható az újszülöttek szérumban, még mielőtt a csecsemő saját antitestje válna dominánsá [305], így lehetőséget biztosít az anyai IgG terhesség alatti, illetve a placentán átjutott IgG glikozilációs státuszának összehasonlítására.

6.2.1. Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációs mintázatának alakulása

Munkám során első lépésként meghatároztam az anyai és a gyermek szérumban lévő IgG antitestek N-glikán összetételét CE-LIF alkalmazásával. Az anyai IgG vonatkozásában 14, míg a csecsemők esetében 13 N-kötött cukorstruktúrát tudtam azonosítani (9. táblázat). Az anyai és gyermek SF/NF arány összehasonlítása során az egészséges kontroll anyák és gyermekeik, valamint az elhízott anyák és gyermekeik között találtam statisztikailag szignifikáns eltérést (25. ábra).



25. ábra: Szérum eredetű IgG SF/NF (szialsavas/neutrális szerkezetek) arányának alakulása a különböző vizsgálati csoportok között

Bár korábbi eredmények szerint az anyai BMI nem érinti sem az anyai, sem az újszülött IgG szérumkoncentrációját, sem pedig az alosztályszintű placentáris transzportarányt [306], mely következők szerint alakul: $\text{IgG1} > \text{IgG3} > \text{IgG4} = \text{IgG2}$ [306], az antitestek elhízással társuló terhesség hatására kialakuló glikozilációs módosulását vizsgáló tanulmány legjobb tudomásom szerint ezidáig nem született. A hiperglikémiás és GDM anyák esetében tapasztalt csökkent IgG szint azonban emelkedett köldökzsinórvér IgG szinttel társul a normoglikémiás csoporttal összevetve [307], így a korábbi és jelen dolgozatban szereplő eredményekből megállapítható, hogy a GDM nemcsak mennyiségi, hanem minőségi különbséget is okoz az IgG transzportfolyamataiban.

Konklúzió:

Az anya-gyermek párok IgG szialiláltságának MALDI-TOF-MS alkalmazásával végzett vizsgálata során eredményeimhez hasonlóan a gyermek IgG antitestjeinek alacsonyabb szialiláltságáról számoltak be normal terhesség során [183]. A jelenség biológiai hasznossága az utódok szempontjából jelenleg tisztázatlan és további vizsgálatokat igényel.

Mivel az elhízott anyák esetében a kontrollhoz hasonlóan szignifikáns eltérést tapasztaltam az anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációjának SF/NF arányában, amely arány a kontroll anyák csoportval ellentétes irányú, így megállapítottam, hogy mind az elhízás, mind pedig a GDM befolyásolhatja a placentáris transzportfolyamatokat.

A kapott eredmények tovább erősíthetik azt a feltételezést, miszerint a méhlepény képes lehet „érzékelni” az anyai környezetet és alkalmazkodva ahhoz, megvédeni a magzatot az anyai elhízásban és gesztációs diabetesben jelenlévő káros gyulladásos, oxidatív, hiperinzulinemiás környezettől [308]. Így a korábbi vizsgálati eredményeket is figyelembe véve úgy gondolom, hogy a jövőben további alanyok bevonásával alosztály és kötőhelyspecifikus IgG glikozilációs analízis elvégzése célszerű lenne, kiegészítve a placenta gyulladásos markereinek analízisével, mellyel közelebb juthatunk az antitestek méhlepényen keresztüli transzportfolyamainak, és ezáltal a magzat immunrendszerének fejlődését befolyásoló tényezőknek a jobb megértéséhez is.

6.2.2. Anyai elhízás és gesztációs diabetes hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára

Az anyai szérumból izolált IgG glikomikai elemzése során az azonosított 14 struktúra közül 11 mutatott szignifikáns eltérést valamely vizsgált csoport között. Ebből 10 szerkezet tért el szignifikánsan a kontroll és valamely, elhízással, GDM kialakulásával, esetleg mindkettővel szövődött anyai csoport között.

Az SF/NF arány alakulásának tanulmányozása során az elhízott anyák alkotta csoportokban ugyan kis mértékben, de a szialsavas struktúrák arányának csökkenését figyeltem meg a kontroll és az NWGDM csoporthoz képest. A változás statisztikai szempontból csak az HOB és az NWGDM csoport között volt szignifikáns.

Konklúzió:

Az anyai IgG N-glikozilációjának SF/NF arány összehasonlítása során bár kizárólag a HOB esetben tapasztaltam szignifikáns, de kismértékű csökkenést az NWGDM csoport szialiláltságához viszonyítva, megfigyelhető az OGDM csoport SF/NF arányának csökkenése is a kontroll és az NWGDM csoporthoz viszonyítva. Az eredmények, miszerint statisztikai szempontból is szignifikáns eltérés csak a HOB és az NWGDM csoportok közötti volt, illetve hogy az arányszám az NWGDM csoportjában egyáltalán nem változott a kontrollhoz viszonyítva azt jelzi, hogy az IgG N-glikozilációjára inkább az elhízásnak, mintsem a GDM-nek lehet hatása az édesanyák esetében. Így a tapasztalt csökkent SF/NF arány az elhízás során fellépő gyulladásos folyamatokat jelezheti, ugyanakkor a kismértékű változások lehetséges oka az IgG glikozilációjának terhesség előtti állapotára történő fokozatos visszatérése is lehet a

szülést követően [188]. Emiatt a GDM okozta esetleges változások már kevésbé észlelhetők a két érintett csoportban.

A GDM csoport vizsgálatának eredményei ugyanakkor összhangban állnak egy nemrégiben megjelent kutatás eredményével, amely szerint az IgG N-glikozilációja alapján nem lehet elkülöníteni egymástól a normál és a GDM édesanyák csoportjait [309]. Eredményeim alapján megerősíthetem, hogy az IgG glikozilációs vizsgálata feltehetően nem alkalmas a GDM kialakulásának előrejelzésére.

A krónikus gyulladással járó autoimmun RA esetén a terhesség során az IgG Fc régiójához konzerváltan kapcsolódó N-glikán szerkezetek galaktozilációjának és szialilációjának a növekedéséről számoltak be a betegség javulásával párhuzamosan [310] [311], így feltételezhető, hogy a terhesség során végbemenő hormonális változások képesek valamelyest ellensúlyozni az elhízás és a GDM káros hatásait, melyeket IgG N-glikozilációs vizsgálatával esetleg feltárhatnánk.

Mivel azonban az OGDM csoport magasabb SF/NF aránnyal rendelkezett, mint a HOB csoport, illetve jelentős eltérést figyeltem meg a méhlepényen keresztül a gyermekekbe átjutott IgG glikozilációjában, ezért a kapott eredmény alapján további vizsgálatok elvégzését tartom indokoltnak, akár nagyobb anya-gyermek párokból kialakított csoportokkal.

Mivel az FABG2S2 szerkezet szignifikáns eltérést mutatott a kontroll és a HOB, valamint a kontroll és az OGDM csoportok között, így a szerkezet az elhízás hatásait tükrözheti, nyomonkövetése esetleges további vizsgálatok során javasolt.

6.2.3. Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása a gyermekek szérum mintáiból izolált IgG antitestek N-glikozilációjára

A vizsgált csoportok édesanyáitól született gyermekek esetében 13 azonosított komplex N-kapcsolt cukorstruktúra közül 9 (FA2G2S2; FA2(3)G1S1; A2G2S1; FA2; FA2[6]G1; FA2[3]G1; FA2B[6]G1; FA2G2 és FA2BG2) relatív terület százalék megoszlásában tapasztaltam statisztikai szempontból is szignifikáns eltérést a csoportok között (18. ábra; 13. táblázat). Ebből a 9 struktúrából 3 alapján tudtam a kontroll csoportot a HOB (FA2(3)G1S1, FA2[6]G1, FA2B[6]G1), és 4 alapján az NWGDM (FA2G2S2, A2G2S1, FA2[6]G1, FA2[3]G1) anyáktól született gyermekek csoportjaitól elkülöníteni.

A minták SF/NF arányában a kontroll csoport értékéhez képest mind az elhízott anyák gyermekei, mind a normál testsúllyal rendelkező GDM anyáktól született gyermekek esetében

kismértékű növekedést tapasztaltam, míg mindkét rendellenességet mutató csoportban érdekes módon a kontrollal megegyező értéket kaptam.

Szignifikáns a HNW és HOB, HOB és OGDM, valamint az NWGDM és OGDM csoportok közötti különbség volt.

Konklúzió:

Az adatok tükrében megállapítható, hogy:

- 1) Mind az elhízás, mind a GDM befolyásolhatja a gyermekekben detektált IgG molekulák N-glikozilációjának szialiláltságát.
- 2) Feltételezhető, hogy a placentán az inkább antiinflammatorikus hatással rendelkező antitestek jutnak át, kompenzálva az anyaméh esetleges gyulladásos környezetét (25. ábra), mivel az elhízással és GDM-vel társult terhességből születő csecsemők IgG N-glikánjainak megnövekedett SF/NF aránnyal rendelkeznek. A szialsavas szerkezetek arányának növekedése az IgG antiinflammatorikus hatásait erősíti.
- 3) A glikoziláció szelektív IgG transzport [180] ennek a védelmi mechanizmusnak része lehet, mely eredményeként gyulladásos körülmények között a placenta a magasabb szialilációval rendelkező molekulákat részesítheti előnyben.
- 4) Ezen mechanizmus sérülésére utalhat az OGDM csoport gyermekei esetében tapasztalt csökkent szialiláció.

Az eredmények további vizsgálatok elvégzését sürgetik a terhesség során fellépő betegségek placentáris transzportfolyamatokra gyakorolt, valamint annak az utódokra kifejtett hatásának megértéséhez.

6.3. IgA N-glikozilációs módosulásai elhízás és gesztációs diabétesz hatására

Mivel korábban Steffen és mtsai. kimutatták, hogy a szérumban az IgA N-glikozilációs profilja és a molekula proinflammatorikus hatása között összefüggés áll fenn [89], így az IgG molekulához hasonlóan az IgA glikozilációs módosulásai a szervezetben aktuálisan zajló, különböző gyulladásos folyamatok, így az elhízás és a GDM hatásainak hatékony markereként is szolgálhatnak. Ennek a hipotézisnek a bizonyítása céljából az elhízással és terhesség alatti cukorbetegséggel diagnosztizált anyai szérumban minták IgA antitestjeinek N-glikozilációs módosulását tanulmányoztam.

A vizsgálat során az IgA N-glikán szerkezetei közül 15 komplex cukorstruktúra mutatott statisztikai szempontból szignifikáns eltérést legalább két csoport között. A vártakkal ellentétben azonban az elhízott anyák csoportjának IgA glikozilációja a kontroll csoporttól csak egyetlen N-glikán szerkezet alapján volt elkülöníthető (A2[3]G1S1), szemben az IgG antitestekkel, ahol a kontroll és az elhízott csoport 4 szerkezete is eltérést mutatott. A kontroll és a normál testsúly ellenére is GDM meglétével diagnosztizált csoport összehasonlításakor 3 szerkezet (FA1[6]+A2BG2S1; A1G1[6]), míg a kontroll és az elhízott terhességi cukorbetegséggel diagnosztizált anyák csoportjainak összehasonlítása során 7 struktúra (FA2BG2S2; A[3]; M5; A1G1[6]; FA1[3]G1; A2G2 és FA2G2) tért el szignifikánsan.

Meg kell azonban említeni, hogy a kontroll és az elhízott GDM-es anyák csoportja közötti szignifikáns eltérést mutató csúcsok jelentős része kisebb területszázalékú csúcs, átlagos értékük nem haladja meg a 4%-ot. Ezért a kontroll csoporttól az ODGM csoportot biztonsággal az FA2BG2S2, az A[3], valamint az A1G1[6] szerkezetek alapján lehet elkülöníteni, melyek közül kiemelkedik a monogalaktozilált szerkezet.

A gyulladásos folyamatokat jelző szialilációs szerkezetek alakulásának tekintetében azonban nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a csoportok között.

Konklúzió:

Eredményeim alapján az alábbi megállapítások tehetők:

- 1) Az IgA A1G1[6] N-glikán szerkezete mivel statisztikailag szignifikánsan eltért a kontroll és az NWGDM, valamint a kontroll és az OGDM csoportok között is, így a szerkezet alkalmas lehet a GDM kialakulásának előrejelzésére a BMI-től függetlenül.
- 2) Az A2G2, FA2G2, valamint az M5 szerkezetek alkalmasak lehetnek az elhízással társuló GDM előrejelzésére, mivel százalékos értékük szignifikánsan kizárólag a HNW és OGDM csoportok között tért el. Ezen struktúrák további vizsgálatát javasolt.
- 3) Megállapítottam, hogy az IgA teljes N-glikozilációs profilját az elhízás kevésbé befolyásolja, mint a GDM, ennek megfelelően potenciális markere lehet az anyai BMI-től függetlenül a GDM kialakulásának és esetleges visszamaradó hatásainak.
- 4) Az IgA antitestek szialiláltságát azonban sem az elhízás, sem pedig a GDM nem befolyásolja, így a molekula feltehetően nem alkalmas a gyulladásos folyamatok fennállásának jelzésére a vizsgált esetekben.

6.4. Szérum N-glikozilációs profiljának modellezése és az új megközelítés alkalmazása különböző tüdőbetegségek N-glikozilációs analízisében

Az IgG és IgA immunglobulinok N-glikozilációs analíziséhez szükséges mintamennyiség, valamint analízisidő szignifikáns csökkentése érdekében munkám során kidolgoztam egy új potenciális módszert, mely révén a szérum minta egészének vizsgálatával nyerhetünk kellő információt a szérumban legnagyobb mennyiségben jelen lévő két antitest glikozilációs módosulásairól.

A modell szérum megalkotása során első lépésként az IgG és az IgA mellett a vérben nagy mennyiségben előforduló 3 glikoprotein (transzferrin, haptoglobin és alfa-1-antitripszin) N-glikozilációját tanulmányoztam, majd az 5 fehérje fiziológiás koncentrációtartományom belüli összekeverésével (5. táblázat) sikeresen modelleztem a humán szérum szialidáz enzimmel kezelt N-glikánprofilját. A szialidáz enzimmel történő kezelés révén növeltem a profil reprodukálhatóságát. A modell és az összehasonlításhoz kontrollként alkalmazott kereskedelmi forgalomban kapható standard szérum esetében is 9 fő (területszázalék $\geq 1\%$) N-glikán szerkezetet azonosítottam (21. ábra és 16. táblázat), mellyel reprezentáltam, hogy a szérum fő N-kapcsolt glikán struktúrái a tanulmányozott 5 fehérjéről származnak.

A modell megalkotását követően egészséges kontroll, COPD-ben, tüdőrákban, valamint a két kórképben együttesen szenvedő betegek szérum N-glikomjának változásait tanulmányoztam a betegségek hatékony elkülönítése érdekében. A betegek szérum mintáiban a modellhez hasonlóan szintén 9 N-glikán szerkezetet azonosítottam a teljes profil szialidáz enzimmel történő emésztését követően (23. ábra, 17. táblázat). Az eredmények értékelése során meghatároztam a teljes szérum N-glikom elágazásának mértékét, mely során statisztikailag szignifikáns eltérést csak a kontroll és a tüdőrákban szenvedő betegek csoportja között tapasztaltam.

A csoportok egyes csúcsai között tapasztalt változások jobb szemléltetése és könnyebb megértése érdekében meghatároztam a kontroll csoport azonos struktúráihoz viszonyított relatív változások mértékét. Eredményeim rávilágítottak arra, hogy az FA2 struktúra (1. csúcs) potenciális glikobiomarker lehet, melynek segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD a tüdőráktól, illetve mindkét tüdőbetegség az egészséges kontroll csoporttól.

A csoportok eredményeinek statisztikai analízise során a kontroll és a COPD csoport 3 (FA2B, FA2[6]G1 és FA2[3]G1), míg a kontroll és a tüdőrák csoport 2 (FA2G2 és FA3G3) N-glikán szerkezet átlagos terület százalékos értékében tapasztaltam szignifikáns eltérést. A két

betegségcsoportot (COPD és tüdőrák) szintén 2 (FA2 és az FA2BG2), a COPD és a komorbid csoportokat csak egyetlen N-glikán szerkezet (A3G3) alapján tudtam elkülöníteni egymástól.

Konklúzió:

A standard fehérjekeverékkel végzett kísérleteim eredményei alapján a humán szérumban jelen lévő 5 nagy koncentrációjú glikoprotein glikozilációs változásai jó közelítéssel tanulmányozhatók a komplett szérum analízisével, ezáltal felgyorsítva az analízisidőt, jelentősen lecsökkentve a vizsgálatok minta- és költségigényét. Azaz a teljes szérum totál glikánprofil tartalma által közvetített információtartalom kellően informatív, és nincs szükség sok esetben az egyes proteinek izolálására és külön-külön történő analízisére. A fennmaradó hozzávetőlegesen 15% jelenléte okozta egyéni különbségek elhanyagolhatóak abban az esetben, ha a tanulmányozni kívánt fehérje elég nagy koncentrációban van jelen a szérumban, vagyis akkor, ha a dolgozatban is vizsgált 5 fehérje valamelyikén glikozilációs változásokat feltételezünk.

Ugyanakkor ebben az esetben is érdemes lehet specifikus tisztítást követően tanulmányozni a fehérje glikozilációját, ha a teljes glikánprofilban a kontrollhoz viszonyítva eltéréseket tapasztalunk. Annyi azonban biztos, hogy sok esetben ezek nélkül a bonyolult, tapasztalatot igénylő, időt és költséget nem kímélő eljárások nélkül is feltárhatunk olyan különbségeket, amelyek patológiás folyamatokra utalhatnak. Ennek feltétele azonban minden esetben az előzetes szakorvosi vélemény és feltételezett betegség ismerete (tudnunk kell, hogy a vizsgált beteg feltehetően valamilyen tüdőbetegségben szenved, jelen esetben COPD-s).

Ennek megfelelően a betegellátáshoz tartozó rendszeres vizsgálatok során érdemes lehet monitorozni a szérum teljes glikánprofilját is annak érdekében, hogy kellően hamar, még korai stádiumban azonosítani tudjunk a rizikócsoportok körében egy esetleges kóros setzburjánzást, legoptimálisabb esetben még a képalkotó eljárásokkal való kimutathatóság előtt, amely a kezelés és a beteg túlélési esélyeinek szempontjából is kulcsfontosságú lehet. Sajnos Magyarországon rendszeres és szervezett tüdőrák szűrés nincs, a COPD betegellátásban és a rákszűrésben is röntgen képalkotást (rtg) alkalmaznak, mint elsőként elvégzendő diagnosztikai módszert, holott tudjuk, hogy a rtg a korai stádiumú tüdőrák kimutatására alkalmatlan. A rutindiagnosztika kiegészítve a szérum teljes glikozilációs analízisével minimális kölcségnövekedés mellett lehet kellően informatív a beteg állapotát illetően.

A COPD, a tüdőrák és a komorbid csoportok a szérum N-glikánprofiljának elágazás mértéke alapján nem különíthetők el egymástól, így ezen tulajdonság biomarkerként való

alkalmazása a betegcsoportok hatékony elkülönítésére eredményeim alapján nem lehetséges. A tulajdonság viszont alkalmas a kontroll és a tüdőrák elkülönítésére.

Bár a szérum N-glikozilációs analízisével a komorbid betegcsoportot sem a kontroll, sem pedig a tüdőrák csoportoktól nem tudtam elkülöníteni az adatok statisztikai elemzésével, a fenti glikán szerkezetek betegségspecifikus biomarkerek lehetnek, ezért követésük és további analízisük mindenképpen javasolt.

Mivel az SPM eredményekből arra következtetek, hogy a csoportok között statisztikai szempontból szignifikáns eltérést mutató szerkezetek jelentős része a szérumban keringő IgG antitestek glikozilációs állapotát tükrözik (21. ábra), így kijelenthető, hogy az IgG molekula glikozilációs vizsgálata mind a tüdőt érintő daganatos, mind pedig a különböző gyulladásos kórképek diagnosztikájában jelentőséggel bírhat.

Eredményeim azt mutatják, hogy a gyulladásos és daganatos tüdőbetegségben szenvedő páciensektől származó szérum minták N-glikomikai elemzése hasznos és gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a globális N-glikozilációs változásokról és azok potenciális glikoproteinforrásairól.

7. Összefoglalás

PhD munkám során a vérminta levételétől a centrifugálásig, majd a fagyasztásig szobahőmérsékleten (24-25°C) történő tárolásának N-glikán összetételére gyakorolt esetleges hatását tanulmányoztam CE-LIF készülék alkalmazásával. Kuttásom célja volt, hogy megvizsgáljam a szérumban N-glikom stabilitását és az abban betegségek hatására tapasztalt változások biomarkerként való alkalmazhatóságát.

Vizsgálataim eredményeként megállapítottam, hogy a 4 és fél órán belüli szobahőmérsékleten való tárolásnak nincs jelentős hatása az N-glikánprofilra. Munkám eredményeként így kijelenthető, hogy az általam alkalmazott, és a klinikai laboratóriumokban is rutinszerű vizsgálati körülmények között a szérumban N-glikom viszonylag stabil biomarkerforrásnak tekinthető.

Mind az elhízás, mind a GDM napjainkban egyre növekvő gyakorisággal fordulnak elő. Az elhízás és a GDM káros hatással lehet az anyára és születendő gyermekére egyaránt, így a növekvő esetszámokat is figyelembe véve, egyre nagyobb igény mutatkozik olyan biomarkerek azonosítására és egységes klinikai alkalmazására, melyek előre jelezhetik a GDM kialakulását, valamint annak hatásait anyára és gyermekére.

Az anyai és gyermek szérumban eredetű IgG, valamint az anyai szérumban IgA N-glikozilációja ígéretes markernek bizonyult vizsgálataim során az elhízás és/vagy GDM kialakulásának és/vagy hatásának jelzésére. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az IgG N-glikán szerkezeteinek változásai az anyai elhízást jól tükrözik, viszont a GDM kialakulását nem képesek jelezni. Ezzel szemben az IgA a GDM kialakulásának jóslására potenciális glikobiomarker forrásnak bizonyult.

A gyermek és anyai IgG glikozilációjának összehasonlítása során megállapítottam, hogy mind az anyai elhízás, mind a GDM befolyásolja a placentáris transzportfolyamatokat.

Célszerűnek tartom további alanyok bevonásával alosztály- és kötőhelyspecifikus IgG glikozilációs analízis elvégzését, kiegészítve a placenta gyulladásos markereinek analízisével. Ezáltal közelebb juthatunk az antitestek méhlepényen keresztüli transzportfolyamatainak, és így a magzat immunrendszerének fejlődését befolyásoló tényezőinek jobb megértéséhez.

A dolgozat utolsó részében bemutatásra került egy olyan új megközelítés (SPM modell), mely révén hatékonyan tanulmányozható a fenti két Ig osztály N-kapcsolt glikoziláció

módosulása további három, az emberi szérumban nagy koncentrációban jelen lévő haptoglobín, transferrin és alfa-1-antitripszin fehérjékkel egyidőben.

A kidolgozott modellt alkalmazva különböző gyulladásos és daganatos tüdőbetegségben szenvedők csoportjait vizsgáltam olyan biomarkerek azonosítása céljából, melyek alapján elkülöníthetők egymástól a COPD-s, tüdőrákkal, valamint mindkét betegség meglétével diagnosztizált betegcsoportok. Munkám során meghatároztam ezen csoportok szérum mintáinak deszialilált N-glikánprofiljához tartozó antennáris elágazás mértékét, mely a tüdőrák és a kontoll csoport elkülönítését tette lehetővé.

A statisztikai elemzés mellett bevezettem egy új értékelési eljárást, mellyel az azonosított szerkezetek relatív területszázalék változását vizsgáltam. A módszer alkalmazásával számos olyan glikán szerkezeteket tudtam azonosítani, amely a jövőben segíthet a betegség diagnosztizálása során. Ezek közül kiemelendő az core-fukozilált kétantennás agalaktozilált struktúra (FA2), mely segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD a tüdőráktól, illetve mindkét tüdőbetegség az egészséges kontroll csoporttól.

Az egyes szerkezetek statisztikai elemzésének eredményét figyelembe véve az SPM modell alapján kijelenthető, hogy az IgG molekula glikozilációs analízise a tüdőt érintő daganatos és különböző gyulladásos betegségek (COPD) diagnosztikájában jelentőséggel bírhat.

A vizsgált tüdőbetegségekben szenvedő páciensektől származó szérum minták N-glikomikai elemzése fontos kiegészítő és gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a globális N-glikozilációs változásokról és azok potenciális glikoproteinforrásairól, azáltal a jövőben megkönnyítve a diagnózis felállítását és a terápiás döntéshozatalt.

8. Summary

I investigated the possible effect of storage at room temperature (24-25°C) on the N-glycan composition depending on the time delay from blood collection to centrifugation and freezing using a CE-LIF device to determine the stability of serum N-glycome and to investigate the applicability of disease-induced changes as potential biomarker. As a result of my experiments, I found that the storage of whole blood at room temperature had no significant effect on the serum N-glycan profile. As a result of my work, it can be stated that serum N-glycome can be considered a relatively stable source of biomarkers under conditions both I applied and routinely used in clinical laboratories.

Both obesity and GDM are occurring more and more frequently among women of childbearing age. Both obesity and GDM can have adverse effects on both the mother and the unborn child, given the greater number of cases there is a growing need to identify and uniformly apply biomarkers that may predict the development of GDM and its effects on the mother and her child. N-glycosylation of maternal and the child-derived serum IgG and maternal serum IgA has been shown to be a promising marker in my studies for the development and / or effects of obesity and / or GDM.

Based on my results, I concluded that the changes in the N-glycan structures of IgG excellently reflect the maternal obesity, but cannot indicate the development of GDM. In contrast, I have demonstrated in my work that IgA may be a potential source of glycobiomarkers in predicting the development of GDM.

Comparing the glycosylation of child and maternal IgG, I terminated that both maternal obesity and GDM can affect placental transport processes.

I consider it appropriate to perform subclass and binding site-specific IgG glycosylation analysis with additional subjects, supplemented by analysis of inflammatory markers of the placenta. In this way, we can get closer to a better understanding of the transport processes of antibodies through the placenta and thus the factors influencing the development of the fetal immune system.

In the last part of the dissertation, a new approach (SPM model) was presented, which can be used to efficiently study the N-linked glycosylation modification of the above mentioned two

Ig classes in parallel with three other proteins present in high concentrations in human serum (haptoglobin, transferrin and alpha-1-antitrypsin).

Using the developed model, I examined the groups of patients with different inflammatory and neoplastic lung diseases in order to identify biomarkers, that can be used to differentiate the groups of patients diagnosed with COPD, lung cancer, and both diseases. During my work, I determined the degree of antennary branching belonging to the desialylated N-glycan profile of the serum samples of these groups, a property that allowed the separation of the lung cancer and the control group.

In addition to the statistical analysis, I introduced a new evaluation procedure to examine the change in the relative area percentage of the identified structures. Using this method, I have been able to identify a number of glycan structures that may assist in diagnosing the disease in the future. Outstanding among these structures is the core-fucosylated biantennary, agalactosylated structure (FA2), which can effectively differentiate COPD from lung cancer and both lung diseases from a healthy control group.

Considering the results of the statistical analysis of each N-glycan structure, the SPM model suggests that glycosylation analysis of the IgG molecule may be of relevance for the diagnosis of lung cancer and various inflammatory diseases (COPD).

N-glycomic analysis of serum samples from patients with the lung diseases studied may provide important additional and rapid preliminary molecular diagnostic information about global N-glycosylation changes and their potential glycoprotein sources, thereby facilitating future diagnosis and therapeutic decision-making.

9. Legfontosabb eredmények

1. A vérvételtől számított 4 és fél órán belül a teljes vérminta centrifugálásig szobahőmérsékleten történő tárolásának nincs jelentős hatása a szérum N-glikom alakulására, így a szérum viszonylag stabil glikobiomarkerforrásnak tekinthető.
2. Az egészséges terhes nőkből a placentán keresztül a magzatba átjutó IgG alacsonyabb szialilációs fokkal rendelkezik.
3. A IgG nem alkalmas glikobiomarker a GDM, az azzal társuló gyulladás, illetve a GDM-ből esetlegesen eredő anyai komplikációk jóslására.
4. Ezzel szemben az IgG N-glikán szerkezetei tükrözik az anyai elhízás során fellépő esetleges gyulladást a várandósság ideje alatt is.
5. A placentán átjutó IgG molekulák N-glikozilációjára mind az anyai elhízás, mind pedig a GDM hatással van. Ez a hatás detektálható a gyermekekből izolált IgG molekulák N-glikozilációjának szialiláltságán keresztül.
6. Mivel az elhízott és a GDM meglétével diagnosztizált édesanyáktól született gyermekek IgG molekuláinak N-glikán szerkezeteit termináló szialsavak aránya magasabb volt, mint a kontroll csoport gyermekei esetében tapasztalt érték, így feltételezhető, hogy a méhlepény képes alkalmazkodni az anyai gyulladásos környezethez megvédve a magzatot az anyai elhízásban és GDM-ben jelenlévő káros gyulladásos, oxidatív, hiperinzulinemiás környezettől.
7. A védelmi mechanizmusnak része lehet a glikoziláció szelektív IgG transzport, mely eredményeként gyulladásos körülmények között a placenta a magasabb szialilációval rendelkező molekulákat részesítheti előnyben. A mindkét rendellenességgel rendelkező anyák és gyermekeik esetében tapasztalt csökkent gyermeki IgG szialiláció ennek a védelmi mechanizmusnak a határait jelezheti, ahol már nem képes a placenta a káros körülmények kompenzálására.
8. Az IgA glikozilációs változásai betegségsspecifikus biomarkerként szolgálhatnak a GDM vonatkozásában.
9. Az IgA szialsav/neutrális szerkezetinek arányát sem az elhízás, sem a GDM, sem pedig a két rendellenesség együttes megléte nem befolyásolta a várandós édesanyák esetében. Ezért az IgA nem alkalmas a gyulladásos folyamatok meglétének jelzésére.
10. Kidolgozásra került egy glikoanalitikai megközelítés, mellyel a szérum minta egészének analízisével információt kaphatunk a szérumban jelen lévő IgG és IgA

antitest glikozilációs módosulásairól, csökkentve a fehérjék elemzéséhez szükséges minta-, anyag-, illetve időigényt.

11. Számos N-kötött glikán szerkezetet azonosítottam szérumszinten, amelyek alapján sikeresen különítettem el a COPD, tüdőrák és komorbid betegcsoportokat egymástól, valamint a kontroll csoporttól.
12. Az IgG potenciális biomarker lehet a tüdőrák és COPD diagnosztizálásban, a betegcsoportok között szignifikáns eltérést mutató szerkezetek jelentős része ugyanis a kidolgozott modell alapján az IgG antitestekről származik.
13. A humán szérum minták N-glikomikai elemzése gyulladásos és daganatos tüdőbetegségek vonatkozásában gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a szérum N-glikom változásairól és azok potenciális glikoproteinforrásairól.

10. Irodalomjegyzék

1. Varki A, C.R., Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors., *Essentials of Glycobiology*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. PMID: 20301239.
2. Pinho, S.S. and C.A. Reis, *Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(9): p. 540-55.
3. Arnold, J.N., et al., *Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation*. Proteomics, 2008. **8**(16): p. 3284-93.
4. Deng, T., et al., *Obesity, Inflammation, and Cancer*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 421-49.
5. Wilson, R.M. and I. Messaoudi, *The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **418 Pt 2**: p. 134-42.
6. Ygberg, S. and A. Nilsson, *The developing immune system - from foetus to toddler*. Acta Paediatr, 2012. **101**(2): p. 120-7.
7. de Jong, S.E., et al., *IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 28207.
8. Boerma, T.A.-Z., C; Kinfu, Y, *World health statistics 2008*. 2008: WHO Pres.
9. Barnes, P.J. and I.M. Adcock, *Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: a lethal association*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(8): p. 866-7.
10. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. **12**: p. 138-63.
11. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
12. Liang, F., et al., *Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 239-40.
13. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
14. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
15. Laine, R.A., *Information capacity of the carbohydrate code*. Pure and Applied Chemistry, 1997. **69**(9): p. 1867-1874.

16. Salisbury, A.M., et al., *Ramachandran-type plots for glycosidic linkages: Examples from molecular dynamic simulations using the Glycam06 force field*. J Comput Chem, 2009. **30**(6): p. 910-21.
17. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
18. Kaji, H., et al., *Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in Caenorhabditis elegans and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2100-9.
19. Sato, C., et al., *Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor*. J Biochem, 2000. **127**(1): p. 65-72.
20. Sasisekharan, R., R. Raman, and V. Prabhakar, *GLYCOMICS APPROACH TO STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF GLYCOSAMINOGLYCANS*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2006. **8**(1): p. 181-231.
21. Perez-Garay, M., et al., *alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo*. PLoS One, 2010. **5**(9).
22. Hennet, T., *Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2012. **1820**(9): p. 1306-1317.
23. Holst, C.R., et al., *Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival*. PLoS One, 2007. **2**(6): p. e575.
24. Inatani, M., et al., *Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1044-6.
25. Iijima, J., et al., *Cell-cell interaction-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected N-glycans in GE11 epithelial cells. Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13038-13046.
26. Haines, N. and K.D. Irvine, *Glycosylation regulates Notch signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 786-97.
27. Srinivasan, A., et al., *Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(8): p. 2800-2805.
28. Rose, M.C. and J.A. Voynow, *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 245-78.
29. Axford, J., *Glycobiology and medicine: an introduction*. J R Soc Med, 1997. **90**(5): p. 260-4.

30. Nairn, A.V., et al., *Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 37835-56.
31. Satomaa, T., et al., *Analysis of the human cancer glycome identifies a novel group of tumor-associated N-acetylglucosamine glycan antigens*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5811-9.
32. Goetz, J.A., et al., *Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells*. Glycoconjugate Journal, 2008. **26**(2): p. 117.
33. Kurebayashi, J., et al., *Combined measurement of serum sialyl Lewis X with serum CA15-3 in breast cancer patients*. Jpn J Clin Oncol, 2006. **36**(3): p. 150-3.
34. Sun, D., et al., *Distribution of abnormal IgG glycosylation patterns from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients by MALDI-TOF-MS(n)*. Analyst, 2019. **144**(6): p. 2042-2051.
35. Wei, X., et al., *Antibody neutralization and escape by HIV-1*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 307-12.
36. Ghaderi, D., et al., *Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(8): p. 863-7.
37. Braakman, I. and D.N. Hebert, *Protein folding in the endoplasmic reticulum*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a013201.
38. Ruggiano, A., O. Foresti, and P. Carvalho, *Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 869-79.
39. Suzuki, T., C. Huang, and H. Fujihira, *The cytoplasmic peptide:N-glycanase (NGLY1) - Structure, expression and cellular functions*. Gene, 2016. **577**(1): p. 1-7.
40. Coutinho, M.F., M.J. Prata, and S. Alves, *Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction*. Mol Genet Metab, 2012. **105**(4): p. 542-50.
41. Peanne, R., et al., *Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis?* Eur J Med Genet, 2018. **61**(11): p. 643-663.
42. Lam, C. and D.M. Krasnewich, *Pmm2-Cdg*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
43. Freeze, H.H., H. Schachter, and T. Kinoshita, *Genetic Disorders of Glycosylation*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2015: Cold Spring Harbor (NY). p. 569-82.
44. Witters, P., D. Cassiman, and E. Morava, *Nutritional Therapies in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)*. Nutrients, 2017. **9**(11).

45. Cymer, F., et al., *Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential*. Biologicals, 2018. **52**: p. 1-11.
46. Hodoniczky, J., Y.Z. Zheng, and D.C. James, *Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(6): p. 1644-52.
47. Yamane-Ohnuki, N., et al., *Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity*. Biotechnol Bioeng, 2004. **87**(5): p. 614-22.
48. Suzuki, E., et al., *A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1875-82.
49. Ferrara, C., et al., *Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II*. Biotechnol Bioeng, 2006. **93**(5): p. 851-61.
50. Shinkawa, T., et al., *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3466-73.
51. Born, G.V. and W. Palinski, *Unusually high concentrations of sialic acids on the surface of vascular endothelia*. Br J Exp Pathol, 1985. **66**(5): p. 543-9.
52. Schwarzkopf, M., et al., *Sialylation is essential for early development in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5267-70.
53. Sato, C. and K. Kitajima, *Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease*. J Biochem, 2013. **154**(2): p. 115-36.
54. Li, F. and J. Ding, *Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression*. Protein Cell, 2019. **10**(8): p. 550-565.
55. Wang, Y.C., et al., *Glycosyltransferase ST6GAL1 contributes to the regulation of pluripotency in human pluripotent stem cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13317.
56. Sakuma, K., M. Aoki, and R. Kannagi, *Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(20): p. 7776-81.
57. Lewis, A.M., et al., *Understanding and Controlling Sialylation in a CHO Fc-Fusion Process*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0157111.
58. Akella, N.M., L. Ciraku, and M.J. Reginato, *Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer*. BMC Biol, 2019. **17**(1): p. 52.

59. Ruhaak, L.R., et al., *Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(8): p. 3457-81.
60. Ruhaak, L.R., et al., *Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomics using 48-channel multiplexed CGE-LIF*. J Proteome Res, 2010. **9**(12): p. 6655-64.
61. Chen, F.T., T.S. Dobashi, and R.A. Evangelista, *Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis*. Glycobiology, 1998. **8**(11): p. 1045-52.
62. Yang, S., et al., *Modification of Sialic Acids on Solid Phase: Accurate Characterization of Protein Sialylation*. Anal Chem, 2017. **89**(12): p. 6330-6335.
63. Kovacs, Z., et al., *Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma*. Electrophoresis, 2017. **38**(17): p. 2115-2123.
64. Evangelista, R.A., A. Guttman, and F.T. Chen, *Acid-catalyzed reductive amination of aldoses with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate*. Electrophoresis, 1996. **17**(2): p. 347-51.
65. Schwedler, C., et al., *Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery*. (1618-2650 (Electronic)).
66. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.
67. Harris, L.J., et al., *The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 369-72.
68. Abul K. Abbas, A.H.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Biology*. 9th ed. 2018: Elsevier.
69. Erdei, A., G. Sármay, and J. Prechl, *Immunológia*. 2012: Medicina Könyvkiadó Zrt.
70. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
71. Arnold, J.N., et al., *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 21-50.
72. Jefferis, R., et al., *A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins*. Biochem J, 1990. **268**(3): p. 529-37.
73. Gudelj, I., G. Lauc, and M. Pezer, *Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases*. Cell Immunol, 2018. **333**: p. 65-79.
74. Anumula, K.R., *Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc*. J Immunol Methods, 2012. **382**(1-2): p. 167-76.

75. Hennig, R., et al., *Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(8): p. 1728-38.
76. Parekh, R., et al., *Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1731-6.
77. Kristic, J., et al., *Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2014. **69**(7): p. 779-789.
78. Engdahl, C., et al., *Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women*. Arthritis Res Ther, 2018. **20**(1): p. 84.
79. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
80. Malhotra, R., et al., *Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein*. Nat Med, 1995. **1**(3): p. 237-43.
81. Forthal, D.N., et al., *Fc-glycosylation influences Fcgamma receptor binding and cell-mediated anti-HIV activity of monoclonal antibody 2G12*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6876-82.
82. Macpherson, A.J., M.B. Geuking, and K.D. McCoy, *Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body*. Trends Immunol, 2012. **33**(4): p. 160-7.
83. Brandtzaeg, P., *Secretory immunity with special reference to the oral cavity*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
84. Lopez, E., et al., *The Multifaceted Nature of Immunoglobulin A and Its Complex Role in HIV*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2018. **34**(9): p. 727-738.
85. Consortium, T.U., *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021*. Nucleic Acids Research, 2020. **49**(D1): p. D480-D489.
86. Woof, J.M. and M.A. Kerr, *The function of immunoglobulin A in immunity*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 270-82.
87. Peterson, D.A., et al., *IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 328-39.
88. Roos, A., et al., *Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2861-8.
89. Steffen, U., et al., *IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 120.

90. Mattu, T.S., et al., *The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fcα receptor interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2260-72.
91. Carayannopoulos, L., E.E. Max, and J.D. Capra, *Recombinant human IgA expressed in insect cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8348-52.
92. Tomana, M., et al., *The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins*. Immunochemistry, 1976. **13**(4): p. 325-328.
93. de Sousa-Pereira, P. and J.M. Woof, *IgA: Structure, Function, and Developability*. Antibodies (Basel), 2019. **8**(4).
94. Kellogg, M.D., et al., *Preanalytical considerations in the design of clinical trials and epidemiological studies*. Clin Chem, 2015. **61**(6): p. 797-803.
95. Plebani, M., et al., *Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing*. Clin Chim Acta, 2014. **432**: p. 44-8.
96. Betsou, F., et al., *Assays for Qualification and Quality Stratification of Clinical Biospecimens Used in Research: A Technical Report from the ISBER Biospecimen Science Working Group*. (1947-5543 (Electronic)).
97. Lebrilla, C.B. and H.J. An, *The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases*. Mol Biosyst, 2009. **5**(1): p. 17-20.
98. Peng, W., et al., *Clinical application of quantitative glycomics*. Expert Rev Proteomics, 2018. **15**(12): p. 1007-1031.
99. Knezevic, A., et al., *Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome*. J Proteome Res, 2009. **8**(2): p. 694-701.
100. Miyagi, T. and K. Yamaguchi, *Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions*. Glycobiology, 2012. **22**(7): p. 880-96.
101. Marchesini S Fau - Cestaro, B., et al., *Human blood cells sialidases*. (0158-5231 (Print)).
102. Hultberg B Fau - Masson, P.K., S. Masson Pk Fau - Sjöblad, and S. Sjöblad, *Neutral alpha-mannosidase activity in human serum*. (0006-3002 (Print)).
103. Lista, S., F. Faltraco, and H. Hampel, *Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research*. Prog Neurobiol, 2013. **101-102**: p. 18-34.
104. Hsieh, S.Y., et al., *Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling*. Proteomics, 2006. **6**(10): p. 3189-98.

105. Ilies, M., et al., *Data on the impact of the blood sample collection methods on blood protein profiling studies*. Data Brief, 2017. **14**: p. 313-319.
106. Yin, P., R. Lehmann, and G. Xu, *Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(17): p. 4879-92.
107. Yin, P., et al., *Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood*. Clin Chem, 2013. **59**(5): p. 833-45.
108. Dedova, T., et al., *The effect of blood sampling and preanalytical processing on human N-glycome*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200507.
109. Ventham, N.T., et al., *Changes to serum sample tube and processing methodology does not cause Intra-Individual [corrected] variation in automated whole serum N-glycan profiling in health and disease*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123028.
110. Cadamuro, J., et al., *Influence of centrifugation conditions on the results of 77 routine clinical chemistry analytes using standard vacuum blood collection tubes and the new BD-Barricor tubes*. Biochem Med (Zagreb), 2018. **28**(1): p. 010704.
111. Donczo, B., G. Kiraly, and A. Guttman, *Effect of the elapsed time between sampling and formalin fixation on the N-glycosylation profile of mouse tissue specimens*. Electrophoresis, 2019. **40**(23-24): p. 3057-3061.
112. Jones, M.B., et al., *B-cell-independent sialylation of IgG*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(26): p. 7207-12.
113. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.
114. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-435.
115. The Global Health Observatory. *Global health estimates: Leading causes of death*. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>.
116. Furman, D., et al., *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. Nature Medicine, 2019. **25**(12): p. 1822-1832.
117. Xu, W. and Y. Huang, *Regulation of Inflammatory Cell Death by Phosphorylation*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 851169.
118. Wei, X., et al., *Role of pyroptosis in inflammation and cancer*. Cell Mol Immunol, 2022. **19**(9): p. 971-992.
119. Hu, W., et al., *Ferroptosis and Its Role in Chronic Diseases*. Cells, 2022. **11**(13).

120. Marchi, S., et al., *Mitochondrial control of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2023. **23**(3): p. 159-173.
121. Bonora, M., C. Giorgi, and P. Pinton, *Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(4): p. 266-285.
122. O-Uchi, J., et al., *7 - Organellar Ion Channels and Transporters*, in *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)*, D.P. Zipes, J. Jalife, and W.G. Stevenson, Editors. 2018, Elsevier. p. 66-79.
123. Magyarország számokban, 2020. Available from: <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/idoszaki/mosz/mosz20.pdf>.
124. United Nations Children's Fund (UNICEF), W.H.O., International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank. *Levels and trends in child malnutrition: key findings of the 2021 edition of the joint child malnutrition estimates*. 2021; Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1344826/retrieve>.
125. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
126. Chen, H., et al., *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. (0092-8674 (Print)).
127. Baratta, M., *Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues*. (1234-1010 (Print)).
128. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
129. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
130. Matsuzawa, Y., et al., *Adiponectin and metabolic syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 29-33.
131. Koster, A., et al., *Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(12): p. 2354-61.
132. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
133. Engin, A., *Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 305-326.
134. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 901-11.

135. Surmi, B.K. and A.H. Hasty, *Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling*. *Future Lipidol*, 2008. **3**(5): p. 545-556.
136. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 772-83.
137. McNelis, J.C. and J.M. Olefsky, *Macrophages, immunity, and metabolic disease*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 36-48.
138. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 930-9.
139. Han, J.M., et al., *IL-33 Reverses an Obesity-Induced Deficit in Visceral Adipose Tissue ST2+ T Regulatory Cells and Ameliorates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance*. *J Immunol*, 2015. **194**(10): p. 4777-83.
140. Castoldi, A., et al., *The Macrophage Switch in Obesity Development*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 637.
141. Qiu, Y., et al., *Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat*. *Cell*, 2014. **157**(6): p. 1292-1308.
142. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. *Diabetes*, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
143. Mathis, D., *Immunological goings-on in visceral adipose tissue*. *Cell Metab*, 2013. **17**(6): p. 851-859.
144. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
145. Wensveen, F.M., et al., *NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(4): p. 376-85.
146. Group, H.S.C.R., et al., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
147. Nguyen-Ngo, C., et al., *Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus*. *J Mol Endocrinol*, 2019. **63**(3): p. R51-R72.
148. McIntyre, H.D., et al., *Gestational diabetes mellitus*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 47.
149. Al-Aissa, Z., et al., *[A brief of gestational diabetes mellitus, risk factors and current criteria of diagnosis]*. *Orv Hetil*, 2017. **158**(8): p. 283-290.

150. Kun, A., J. Tornoczký, and A.G. Tabak, *The prevalence and predictors of gestational diabetes mellitus in Hungary*. Horm Metab Res, 2011. **43**(11): p. 788-93.
151. International Diabetes Federation. *Hungary diabetes report 2000-2045*. Available from: <https://diabetesatlas.org/data/en/country/91/hu.html>.
152. Emberi Erőforrások Minisztériuma – Egészségügyért Felelős Államtitkárság. *Egészségügyi szakmai irányelv – A diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegség antihyperglykaemiás kezeléséről és gondozásáról felnőttkorban*. 2017; Available from: http://www.diabet.hu/upload/diabetes/magazine/dh.2017.1.pdf?web_xml:id=2017.
153. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 10th edition 2021*. Available from: <https://diabetesatlas.org/data/en/indicators/14/>.
154. McLachlan, K.A., et al., *Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy*. Diabetes Metab Res Rev, 2006. **22**(2): p. 131-8.
155. Mialhe, G., et al., *Selective rather than universal screening for gestational diabetes mellitus?* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015. **191**: p. 95-100.
156. Nanda, S., et al., *Prediction of gestational diabetes mellitus by maternal factors and biomarkers at 11 to 13 weeks*. Prenat Diagn, 2011. **31**(2): p. 135-41.
157. Smirnakis, K.V., et al., *Predicting gestational diabetes: choosing the optimal early serum marker*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(4): p. 410 e1-6; discussion 410 e6-7.
158. Rasanen, J.P., et al., *Glycosylated fibronectin as a first-trimester biomarker for prediction of gestational diabetes*. Obstet Gynecol, 2013. **122**(3): p. 586-94.
159. Renz, P.B., et al., *HbA1c Test as a Tool in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135989.
160. Abell, S.K., et al., *Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(6): p. 13442-73.
161. Dias, S., et al., *Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
162. Bogdanet, D., et al., *Emerging Protein Biomarkers for the Diagnosis or Prediction of Gestational Diabetes-A Scoping Review*. J Clin Med, 2021. **10**(7).
163. Hajagos-Toth, J., et al., *Obesity in pregnancy: a novel concept on the roles of adipokines in uterine contractility*. Croat Med J, 2017. **58**(2): p. 96-104.
164. Olmos-Ortiz, A., et al., *Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).

165. Angelo, A.G.S., et al., *Monocyte profile in peripheral blood of gestational diabetes mellitus patients*. Cytokine, 2018. **107**: p. 79-84.
166. Mrizak, I., et al., *Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women*. Gen Physiol Biophys, 2014. **33**(2): p. 169-76.
167. Tsiotra, P.C., et al., *Circulating adipokines and mRNA expression in adipose tissue and the placenta in women with gestational diabetes mellitus*. Peptides, 2018. **101**: p. 157-166.
168. Hara Cde, C., et al., *Characterization of Natural Killer Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 7154524.
169. Nikolac Perkovic, M., et al., *The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014. **48**: p. 20-5.
170. Lemmers, R.F.H., et al., *IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017. **1861**(9): p. 2240-2249.
171. Trbojević Akmačić, I., et al., *Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome*. (1536-4844 (Electronic)).
172. Yu, X., et al., *Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population*. (1536-5964 (Electronic)).
173. Russell, A.C., et al., *Increased central adiposity is associated with pro-inflammatory immunoglobulin G N-glycans*. (1878-3279 (Electronic)).
174. Poston, L., E.M. Harthoorn Lf Fau - Van Der Beek, and E.M. Van Der Beek, *Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement*. (1530-0447 (Electronic)).
175. Challier, J.C., et al., *Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta*. (0143-4004 (Print)).
176. Liu, D., et al., *The Association Between Normal BMI With Central Adiposity And Proinflammatory Potential Immunoglobulin G N-Glycosylation*. (1178-7007 (Print)).
177. Pekelharing, J.M., et al., *Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women*. Ann Rheum Dis, 1988. **47**(2): p. 91-5.
178. Niewiesk, S., *Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 446.
179. Koch, M.A., et al., *Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life*. Cell, 2016. **165**(4): p. 827-41.

180. Williams, P.J., et al., *Short communication: selective placental transport of maternal IgG to the fetus*. (0143-4004 (Print)).
181. KIBE, T., et al., *Glycosylation and placental transport of immunoglobulin G*. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 1996. **21**(1): p. 57-63.
182. Einarsdottir, H.K., et al., *Comparison of the Fc glycosylation of fetal and maternal immunoglobulin G*. Glycoconj J, 2013. **30**(2): p. 147-57.
183. Jansen, B.C., et al., *MALDI-TOF-MS reveals differential N-linked plasma- and IgG-glycosylation profiles between mothers and their newborns*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 34001.
184. Ruhaak, L.R., et al., *Targeted biomarker discovery by high throughput glycosylation profiling of human plasma alpha1-antitrypsin and immunoglobulin A*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73082.
185. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 327-36.
186. Bondt, A., et al., *Longitudinal monitoring of immunoglobulin A glycosylation during pregnancy by simultaneous MALDI-FTICR-MS analysis of N- and O-glycopeptides*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27955.
187. Bondt, A., et al., *IgA N- and O-glycosylation profiling reveals no association with the pregnancy-related improvement in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 160.
188. Ruhaak, L.R., et al., *Total plasma N-glycome changes during pregnancy*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1657-68.
189. Brusselle, G.G., K.R. Joos Gf Fau - Bracke, and K.R. Bracke, *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease*. (1474-547X (Electronic)).
190. Naghavi, M., et al., *Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet, 2017. **390**(10100): p. 1151-1210.
191. Lortet-Tieulent, J., et al., *International trends in COPD mortality, 1995-2017*. Eur Respir J, 2019. **54**(6).
192. Központi Statisztikai Hivatal. *Tüdőgondozókban nyilvántartott és új tüdőbetegek*. Available from: https://www.ksh.hu/stadat_files/ege/hu/ege0026.html.
193. Blanco, I., et al., *Geographic distribution of COPD prevalence in the world displayed by Geographic Information System maps*. Eur Respir J, 2019. **54**(1).
194. Scanlon, P.D., et al., *Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 381-90.

195. Balikó, Z.K., G.; Magyar, P.; Somfay, A.; Szilasi, M.; Strausz, J., *A KRÓNIKUS OBSTRUKTÍV LÉGÚTI BETEGSÉG (CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE – COPD) DIAGNOSZTIKÁJA ÉS KEZELÉSE*, T.S. Kollégium, Editor. 2008.
196. Vogelmeier, C.F., et al., *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(5): p. 557-582.
197. MacNee, W., *Pathology, pathogenesis, and pathophysiology*. (0959-8138 (Print)).
198. Brusselle, G.G., G.F. Joos, and K.R. Bracke, *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2011. **378**(9795): p. 1015-26.
199. Wang, Y., et al., *Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018. **13**: p. 3341-3348.
200. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. (1474-547X (Electronic)).
201. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2645-53.
202. Bardoel, B.W., et al., *The balancing act of neutrophils*. Cell Host Microbe, 2014. **15**(5): p. 526-36.
203. Wang, Y., et al., *Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(11): p. 1147-1159.
204. Barnes, P.J., *Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Chest Med, 2014. **35**(1): p. 71-86.
205. Gohy, S.T., et al., *Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition*. Eur Respir J, 2015. **45**(5): p. 1258-72.
206. Xu, J., et al., *Macrophage-Restricted Shp2 Tyrosine Phosphatase Acts as a Rheostat for MMP12 through TGF-beta Activation in the Prevention of Age-Related Emphysema in Mice*. J Immunol, 2017. **199**(7): p. 2323-2332.
207. Fujimoto, K., et al., *Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema*. Chest, 1999. **115**(3): p. 697-702.
208. Virk, H., G. Arthur, and P. Bradding, *Mast cells and their activation in lung disease*. Transl Res, 2016. **174**: p. 60-76.

209. Turato, G., et al., *Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(1): p. 105-10.
210. Mannino, D.M., *Biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease diagnosis and progression: insights, disappointments and promise*. Curr Opin Pulm Med, 2019. **25**(2): p. 144-149.
211. Roslind, A. and J.S. Johansen, *YKL-40: a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation*. Methods Mol Biol, 2009. **511**: p. 159-84.
212. Malinda, K.M., et al., *Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells*. Exp Cell Res, 1999. **250**(1): p. 168-73.
213. Nishikawa, K.C. and A.J.T. Millis, *gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells*. Experimental Cell Research, 2003. **287**(1): p. 79-87.
214. Letuve, S., et al., *YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 5167-73.
215. Lai, T., et al., *YKL-40 expression in chronic obstructive pulmonary disease: relation to acute exacerbations and airway remodeling*. Respir Res, 2016. **17**: p. 31.
216. Madsen, J., et al., *Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5866-70.
217. Ju, C.R., W. Liu, and R.C. Chen, *Serum surfactant protein D: biomarker of chronic obstructive pulmonary disease*. Dis Markers, 2012. **32**(5): p. 281-7.
218. Selvin, E., et al., *sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 2116-21.
219. Lindsey, J.B., et al., *Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study*. Diabetes Care, 2009. **32**(7): p. 1218-20.
220. Yonchuk, J.G., et al., *Circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of emphysema and the RAGE axis in the lung*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(7): p. 785-92.
221. Kim, J.K., et al., *Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis*. Atherosclerosis, 2012. **220**(1): p. 208-14.

222. Al Rifai, M., et al., *sRAGE, inflammation, and risk of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. J Diabetes Complications, 2015. **29**(2): p. 180-5.
223. Cheng, D.T., et al., *Systemic soluble receptor for advanced glycation endproducts is a biomarker of emphysema and associated with AGER genetic variants in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(8): p. 948-57.
224. Pratte, K.A., et al., *Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of COPD*. Respir Res, 2021. **22**(1): p. 127.
225. Yoneda, K., *Ultrastructural localization of phospholipases in the Clara cell of the rat bronchiole*. (0002-9440 (Print)).
226. Lomas, D.A., et al., *Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort*. Thorax, 2008. **63**(12): p. 1058.
227. Sin, D.D., et al., *Serum PARC/CCL-18 concentrations and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(9): p. 1187-92.
228. Minas, M., et al., *Fetuin-A is associated with disease severity and exacerbation frequency in patients with COPD*. COPD, 2013. **10**(1): p. 28-34.
229. Wao, H., et al., *Survival of patients with non-small cell lung cancer without treatment: a systematic review and meta-analysis*. Syst Rev, 2013. **2**: p. 10.
230. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
231. World Health Organization. *Cancer*. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
232. Greten, F.R. and S.I. Grivnenkov, *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences*. Immunity, 2019. **51**(1): p. 27-41.
233. Baranyi, M., M. Lippai, and Z. Szatmari, *[Role of the stroma in the initiation and progression of tumors]*. Orv Hetil, 2015. **156**(45): p. 1816-23.
234. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* (0140-6736 (Print)).
235. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
236. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
237. Ben-Baruch, A., *Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 38-52.

238. Mao, X., et al., *Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives*. Mol Cancer, 2021. **20**(1): p. 131.
239. Wang, L., et al., *Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway*. Oncotarget, 2017. **8**(44): p. 76116-76128.
240. Herrera, M., et al., *Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients*. Cancer Sci, 2013. **104**(4): p. 437-44.
241. Bremnes, R.M., et al., *The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 824-33.
242. Chaib, M., S.C. Chauhan, and L. Makowski, *Friend or Foe? Recent Strategies to Target Myeloid Cells in Cancer*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**.
243. Chen, Z., et al., *Roles of the Exosomes Derived From Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Immunity and Cancer Progression*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 817942.
244. Wu, Y., et al., *Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy*. Mol Cancer, 2022. **21**(1): p. 184.
245. Kumar, V., et al., *The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment*. Trends Immunol, 2016. **37**(3): p. 208-220.
246. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, and A.C. Ochoa, *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1568-73.
247. Masucci, M.T., M. Minopoli, and M.V. Carriero, *Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1146.
248. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 183-94.
249. Zhu, Q., et al., *The IL-6-STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression*. Cell Death Dis, 2014. **5**(6): p. e1295.
250. Al-Shibli, K.I., et al., *Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5220-7.
251. Dai, F., et al., *The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 220.

252. Bremnes, R.M., et al., *The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer*. (1556-1380 (Electronic)).
253. Jawad, N., N. Direkze, and S.J. Leedham, *Inflammatory bowel disease and colon cancer*. Recent Results Cancer Res, 2011. **185**: p. 99-115.
254. Wang, F., et al., *Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer*. Cancer Lett, 2014. **345**(2): p. 196-202.
255. Young, R.P. and R.J. Hopkins, *Link between COPD and lung cancer*. Respir Med, 2010. **104**(5): p. 758-9.
256. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. 2022; Available from: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2021/12/GOLD-REPORT-2022-v1.1-22Nov2021_WMV.pdf.
257. Szabo, M., et al., *Proteomic and Glycomic Markers to Differentiate Lung Adenocarcinoma from COPD*. Curr Med Chem, 2020. **27**(20): p. 3302-3313.
258. Wang, Y., et al., *CT-guided percutaneous transthoracic needle biopsy for paramediastinal and nonparamediastinal lung lesions: Diagnostic yield and complications in 1484 patients*. (1536-5964 (Electronic)).
259. Xi, Y., et al., *Distant Metastasis and Survival Outcomes after Computed Tomography-Guided Needle Biopsy in Resected Stage I-III Non-Small Cell Lung Cancer*. J Cancer, 2017. **8**(16): p. 3356-3361.
260. de Torres, J.P., et al., *Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease--incidence and predicting factors*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(8): p. 913-9.
261. Durham, A.L. and I.M. Adcock, *The relationship between COPD and lung cancer*. Lung Cancer, 2015. **90**(2): p. 121-7.
262. Nagy, B., Jr., et al., *Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis*. Chest, 2016. **150**(3): p. 661-72.
263. Nagy, B., Jr., et al., *Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(11): p. 1639-48.
264. Duffy, M.J. and K. O'Byrne, *Tissue and Blood Biomarkers in Lung Cancer: A Review*. Adv Clin Chem, 2018. **86**: p. 1-21.
265. Varadi, C., et al., *Analysis of haptoglobin N-glycome alterations in inflammatory and malignant lung diseases by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2013. **34**(16): p. 2287-94.

266. Ito, E., et al., *Fucosylated surfactant protein-D is a biomarker candidate for the development of chronic obstructive pulmonary disease*. J Proteomics, 2015. **127**(Pt B): p. 386-94.
267. Pavic, T., et al., *N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 323.
268. El-Akawi, Z.J., N.A. Al-Hindawi Fk Fau - Bashir, and N.A. Bashir, *Alpha-1 antitrypsin (alpha1-AT) plasma levels in lung, prostate and breast cancer patients*. (0172-780X (Print)).
269. Liang, Y., et al., *Differentially expressed glycosylated patterns of alpha-1-antitrypsin as serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer*. Glycobiology, 2015. **25**(3): p. 331-40.
270. Arnold, J.N., et al., *Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1755-64.
271. Bartling, B., et al., *Altered desialylated plasma N-glycan profile in patients with non-small cell lung carcinoma*. (1875-8592 (Electronic)).
272. Ruhaak, L.R., et al., *Enrichment strategies in glycomics-based lung cancer biomarker development*. (1862-8354 (Electronic)).
273. Whatley, H., *Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis*, in *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, J. Petersen, R. and A. Mohammad, A. , Editors. 2001, Humana Press. p. 21-58.
274. Grossman, P., D.; Colburn, J., C., *Capillary Electrophoresis. Theory And Practice*. 1992: Academic Press, Inc.
275. Tiselius, A.W., *Electrophoresis and adsorption analysis as aids in investigations of large molecular weight substances and their breakdown products*. Nobelprize. org, 1948.
276. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Capillary zone electrophoresis*. Science, 1983. **222**(4621): p. 266-72.
277. Gáspár, A. *Kapilláris elektroforézis*. Available from: <https://www.muszeroldal.hu/measurenotes/kapillelfo.pdf>.
278. Suzuki, S., *Recent developments in liquid chromatography and capillary electrophoresis for the analysis of glycoprotein glycans*. Anal Sci, 2013. **29**(12): p. 1117-28.
279. Subbarao, K.C., et al., *Gingival Crevicular Fluid: An Overview*. J Pharm Bioallied Sci, 2019. **11**(Suppl 2): p. S135-S139.
280. Kovats, E., *Gas-Chromatographische Charakterisierung Organischer Verbindungen .1. Retentionsindices Aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde Und Ketone*. Helv Chim Acta. Helvetica Chimica Acta, 2004. **41**: p. 1915-1932.

281. Mittermayr, S. and A. Guttman, *Influence of molecular configuration and conformation on the electromigration of oligosaccharides in narrow bore capillaries*. Electrophoresis, 2012. **33**(6): p. 1000-7.
282. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis*. Electrophoresis, 2015. **36**(24): p. 3094-6.
283. Chen, J., et al., *Serum N-Glycans: A New Diagnostic Biomarker for Light Chain Multiple Myeloma*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127022.
284. Dennis, J.W., C.E. Granovsky M Fau - Warren, and C.E. Warren, *Protein glycosylation in development and disease*. (0265-9247 (Print)).
285. Donczo, B., et al., *N-Glycosylation analysis of formalin fixed paraffin embedded samples by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2016. **37**(17-18): p. 2292-6.
286. Szabo, M., et al., *N-glycosylation structure - function characterization of omalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product*. J Pharm Biomed Anal, 2022. **209**: p. 114483.
287. Borza, B., et al., *Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: Quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept*. J Pharm Biomed Anal, 2018. **153**: p. 182-185.
288. Szigeti, M. and A. Guttman, *Sample Preparation Scale-Up for Deep N-glycomic Analysis of Human Serum by Capillary Electrophoresis and CE-ESI-MS*. Mol Cell Proteomics, 2019. **18**(12): p. 2524-2531.
289. Reider, B., M. Szigeti, and A. Guttman, *Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination*. Talanta, 2018. **185**: p. 365-369.
290. Goonatilleke, E., et al., *Immunoglobulin A N-glycosylation Presents Important Body Fluid-specific Variations in Lactating Mothers*. Mol Cell Proteomics, 2019. **18**(11): p. 2165-2177.
291. Mesko, B., et al., *Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2012. **39**(5): p. 916-28.
292. Meszaros, B., et al., *N-glycomic Analysis of Z(IgA1) Partitioned Serum and Salivary Immunoglobulin A by Capillary Electrophoresis*. Curr Mol Med, 2020. **20**(10): p. 781-788.
293. Secchiero, S., L. Sciacovelli, and M. Plebani, *Harmonization of units and reference intervals of plasma proteins: state of the art from an External Quality Assessment Scheme*. Clin Chem Lab Med, 2018. **57**(1): p. 95-105.
294. Varadi, C., C. Lew, and A. Guttman, *Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies*. Anal Chem, 2014. **86**(12): p. 5682-7.

295. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial*. J Proteomics, 2018. **171**: p. 107-115.
296. Friedman, M., *The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance*. Journal of the American Statistical Association, 1937. **32**(200): p. 675-701.
297. Sinkovits, G.P.Z. *Paraméteres és nem paraméteres próbák alkalmazása több csoport összehasonlítására folytonos változók esetén*. 2021; Available from: https://semmelweis.hu/kutlab/files/2021/03/Csoportok_%C3%B6sszehasonl%C3%ADt%C3%A1sa_2021_SGy.pdf.
298. Dunn, O.J., *Multiple Comparisons Using Rank Sums*. Technometrics, 1964. **6**(3): p. 241-252.
299. Varki, A., R.L. Schnaar, and R. Schauer, *Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids*, in *Essentials of Glycobiology*, rd, et al., Editors. 2015: Cold Spring Harbor (NY). p. 179-195.
300. Meszaros, B., et al., *Machine Learning Based Analysis of Human Serum N-glycome Alterations to Follow up Lung Tumor Surgery*. Cancers (Basel), 2020. **12**(12).
301. Kaneko, Y., J.V. Nimmerjahn F Fau - Ravetch, and J.V. Ravetch, *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*. (1095-9203 (Electronic)).
302. Nimmerjahn, F., R.M. Anthony, and J.V. Ravetch, *Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8433-7.
303. Saldova, R., et al., *Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG*. Glycobiology, 2007. **17**(12): p. 1344-56.
304. Mariño, K., et al., *Changes in serum N-glycosylation profiles: Functional significance and potential for diagnostics*. Carbohydrate Chemistry, 2011. **37**: p. 57-93.
305. Niers, L., et al., *Nutritional support for the infant's immune system*. Nutr Rev, 2007. **65**(8 Pt 1): p. 347-60.
306. Clements, T., et al., *Update on Transplacental Transfer of IgG Subclasses: Impact of Maternal and Fetal Factors*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1920.
307. Franca, E.L., et al., *Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 928187.
308. Denison, F.C., et al., *Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function*. Reproduction, 2010. **140**(3): p. 373-85.
309. Štambuk, T., et al., *Associations between plasma protein, IgG and IgA N-glycosylation and metabolic health markers in pregnancy and gestational diabetes*. 2021.

310. Raju, T.S. and S.E. Lang, *Diversity in structure and functions of antibody sialylation in the Fc*. (1879-0429 (Electronic)).
311. Bondt, A., et al., *Association between Galactosylation of Immunoglobulin G and Improvement of Rheumatoid Arthritis during Pregnancy Is Independent of Sialylation*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(10): p. 4522-4531.

11. Publikációs lista



**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/369/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Farkas Anna

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Török, R., **Farkas, A.**, Guttman, A., Járvás, G.: Evaluation of Possible Processing Time Effects on the Global N-Glycosylation Profile of Human Blood Samples.
Curr. Mol. Med. 20 (10), 840-846, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666201230094722>
IF: 2.222
2. **Farkas, A.**, Mészáros, B., Szarka, M., Szigeti, M., Kappelmayer, J., Szabó, M., Csánky, E., Guttman, A.: Modeling of the Desialylated Human Serum N-glycome for Molecular Diagnostic Applications in Inflammatory and Malignant Lung Diseases.
Curr. Mol. Med. 20 (10), 765-772, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666200422085316>
IF: 2.222





További közlemények

3. Mészáros, B., Járvás, G., **Farkas, A.**, Szigeti, M., Kovács, Z., Kun, R., Szabó, M., Csánky, E.,
Guttman, A.: Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD
and their comorbidity using capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. B. 1137, 1-7, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121913>
IF: 3.205

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,649

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,444**

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, 2022.07.14.



12. Tárgyszavak/Keywords

COPD, tüdőrák, elhízás, gesztációs diabétesz mellitusz, gyulladás, IgG, IgA, N-glikán, lézer-indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézis

COPD, lung cancer, obesity, gestational diabetes mellitus, inflammation, IgG, IgG, N-glycan, capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Guttman Andrásnak munkám során nyújtott szakmai irányításáért és támogatásáért, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönöm a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium minden tagjának, kiemelten Dr. Dönczö Boglárkának, Szarka Máténak, Filep Csengének, Sárközy Dánielnek, Dr. Kovács Zsuzsannának és Szigeti Mártonnak, akik tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm a Cedars-Sinai Regionális Egészségügyi, Tudományos és Technológiai Együttműködés (RECOOP HST) Egyesületnek, hogy munkám során biztosította kísérletek egy részéhez szükséges anyagokat.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Vári Sándor Györgynek, a Cedars-Sinai Regionális Egészségügyi, Tudományos és Technológiai Együttműködés (RECOOP HST) Egyesület Nemzetközi Kutatási és Innovációs Orvostudományi Programjának társigazgatójának megtisztelő bizalmáért és támogatásáért.

Köszönetemet fejezem ki az anyai és gyermek szérum minták gyűjtését Dr. Surányi Andreának és Dr. Ábel Altorynak, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak, valamint Dr. Oksana Matsyuranak és Dr. Lesya Beshnek, a Communal Nonprofit Enterprise "City Children's Clinical Hospital of Lviv", Department of Pediatrics №2 in Danylo Halytsky Lviv National Medical University munkatársainak.

Köszönet illeti Miskolci Semmelweis Kórház és Egyetemi Oktatókórház (MISEK) Pulmonológia Osztályának munkatársai, kiemelten Dr. Csánky Eszter osztályvezető főorvosasszonyt és Dr. Szabó Miklós osztályvezető helyettes főorvos urat, akik a krónikus gyulladásos tüdőbetegségben és tüdőrákban szenvedő betegek szérum mintáit rendelkezésemre bocsátották.

Köszönettel tartozom Dr. Gebri Enikő Zsuzsának, a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar Fogászati ambulancia szakorvosának és az Oralis Medicina nem önálló Tanszék adjunktusának, aki szakmai tanácsaival segített a dolgozat készítése során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, kifejezetten édesanyának, aki tanulmányaim során végig támogatott. Köszönöm páromnak, Kokas Csabának, hogy mindig mellettem állt és a legnehezebb pillanatokban is biztatott, támogatott.

14.Függelék