

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Szérum biomarkerek optimalizált
felhasználása a sarcoidosis
diagnosztikájában**

Dr. Enyedi Attila

TÉMAVEZETŐ: Dr. Fagyas Miklós, PhD
Dr. Takács István, PhD



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2021.**

*“Tudomány nélkül nem lennénk azok, amik vagyunk. És tudomány nélkül nem
leszünk, amik lehetnénk.” /Teller Ede /*

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	1
2. Bevezetés	3
3. Irodalmi áttekintés	4
3.1. <i>A sarcoidosis általános jellemzése, epidemiológiája</i>	4
3.2. <i>A sarcoidosis szövettani megjelenése</i>	4
3.3. <i>A sarcoidosis patofiziológiája</i>	5
3.4. <i>A sarcoidosis klinikai manifesztációja</i>	7
3.4.1. Tüdő	7
3.4.2. Bőr	8
3.4.3. Szem	9
3.4.4. Gasztrointesztinális rendszer és máj	10
3.4.5. Vese	10
3.4.6. Idegrendszer	11
3.4.7. Szív	12
3.4.8. Csont, izom, ízületek	13
3.5. <i>A sarcoidosis diagnosztikája</i>	14
3.6. <i>A sarcoidosis jelenlegi terápiája</i>	15
3.7. <i>Újabb diagnosztikai eszközök – szérumbiomarkerek</i>	18
4. Célkitűzés	20
5. Anyagok és módszerek	21
5.1. <i>Első ciklus</i>	21
5.1.1. Vizsgált alanyok	21
5.1.2. Szérumb- és DNS-minták	21
5.1.3. ACE-aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetikai esszé segítségével	22

5.1.4. ACE-aktivitás mérése az “ACE color diagnosztikai kit” segítségével	22
5.1.5. ACE genotípus	23
5.1.6. Etikai engedély	23
5.1.7. Statisztikai analízis	23
5.2. <i>Második ciklus</i>	23
5.2.1. Vizsgált alanyok	23
5.2.2. Szérum- és DNS-minták	24
5.2.3. ACE-aktivitás mérése	24
5.2.4. A szérum CTO-aktivitás mérése	25
5.2.5. A szérum LZM koncentráció mérése	25
5.2.6. SAA koncentráció mérése	25
5.2.7. A sIL-2R koncentráció mérése	26
5.2.8. Az ACE gén inzerció/delécio, illetve a kitotriozidáz gén duplikációs polimorfizmusainak meghatározása	26
5.2.9. Etikai engedély, Statisztikai analízis	26
6. Eredmények	28
6.1. <i>Első ciklus</i>	28
6.2. <i>Második ciklus</i>	30
7. Megbeszélés	38
8. Összefoglalás	43
Summary	44
9. Irodalomjegyzék	46
10. Tárgyszavak	55
11. Köszönetnyilvánítás	56

1. Rövidítések jegyzéke

ARB – angiotenzin-II receptor blokkoló

ACE – angiotenzin konvertáló enzim

AUC – area under curve (görbe alatti terület)

BAL – bronchoalveolaris lavage

BTNL2 – butyrophilin-szerű fehérje 2

CRP – C-reaktív protein

CT – computer tomographia

CTO – kitotrioizidáz

DNS – deoxyribonucleinsav

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA – enzimhez kapcsolt immunoszorbens esszé

^{18}F -FDG – 18-as fluorral jelölt fluoro-dezoxi-glükóz

FEV1 – erőltetett kilégzési térfogat (1 s)

FVC – erőltetett vitálkapacitás

GIT – gasztrointesztinális traktus

GM-CSF – granulocyta-macrophag kolónia stimuláló faktor

ICAM – intercelluláris adhézións molekula

IC₅₀ – az 50%-os enzimgátló hatás eléréséhez szükséges koncentráció

I/D – inzerció/deléción

IFN γ – interferon γ

LZM – lizozim

MTX – methotrexat

NPV – negative predictive value (negatív prediktív érték)

PAMP –pathogen-associated molecular pattern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)

PET – pozitron emissziós tomográfia

PPV – positive predictive value (pozitív prediktív érték)

ROC – receiver operating characteristic

RTG - röntgen

SAA – szérum amyloid-A

SD – standard deviáció

sIL-2R – szolubilis interleukin 2 receptor

TLR-2 – Toll-like receptor 2

Treg – regulációs T sejtek

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminometán hydrochlorid

UV – ultraviola

VIP – vazóaktív intestinalis peptid

2. Bevezetés

A sarcoidosis egy szisztémás granulomatosus betegség, mely elsősorban a mellkasi szerveket érinti (nyirokcsomók és a tüdők, >90%), habár az esetek felében extrapulmonalis manifesztáció is megfigyelhető – pl. bőr, szem, máj, szív, vese stb. – [1]. A sarcoidosis diagnózisának felállítása legtöbbször sebészi mintavételt és szövettani vizsgálatot igényel, alátámasztva a klinikai-radiológiai eredményeket [2]. Az invazív diagnosztikai mintavétel nagyban megnöveli a betegséggel járó terhet, különösen a csak mellkasi érintettségű betegek esetében, mivel ilyenkor nem áll rendelkezésünkre könnyen és biztonságosan hozzáférhető mintavételi hely.

A szérumbiomarkerek a diagnózisalkotás szempontjából limitált szereppel bírnak, mivel egyelőre nincs olyan molekula, mely kellően specifikus és szenzitív lenne a sarcoidosis megállapítása szempontjából. Az elmúlt évtizedekben számos potenciális biomarkert vizsgáltak ezzel a céllal (pl. kitotrioxidáz, (CTO), lizozim (LZM), szérumbi amyloid-A (SAA), szolubilis interleukin 2 receptor (sIL-2R), stb.), de a klinikai gyakorlatba csak az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) került be [3]. A metalloproteináz-típusú ACE az angiotenzin-II produkciót katalizálja, ezáltal részt vesz a szervezet vérnyomás, valamint só-vízháztartásának szabályozásában [4]. Az ACE egy membránprotein, amely többféle sejt felszínén megtalálható, és amely proteolitikus hasítás útján kerül a keringésbe [5]. A szérumban található ACE elsősorban a tüdő microvasculaturájából származik [6], és a koncentrációja, valamint aktivitása nagymértékben függ az ACE gén úgynevezett inzerció/deleció polimorfizmusától [7]. A sarcoid granulomák epitheloid sejtjei ACE-t termelnek [8], mely magyarázhatja a sarcoidosisban szenvedő betegek magasabb szérumbi ACE-szintjét, az ACE koncentrációjából pedig következtethetünk a granulomatosus folyamat kiterjedésére [9].

A genotípus mellett, különböző endogén ACE-gátló anyagok szignifikánsan befolyásolhatják a keringő enzim aktivitását [10]. Az egyik legjelentősebb gátló hatása az albuminnak van (referencia tartománya 35-52 g/L), melynek IC₅₀ értéke 5,7 és 9,5 g/L közöttire becsülhető [11]. A legtöbb, kereskedelmi forgalomban elérhető ACE-aktivitást mérő diagnosztikus teszt 1:5 vagy 1:10 arányú szérumbi és szubsztrát elegyítést ajánl a mérés kivitelezéséhez. Az albumin endogén ACE-gátló hatása még ilyen hígítási arányoknál is megfigyelhető, következésképpen ezekkel a tesztekkel az ACE-aktivitás alulbecsült, a sarcoidosis pedig aluldiagnosztizált.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A sarcoidosis általános jellemzése, epidemiológiája

A sarcoidosis egy szisztémás granulomatosis megbetegedés, melyet epitheloid és óriássejtes granulomaképződés jellemez, és az esetek 90%-ban a tüdőt, illetve mediastinalis nyirokcsomókat támadja [12]. 20-40%-ban bőr és szem érintettséggel is találkozhatunk [13]. A betegség diagnosztikája nehézségekbe ütközik, mivel nem áll rendelkezésre egységes algoritmus az azonosítására. Leggyakrabban a klinikai megjelenésre, a radiológiai, valamint szövettani leletre támaszkodunk. Mindazonáltal a sarcoidosis intenzív kutatások tárgyát képezi, melyeknek köszönhetően egyre több innovatív terápiás és diagnosztikus eszköz áll rendelkezésünkre.

A sarcoidosis epidemiológiáját meghatározni meglehetősen nehéz, mivel az érintettek közel 50 %-a soha nem produkál klinikai tüneteket, míg közel 30%-uk spontán remisszióba kerül [146]. A betegség prevalenciája 4,7-64/100 000-re tehető, és bizonyos etnikai csoportok körében gyakrabban fordul elő, mint pl. az afro-amerikaiak, a skandinávok, az írek és az Antillákon élők között [14]. Jellemzően 50 éves kor előtt jelentkeznek a tünetek, leggyakrabban 20-29 éves kor között – habár Európában és Japánban megfigyelhető a betegség kialakulásának egy második csúcspontja 50 éves kor körül – illetve világszerte megfigyelhető egy női predominancia [15].

3.2. A sarcoidosis szövettani megjelenése

A betegség patológiai megjelenésére legjellemzőbb az el nem sajtosodó óriássejtes, epitheloid granulomák kialakulása, mely az aktív gyulladás helyére történő T-lymphocytá és macrophag beáramlással kezdődik. A macrophagok az aktiváció után epitheloid sejtek alakját öltik, időnként pedig óriássejtekké egyesülnek, és a CD4+ lymphocytákkal együtt képezik a granuloma középpontját, melyet egy általában CD8+ T-lymphocytákból és fibroblastokból álló gyűrű övez. Rendszerint ebben a lymphocytá gyűrűben kollagén halmozódik fel egészen addig, míg a granulomasejtek helyét egy fibrotikus hegszövet át nem veszi [2].

3.3. A sarcoidosis patofiziológiája

A sarcoidosisra patognomikus granulomaképződést egy krónikus immunválasz következményének tartják, melyet egy genetikailag fogékony személy valamilyen környezeti (pl. elhalt és részben degradálódott mikrobiológiai ágensek patogén asszociált molekuláris mintázatai – PAMP) vagy nem környezeti ágenssel történő találkozása indít el. Ezek alapján érthető, hogy a folyamatra több különböző faktor – genetikai és környezeti tényezők – lehetnek hatással.

Számos kutatás igazolt összefüggést a betegség „akut” megjelenése és a HLA-B8 gén között, valamint a kedvezőbb lefolyású forma és a HLA-DQB1*0201 és HLA-DRB1*0301 gének jelenléte között [16, 17]. Rossman és mtsai kimutatták, hogy a HLA-DRB1*1101 gén fokozza a sarcoidosis kialakulásának kockázatát mind a fehér, mind az afro-amerikai populáció körében [18]. Kuroda és mtsai pedig 2 olyan polimorfizmust azonosítottak az interleukin-10 (IL-10) génjében, ami növelheti a betegségre való fogékonyságot [19]. A nem-HLA gének közül a butyrophilin-szerű fehérje 2 (BTNL2) génje hozható összefüggésbe a betegségre való hajlammal, mivel a fehérje szoros kapcsolatban van a lymphocita regulációban szerepet játszó, B7 kostimulációs molekulával [20].

A betegség előfordulásának alakulásában megfigyelhetünk földrajzi, éghajlati, valamint közvetlen környezeti befolyást [14]. Epidemiológiai tanulmányok összefüggésbe hozták a sarcoidosis kialakulását különböző szerves anyagok (pl. fa vagy széna) égetése során keletkező melléktermékekkel, illetve inorganikus részecskékkal történő krónikus érintkezéssel – mint a berillium, cirkónium vagy alumínium –. Ezeken kívül a levegő magas pára, - illetve pollentartalma szintén fokozhatja a betegség kialakulásának a kockázatát [21]. Egyes tanulmányok szerint bizonyos fertőző ágensek (pl. mycobacteriumok, propionibacteriumok) is növelhetik a rizikót. Ezt a feltételezést azzal támasztották alá, hogy a sarcoid granulomákból elvégzett polimeráz láncreakció (PCR) segítségével kimutattak bizonyos bakteriális összetevőket (pl. HSP 70, mikoziltranszferáz antigén 85A) vagy a betegek szérumból az ezen antigének ellen termelt antitesteket [22, 23]. A baktériumok PAMP-jei olyan mintázat-felismerő receptorokat aktiválnak, mint a Toll-like receptor 2 és 9, a C-lektin, valamint a NOD-like receptorok. A mycobacteriumok és propionibacteriumok ezután perzisztálnak a macrophagok fagosomáiban, mivel sejtmembránjuk nagy mennyiségű lipidet tartalmaz, ezáltal ellenállnak a savas emésztésnek, glycoproteinjeik pedig oldhatatlanok, nem degradálódnak [24], így krónikus gyulladásos választ tartanak fent. A mycobacteriumok szerepét azon

kutatások is alátámasztották, melyek igazolták, hogy különböző PAMP-ok (pl. a mycobacterialis kataláz-peroxidáz, superoxid-dizmutáz A vagy a hővel előlt propionibacteriumok lizátuma) pulmonalis granulomaképződést képesek indukálni egerekben [25, 26].

Amíg az egészséges egyének alveolaris macrophagjai elnyomják az effektor T-sejt funkciót, addig a sarcoidosisban szenvedő betegek alveolaris macrophagjai aktív antigén-prezentáló sejtekként viselkednek, és támogatják azt. Ez az MHC2 molekulák és olyan ko-stimulátorok, mint a CD86, CD80, CD40 és az intercellularis adhézis (ICAM) molekulák fokozott expressziójának köszönhető [27]. Az alveolaris macrophagok hyperreaktívak az egyes mintázat-felismerő receptorok stimulációjára, és intenzív $\text{TNF}\alpha$ -termeléssel válaszolnak [28, 29]. A sarcoidosis patogenezisének alapját elsősorban a CD4^+ T-sejtek képezik, amelyek reakcióba lépnek az antigén prezentáló macrophagokkal, ezzel megkezdik a granulomák kialakulását, illetve későbbiekben felelősek annak folyamatos megújításáért [30]. A triggerelő ágens specifikus T-sejt klónok progresszív felszaporodásának kedvez [31]. Ezek a CD4^+ sejtek TH1 irányba differenciálódnak, és IL-2-t, valamint interferon γ -t ($\text{IFN}\gamma$) szekretálnak. Mindezekon túl granulocita-macrophag kolónia stimuláló faktort (GM-CSF) és monocita kemotaktikus protein-1-t (MCP-1) termelnek, melyek a macrophagok beáramlását, az általuk termelt macrophag inflammatorikus protein (MIP-1), IL-12, IL-15, IL-18 és $\text{TNF}\alpha$ felhalmozódását, következményesen pedig a lokális gyulladásos folyamat eszkalálódását vonja maga után [30]). A folyamat eredményeképpen nő a $\text{CD4}/\text{CD8}$ T-sejt arány, illetve csökken a keringő lymphocyták mennyisége. A CD4^+ sejtek felszaporodása fokozott immunglobulin termelődést eredményez a B sejtek által, ami poliklonális hyper- γ -globulinaemiában nyilvánul meg. Több sarcoidosisban szenvedő beteg esetében kimutatták a Treg-ek csökkent aktivitását, melyet azonban kísérletes körülmények között, inhalációs vazoaktív intestinalis peptid (VIP) segítségével sikerült visszaállítani. A VIP mérsékelte a bronchoalveolaris sejtek $\text{TNF}\alpha$ termelését [32, 33].

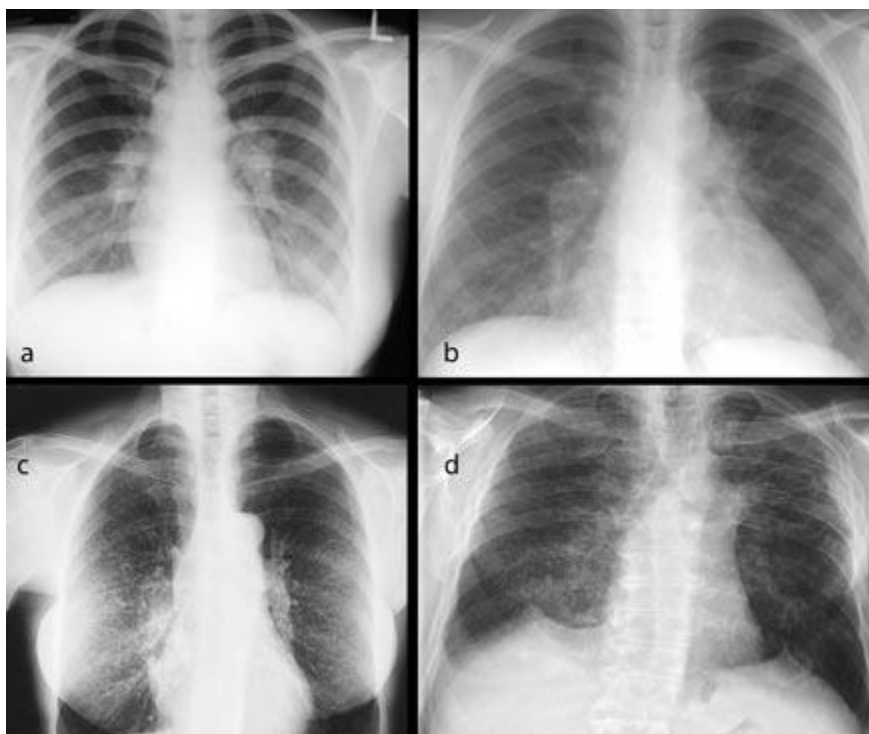
3.4. A sarcoidosis klinikai manifestációja

A betegség klinikai megjelenése függ a beteg etnikai hovatartozásától, a betegség fennállásának idejétől, a lézió helyétől, illetve a granulomatosus folyamat intenzitásától. A betegek egyharmada nem specifikus tünetekkel jelentkezik, mint pl. láz, gyengeség, ízületi

fájdalom vagy fogyás [34].

3.4.1. Tüdő (90-95%)

Az intrathoracalis érintettség (leggyakrabban mediastinalis adenopathia) az esetek kb. 95%-ában megtalálható, habár a betegek közel 50%-a egyáltalán nem produkál légúti tünetet [35]. A leggyakoribb tünetek a nem-produktív köhögés és a nehézlégzés. Kevésbé gyakori a mellkasi fájdalom vagy dyscomfort, és legritkább a haemoptoe [12]. A mellkas fizikális vizsgálata lehet negatív, annak ellenére, hogy a mellkasröntgenen látszik elváltozás (1. ábra) [36]. Az esetek 90%-ában pozitív a mellkasi képalkotó vizsgálat. 25-65%-ban lymphadenopathia, 40%-ban diffúz infiltráció, 5%-ban pulmonalis fibrosis látható az első vizsgálat alkalmával. A pleurát involváló folyamat ritka. Pulmonalis fibrosis esetén másodlagos komplikációk lehetőségére is gondolnunk kell, mint pl. infekciók (pl. aspergilloma, mycobacteriumok), légzési elégtelenség, pneumothorax vagy cor pulmonale [37].



1. **ábra. Különböző stádiumú sarcoidosisban szenvedő betegek röntgenképei.** a) 1. stádium – bilaterális hilaris lymphadenopathia (a spontán remisszió valószínűsége 55-90%); b) bilaterális hilaris lymphadenopathia pulmonalis infiltrátumokkal (40-70%); c) csak pulmonalis infiltrátum jelenléte (10-20%); d) pulmonalis fibrosis (0%) [36].

3.4.2. Bőr (24%)

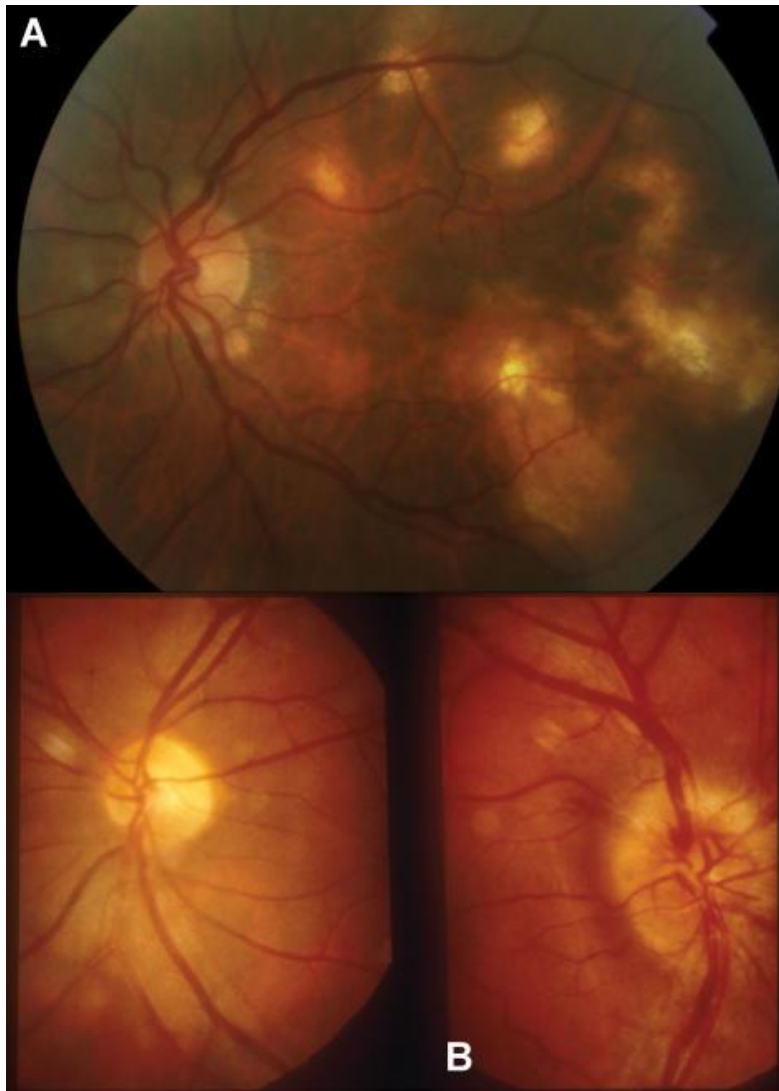
Az egyik leggyakoribb bőrtünet az erythema nodosum (2. ábra). Az úgynevezett Löfgren-szindróma (erythema nodosum, arthralgia, általános gyengeség, illetve a mellkasröntgenen látható bilaterális hilaris lymphadenopathia) általában nagyon jó prognózisú állapot, és gyakori a spontán remisszió [38]. Egyéb bőrtünetek is előfordulhatnak, mint például maculopapulósus léziók, lupus pernio (gyakran az elhúzódó betegségnek a jele), csomók, hypo- vagy hyperpigmentatio [39].



2. ábra. Különböző bőrtünetek sarcoidosisban [40]. a) erythema nodosum, mely a leggyakoribb, nem specifikus bőrtünet sarcoidosisban; b) erythemás papulák, melyek a leggyakoribb specifikus bőrjelenségek, amelyek sarcoidosisra utalnak; c) multiplex, nagyméretű annularis plakkok; d) lupus pernio.

3.4.3. Szem (12%)

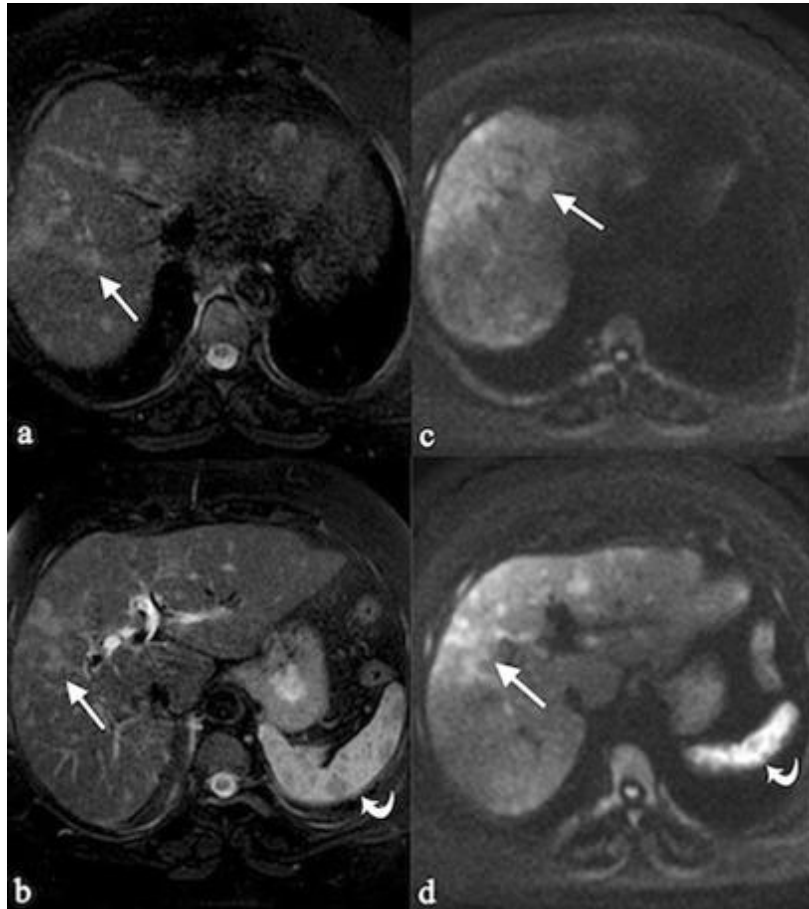
A sarcoidosis komplikációja lehet a látást veszélyeztető uveitis (3. ábra), és gyakran a betegeknek kezdetben nincs tünetük – például, ha posterior régiót érint az uveitis –, ezért minden betegnél kötelező a fundusvizsgálat [12]. Számos egyéb ocularis elváltozás is megjelenhet, úgymint conjunctivális csomók, a könnymirigy megnagyobbodása, cataracta, glaucoma, retinalis ischaemia, opticus neuropathia vagy papilla-oedema [41].



3. ábra. Sarcoidosisban előforduló uveitis [42]. a) multifocalis choroiditis; b) a nervus opticus megduzzadt – összehasonlítva a mellette lévő normál méretű ideggel –, illetve egy granuloma is látható.

3.4.4. Gastrointestinalis rendszer (GIT) és máj (15%)

Az esetek 10-15%-ában GIT és májérintettség is előfordulhat, mely általában tünetmentes, csupán a májenzimek lehetnek enyhén emelkedettek (4. ábra). Az intrahepaticus cholestasis, hepatosplenomegalia vagy portalis hipertenzió ritka [43].



4. ábra. Sarcoidosis a májban és a lépben [40]. a-b) a T2 súlyozott máj MRI felvételeken, valamint a c-d) diffúzió-súlyozott felvételeken jól láthatóak a hyperintenzitást mutató nodulusok (fehér nyilak) a májban és a lépben. A T2 jel a patológiás folyamat intenzitásával egyenesen arányos: a hyperintenzitás utalhat nagyfokú gyulladásra, tehát oedemára, valamint fokozott vascularis permeabilitásra.

3.4.5. Vese (5%)

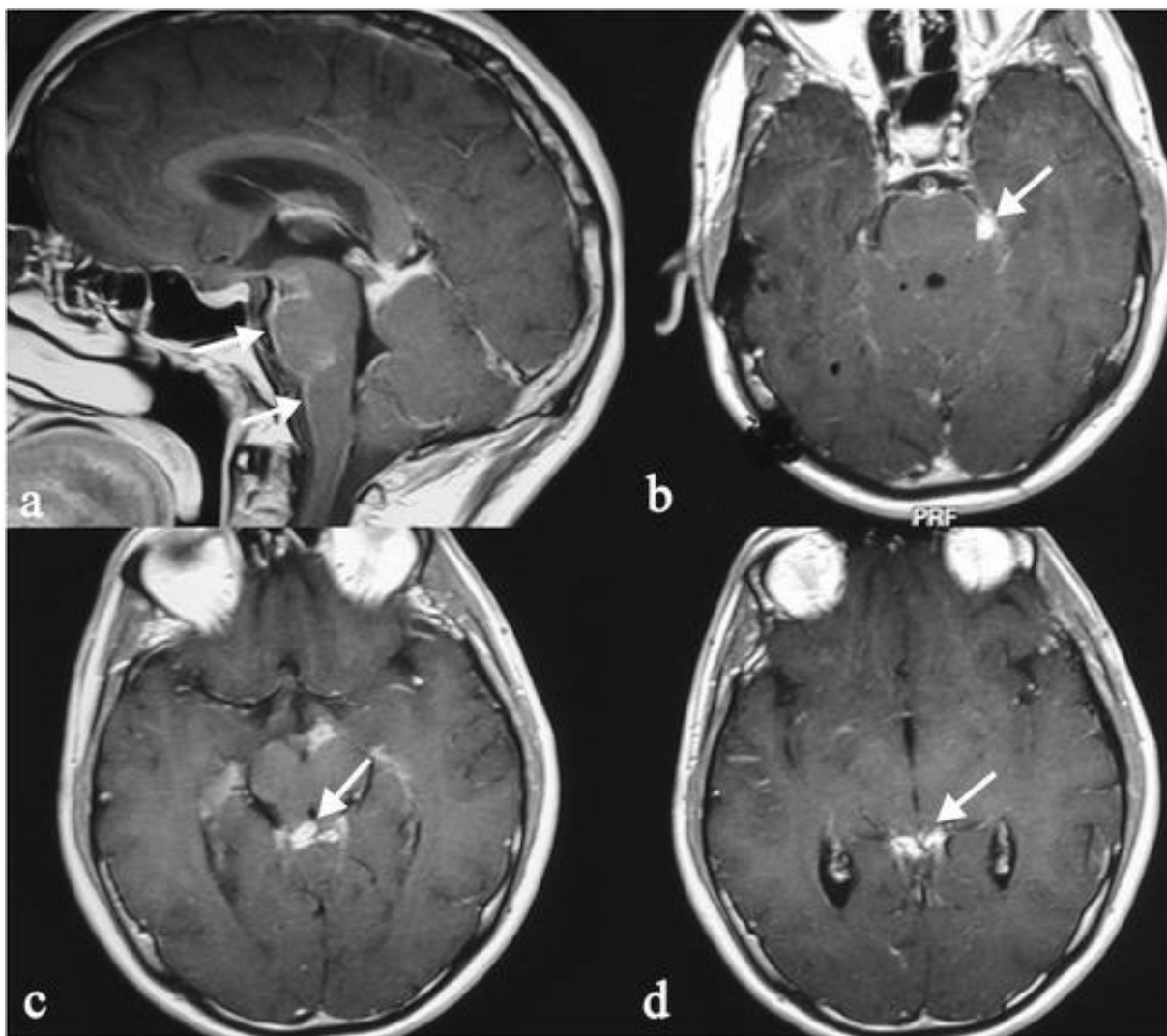
A sarcoid típusú granulomák megjelenhetnek a vesében is (5. ábra), illetve a macrophagok által termelt extrarenalis calcitriol vesekőképződést eredményezhet, ritkábban nephrocalcinosis, interstitialis nephritist, valamint veseelégtelenséget okozhat [44].



5.ábra. Renalis sarcoidosis [40]. Az a-c) ábrán jól láthatóak a nodulus formájú hypodenz léziók a vesében (nyilak). A d) ábrán a ugyanannál a betegnél a tüdőről készült HRCT felvételen láthatók a sarcidotikus elváltozások (nyilak).

3.4.6. Idegrendszer (5%)

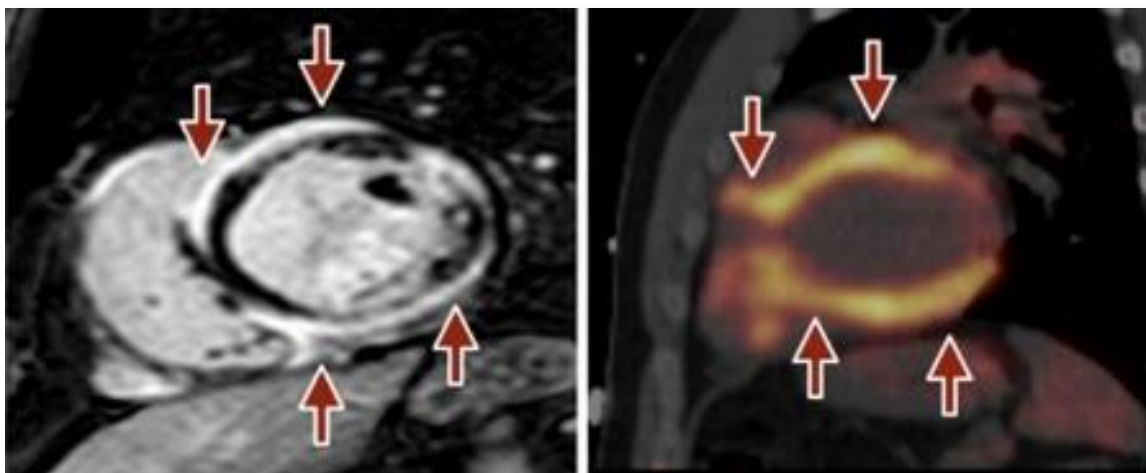
A sarcoidosis egy meglehetősen ritka, ugyanakkor sok veszélyt magában rejtő komplikációja az idegrendszert érintő formája, különösen akkor, ha a központi idegrendszert érinti (6. ábra). Ilyenkor előfordulhat meningealis gyulladás, infiltratio, hypothalamo-hypophysealis elégtelenség (pl. diabetes insipidus), encephalopathia, vasculopathia, epilepsiás rohamok vagy hydrocephalus. A perifériás idegrendszeri léziók járhatnak agyideg bénulással, legtöbbször a nervus facia list érintve, illetve egyéb perifériás, valamint kis rostokat támadó neuropathiával [45].



6. ábra. Leptomeningealis sarcoidosis [40]. a-b) az agytörzs felszínén láthatók a léziók – T1-súlyozott felvételeken a legjobban; c-d) sarcoid típusú nodulusok láthatók a felső cerebellaris cysternában is.

3.4.7. Szív (2%)

Annak ellenére, hogy a cardialis szövődmények nagyon ritkák, potenciálisan halálosak lehetnek (7. ábra). Ebből kifolyólag nagy jelentőségű, hogy amennyiben cardialis érintettségre utaló tüneteket észlelünk (pl. angina vagy bármilyen EKG-elterés), úgy kardiológus segítségét kérjük. Az átfogó vizsgálat többnyire magába foglalja a Holter-monitorozást, szívultrahangot, MRI vizsgálatot, esetleg pozitron emissziós tomográfiát (PET) [46].



7.ábra. Cardialis sarcoidosis [47]. A bal oldali képen MRI felvétel, míg a jobb oldali képen ^{18}F -FDG PET felvétel látható. Mind a két technikával jól azonosítható a kiterjedt myocardialis érintettség.

3.4.8. Csont, izom, ízületek (0,9%)

A legritkább szövődmények a vázrendszert érintik (8. ábra). Elsősorban ízületi fájdalmak, mozgási nehezítettség jellemző, de előfordulhat cystaképződés a csontokban, illetve kisebb csomók megjelenése az izmokban, esetleg myositis vagy krónikus izomfájdalom [48].



8.ábra. Sarcoidotikus léziók az ujjpercekben (nyilak) [40].

3.5. A sarcoidosis diagnosztikája

A sarcoidosis kezdeti tünetei változnak az etnikai hovatartozás, a nem és a kor függvényében. A betegség legjellemzőbb manifesztációi a perzisztáló köhögés, a bőrben, szemben, perifériás nyirokcsomókban megjelenő elváltozások, a fáradtság, illetve a véletlenszerűen napvilágra kerülő mellkasröntgen eltérések. Amennyiben a bőrtünetek dominálnak, úgy hamar eljuthatunk a diagnosis felállításáig, azonban, ha nem specifikus légúti jelek állnak előtérben, akkor a sarcoidosis gondolata később merül fel [49]. A diagnózis három alapvető kritériuma az egyértelmű klinikai és radiológiai jelek, az el-nem-sajtosodó granulomák meglétének igazolása, illetve az alternatív lehetőségek kizárása [2].

A leggyakoribb diagnosztikus jel az intrathoracalis bilateralis hilaris lymphadenopathia vagy a diffúz micronodularis pulmonalis infiltráció a mellkasi radiológiai felvételen (RTG vagy CT), melyekhez tipikus nyirokelrendezés, ún. „üstökös jel” társul. Emellett a legtöbb esetben valamilyen extrathoracalis érintettség, pl. szem vagy bőrtünet is jelen van.

A diagnózisalkotás pontosítható szöveti mintavétellel és hisztológiai analízissel, mely során az el-nem-sajtosodó granulomák igazolhatók. Általában egy pozitív szövettani lelet elegendő. Elsőkorben a superficialis léziókból – erythema nodosumra jellemző bőrtünet, tapintható perifériás nyirokcsomó vagy látható konjunktivális csomók – származó mintavételt fontoljuk meg. Amennyiben nem elérhető ilyen lézió, úgy flexibilis bronchosopia endobronchialis és transbronchialis tűbiopsiával kombinálva választandó. Az endobronchialis ultrahang-vezérelt tűbiopsia nagyon effektív a mediastinalis és hilaris lymphadenopathia igazolására, és akár 87%-ban szükségtelenné teszi a mediastinoscopiát [50]. Sőt, a tapasztalt szakembertől származó gyors citológiai vélemény abban is segíti a bronchoscopiát végző orvost, hogy szükséges-e transbronchialis tüdőbiopsia [51]. A szövettani mintavétel és analízis nagy pontossággal igazolja vagy zárja ki a sarcoidosis lehetőségét, azonban invazivitása miatt nagyban megnöveli a betegséggel járó terhet. A bronchoalveolaris lavage (BAL) az esetek 80%-ában mutat enhye (20-50%) lymphocytosist, illetve az esetek 50%-ában igazol több mint 3,5-szer magasabb CD4:CD8 T sejt arányt, ezáltal ez a technika alkalmazható a diagnózis alátámasztására [52].

A ^{18}F -FDG PET segít megítélni a gyulladásos folyamat mértékét és kiterjedését a bizonytalan eredetű, folyamatosan fennálló, nagymértékben korlátozó tüneteket produkáló betegek esetében, valamint segít meghatározni a tüdőkárosodás mértékét, illetve annak regrediálódását a kezelést követően [53, 54]. A PET a cardialis érintettség felmérésére szintén alkalmas

módszer [55].

Differenciáldiagnosztikai szempontból gondolni kell a különböző infekciókra – különösen a tuberculosisra –; a foglalkozással szerzett, környezet által indukált, illetve a gyógyszer-indukált granulomatosusra; a közönséges változó immunhiányra (CVID) – melynek elkülönítésében segít a hypogammaglobulinaemia –; a Blau-szindrómára, különböző rosszindulatú daganatos betegségek, lymphomák által okozott sarcoid-típusú reakciókra; valamint egyéb idiopathiás granulomatosusra [56-58].

3.6. A sarcoidosis jelenlegi terápiája

Effektív, oki terápia sajnos nem áll rendelkezésre, a különböző gyógyszerekkel csak a patológias folyamat intenzitását tudjuk befolyásolni. A legtöbb hatóanyag célpontja a TNF α , ami felelős a granulomatosus események elindításáért és fenntartásáért. Nincs egyértelmű iránymutatás arra vonatkozóan, hogy mikor és mivel kezdjük a terápiát [38]. A betegek 20-70%-a igényel gyógyszeres kezelést, és általában a három fő érv valamelyikének megléte esetén kezdjük el – ezek a fenyegető súlyos szervi elégtelenség, fenyegető halál vagy krónikusan fennálló tünetek [2, 59]. A terápiai egyéb fő indikációi a kardiológiai, neurológiai vagy nephrológiai érintettség, a lokális terápiára nem reagáló szembántalom, illetve a tüneteket okozó hypercalcaemia [2, 60]. Általánosságban a legjobbnak tűnő stratégia egy újonnan diagnosztizált esetben, hogy amennyiben jelentős a spontán remisszió esélye, akkor várjunk, ameddig a betegség nem progrediál, és egyértelmű radiológiai és funkcionális tüdőinvolválció nem jelenik meg. A kezelést illetően sajnos csak néhány randomizált kontrollált vizsgálat készült; ebből 13 kortikoszteroidokkal [61], 5 immunszuppresszív és egyéb citotoxikus szerekkel [62], valamint 5 egyéb randomizált vizsgálatot említ a szakirodalom [63-65].

A standard terápia a szisztémás kortikoszteroid alkalmazása. A dózist, illetve kezelési időtartamot tekintve nincs egyértelmű protokoll. A kezdeti lépés általában 20-40 mg prednison naponta 6-12 hétig, majd fokozatos dóziscsökkentés. Életet veszélyeztető esetekben, mint pl. szív, központi idegrendszer vagy vese érintettség, illetőleg súlyos szemkárosodás esetén a kezdő dózis 1 mg/ttkg naponta. Habár minimum 12 havi fenntartó kezelés ajánlott a relapsus megakadályozásához, számos kutató úgy véli, hogy 6 hónap után érdemes megszakítani a kezelést [66]. A betegek egy része hosszan tartó, alacsony dózisu kezelést igényel még évekig,

míg a betegség akut formájában szenvedők számára elegendő lehet 3-6 havi terápia. Habár a szisztémás kortikoszteroid kezelésnek vannak rövidtávú előnyei, hosszú távú hatásossága megkérdőjelezhető. Egy metaanalízis szerint a 2. és 3. stádiumú pulmonalis sarcoidosisban szenvedő betegek esetében 6-24 hónapig tartó kezelés minimálisan javította a betegek erőltetett vitálkapacitását (FVC) – 4,2 %-kal –, illetve a szén-dioxid diffúzióját (DLCO) – 5,7 %-kal –, azonban az aszimptomatikus állapotú betegek hosszútávú szteroidkezelése megkérdőjelezhető [59, 61].

A krónikus szteroid terápia mellékhatásai, illetve az új gyógyszerek egyre nagyobb térhódítása módosította a sarcoidosis eddigi kezelési gyakorlatát. A kortikoszteroidok mellett alternatív, illetve kiegészítő hatóanyagokra is gondolnunk kell bizonyos körülmények között: speciális szervek érintettsége esetén, a kortikoszteroidok kontraindikációja esetén, a szteroid dózisának csökkentése esetén, valamint szteroid-rezisztens esetekben. Amennyiben enyhe bőrérzékenységet vagy hypercalcaemiát tapasztalunk, a szteroidok helyett előnyben részesítendőek az antimalariás hatóanyagok, illetve a tetracycline [2, 60]. Konvencionális szteroidot helyettesítő gyógyszerek az antimalariás hatóanyagok /atovakon és a proguanil-hidroklorid, meflokin, klorokin, kinin, artemisinin/ [67], a methotrexat (MTX) [68] vagy az azathioprin [69]. Mivel a MTX hatása később jelentkezik, amennyiben gyors eredményre van szükségünk, mert a betegség életfontosságú szervet érint, illetve elnyújtott lefolyásra van kilátás, úgy a MTX-et szteroiddal kombinációban kell alkalmazni. Két retrospektív kontrollálatlan tanulmány szerint a leflunomid alkalmazása csökkentheti a szükséges szteroid dózist, illetve hatékony lehet akár egyedül, és akár methotrexattal együtt olyan pulmonalis vagy extrapulmonalis lokalizációjú esetekben, melyek gyengén reagálnak a konvencionális kezelési protokollra, illetve azok túl sok mellékhatást eredményeztek [70].

A betegek közel 10%-a az immunszuppresszáns kezelés ellenére is tüneteket produkál [71]. Az elmúlt 10 évben egyre gyakrabban alkalmaznak TNF α -antagonistákat (Humira-adalimumab, Enbrel-etanercept, Remicade-infliximab, Simponi-golimumab, Cimzia-certulizimab pegol) a krónikus sarcoidosis kezelésében. Az infliximab hatékonynak bizonyult egy randomizált placebo-kontrollált vizsgálatban refrakter pulmonalis sarcoidosisban szenvedő betegeknél [72]. Mindazonáltal, az erőltetett vitálkapacitás tekintetében csupán 2,5%-os javulást ért el, a Szent György Respiratórikus Kérdőív alapján a dyspnoe nem csökkent, a 6 perces sétatesztben pedig szintén nem mutatkozott javulás [72]. A post-hoc analízis szerint azok a betegek profitáltak többet a kezelésből, akiknek alacsonyabb volt a FVC-uk, magasabb a Szent György Respiratórikus Kérdőív alapján számolt összesített pontszámuk, erősebb a dyspnoe érzésük

vagy emelkedettebb volt a CRP szintjük [73]. Az infliximab az extrapulmonalis sarcoidosis tekintetében is eredményes volt (mint a vizsgálat második végpontja), habár a kezelés 24 hete alatt elért állapotjavulás eltűnt a következő 24 heti kiürülési periódus alatt. Különböző retrospektív vizsgálatok arra utalnak, hogy az infliximab elsősorban azon betegeknél hatékony, akik központi idegrendszeri [74, 75], ocularis érintettséggel [74] vagy lupus pernioval [76] jelentkeznek. Mindazonáltal fontos tisztában lennünk a biológiai terápia mellékhatásaival. Az adalimumab szintén hatékony uveitisben, illetve egyéb fogyatékossgot okozó sarcoidosis tünetben [77]. A rituximab hatásos lehet a refrakter ocularis léziókban [78], míg az apremilast elsősorban a nehezen kezelhető bőrelváltozások esetén alkalmazandó [79].

A dexamethylfenidat effektívnek bizonyult a placeboval szemben a fáradtság kezelésének tekintetében, amely tünet egyébként meglehetősen nehezen kezelhető [65]. Mindazonáltal a dexamethylfenidat egy amfetamin típusú psychostimuláns, ezért felírása körültekintést igényel. A betegség számos fázisában meggondolandó a hatóanyagok kombinált alkalmazása, ezáltal a mellékhatások mérséklése. A lokálisan adható kortikoszteroidok megfelelőek lehetnek a szem- és bőrtünetek kezelésére. Habár a köhögés és bronchus hyperreaktivitás csillapításában is hatásosak, egyedül alkalmazva nem javították jelentősen a légzésfunkciós tesztek eredményeit, sem pedig a radiológiai képet [72]. A specifikus terápia mellett a tünetek kezelése, illetve szupportív intézkedések is nagyon fontosak, mint pl. a kalciumbevétel csökkentése és a napfény kerülése hypercalcaemiában, gyógyszerek és implantálható eszközök kardiális érintettség esetén, hormonális szubsztitúció hypothalamo-hypophysealis elégtelenség esetén, valamint az oxigénterápia [2].

A sarcoidosis-asszociált pulmonalis hypertensio kezelésére használt gyógyszerek előnyei és biztonságossága még nem tisztázott, és nagyban függhet a mögöttes patológiai folyamattól [80]. Az endobronchialis stenosis megoldására mechanikai tágítás szükséges. A sarcoidosisban szenvedő betegeknél jelentkező aspergilloma kezelésére az antifungális gyógyszerek adása ellentmondásos, míg a sebészi eltávolítás komplikáltabb lehet azoknál, akiknél jelentős pulmonalis fibrosis alakult ki. Azon betegek esetében, akiknél szteroid-asszociált osteoporosissal kell számolnunk, érdemes lehet mérni a szérum és a vizelet kalcium koncentrációját a terápia megkezdése előtt, illetve a kalcium és D-vitamin pótlás során is folyamatosan. Az osteoporosis primer prevenciójára a bisphosphonátok az elsődlegesen választandók [81].

A végstádiumú betegség megoldására tüdő-, máj-, szív- vagy vesetranszplantáció a

legésszerűbb gondolat, tekintve, hogy a beavatkozás sikerrátája pont olyan, mint a más okból elvégzett transzplantációké [82]. A várólistára helyezés csak azután történhet meg, miután valamennyi gyógyszeres terápiás lehetőséget kimerítettünk, illetve a betegség aktivitását és kiterjedését pontosan meg tudjuk ítélni. A sarcoidosis rekurrencia aránya a graftokban 14-35%, és általában gyógyszeresen jól kezelhető [83].

3.7. Újabb diagnosztikai eszközök – szérumbiomarkerek

A fent említett diagnosztikai eszközökön túl egyre nagyobb teret hódítanak a különböző szérumbiomarkerek, melyeket a sarcoidosis diagnosztikájához, aktivitásának, illetve prognózisának megbecsléséhez használhatunk [84]. Ezen biomarkerek közül a „prototípus” a szérumbiotenzin konvertáz enzim (ACE). Az ACE-t a sarcoidotikus granuloma epitheloid sejtjei termelik, minek következtében a ACE aktivitása elviekben arányos a szervezetben lévő granulomák mennyiségével [9]. Az ACE-aktivitás sarcoidosis biomarkerként való alkalmazása évtizedek óta vitatott kérdés. Különböző sarcoidosis kohorsz vizsgálatok 41-100% közé becsülték a ACE-aktivitás szenzitivitását, míg specificitását 83-91% közé [84]. Az ACE-aktivitás pontos megítélését befolyásolja a méréshez használt esszé, a vizsgált populáció összetétele, a különböző ACE-gátló gyógyszerek hatása, a sarcoidosis ellen alkalmazott terápia, illetve az inter-individuális különbségek, melyek az ACE gén inzerció/deleció (I/D) polimorfizmusából adódnak [85, 86]. A 17-es kromoszómán elhelyezkedő ACE génben található egy ún. inzerció/deleció (I/D) polimorfizmus, mely tartalmaz (vagy nem) egy 287 bázispár hosszúságú szakaszt, ennek megfelelően beszélünk *II*, *ID* vagy *DD* genotípusról [87]. Számos tanulmány igazolta már korábban, hogy a *DD* genotípus közel kétszeres (~80%) szöveti és plazma ACE koncentrációt eredményez, mint az *II* genotípus jelenléte [88, 89]. Egy 2013-as meta-analízis eredményei alapján van összefüggés az ACE gén I/D polimorfizmusa és a sarcoidosis prevalenciája között. Az analízis során összesen 1556 beteg és 2381 kontroll adatait vizsgálták meg, és értékelték, még hozzá etnikai hovatartozásnak megfelelően (külön a kelet-ázsiai és külön az európai adatokat), és arra a következtetésre jutottak, hogy az ACE gén I/D polimorfizmusa befolyásolja a sarcoidosis kialakulására való hajlamot. A kelet-ázsiai alanyok esetében az *I/D* és *D/D* polimorfizmus, míg az európaiak esetében a *D/D* polimorfizmus mutatott szorosabb összefüggést a sarcoidosis gyakoriságával. Az európai lakosság körében gyakoribb a *D/D* polimorfizmus előfordulása, ami magyarázhatja, hogy ezen a kontinensen a betegség előfordulása is gyakoribb. Mindazonáltal a vizsgálatnak, illetve az enzimaktivitás

meghatározásának vannak korlátai – pl. az aktivitásmérést zavaró tényezők (szérumelemek, gyógyszeres interakciók); a nem túl nagy elemszám; egyéb polimorfizmusok, melyek módosíthatják az enzim aktivitását –, melyekkel tisztában kell lennünk [90].

Munkánk során mi is beállítottunk és optimalizáltunk egy fluoreszcens kinetikus esszét a szérum ACE aktivitásának meghatározására. Rájöttünk arra, hogy az albumin-mediált endogen ACE-gátlás elhanyagolhatóvá válik a szérum 35-szörösére vagy többszörösére történő hígítása esetén. A mintákban lévő bilirubin és hemoglobin zavaró hatásának elkerülése érdekében a szérum minták további hígítása ajánlott 0,71 g/L hemoglobin koncentráció vagy 150 μ M bilirubin koncentráció fölött. Mindezeket túl pedig genotípus-független, valamint I/D polimorfizmus-függő referencia intervallumokat is létrehoztunk ezzel a módszerrel.

Egyéb szérum biomarkerek, melyek hasznosak lehetnek a betegség diagnosztizálásában azok, melyek a CD4⁺ T-sejtek aktivitását mutatják – pl. a szérum IL-2R (sIL-2R) [91], valamint a különböző kemokinek, mint a CXCL9, CXCL10 és CXCL11 [92, 93] –, illetve azok, melyek a macrophag aktivitásra utalnak – mint a kítotriozidáz [94], lizozim [95] és szérum amyloid A (SAA) [96]. A betegség aktivitásának meghatározására legígéretesebb a kítotriozidáz és a sIL-2R, legalábbis a jelen tanulmányok alapján. A SAA pedig nagyfokú specificitással bír – szövettani eljárás során történő megfestéssel, valamint szérumkoncentráció méréssel – a sarcoid típusú granuloma nem sarcoid típusú granulomától való elkülönítésében [97].

4. Célkitűzés

Az irodalmi áttekintés után érthető, hogy mennyire fontos lenne egy megbízható, nagy pontosságú mérőmódszer kidolgozása, mellyel egyszerűbbé válhatna a sarcoidosis diagnosztizálása. Kutatásaink során erre törekedtünk.

Kísérleteink első felében a munkacsoportunk által korábban kidolgozott és beállított optimalizált ACE-aktivitás mérő teszt diagnosztikai hatékonyságát egy klinikai tanulmány során vizsgáltuk meg.

Kutatásunk második felében körüljártuk annak a lehetőségét is, hogy az ACE I/D polimorfizmus figyelembevétele a sarcoidosis laboratóriumi diagnózisának felállításában a mi általunk optimalizált teszten túl segíti-e az ACE aktivitásmérés szenzitivitásának növelését más, kereskedelmi forgalomban kapható diagnosztikai tesztek esetében.

Ezen túlmenően kíváncsiak voltunk arra is, hogy egyéb, a sarcoidosisban kevésbé használt biomarkerek önmagukban, vagy más tesztekkel kombinálva hozzájárulhatnak-e a pontosabb, gyorsabb laboratóriumi diagnózis felállításában.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Első ciklus

5.1.1. Vizsgált alanyok

Kísérleteink első részének kontroll csoportját 201 magyar felnőtt alkotta, akik a Debreceni Egyetem, Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika Járóbeteg-szakrendelés által gondozottak vagy a Klinika önkéntes dolgozói voltak. Önértékelésük alapján valamennyien egészségesek. Az enyhe (I-es típusú) hypertonia nem minősült kizárási kritériumnak. Egyikőjük sem részesült ACE-gátló kezelésben, és valamennyien írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba.

A klinikai vizsgálatba, - mely egy obszervációs eset-kontroll típusú tanulmány-, 59 beteget vontunk be, hogy felmérjük az optimalizált ACE aktivitásmérő teszt diagnosztikai pontosságát sarcoidosisban. Ezek a betegek diagnosztikus mediastinoscopián vagy video-asszisztált thoracoscopiás sebészeti eljáráson mentek keresztül, a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézetében. Az eljárások alkalmával szövettani mintavétel történt a sarcoidosis jelenlétének vagy hiányának megállapítása céljából. A histopathologiai analízist rutinszerűen a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének szakemberei végezték. Minden beteg írásos beleegyezését adta a tanulmányba.

5.1.2. Szérum- és DNS-minták

A vérmintákat Vacutainer csövekbe (Katalógusszám **368857** Vacutainer cső 3 ml lila K3 EDTA, **367955** vacutainer cső sárga 5 ml szérum / gél, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vettük le, standard, aseptikus vérvételi technikával. Az alvadást követően 15 percig tartó, 1500g-n, +4 °C-n történő centrifugálás segítségével elválasztottuk a szérumot a sejtes elemektől. Az ACE aktivitás méréséig a mintákat –20 °C-n tároltuk. A klinikai tanulmányban résztvevő betegektől közvetlenül a sebészeti beavatkozás előtt vettünk vérmintát. EDTA-val antikoagulált teljes vért használtunk a genetikai vizsgálatokhoz, melyeket –20 °C-n tároltunk a dezoxiribonucleinsav (DNS) izoláció időpontjáig. A mintavétel és a DNS-izoláció között eltelt átlagos időtartam 1 hónap (2 nap – 3 hónap) volt. A genomi DNS-t a NucleoSpin Blood kit (Katalógusszám: 740951.50; Macherey-Nagel GmbH, Düren, Németország) segítségével

izoláltuk a gyártó által meghatározott instrukciók alapján, és a tisztított DNS-t + 4 °C-n tároltuk.

5.1.3. ACE-aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetikus esszé segítségével

A szérum ACE-aktivitás meghatározását a Carmona és mtsai [98] által meghatározott protokoll alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Röviden, a reakcióelegy tartalma: 100 mM tris(hydroxymethyl)aminometán hydrochlorid (TRIS) puffer (pH 7,0), 15 μ M Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrát (a Peptide 2.0, Chantilly, VA, USA által szintetizálva), 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂ és szérum, 35-szörös hígításban. A reakcióelegy fluoreszcencia intenzitásának változását NovoStar plate readerrel (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország) 96 mérési vályús fekete plate-eken határoztuk meg (Katalógusszám: 655-900, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria) 37 °C-on. Folyamatos adatrögzítést végeztünk 30 percen keresztül, 1 perces mérési intervallumokkal, az excitációs és emissziós hullámhosszúságok pedig 340 és 405 nm voltak (ebben a sorrendben). Az aktivitást U/L-ben fejeztük ki, melyet a következő egyenlet segítségével számoltuk ki: ACE-aktivitás = $S / k \times D$, ahol az „S” jelöli az idő során növekvő fluoreszcencia intenzitási görbe meredekségét, a „k” a teljes hidrolizált szubsztrát 1 nM-jának fluoreszcencia intenzitását, a „D” pedig a szérum hígításának mértékét. Minden minta esetén legalább kétszer határoztuk meg az ACE-aktivitást, melyet átlagértékként fejeztük ki.

5.1.4. ACE-aktivitás mérése az “ACE color diagnosztikai kit” segítségével

A klinikai tanulmányba bevont 51 betegből 40 esetében az ACE-aktivitást ACEcolor diagnosztikai reagens (Katalógusszám: 205259, Fujirebio Inc, Tokyo, Japán) segítségével is meghatároztuk a gyártó által kiadott instrukciónak megfelelően. Az alkalmazott szérumhígítás az előírt hatszoros volt, és a reakcióelegyek abszorbancia maximumát egy Hitachi U-299 spektrofotométer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japán) segítségével, 505 nm-en átlátszó küvetákban (Katalógusszám: 7591 15, Brand GmbH, Wertheim, Németország) határoztuk meg. Az aktivitást U/L-ben fejeztük ki, és a következő egyenlet segítségével számoltuk ki: ACE-aktivitás = $A - B \times 87,5$ ahol „A” jelölte a minta reakcióelegy

abszorbanciáját, „B” pedig a vak minta abszorbanciáját. Ehhez a módszerhez a normál referencia tartományt (8,3–21,4 IU/L 37 °C-on) a kit alkalmazási előírata szolgáltatta.

5.1.5. ACE genotípus

Az ACE gén *I/D* genotípus meghatározását a Riga és mtsai által leírt protokoll [99] alapján végeztük, és az *I* allél jelenlétét egy második polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával igazoltuk, Lindpaintner és mtsai. módszerének [100] segítségével. Ezen reakciók amplitonja it 3%-os agaróz gélen választottuk el, majd elemeztük [7]. A DNS-t SYBR safe gél festékkel festettük meg (Katalógusszám: S33102, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.1.6. Etikai engedély és statisztikai analízis

A Regionális és Intézményi Etikai Bizottság, Debreceni Egyetem, Klinikai Központ (DEKK, REB/IEB szám:4375-2015), valamint a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács (33327-1/2015/EKU) valamennyi vizsgálatot engedélyezte. A kutatás a Helsinki Deklaráció irányelveinek megfelelően történt.

A genotípus-függő csoportok tagjai esetében mért ACE-aktivitások közötti különbségeket egyutas ANOVA és Tukey post-hoc teszttel értékeltük. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7-es verziójú szoftverrel végeztük (San Diego, CA, USA). Az eredményeket a kapott értékek átlagai $\pm$ standard deviáció (SD) vagy median értékek és tartomány feltüntetésével szemléltettük; a kapott eredményt akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ volt.

5.2. Második ciklus

5.2.1. Vizsgált alanyok

Kutatásunk második részébe 104 feltételezetten sarcoidosisban szenvedő beteget vontunk be. Minden beteg diagnosztikus mediasztinoszkópián vagy videó-asszisztált thorascopián esett át a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Sebészeti Intézetében, annak érdekében, hogy igazoljuk a sarcoidosis meglétét vagy hiányát. A rutin szövettani vizsgálat a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében történt. A szteroid terápiában részesülő betegek kizárásra kerültek. Minden beteg írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz.

A referencia intervallumok (CTO-aktivitás, LZM és sIL-2R koncentrációk) meghatározásához 133 felnőtt önkéntest vontunk be a tanulmányba, akik a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai Klinika Ambulanciáján jelentek meg, illetve a Kardiológiai Klinika dolgozói közül kerültek ki. Saját véleményük alapján a legtöbbjüket egészségesnek tekintettük. Az enyhe (I-es típusú) hypertonia nem volt kizáró tényező. A 104-ből 9 beteget kizártunk a vizsgálatból, mert ACE-gátló gyógyszeres terápiában részesültek, ezért mesterségesen alacsony volt az ACE-aktivitási szintjük. A résztvevők közül senki nem részesült szteroid vagy sarcoidosis ellenes egyéb gyógyszeres terápiában, és minden résztvevő írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz.

5.2.2. Szérum- és DNS-minták

A vérmintákat standard aszeptikus technikával vettük Vacutainer csövekbe (Kat. szám. 368857, 367955, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A szérum szeparációja a natív vérből alvadás, illetve 15 perc 1500 g-n, +25 °C-n történő centrifugálás segítségével történt. A mérések elvégzéséig -20 °C-n tároltuk a szérummintákat. A klinikai tanulmányban résztvevő betegek esetében a vérmintákat közvetlenül a sebészi beavatkozás előtt vettük. A genetikai vizsgálatokhoz EDTA-val antikoagulált teljes vérmintákat használtunk, melyeket -20 °C-n tároltuk a DNS izolálásáig. A genomi DNS-t NucleoSpin DNS izoláló kit segítségével állítottuk elő (Katalógusszám: 740951.50; Macherey-Nagel GmbH, Düren, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően, és a tisztított DNS-t +4 °C-n tároltuk.

5.2.3. ACE-aktivitás mérése

A szérum ACE-aktivitását három különböző módszerrel határoztuk meg. A kísérleteink első felében kidolgozott, és ebben a dolgozatban korábban bemutatott módszer [102], eredményeit összehasonlítottuk két, kereskedelmi forgalomban elérhető módszer, nevezetesen az **Infinity ACE** (Kat. szám: TR85056, Fisher Diagnostics, Middletown, USA) és az **ACEcolor** (Kat. szám: 205259, Fujirebio Inc., Tokyo, Japán) eredményeivel. Az Infinity ACE egy UV kinetikai-esszé, mely az N-[3-(2-furil)-acryloyl]-L-fenilalanilglicilglicin hasításán alapul, míg az ACEcolor egy végpont kolorimetriás módszer, mely a p-hidroxybenzoyl-glicil-L-hisztidil-L-leucin szubsztrát hasításán alapul. A teszteket a gyártók utasításai alapján végeztük egy

mikrotiter lemez-olvasó, (fluoreszcens kinetikus esszé; NovoStar, BMG Labtech, Németország), egy klinikai kémiai analizátor (Infinity ACE, Cobas c501, Roche, Basel, Svájc) vagy egy spektrofotométer segítségével (ACEcolor, Hitachi U-2900, Japán).

5.2.4. A szérum CTO (kitotriozidáz) - aktivitás mérése

A szérum CTO-aktivitást a Hollak és mtsai [103] által leírt módszer alapján határoztuk meg, minimális módosításokkal. Röviden, a CTO-aktivitást egy mesterséges szubsztrát (4-metilumbelliferil- β -D-N,N',N''-triacetil-kitotriozid; Kat. szám:19715, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA) segítségével mértük egy olyan reakcióelegyben, mely 20 μ M szubsztrátot, 50-szeres hígítású szérumot és 100 mM / 200 mM citrát / foszfát puffert tartalmazott, 5,2-es pH-n. A méréseket 96-lyukú mikrotiter lemezben végeztük (Kat. szám: 655-900, Greiner Bio-One GmbH, Németország) 37 °C-n. A fluoreszcencia intenzitásokban bekövetkezett változásokat ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) percenként mértük legalább 30 percen keresztül mikrotiter lemez-olvasó segítségével (NovoStar plate reader; BMG Labtech, Németország). A fluoreszcencia intenzitás értékeket a reakcióidő függvényeként ábrázoltuk és egyenessel illesztettük (GraphPad Prism 7.2). A CTO-aktivitást 4-metilumbelliferon (Kat. szám: M1381, Merck, Németország) kalibrációs görbe használatával számoltuk ki és mU/L egységben fejeztük ki.

5.2.5. A szérum LZM (lizozim)-koncentráció mérése

A szérum LZM koncentrációját egy kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kit (Kat. szám: SEB193Hu, Cloud-Clone Corp., Katy, Texas, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A cellák abszorbancia értékeit mikrotiter lemez-olvasóval detektáltuk (NovoStar, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország).

5.2.6. SAA(szérum amyloid A)-koncentráció mérése

A SAA koncentrációt immun-nefelometriás esszé (Kat. szám: OQMP11, Cruinn Diagnostics

Limited, Dublin, Írország) alkalmazásával határoztuk meg egy BN ProSec analízátor (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. Referencia intervallumként a 0 -6,4 mg/L tartományt jelöltük meg.

5.2.7. A sIL-2R (szolubilis interleukin 2 receptor) koncentráció mérése

A szérum sIL-2R koncentrációjának meghatározásához egy kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kitet (Kat. szám: BMS212INST, eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Bécs, Ausztria) használtunk. A méréseket a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A mikrotiter lemez mérőhelyek abszorbancia értékeit mikrotiter lemez-olvasóval mértük meg (NovoStar, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország).

5.2.8. Az ACE gén inzerció/delécio, illetve a kitotriozidáz gén duplikációs polimorfizmusainak meghatározása

Az ACE gén (rs1799752) *I/D* genotípusát a Rigat és mtsai által leírt protokoll [99] alapján határoztuk meg, az *I* allél jelenlétét pedig egy második polimeráz láncreakció (PCR) segítségével erősítettük meg, Lindpainter és mtsai-nak módszerével [100]. Ezen reakciók amplikonjait 3%-os agaróz gélen szeparáltuk [7], a DNS-eket SYBR safe gélfestékkel vizualizáltuk (Kat. szám: S33102, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A Livnat és mtsai által leírt protokollnak megfelelően határoztuk meg a CTO gén 24 bázispár hosszú duplikátumait (rs3831317) [104].

5.2.9. Etikai engedély és Statisztikai analízis

A Regionális és Intézményi Etikai Bizottság, Debreceni Egyetem, Klinikai Központ (DEKK, REB/IEB szám:4375-2015), valamint a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács (33327-1/2015/EKU) valamennyi vizsgálatot engedélyezett. A kutatás a Helsinki Deklaráció irányelveinek megfelelően történt.

Az adatok eloszlási mintázatát D'agostino-Pearson omnibusz normalitási teszttel vizsgáltuk. Minden olyan érték, mely normál eloszlású volt átlagként ($\pm$ standard deviáció) van ábrázolva, míg azok, melyek eloszlása nem normál volt, azokat mediánként (25-75 percentilis tartomány) ábrázoltuk. A normál eloszlást követő adatokat párosítatlan t-teszttel hasonlítottuk össze Welch-féle korrekciót alkalmazva, míg a nem normál eloszlást követő adatokat Mann-Whitney U teszttel. A nominális értékek analízisét kétirányú Fisher teszttel végeztük. χ^2 -tesztet alkalmaztunk annak megbecsüléséhez, hogy a genotípus eloszlás a Hardy-Weinberg egyenletnek megfelelően alakult-e [101]. A különböző csoportokon belüli allélmegoszlást kétirányú Fisher teszttel hasonlítottuk össze. A referencia tartományok megállapításához alkalmazott statisztikai vizsgálatok az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) ajánlásainak megfeleltek. Ezek az ajánlások a Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) útmutatásában jelentek meg [139]. A referencia intervallumokat nem-parametrikus, percentilis módszerrel határoztuk meg. A kieső értékeket Tukey szerint azonosítottuk [140]. A kombinált szenzitivitás és specificitás kiszámításához Kanchanaraksa szimultán tesztjét [105]) alkalmaztuk. A statisztikai analízis elvégzéséhez a GraphPad Prism szoftver 7.2.-es verzióját használtuk [105]. Statisztikailag szignifikánsnak minősítettük azokat az eredményeket, amelyeknél a $p < 0,05$ volt. A különböző vizsgált biomarkerek, valamint az ACE - aktivitást mérő tesztek diagnosztikai hatékonyságát, ROC görbék (receiver operating characteristic) segítségével vizsgáltuk, melyeket a GraphPad Prism 8 szoftverrel hoztunk létre. A görbe alatti területet az ábrákon feltüntettük.

6. Eredmények

6.1. Első ciklus

Munkacsoportunk korábban kidolgozott egy optimalizált fluoreszcens ACE-aktivitás mérő tesztet, melyet nem befolyásol az albumin vagy más szérumszervet jelenléte. Jelen kutatás első fázisában ennek a tesztnek a diagnosztikus pontosságát egy klinikai vizsgálatban teszteltük. 59 beteget vontunk be a vizsgálatba, akik valamennyien diagnosztikus mediastinoscopián vagy hilaris nyirokcsomó, illetve tüdőszövet biopsia vétel céljából történő thoracoscopián estek át a sarcoidosis tüneteinek megjelenését követően. A sarcoidosis diagnózisát ezen minták szövettani analizisét követően állították fel vagy zárták ki. A műtétet megelőzően minden betegről vérmintát vettünk a genotípus és az ACE-aktivitás meghatározása érdekében.

59 betegből 8 került kizárássra ACE-gátló kezelés alkalmazása, ezáltal mesterségesen csökkentett ACE-aktivitás miatt (1. táblázat).

Összes beteg, n	59	
ACE-gátló kezelés miatt kizárt betegek száma, n	8	
	Sarcoidosisra pozitív szövettan	Sarcoidosisra negatív szövettan
Szám, n	40	11
Nem, nő/férfi, n	18 n / 22 f	3 n / 8 f
Életkor, évek	39,0 ± 11,0	54,0 ± 15,2
II genotípus, n	4	3
ID genotípus, n	24	5
DD genotípus, n	12	3
ACE-aktivitás (II), U/L, (átlag ± SD)	10,38 ± 3,67	5,73 ± 0,91
ACE-aktivitás (ID), U/L, (átlag ± SD)	12,24 ± 4,35	7,38 ± 2,90
ACE-aktivitás (DD), U/L, (átlag ± SD)	13,99 ± 4,82	10,97 ± 0,70
Tüdőbetegség radiológiai stádiuma		
Stádium 0, n	1	0
Stádium 1, n	24	8
Stádium 2, n	11	3
Stádium 3, n	3	0
Stádium 4, n	0	0
Bal kamrai ejekciós frakció, % (átlag ± SD)	60,4 ± 4,8	61,1 ± 5,4
FVC, % (átlag ± SD)	96,0 ± 16,5	85,8 ± 19,1
FEV1, % (átlag ± SD)	92,7 ± 15,0	80,0 ± 18,8
Tiffeneau-index, % (átlag ± SD)	82,82 ± 5,82	79,05 ± 7,13

1. táblázat. A klinikai vizsgálatba bevont betegek jellemzői a szövettani eredmény szerint csoportosítva

ACE: angiotenzin-konvertáló enzim; EF: ejekciós frakció; FVC: erőltetett vitálkapacitás; FEV1: erőltetett kilégzési térfogat (1 s); Tiffeneau-index FEV1/FVC.

A szövettani analízis 51 betegből 40 esetében specifikus volt sarcoidosisra, míg 11 beteg kapcsán más diagnózis nyert szövettani alátámasztást (lymphoma, carcinoma, anthracosis, sinus histiocytosis stb.). Az *I/D* genotípus prevalenciáját és az allélgyakoriságot illetően nem találtunk szignifikáns különbséget a szövettanilag pozitív, illetve negatív esetek között, valamint a sarcoidosisra pozitív és a kontroll csoport között (az adatokat nem ábrázoltuk). A betegek klinikai tulajdonságait az 1. táblázat mutatja.

Az ACE-aktivitás értéket akkor minősítettük pozitívnak, ha az meghaladta az általunk korábban meghatározott referencia intervallum felső határát [102]. A genotípus-független referencia intervallum alkalmazása esetén 40-ből 9 beteg rendelkezett a referencia intervallum felső határánál magasabb ACE-aktivitással, míg a genotípus-függő referencia intervallum alkalmazása esetén ugyanez az arány 17 volt (2. táblázat). Ezáltal azt mondhatjuk, hogy az ACE-aktivitás meghatározásának szenzitivitása a sarcoidosis diagnózisának felállításában jelentősen emelkedett a genotípus-függő referencia intervallum alkalmazása esetén (42,5% a 22,5%-kal szemben) a mi általunk kidolgozott teszt esetében. 51 betegből 11 esetében kaptunk valódi negatív értéket, ami mindkét kiértékelési technika alkalmazása után is negatív maradt, míg 31, illetve 23 beteg esetében álnegatív eredményt kaptunk a genotípus-független, illetve genotípus-függő referencia intervallumot alkalmazva, ebben a sorrendben. A módszer specifitása, illetve pozitív prediktív értéke mindkét esetben 100%-nak bizonyult, míg a negatív prediktív érték 26,2%, valamint 32,4% lett a genotípus-független és genotípus-függő referencia intervallumok használata esetén. Az ACE-aktivitásmérés értékelése pontosabb volt a genotípus-függő referencia intervallum alkalmazása esetén (54,9% vs. 39,2%).

	Genotípus-független kiértékelés	Genotípus-függő kiértékelés
Valódi pozitív, n	9	17
Valódi negatív, n	11	11
Fals pozitív, n	0	0
Fals negatív, n	31	23
Szenzitivitás, %	22,5	42,5
Specifitás, %	100	100
PPV, %	100	100
NPV, %	26,2	32,4
Pontosság, %	39,2	54,9

2. táblázat. A fluoreszcens kinetikai ACE aktivitási teszt diagnosztikai hatékonysága.

PPV: pozitív prediktív érték; NPV: negatív prediktív érték.

Összehasonlítottuk ennek a fluoreszcens kinetikus esszének a diagnosztikai pontosságát egy, a kereskedelmi forgalomban elérhető diagnosztikai teszt, az “ACEcolor” pontosságával (3. táblázat). Az 51-ből 40 beteg ACE-aktivitása alapján a mi tesztünk diagnosztikai teljesítőképessége (a genotípus-független referencia intervallummal) hasonló volt az “ACEcolor” teszt pontosságához (42,5% vs. 40%, ebben a sorrendben), mindazonáltal az “ACEcolor” fals pozitívnak értékelt egy nem sarcoidosisos mintát is. Amikor a genotípus-függő határértékeket alkalmaztuk, a mi tesztünk felülmúlta az “ACEcolor” diagnosztikai teszt pontosságát (50% vs. 40%, ebben a sorrendben), mely nem veszi figyelembe az ACE I/D polimorfizmust.

	ACEcolor (Fujirebio Inc.)	Optimalizált fluoreszcens kinetikai ACE aktivitási esszé	
		Genotípus-független kiértékelés	Genotípus-függő kiértékelés n=40
Valódi pozitív, n	6	6	9
Valódi negatív, n	10	11	11
Fals pozitív, n	1	0	0
Fals negatív, n	23	23	20
Szenzitivitás, %	20,7	20,7	31,3
Specificitás, %	90,9	100	100
PPV, %	85,7	100	100
NPV, %	30,3	32,4	35,5
Pontosság, %	40	42,5	50

3. táblázat. Az “ACEcolor” és az optimalizált fluoreszcens kinetikus esszé diagnosztikai hatékonysága.

PPV; pozitív prediktív érték; NPV, negatív prediktív érték

6.2. Második ciklus

Kutatásunk második felében többek között arra kerestük a választ, hogy az ACE I/D polimorfizmus figyelembevétele segíti-e a pontosabb diagnosis felállítását egyéb, a kereskedelmi forgalomban kapható diagnosztikai tesztek esetében.

A vizsgálatba összesen 104 sarcoidosis-gyanús beteget vontuk be, akik szintén diagnosztikus

mediastinoscopián vagy hilaris nyirokcsomó, illetve tüdőszövet biopsia vételen estek keresztül a sarcoidosis szövettani megerősítése vagy kizárása végett.

A szövettani vizsgálat 104-ből 69 esetben bizonyult specifikusnak sarcoidosisra, míg 35 beteg szövettanilag eltérő diagnózist kapott (sinus histiocytosist, lymphomát, carcinomát, anthracosist stb., 4. táblázat).

	Sarcoidosis szövettan		Referencia populáció
	Pozitív	Negatív	
Szám, n	69	35	133
Nem, nő/férfi, n	30 n/ 39 f	12 n/ 23 f	72 n/ 61 f
Életkor, évek	40,9 (±12,3) [*] #	50,5 (±14,0)	48,3 (±15,0)
Bal kamrai ejekciós frakció, %	60 (57-64)	61 (±6)	60 (56-64)
Thrombocyta szám, G/L	246 (208-298)	268 (±79)	255 (225-299)
Lymphocyta szám, G/L	1,56 (1,21-1,85) [*] #	1,82 (±1,39-2,38)	1,89 (1,58-2,25)
Lymphocyta arány, %	23,3 (18,5-28,1) [#]	24,3 (±9,3) [#]	29,2 (24,4-32,7)
Thrombocyta-lymphocyta arány	160 (125-213) [#]	140 (118-186)	130 (113-165)
Kreatinin, mM	71,7 (±15,4)	73,0 (±20,3)	73,0 (59,8-83,3)
eGFR, mL*perc ⁻¹ *(1,73m2) ⁻¹	103,5 (±15,9) [#]	96,0 (±22,5)	93,6 (81,0-105,4)
Tüdőbetegség radiológiai stádiuma			
Stádium 0, %	5	17	100
Stádium 1, %	63	54	0
Stádium 2, %	29	23	0
Stádium 3, %	3	6	0
FVC, %	97 (±16)	89 (±19)	ND
FEV1, %	93 (±16) [*]	84 (±19)	ND
Tiffeneau-index, %	81 (78-86)	79 (±8)	ND
ACE aktivitás, Fluoreszcens kinetikai esszé, U/L	11,89 (10,5-13,7) [*] #	8,88 (±2,3)	9,19 (±2,1)
ACE aktivitás, ACEcolor, IU/L	17,87 (14,9-21,7) [*]	12,30 (±4,9)	ND
ACE aktivitás, Infinity, U/L	67 (54-90) [*]	39 (21-54)	ND
ACE genotípus, II/ID/DD, %	14 / 54 / 32	25 / 44 / 31	18 / 47 / 35
sIL-2R koncentráció, µg/L	0,74 (0,42-1,14) [*] #	0,47 (0,33-0,82) [#]	0,35 (0,26-0,35)
CRP, mg/L	4,53 (1,9-8,1)	4,5 (0,8-28,8)	ND
LZM koncentráció, mg/L	2,14 (1,93-2,36) [#]	2,30 (1,99-2,49) [#]	1,81 (1,68-1,97)
SAA koncentráció, mg/L	5,44 (2,95-12,5)	6,97 (3,03-44,4)	ND
CTO aktivitás, mU/L	3235 (1523-4482) [*] #	688 (424-1210)	539 (316-884)
CTO genotípus, WW/WD/DD, %	66 / 32 / 2	63 / 37 / 0	61 / 37 / 2

4. táblázat. A vizsgálati csoportok klinikai és laboratóriumi jellemzői.

FVC, erőltetett vitálkapacitás; FEV1, erőltetett kilégzési térfogat (1 s), ACE, angiotenzin konvertáló enzim; sIL-2R, szolubilis interleukin 2 receptor; CRP, C-reaktív protein; SAA, szérumb amyloid A; LZM, lizozim; CTO, kitotriozidáz; ND, nem elérhető adatok.

* a sarcoidosisra pozitív, illetve negatív csoportok közötti szignifikáns különbség.

pozitív, vagy negatív szövettanú csoportok, valamint a referencia populáció közötti szignifikáns különbség.

133 egészséges önkéntest szintén bevontunk a vizsgálatba, ők alkották a referencia populációt.

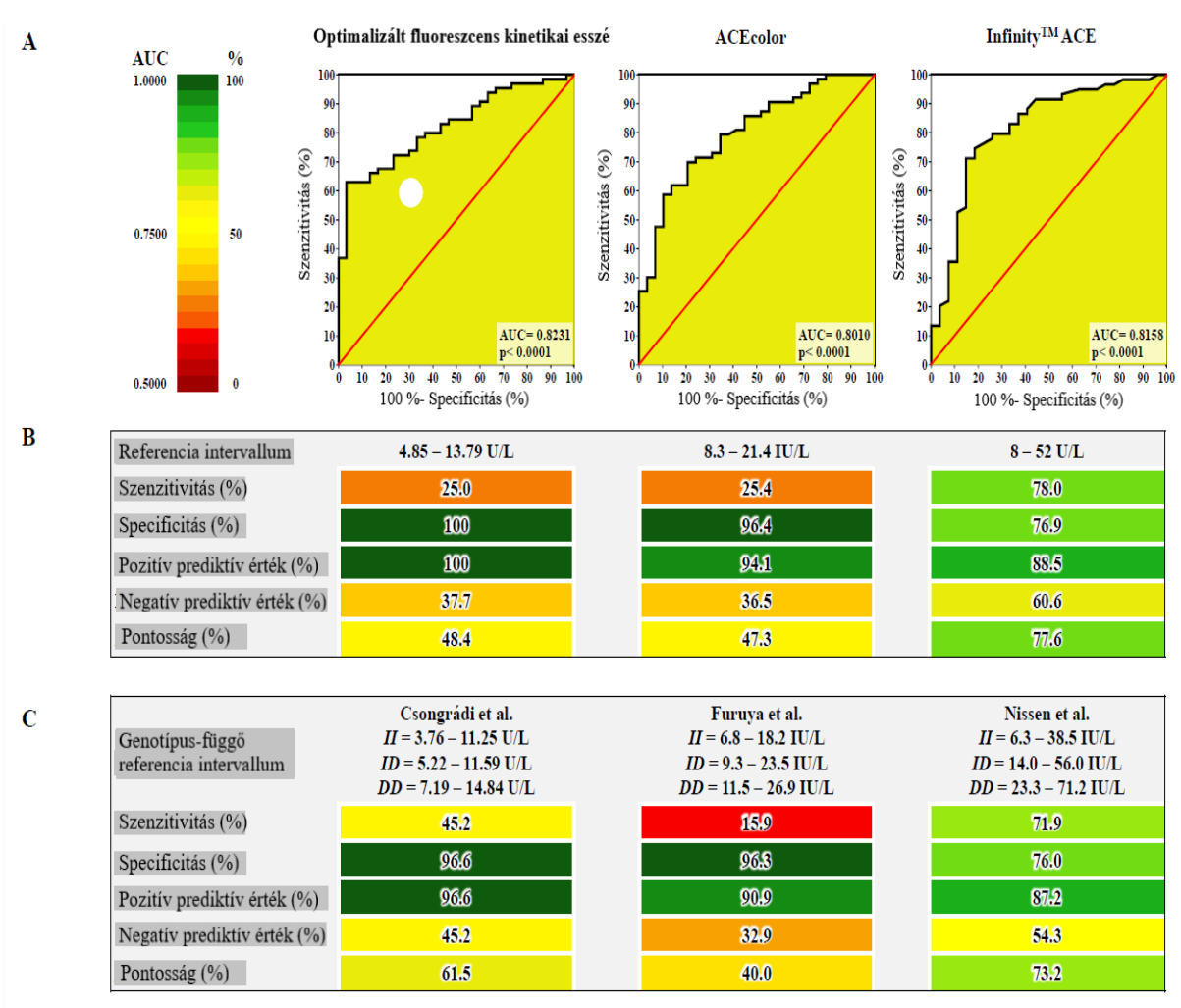
A sarcoidosisban szenvedő betegek szignifikánsan fiatalabbak voltak, mint a negatív szövettannal rendelkezők vagy az egészséges kontrollcsoport tagjai ($40,9 \pm 12,3$ év, illetve $50,5 \pm 14,0$ év és $48,3 \pm 15,0$ év, ebben a sorrendben). Bal kamrai szisztolés funkciót, thrombocytaszámot, erőltetett vitálkapacitást és Tiffneau-indexet tekintve nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között. A vérben lévő lymphocytaszám jelentősen alacsonyabbnak bizonyult a sarcoidosisos betegek esetében, a negatív vagy referencia populációhoz viszonyítva ($1,56$ G/L ($1,21$ - $1,85$ G/L) vs. $1,82$ G/L ($1,39$ - $2,38$ G/L), illetve $1,89$ G/L ($1,58$ - $2,25$ G/L, ebben a sorrendben), habár a vér lymphocyta aránya mindkét betegcsoportban alacsonyabbnak mutatkozott, mint a referencia csoportban ($23,3\%$ ($18,5$ - $28,1\%$) vagy $24,3 \pm 9,3\%$ vs. $29,2\%$ ($24,4$ - $32,7\%$), ebben a sorrendben). A thrombocyta-lymphocyta arány szignifikánsan magasabb volt a sarcoidosisban szenvedő betegek esetében (160 (125 - 213)), mint a kontroll csoportban (130 (113 - 165)). A szérum kreatinin koncentráció nem különbözött szignifikánsan a csoportok között, a becsült glomeruláris filtrációs ráta pedig minden csoportban meghaladta a $90 \text{ mL} \cdot \text{perc}^{-1} \cdot (1,73 \text{ m}^2)^{-1}$ -et. Az erőltetett kilégzési térfogat ($1s$) magasabbnak bizonyult a sarcoidosisos csoportban a nem-sarcoidosis csoporthoz viszonyítva ($93 \pm 16\%$ vs. $84 \pm 19\%$, ebben a sorrendben).

Az ACE gén inzerció/deleció polimorfizmusa szignifikánsan befolyásolja a keringő ACE aktivitását, csakúgy, mint ahogy a CTO gén duplikációs polimorfizmusa hatással van a CTO aktivitására. Az ACE I/D polimorfizmus és CTO gén duplikációs genotípus-eloszlása a Hardy-Weinberg egyenletnek megfelelően alakult, és nem mutattak különbséget a csoportok esetében. Az ACE-aktivitás átlaga, illetve mediánja (bármely módszerrel mérve), a sIL-2R koncentráció és CTO-aktivitás szignifikánsan eltért a sarcoidosisban szenvedő betegek és nem sarcoidosisban szenvedő betegek között, míg a CRP, LZM és SAA koncentrációk esetében nem figyeltünk meg különbséget ezen csoportok között (4. táblázat).

Az ACE-aktivitást 3 különböző módszerrel mértük meg. Munkacsoportunk által korábban létrehozott optimalizált fluoreszcens kinetikai esszé diagnosztikai hatékonyságát most összehasonlítottuk két másik, kereskedelmi forgalomban kapható ACE-aktivitási teszttel. Az enzimaktivitási értéket pozitívnak minősítettük sarcoidosisra nézve, ha meghaladta a gyártó vagy más kutatócsoportok által meghatározott referencia intervallum felső határát, továbbá a kiértékelést kiegészítettük az irodalomban elérhető ACE I/D genotípus-függő referencia tartományok szerinti értékeléssel is.

Összehasonlítottuk ezen tesztek receiver operating characteristics (ROC) görbéi alatti

területeket, és mindhárom teszt esetében egymáshoz hasonló görbe alatti területeket (AUC) találtunk (fluoreszcens kinetikus esszé vs. ACEcolor vs. InfinityACE = 0,8231 vs. 0,8010 vs. 0,8158, ebben a sorrendben, 9/A. ábra). Mindazonáltal szignifikáns különbségek mutatkoztak a szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek terén (9/B. ábra). A fluoreszcens kinetikus esszé és az ACEcolor alacsony szenzitivitással (25,0% és 25,4%, ebben a sorrendben), viszont különösen magas specificitással és pozitív prediktív értékkel (100% és 100%, valamint 96,4% és 94,1% ebben a sorrendben) bírtak. Ezzel ellentétben, az Infinity ACE teszt megközelítőleg 80%-os szenzitivitással, specificitással és pozitív prediktív értékkel rendelkezik (9/B. ábra).



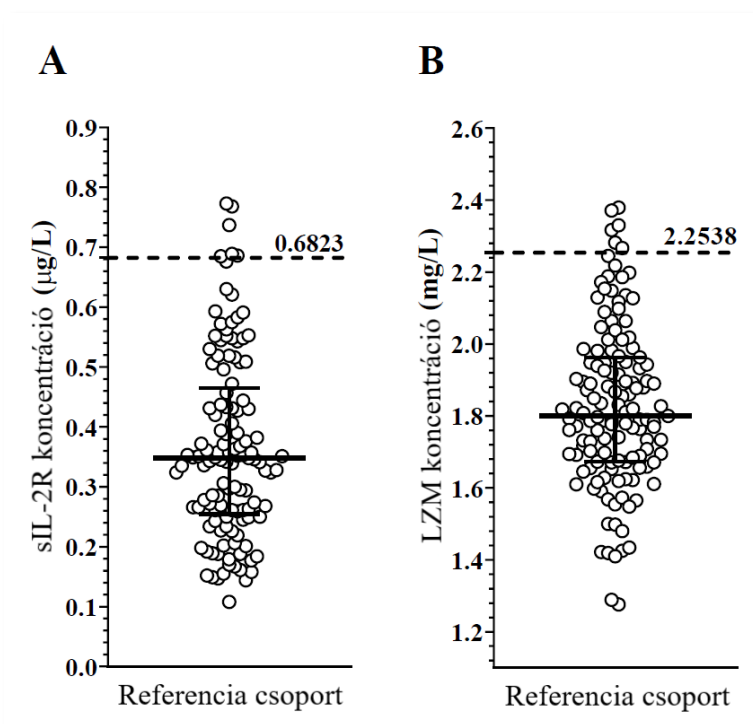
9. ábra. A különböző ACE aktivitási tesztek diagnosztikai pontossága.

A receiver operating characteristics (ROC) görbék alakulása a különböző ACE aktivitási tesztek függvényében (A), illetve a különböző ACE aktivitási tesztek diagnosztikai hatékonysága ACE gén *I/D* polimorfizmus független (B), valamint függő (C) módon elemezve. Egy érték akkor bizonyult

sarcoidosisra pozitívnak, ha meghaladta a referencia intervallum felső határértékét. AUC, görbe alatti terület jelzi.

Amikor az adatokat a genotípus-függő ACE-aktivitás referencia tartomány alapján újraelemeztük (9/C. ábra), azt találtuk, hogy az ACE genotípus ismerete szignifikánsan javította az optimalizált fluoreszcens kinetikus esszé diagnosztikai hatékonyságát (a szenzitivitás 25,0-ról 45,2%-ra emelkedett megtartott specificitással és pozitív prediktív értékkel), míg enyhe hanyatlást tapasztaltunk az ACEcolor és InfinityACE tesztek esetében.

Következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy egyéb biomarkerek segíthetik-e a sarcoidosis laboratóriumi diagnosztikáját. A sIL-2R és lizozim mérésekhez használt kitek nem tartalmaztak egészséges populációra vonatkozó referencia tartományokat, így meghatároztuk azokat (10. ábra). A referencia populáción belül a sIL-2R esetén 8 ($\geq 0,879$ $\mu\text{g/L}$), míg a LZM esetén 2 ($\geq 2,477$ mg/L) értéket kieső értéként azonosítottunk, és kizártuk az elemzésből. A referencia tartományokat a sIL-2R esetén 0 – 0,6823 $\mu\text{g/L}$ koncentrációk között (10/A. ábra), míg a LZM esetén 0 – 2,2538 mg/L koncentrációk között állapítottuk meg (10/B. ábra).

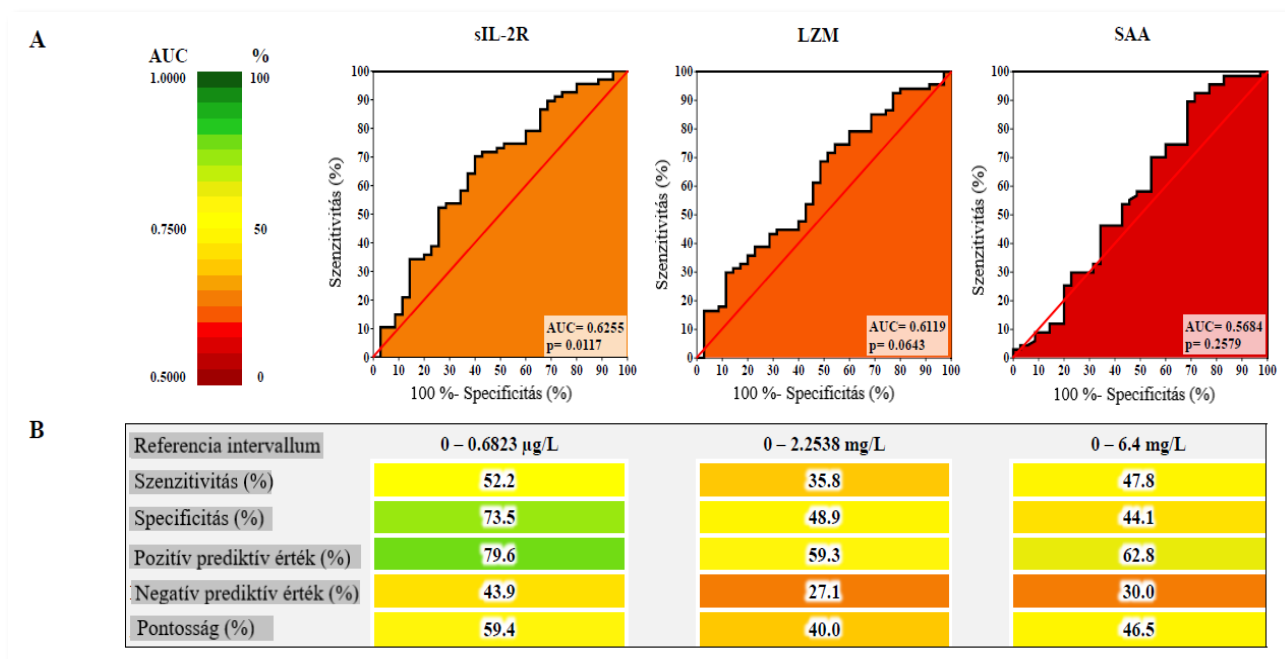


10. ábra. A szérumsIL-2R és LZM koncentráció értékek megoszlása a referencia csoportban.

A szérumszolubilis interleukin 2 receptor (sIL-2R, A) és lizozim (LZM, B) referencia csoportban észlelt megoszlása. Minden egyes kör egy referencia egyén értékét szemlélteti. A horizontális vonal

mutatja a medián értéket interquartilis tartománnyal. A szaggatott vonal a felső referencia határértéket jelzi.

A referencia intervallumok tükrében teszteltük a sIL-2R, LZM és SAA koncentrációk diagnosztikai pontosságát a betegpopulációnkon (11. ábra). Az ROC analízisek arra a következtetésre juttattak bennünket, hogy ebben a tanulmányban csak a sIL-2R koncentráció alapján különíthetők el a sarcoidosisban szenvedő betegek a nem sarcoidosisban szenvedő betegektől ($p=0,0117$, $p=0,0643$, $p=0,5684$, ebben a sorrendben), annak ellenére, hogy a sIL-2R alacsony AUC értékkel bírt (11/A ábra). Ezen biomarkerek szenzitivitása (52,2%, 35%, 47,8% ebben a sorrendben) és specificitása (73,5%, 48,9%, 44,1%, ebben a sorrendben) alacsonynak bizonyult (11/B. ábra).

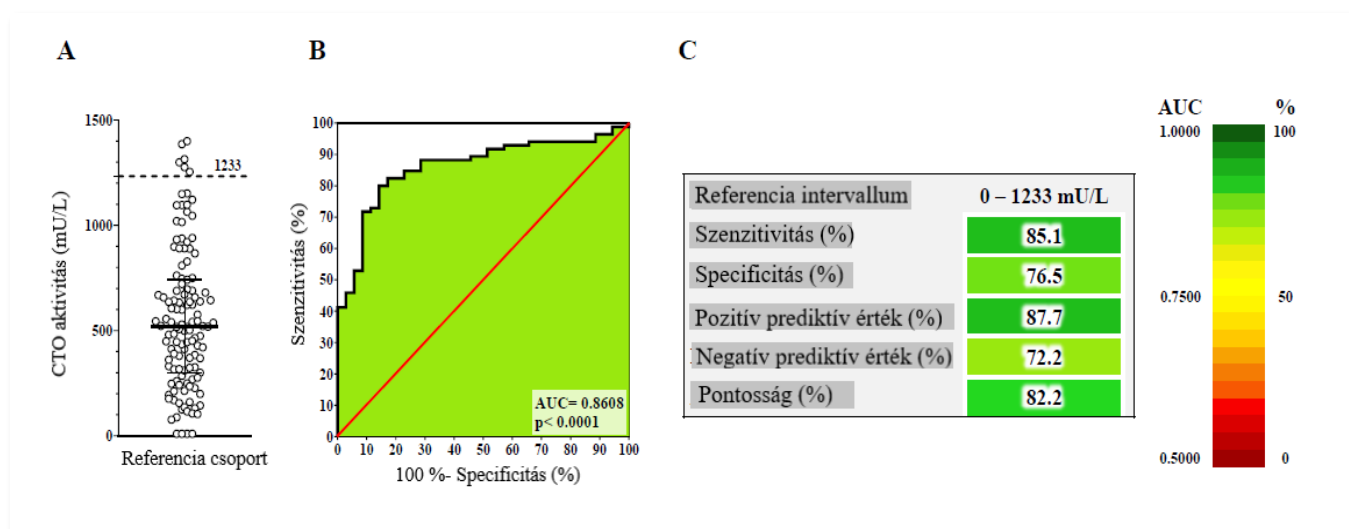


11. ábra. A sIL-2R, LZM és SAA esszék diagnosztikai hatékonysága.

A receiver operating characteristics (ROC) görbék alakulása az sIL-2R, LZM, SAA tekintetében (A), illetve a szolubilis interleukin 2 receptor (sIL-2R), lizozim (LZM) és szérum amyloid A (SAA) koncentrációk diagnosztikai pontossága látható. Egy érték akkor bizonyult sarcoidosisra pozitívnak, ha meghaladta a referencia intervallum felső határértékét. AUC, görbe alatti terület.

Az utóbbi évtizedekben a szérum CTO-aktivitás (Kitotriozidáz - CTO) mérés egy ígéretes eszköznek tűnt a sarcoidosis diagnosztizálása kapcsán. Kutatásunkban kidolgoztunk egy módszert a CTO-aktivitás mérésére, és a beállított módszerre meghatároztunk a referencia tartományt is. Tíz egészséges egyént kizártunk a referencia populációból a statisztikailag magas

CTO aktivitás miatt (≥ 1423 mU/L), így 0-1233 mU/L között tudtuk kijelölni a referencia tartományt (12/A. ábra). A ROC analízis szerint a szérumban CTO-aktivitás alapján hatékonyan elkülöníthető a sarcoidosisos beteg a nem sarcoidosisban szenvedőtől (AUC=0,8608, $p < 0,0001$, 12/B. ábra). Amennyiben a referencia tartomány felső határát alkalmazzuk diagnosztikus határértékként sarcoidosis esetén, akkor ez a teszt 85,1%-os szenzitivitással, 76,5%-os specificitással, 87,7% pozitív prediktív értékkel, 72,2% negatív prediktív értékkel, valamint 82,2% diagnosztikai pontossággal rendelkezik a sarcoidosis azonosításában (12/C. ábra).



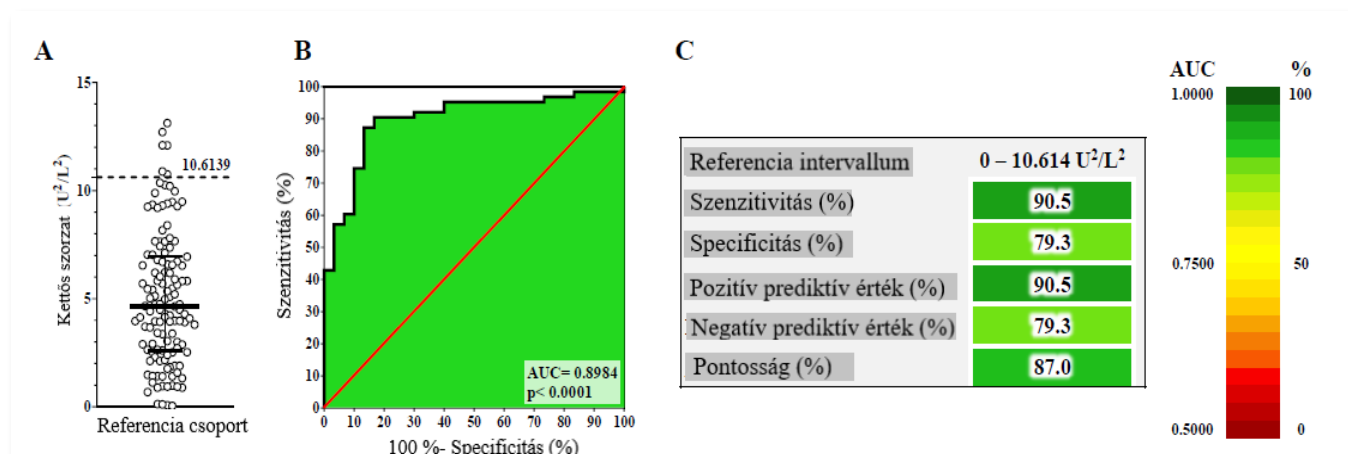
12. ábra. A szérumban CTO-aktivitások diagnosztikai tulajdonságai.

(A) A referencia csoport szérumban kitotriozidáz (CTO) aktivitásának megoszlása. Minden egyes kör egy referencia egyén értékét szemlélteti. A horizontális vonal mutatja a medián értéket interquartilis tartománnyal. A szaggatott vonal a felső referencia értéket jelzi. A receiver operating characteristic (ROC) (B) és a CTO-aktivitás diagnosztikai pontossága (C) látható. Egy érték akkor bizonyult sarcoidosisra pozitívnak, ha meghaladta a referencia intervallum felső határértékét. AUC, görbe alatti terület.

Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy vajon a legmagasabb szenzitivitású és specificitású szérumban biomarkerek kombinált vizsgálata javítja-e a sarcoidosis laboratóriumi diagnosztikájának hatékonyságát. A szérumban ACE-aktivitás (a fluoreszcens kinetikus esszével meghatározva a legmagasabb specificitású) és szérumban CTO-aktivitás (legmagasabb szenzitivitású) mérések kombinálása, mint szimultán vizsgálat javította a szenzitivitást (88,8%) megtartott specificitás mellett.

Még tovább igyekeztünk fokozni a diagnosztikai pontosságot, ezért meghatároztunk egy új

paramétert, a szérum ACE- és CTO-aktivitások úgynevezett „kettős szorzatát”, ezen értékek összeszorzásával. A kettős szorzat referencia intervallumaként 0-10,614 U^2/L^2 -t jelöltünk meg (13/A. ábra). A kettős szorzat ROC analízise az eddigi legjobb AUC értéket mutatta, 0,8984-et (13/B. ábra). A referencia intervallum felső határát alkalmazva döntési határértékként, a kettős



szorzat szenzitivitása 90,5%, specificitása 79,3%, pozitív prediktív értéke 90,5%, negatív prediktív értéke pedig 79,3% volt ebben a tanulmányban, ami azt jelenti, hogy a laboratóriumi tesztet alkalmazva csupán a betegek 13%-át diagnosztizáltuk helytelenül (13/C. ábra).

13. ábra. A „kettős szorzat” diagnosztikai tulajdonságai.

(A) A „kettős szorzat” (az ACE és CTO aktivitás összeszorzásából kapott érték) megoszlása a referencia csoportban. Minden egyes kör egy referencia egyén értékét szemlélteti. A horizontális vonal mutatja a medián értéket interquartilis tartománnyal. A szaggatott vonal a felső referencia értéket jelzi. A receiver operating characteristics (ROC) görbéje (B) és a „kettős szorzat” diagnosztikus pontossága (C) látható. Egy érték akkor bizonyult sarcoidosishoz pozitívnak, ha meghaladta a referencia intervallum felső határértékét. AUC: görbe alatti terület.

7. Megbeszélés

A humán szérumból történő ACE-aktivitásmérés értékes információt szolgáltathat bizonyos betegségek diagnosztizálásához, mint pl. a sarcoidosis [106], a Gaucher-kór [107] és a granulomatosus fertőzések [108]. Az ACE-aktivitás egy hasznos biomarkernek tűnik a sarcoidosis diagnosztizálásához és monitorizálásához [84]. Napjainkban radioliganddal jelölt, colorimetriás és fluoreszcens esszék érhetőek el a szérum ACE-aktivitás meghatározásához, illetve nemrégiben megjelent egy gyors, nagyon érzékeny fluoreszcens kinetikai esszé, amely egy quenched fluorogén szubsztrátot (Abz-FRK(Dnp)P-OH) alkalmaz [109].

Jelen kutatás első felében a munkacsoportunk által tökéletesített fluoreszcens kinetikus esszé diagnosztikai hatékonyságát egy klinikai tanulmányban vizsgáltuk. Azok a betegek, akik feltételezetten sarcoidosisban szenvedtek, diagnosztikus műtéten estek át, hogy szövetmintát nyerjünk a hisztopatológiai vizsgálathoz, illetve ezzel párhuzamosan mértük a szérum ACE-aktivitásukat is. Azok a betegek, akiknél az enzim aktivitása meghaladta a referencia intervallum felső határát, azok sarcoidosis szempontjából pozitívnak minősültek. A genotípus-függő referencia intervallumok alapján meghatározva közel kétszer annyian bizonyultak pozitívnak, mint a genotípus-független referencia tartomány alapján értékelve. Ezzel az ACE-aktivitás esszével, illetve a genotípus-függő referencia intervallumok alkalmazásával a sarcoidosis 42,5%-os szenzitivitással, 100%-os specificitással és 100%-os pozitív prediktív értékkel (PPV) állapítható meg. Ez az ACE-aktivitásmérő teszt és az alkalmazott referencia tartományok nem eredményeztek fals pozitív eseteket, ezáltal a fals negatív esetek száma nőtt, a szenzitivitás pedig csökkent. Más szavakkal, a fals pozitív eseteket a szenzitivitás feláldozásával elimináltuk. Következésképpen, a sarcoidosist alátámasztó tünetek jelenléte és a referencia intervallum felső határát meghaladó ACE-aktivitási érték a sarcoidosis elleni gyógyszeres terápia elindításának megfontolására kell, hogy sarkallja a kezelőorvost a sebészi mintavétel helyett.

Különböző módszerek és diagnosztikai kitek állnak rendelkezésre az ACE-aktivitás méréséhez. Az itt bemutatott fluoreszcens kinetikai esszé diagnosztikai pontosságát más kereskedelmi forgalomban kapható ACE aktivitási kitek hatékonyságához viszonyítva az állapítható meg, hogy a fluoreszcens kinetikai esszé kismértékben pontosabb a többi kitnél. Másrésről, az ACE I/D genotípus meghatározása szignifikánsan javította a sarcoidosis detektálásának szenzitivitását. A genotípus-függő referencia intervallumok és határértékek alkalmazásával ez

a teszt az invazív mintavétel alternatívájaként szolgálhat a sarcoidosis diagnózisának megerősítésében, a betegek közel 50%-ának esetében.

Kutatásaink második felében összehasonlítottuk a különböző ACE-aktivitást mérő módszerek laboratóriumi hatékonyságát, meghatároztuk számos szérumbiomarker diagnosztikai pontosságát, illetve, kifejlesztettünk egy kombinált biomarkert a sarcoidosis diagnosztizálásához.

Az Amerikai Mellkassebészeti Szövetség, az Európai Respiratórikus Társaság, valamint a Sarcoidosis és Más Granulomatosis Betegségek Világszervezete (WASOG) 1999-ben a sarcoidosis egy ismeretlen eredetű, több szervrendszert érintő granulomatosis megbetegedésként definiálta [110]. Az volt az álláspont, hogy a sarcoidosis diagnózisa akkor állapítható meg, ha a radiológiai leletet szövettani vizsgálat támasztja alá, mely a mintában el nem sajtosodó granulomákat igazol, és a granulomaképződés egyéb okai kizárhatóak [111]. Továbbá azt is kijelentették, hogy amennyiben egyszer a sarcoidosis pathogenezisét megértjük, valószínű, hogy a betegség specifikus mechanizmusa alapján képesek leszünk kifejleszteni egy nagyon pontos diagnosztikai tesztet [110]. Addig pedig a laboratóriumi medicina specialistái új biomarker alapú esszékkel vagy a már elérhető laboratóriumi technikák pontosításával segíthetik a klinikusok munkáját.

A sarcoidosis egyik tradicionális szérumbiomarkere az ACE, amelyet 1975 óta használnak erre a célra [112], mivel az ACE-t a granulomában található macrophagok és epitheloid sejtek szekretálják [84, 113]. A szérumbiomarker ACE-aktivitás meghatározása nagy óvatosságot igényel, mivel számos tényező befolyásolhatja, mint például az endogén ACE-gátlók [11]. Az ACE-gátló hatóanyagok [114], az ACE gén inzerció/deleció polimorfizmusa [7] stb. módosíthatja az enzimaktivitás mértékét. Kísérleteink második felében három különböző ACE-aktivitást mérő technika diagnosztikai pontosságát hasonlítottuk össze. A ROC analízis alapján nem találtunk közöttük szignifikáns különbséget. Korábban publikálták, hogy az ACE gén I/D polimorfizmusának meghatározása, illetve a genotípus-függő ACE-aktivitás referencia intervallum alkalmazása növeli az ACE szenzitivitását, de csökkenti annak specificitását a sarcoidosis diagnosztikájában [3, 115]. Ezzel ellentétben, ebben a kutatásban demonstráltuk, hogy az optimalizált fluoreszcens kinetikai esszénk [102] és a genotípus-függő referencia intervallumok alkalmazása szignifikánsan javította a teszt szenzitivitását, megtartott, magas specificitás mellett.

Nemrégiben bebizonyosodott, hogy a thrombocyta:lymphocyta arány alkalmazható lehet mind

a sarcoidosis diagnosztikájában, mind pedig a tüdő parenchyma érintettség mértékének megállapításában [116]. Ezeknek megfelelően azt találtuk, hogy a thrombocyta:lymphocyta arány magasabb volt a sarcoidosisban szenvedő csoportban a kontroll csoporthoz képest, de a ROC analízis szerint az erre a változóra vonatkozó AUC érték (0,584) alacsonyabb volt, mint azt korábban publikálták (0,79) [116].

A sIL-2R egy trunkált fehérje, mely az aktivált T-lymphocytaiból szabadul fel, ezáltal a T-sejt aktiváció szerológiai markerének nevezhető [117]. Tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik a sIL-2R diagnosztikai pontosságát vizsgálták pulmonális sarcoidosisban szenvedő betegek esetében, kontroll csoporthoz viszonyítva [10]. Eredményeink alátámasztják a korábbi megállapítást, miszerint a sIL-2R koncentrációja megemelkedik sarcoidosisban. Mindazonáltal, hangsúlyoznunk kell, hogy a sarcoidosisban nem szenvedő csoportban is szignifikánsan magasabb sIL-2R koncentrációkat mértünk a referencia populációhoz képest. Ez feltehetően egyéb, mindeztidáig ismeretlen mechanizmusoknak köszönhető, melyek hematológiai malignitásokkal, más granulomatosus betegségekkel vagy különböző autoimmun kórképekkel hozhatók összefüggésbe, amelyek megemelik a sIL-2R szintjét a szérumban [118-120]. A nem-sarcoidosis csoportban a betegek egy része hematológiai malignitásban szenvedett. A vizsgálatunkban elvégzett ROC analízis alacsony AUC értéket mutatott, ami alapján a sIL-2R-t nem tartjuk megfelelő egyedüli szérumbiomarkernek a sarcoidosis általi tüdőérintettség diagnosztizálásához.

A granulomát alkotó macrophágok és epitheloid sejtek lizozimet termelnek, ami egy alacsony molekulatömegű bakteriolitikus enzim. Számos, a közelmúltban megjelent tanulmány igazolta, hogy a szérumban lizozim emelkedett lehet sarcoidosisban, okuláris érintettség esetén [121-124]. A vizsgálatunkba bevont betegeknek csak a tüdejük vagy a hilaris nyirokcsomók voltak érintettek, ami magyarázhatja, hogy nem találtunk jelentős különbséget a sarcoidosisra pozitív, illetve negatív biopsiával rendelkező csoport között. Fontos megjegyezni, hogy a lizozim a vese glomerulusok által filtrálódik, ezáltal veseelégtelenségben megemelkedhet a keringésben lévő enzim szintje [125]. Az általunk vizsgált betegek, illetve egészséges kontrollok normális vesefunkcióval rendelkeztek, így ez a tényező nem befolyásolta a kapott eredményeket.

A szérumban amyloid A (SAA) egy akut fázis fehérje, mely a Toll-like receptor-2 (TLR-2) segítségével szabályozza a gyulladásos folyamatokat sarcoidosisban [96]. Korábban már igazoltak emelkedett SAA szinteket a betegségben [126, 127], habár, semmilyen összefüggést nem találtak a fehérje szérumszintje és a tüdőérintettség mértéke között [128, 129]. Korábbi

tanulmányokkal ellentétben, mi nem tudtunk magasabb SAA koncentrációt kimutatni a biopsziával igazolt sarcoidosis esetekben, mint a sarcoidosisra negatív szövettani mintájú betegek esetében.

2004 óta egyre több vizsgálat támasztja alá, hogy a plazma CTO-aktivitás hasznos biomarker lehet akár a sarcoidosis diagnosztizálásához, akár a betegség súlyosságának megállapításához [130]. A CTO-t macrophágok termelik, és a kitint előállító mikroorganizmusok eliminációjában játszik szerepet, a kitin degradációja által [131]. A korábbi tanulmányokkal [130, 132, 133] összhangban eredményeink azt sugallják, hogy a szérum CTO-aktivitás egy jól alkalmazható biomarker a hiliaris nyirokesomókat érintő vagy pulmonalis sarcoidosis diagnosztikájában. Fontos megjegyezni, hogy a CTO génnek egy gyakran előforduló mutációja szignifikánsan módosíthatja az enzim aktivitását. Pontosabban, egy bizonyos, 24 bázispár hosszú génszakasz duplikációjára nézve heterozigóta egyének enzimaktivitása közel fele a homozigóta vad típusúakkal összehasonlítva, míg azok, akik homozigóták a mutációt tekintve, azok szérumában vagy plazmájában egyáltalán nem detektálható enzimaktivitás. Ez a tény megnehezíti az eredmények értékelését, főként a heterozigóta betegek esetében.

Számos kutatás több biomarkert együttesen vizsgált a sarcoidosis stádiumának megállapításához [134], a betegség intenzitásának felméréséhez [135] vagy a terápiára adott válasz megítéléséhez [136]. Habár, csak néhány tanulmány hasonlította össze a különböző biomarker kombinációk hatékonyságát a sarcoidosis diagnosztikájában, összességében ezek a vizsgálatok csekély eredménnyel zárultak. Például, Groek-Hakan és mtsai. azt igazolták, hogy a sIL-2R szintje és az ACE-aktivitás együttes vizsgálata nem volt hatékonyabb, mint ennek a két paraméternek a külön-külön történő mérése azon betegek esetében, akiknél a sarcoidosis uveitis-t eredményezett [137].

Kutatásunkban kombináltuk a magas specificitású ACE-aktivitási tesztünket a magas szenzitivitású CTO-aktivitási tesztünkkel, és ezen értékek összeszorzásával egy új paramétert határoztunk meg (kettős szorzatnak nevezzük). Klinikai vizsgálatunkban ez a kettős szorzat rendelkezett a legmagasabb diagnosztikai pontossággal, 90% fölötti szenzitivitással és pozitív prediktív értékkel, valamint jelentősen magas specificitással és negatív prediktív értékkel (80%). Az egyik legnagyobb előnye ennek a kettős szorzatnak, hogy ez a nagymértékű diagnosztikai pontosság az ACE vagy CTO gének polimorfizmusainak genetikai vizsgálata nélkül érhető el, ezáltal a sarcoidosis laboratóriumi diagnózisa gyorsabb és olcsóbb lehet.

Számos sarcoidosis biomarker vizsgálata után, következésképpen megállapíthatjuk, hogy

egyetlen biomarker értékelése nem alkalmas meggyőző, korrekt laboratóriumi diagnózist biztosítani a klinikusok számára. Az ACE- és CTO-aktivitási értékekből származtatott kettős szorzat viszont a szövettani mintavétel reális alternatívája lehet a pulmonális manifestációjú sarcoidosis diagnosztizálásában.

8. Öszefoglalás

A sarcoidosis egy szisztémás granulomatosus betegség, melynek diagnosztizálása legtöbbször invazív módszerekkel történik – megnövelve a betegséggel járó terhet – mivel egyelőre nem áll rendelkezésünkre olyan szérumbiomarker, mely kellően specifikus és szenzitív lenne a sarcoidosis megállapítása szempontjából. Az elmúlt évtizedekben számos potenciális biomarkert vizsgáltak ezzel a céllal, de a klinikai gyakorlatba csak az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) kerülhetett be, melyet a sarcoid granulomák epitheloid sejtjei termelnek, ezáltal koncentrációja korrelál a granulomatosus folyamat kiterjedésével és aktivitásával. Azonban a genotípus, endogén ACE-gátló anyagok – elsősorban az albumin –, illetve különböző szérumbiomarkerek (pl. bilirubin, hemoglobin) szignifikánsan befolyásolhatják a keringő enzim aktivitását.

Kutatásaink első felében egy klinikai tanulmány keretében megvizsgáltuk, hogy a munkacsoportunk által korábban optimalizált fluoreszcens kinetikus ACE aktivitásmérő esszé milyen diagnosztikai hatékonysággal ismeri fel a sarcoidosisban szenvedő betegeket. Kutatásaink második felében pedig összehasonlítani kívántuk a különböző ACE-aktivitást mérő módszerek diagnosztikai hatékonyságát, illetve, hogy megvizsgáljuk egyéb szérumbiomarkerek potenciális szerepét a sarcoidosis laboratóriumi diagnosztikájában.

Kísérleteink első felében a fluoreszcens kinetikai esszé diagnosztikai pontosságát klinikai kutatásban vizsgáltuk, melyben az invazív diagnosztikai eljárás és a szérumbiomarker mérés pontosságát hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az általunk optimalizált ACE-aktivitás esszével a sarcoidosis 42,5%-os szenzitivitással, 100%-os specificitással és 100%-os pozitív prediktív értékkel (PPV) állapítható meg, amennyiben genotípus-függő referencia intervallumokat alkalmazunk. Összességében pedig elmondható, hogy az általunk továbbfejlesztett teszt a meghatározott referencia intervallumokkal pontosabb, mint a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható diagnosztikus kiték.

Kísérleteink második felében három különböző ACE-aktivitást mérő technika diagnosztikai pontosságát hasonlítottuk össze. A ROC analízis alapján nem találtunk közöttük szignifikáns különbséget. Ezt követően különböző szérumbiomarkerek (sIL-2R, lizozim, SAA, CTO) diagnosztikai pontosságát igyekeztünk felmérni, és összevetni az ACE-aktivitás meghatározásának diagnosztikai értékével. Következésképpen megállapíthatjuk, hogy egyetlen biomarker értékelése nem alkalmas meggyőző, korrekt laboratóriumi diagnózist biztosítani a

klinikusok számára. Az ACE- és CTO-aktivitási értékekből származtatott kettős szorzat viszont a szövettani mintavétel reális alternatívája lehet a pulmonális manifesztációjú sarcoidosis diagnosztizálásában, mivel klinikai vizsgálatunkban ez a kettős szorzat rendelkezett a legmagasabb diagnosztikai pontossággal, 90% fölötti szenzitivitással és pozitív prediktív értékkel, valamint jelentősen magas specifitással és negatív prediktív értékkel (80%). Az egyik legnagyobb előnye ennek a kettős szorzatnak, hogy ez a nagymértékű diagnosztikai pontosság az ACE vagy CTO gének polimorfizmusainak genetikai vizsgálata nélkül érhető el, ezáltal a sarcoidosis laboratóriumi diagnózisa gyorsabb és olcsóbb lehet.

Summary

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease, and its diagnosis is usually made up by invasive tools – increasing the disease burden of the patient – because there are no gold standard laboratory tests – sensitive and specific enough – for non-invasive diagnosis. Though several new biomarkers have been discovered in the last decades, only angiotenzin converting enzyme (ACE) has been introduced into clinical practice. ACE is produced by the epitheloid cells of the sarcoid granulomas; therefore its concentration correlates with the extension and activity of the disease. However, genotype, endogenous ACE-inhibitory molecules – especially albumin – and different serum components (e.g. bilirubin and hemoglobin) can significantly affect the activity of the circulating enzyme.

In the first phase of our study we aimed to establish an optimized fluorescent kinetic assay, that is not influenced by albumin or other serum components. We also wanted to determine genotype-independent and I/D polymorphism-dependent reference intervals. In the second phase of the study we aimed to compare the diagnostic efficiency of different ACE-activity measuring tests, to determine the diagnostic accuracy of several serum biomarkers and to create a combined biomarker for diagnosing sarcoidosis.

In the first half of the research we found out that albumin-mediated inhibitory effect became negligible at 35x or higher serum dilution. In order to avoid the disturbing effect of bilirubin and hemoglobin serum is needed to be further diluted below 0,71 g/l hemoglobin and 150 µM bilirubin concentrations. We examined the diagnostic accuracy of the fluorescent kinetic assay in a clinical study, in which invasive diagnostic tool was compared to serum biomarker measurement. According to our results we claim that with this fluorescent ACE kinetic assay

sarcoidosis can be diagnosed with 42,5% sensitivity, 100% specificity and 100% positive predictive value, if we apply the genotype-dependent reference intervals. In summary we can declare that our improved fluorescent kinetic assay is more accurate than other commercially available diagnostic kits.

In the second phase of our study we compared the diagnostic accuracy of 3 different ACE-activity measuring tests. Based on the ROC analysis we didn't find any significant differences among them. We also aimed to determine the diagnostic efficiency of different serum biomarkers (sIL-2R, lizozim, SAA, CTO) and compare them to that of ACE-activity. As a result we conclude that determining only one biomarker is not feasible in establishing a correct, convincing laboratory diagnosis for clinicians. However, we created a new biomarker, a 'double product', generated from ACE- and CTO-activities, that can be a real alternative of histological examination in case of pulmonary sarcoidosis. In our clinical study this double product showed the highest diagnostic accuracy, with more than 90% sensitivity and positive predictive value and significantly high specificity and negative predictive value (80%). One of the greatest advantage of this double product is that this great diagnostic accuracy can be reached without genetic examination of ACE and CTO genes, therefore laboratory diagnosis of sarcoidosis can be faster and cheaper.

9. Irodalomjegyzék

1. Haimovic, A., et al., *Sarcoidosis: a comprehensive review and update for the dermatologist: part I. Cutaneous disease*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(5): p. 699 e1-18; quiz 717-8.
2. *Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 736-55.
3. Ramos-Casals, M., et al., *Clinically-useful serum biomarkers for diagnosis and prognosis of sarcoidosis*. Expert Rev Clin Immunol, 2019. **15**(4): p. 391-405.
4. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 669-77.
5. Oppong, S.Y. and N.M. Hooper, *Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane*. Biochem J, 1993. **292** (Pt 2): p. 597-603.
6. Metzger, R., et al., *Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity*. Microvasc Res, 2011. **81**(2): p. 206-15.
7. Fagyas, M., et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93719.
8. Sheffield, E.A., *Pathology of sarcoidosis*. Clin Chest Med, 1997. **18**(4): p. 741-54.
9. Lynch, J.P., 3rd, E.A. Kazerooni, and S.E. Gay, *Pulmonary sarcoidosis*. Clin Chest Med, 1997. **18**(4): p. 755-85.
10. Fagyas, M., et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e87843.
11. Fagyas, M., et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e87844.
12. Baughman, R.P., et al., *Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1885-9.
13. Judson, M.A., A.D. Boan, and D.T. Lackland, *The clinical course of sarcoidosis: presentation, diagnosis, and treatment in a large white and black cohort in the United States*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2012. **29**(2): p. 119-27.

14. Hosoda, Y., S. Sasagawa, and N. Yasuda, *Epidemiology of sarcoidosis: new frontiers to explore*. Curr Opin Pulm Med, 2002. **8**(5): p. 424-8.
15. Bonfioli, A.A. and F. Orefice, *Sarcoidosis*. Semin Ophthalmol, 2005. **20**(3): p. 177-82.
16. Brewerton, D.A., et al., *HLA antigens in sarcoidosis*. Clin Exp Immunol, 1977. **27**(2): p. 227-9.
17. Sato, H., et al., *HLA-DQB1*0201: a marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(4): p. 406-12.
18. Rossman, M.D., et al., *HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(4): p. 720-35.
19. Kuroda, H., et al., *Relationship between cytokine single nucleotide polymorphisms and sarcoidosis among Japanese subjects*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2013. **30**(1): p. 36-42.
20. Rybicki, B.A., et al., *The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 491-9.
21. Prezant, D.J., et al., *The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters*. Chest, 1999. **116**(5): p. 1183-93.
22. Dubaniewicz, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis complex and mycobacterial heat shock proteins in lymph node tissue from patients with pulmonary sarcoidosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(9): p. 3448-51.
23. Hajizadeh, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis Antigen 85A induces Th-1 immune responses in systemic sarcoidosis*. J Clin Immunol, 2007. **27**(4): p. 445-54.
24. Bafica, A., et al., *TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med, 2005. **202**(12): p. 1715-24.
25. Swaisgood, C.M., et al., *Development of a sarcoidosis murine lung granuloma model using Mycobacterium superoxide dismutase A peptide*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **44**(2): p. 166-74.
26. Eishi, Y., et al., *Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(1): p. 198-204.
27. Zissel, G., A. Prasse, and J. Muller-Quernheim, *Immunologic response of sarcoidosis*. Semin Respir Crit Care Med, 2010. **31**(4): p. 390-403.
28. Rastogi, R., et al., *Dysregulation of p38 and MKP-1 in response to NOD1/TLR4 stimulation in sarcoid bronchoalveolar cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(4): p. 500-10.
29. Wiken, M., et al., *Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in sarcoidosis*. J Clin Immunol, 2009. **29**(1): p. 78-89.

30. Agostini, C., F. Adami, and G. Semenzato, *New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma*. Curr Opin Rheumatol, 2000. **12**(1): p. 71-6.
31. Silver, R.F., R.G. Crystal, and D.R. Moller, *Limited heterogeneity of biased T-cell receptor V beta gene usage in lung but not blood T cells in active pulmonary sarcoidosis*. Immunology, 1996. **88**(4): p. 516-23.
32. Miyara, M., et al., *The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(2): p. 359-70.
33. Prasse, A., et al., *Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(4): p. 540-8.
34. Drent, M., et al., *Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis*. Eur Respir J, 1999. **13**(4): p. 718-22.
35. Gribbin, J., et al., *Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK*. Thorax, 2006. **61**(11): p. 980-5.
36. Dempsey, O.J., et al., *Sarcoidosis*. BMJ, 2009. **339**: p. b3206.
37. Bonham, C.A., M.E. Streck, and K.C. Patterson, *From granuloma to fibrosis: sarcoidosis associated pulmonary fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2016. **22**(5): p. 484-91.
38. Bradley, B., et al., *Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society*. Thorax, 2008. **63 Suppl 5**: p. v1-58.
39. Jones, S.E. and N. Pollak, *Variability of Sarcoid Skin Manifestations Is Illustrated in a Patient With Multiple Concurrent Pinna Lesions*. Ear Nose Throat J, 2019: p. 145561319871227.
40. Palmucci, S., et al., *Clinical and radiological features of extra-pulmonary sarcoidosis: a pictorial essay*. Insights Imaging, 2016. **7**(4): p. 571-87.
41. Pasadhika, S. and J.T. Rosenbaum, *Ocular Sarcoidosis*. Clin Chest Med, 2015. **36**(4): p. 669-83.
42. Ooi, K.G., et al., *Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype?* Clin Med Res, 2006. **4**(4): p. 294-309.
43. Syed, U., et al., *Hepatic sarcoidosis: pathogenesis, clinical context, and treatment options*. Scand J Gastroenterol, 2016. **51**(9): p. 1025-30.
44. Loffler, C. and R. Bergner, *[Sarcoidosis : Renal manifestations]*. Z Rheumatol, 2017. **76**(5): p. 398-407.
45. Ibitoye, R.T., A. Wilkins, and N.J. Scolding, *Neurosarcoidosis: a clinical approach to diagnosis and management*. J Neurol, 2017. **264**(5): p. 1023-1028.
46. Cohen Aubart, F., et al., *[Cardiac sarcoidosis: Diagnosis and therapeutic challenges]*. Rev Med Interne, 2017. **38**(1): p. 28-35.
47. Patel, A.R. and N. Rashedi, *Cardiac Sarcoidosis: A Picture May Be Worth a Thousand Words, But Do We Need More?* J Am Heart Assoc, 2019. **8**(10): p. e012715.

48. Yee, A.M., *Sarcoidosis: Rheumatology perspective*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2016. **30**(2): p. 334-356.
49. Judson, M.A., et al., *The diagnostic pathway to sarcoidosis*. Chest, 2003. **123**(2): p. 406-12.
50. Navani, N., et al., *Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration prevents mediastinoscopies in the diagnosis of isolated mediastinal lymphadenopathy: a prospective trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(3): p. 255-60.
51. Plit, M.L., et al., *Rapid cytological analysis of endobronchial ultrasound-guided aspirates in sarcoidosis*. Eur Respir J, 2013. **42**(5): p. 1302-8.
52. Costabel, U., et al., *Diagnostic modalities in sarcoidosis: BAL, EBUS, and PET*. Semin Respir Crit Care Med, 2010. **31**(4): p. 404-8.
53. Mostard, R.L., et al., *A predictive tool for an effective use of (18)F-FDG PET in assessing activity of sarcoidosis*. BMC Pulm Med, 2012. **12**: p. 57.
54. Sobic-Saranovic, D., et al., *The utility of 18F-FDG PET/CT for diagnosis and adjustment of therapy in patients with active chronic sarcoidosis*. J Nucl Med, 2012. **53**(10): p. 1543-9.
55. Youssef, G., et al., *The use of 18F-FDG PET in the diagnosis of cardiac sarcoidosis: a systematic review and metaanalysis including the Ontario experience*. J Nucl Med, 2012. **53**(2): p. 241-8.
56. Hansen, K.C., S. Jensen-Fangel, and B.L. Hønge, *Contribution to differential diagnosis of sarcoidosis and disseminated tuberculosis*. BMJ Case Rep, 2019. **12**(11).
57. Park, M.A., et al., *Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease*. Lancet, 2008. **372**(9637): p. 489-502.
58. Wouters, C.H., et al., *Blau syndrome, the prototypic auto-inflammatory granulomatous disease*. Pediatr Rheumatol Online J, 2014. **12**: p. 33.
59. Gibson, G.J., et al., *British Thoracic Society Sarcoidosis study: effects of long term corticosteroid treatment*. Thorax, 1996. **51**(3): p. 238-47.
60. Baughman, R.P., E.E. Lower, and R.M. du Bois, *Sarcoidosis*. Lancet, 2003. **361**(9363): p. 1111-8.
61. Paramothayan, N.S., T.J. Lasserson, and P.W. Jones, *Corticosteroids for pulmonary sarcoidosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): p. CD001114.
62. Paramothayan, S., T.J. Lasserson, and E.H. Walters, *Immunosuppressive and cytotoxic therapy for pulmonary sarcoidosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(3): p. CD003536.
63. Baughman, R.P., et al., *Etanercept for refractory ocular sarcoidosis: results of a double-blind randomized trial*. Chest, 2005. **128**(2): p. 1062-47.
64. Rossman, M.D., et al., *A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of infliximab in subjects with active pulmonary sarcoidosis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse

- Lung Dis, 2006. **23**(3): p. 201-8.
65. Lower, E.E., S. Harman, and R.P. Baughman, *Double-blind, randomized trial of dexamethylphenidate hydrochloride for the treatment of sarcoidosis-associated fatigue*. Chest, 2008. **133**(5): p. 1189-95.
 66. Judson, M.A., *An approach to the treatment of pulmonary sarcoidosis with corticosteroids: the six phases of treatment*. Chest, 1999. **115**(4): p. 1158-65.
 67. Pietinalho, A., et al., *Early treatment of stage II sarcoidosis improves 5-year pulmonary function*. Chest, 2002. **121**(1): p. 24-31.
 68. Baughman, R.P., D.B. Winget, and E.E. Lower, *Methotrexate is steroid sparing in acute sarcoidosis: results of a double blind, randomized trial*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2000. **17**(1): p. 60-6.
 69. Muller-Quernheim, J., et al., *Treatment of chronic sarcoidosis with an azathioprine/prednisolone regimen*. Eur Respir J, 1999. **14**(5): p. 1117-22.
 70. Baughman, R.P. and E.E. Lower, *Leflunomide for chronic sarcoidosis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2004. **21**(1): p. 43-8.
 71. Baughman, R.P., D.A. Culver, and M.A. Judson, *A concise review of pulmonary sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(5): p. 573-81.
 72. Baughman, R.P., et al., *Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(7): p. 795-802.
 73. Sweiss, N.J., et al., *C-reactive protein predicts response to infliximab in patients with chronic sarcoidosis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2010. **27**(1): p. 49-56.
 74. Baughman, R.P., E.E. Lower, and M. Drent, *Inhibitors of tumor necrosis factor (TNF) in sarcoidosis: who, what, and how to use them*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2008. **25**(2): p. 76-89.
 75. Sodhi, M., et al., *Infliximab therapy rescues cyclophosphamide failure in severe central nervous system sarcoidosis*. Respir Med, 2009. **103**(2): p. 268-73.
 76. Stagaki, E., et al., *The treatment of lupus pernio: results of 116 treatment courses in 54 patients*. Chest, 2009. **135**(2): p. 468-476.
 77. Erckens, R.J., et al., *Adalimumab successful in sarcoidosis patients with refractory chronic non-infectious uveitis*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. **250**(5): p. 713-20.
 78. Lower, E.E., R.P. Baughman, and A.H. Kaufman, *Rituximab for refractory granulomatous eye disease*. Clin Ophthalmol, 2012. **6**: p. 1613-8.
 79. Baughman, R.P., et al., *Efficacy and safety of apremilast in chronic cutaneous sarcoidosis*. Arch Dermatol, 2012. **148**(2): p. 262-4.
 80. Corte, T.J., et al., *Pulmonary hypertension in sarcoidosis: a review*. Respiriology, 2011. **16**(1): p. 69-77.
 81. Burke, R.R., B.A. Rybicki, and D.S. Rao, *Calcium and vitamin D in sarcoidosis: how*

- to assess and manage. *Semin Respir Crit Care Med*, 2010. **31**(4): p. 474-84.
82. Shah, L., *Lung transplantation in sarcoidosis*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2007. **28**(1): p. 134-40.
 83. Collins, J., et al., *Frequency and CT findings of recurrent disease after lung transplantation*. *Radiology*, 2001. **219**(2): p. 503-9.
 84. Chopra, A., A. Kalkanis, and M.A. Judson, *Biomarkers in sarcoidosis*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016. **12**(11): p. 1191-1208.
 85. Krasowski, M.D., et al., *Ordering of the Serum Angiotensin-Converting Enzyme Test in Patients Receiving Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy: An Avoidable but Common Error*. *Chest*, 2015. **148**(6): p. 1447-1453.
 86. Floe, A., et al., *Genotyping increases the yield of angiotensin-converting enzyme in sarcoidosis--a systematic review*. *Dan Med J*, 2014. **61**(5): p. A4815.
 87. Rigat, B., et al., *An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(4): p. 1343-6.
 88. Danser, A.H., et al., *Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism*. *Circulation*, 1995. **92**(6): p. 1387-8.
 89. Costerousse, O., et al., *Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes*. *Biochem J*, 1993. **290** (Pt 1): p. 33-40.
 90. Song, G.G., J.H. Kim, and Y.H. Lee, *Associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to sarcoidosis: A meta-analysis*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015. **16**(1): p. 219-26.
 91. Grutters, J.C., et al., *Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients with sarcoidosis: a clinical evaluation*. *Chest*, 2003. **124**(1): p. 186-95.
 92. Katchar, K., A. Eklund, and J. Grunewald, *Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis*. *J Intern Med*, 2003. **254**(6): p. 564-71.
 93. Nishioka, Y., et al., *CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **149**(2): p. 317-26.
 94. Bargagli, E., et al., *Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis*. *J Clin Immunol*, 2013. **33**(1): p. 264-70.
 95. Tomita, H., et al., *Serum lysozyme levels and clinical features of sarcoidosis*. *Lung*, 1999. **177**(3): p. 161-7.
 96. Chen, E.S., et al., *Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **181**(4): p. 360-73.
 97. Huho, A., et al., *The role of serum amyloid A staining of granulomatous tissues for the diagnosis of sarcoidosis*. *Respir Med*, 2017. **126**: p. 1-8.

98. Carmona, A.K., et al., *A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1971-6.
99. Rigat, B., et al., *PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1)*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(6): p. 1433.
100. Lindpaintner, K., et al., *A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease*. N Engl J Med, 1995. **332**(11): p. 706-11.
101. Rodriguez, S., T.R. Gaunt, and I.N. Day, *Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies*. Am J Epidemiol, 2009. **169**(4): p. 505-14.
102. Csongradi, A., et al., *Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(7): p. 1117-1125.
103. Hollak, C.E., et al., *Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1288-92.
104. Livnat, G., et al., *Duplication in CHIT1 gene and the risk for Aspergillus lung disease in CF patients*. Pediatr Pulmonol, 2014. **49**(1): p. 21-7.
105. Swartz, L.J., et al., *Methods and issues in conducting a community-based environmental randomized trial*. Environ Res, 2004. **95**(2): p. 156-65.
106. Bunting, P.S., J.P. Szalai, and M. Katic, *Diagnostic aspects of angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis*. Clin Biochem, 1987. **20**(3): p. 213-9.
107. Lieberman, J. and E. Beutler, *Elevation of serum angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease*. N Engl J Med, 1976. **294**(26): p. 1442-4.
108. Lieberman, J. and T.H. Rea, *Serum angiotensin-converting enzyme in leprosy and coccidioidomycosis*. Ann Intern Med, 1977. **87**(4): p. 423-5.
109. Alves, M.F., et al., *A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(6): p. 861-8.
110. Judson, M.A., *The diagnosis of sarcoidosis*. Curr Opin Pulm Med, 2019.
111. Costabel, U. and G.W. Hunninghake, *ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 735-7.
112. Lieberman, J., *Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis*. Am J Med, 1975. **59**(3): p. 365-72.
113. Bargagli, E., A. Mazzi, and P. Rottoli, *Markers of inflammation in sarcoidosis: blood, urine, BAL, sputum, and exhaled gas*. Clin Chest Med, 2008. **29**(3): p. 445-58, viii.
114. Darago, A., et al., *Differences in angiotensin convertase enzyme (ACE) activity and*

- expression may contribute to shorter event free period after coronary artery bypass graft surgery. Cardiovasc Ther*, 2012. **30**(3): p. 136-44.
115. Stokes, G.S., et al., *Influence of angiotensin converting enzyme (ACE) genotype on interpretation of diagnostic tests for serum ACE activity. Aust N Z J Med*, 1999. **29**(3): p. 315-8.
 116. Yalniz, E., et al., *Predictive value of platelet-to-lymphocyte ratio in patients with sarcoidosis. Biomark Med*, 2019. **13**(3): p. 197-204.
 117. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 180-90.
 118. Brown, A.E., K.T. Rieder, and H.K. Webster, *Prolonged elevations of soluble interleukin-2 receptors in tuberculosis. Am Rev Respir Dis*, 1989. **139**(4): p. 1036-8.
 119. Greene, W.C., et al., *The human interleukin-2 receptor: normal and abnormal expression in T cells and in leukemias induced by the human T-lymphotropic retroviruses. Ann Intern Med*, 1986. **105**(4): p. 560-72.
 120. Rubin, L.A. and D.L. Nelson, *The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. Ann Intern Med*, 1990. **113**(8): p. 619-27.
 121. Birnbaum, A.D., et al., *Clinical features and diagnostic evaluation of biopsy-proven ocular sarcoidosis. Arch Ophthalmol*, 2011. **129**(4): p. 409-13.
 122. Sahin, O., et al., *The serum angiotensin converting enzyme and lysozyme levels in patients with ocular involvement of autoimmune and infectious diseases. BMC Ophthalmol*, 2016. **16**: p. 19.
 123. Febvay, C., et al., *Clinical features and diagnostic evaluation of 83 biopsy-proven sarcoid uveitis cases. Br J Ophthalmol*, 2015. **99**(10): p. 1372-6.
 124. Kawaguchi, T., et al., *Evaluation of characteristic ocular signs and systemic investigations in ocular sarcoidosis patients. Jpn J Ophthalmol*, 2007. **51**(2): p. 121-6.
 125. Pruzanski, W. and M.E. Platts, *Serum and urinary proteins, lysozyme (muramidase), and renal dysfunction in mono- and myelomonocytic leukemia. J Clin Invest*, 1970. **49**(9): p. 1694-708.
 126. Zhang, Y., et al., *Preliminary characterizations of a serum biomarker for sarcoidosis by comparative proteomic approach with tandem-mass spectrometry in ethnic Han Chinese patients. Respir Res*, 2013. **14**: p. 18.
 127. Rothkrantz-Kos, S., et al., *Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. Clin Chem*, 2003. **49**(9): p. 1510-7.
 128. Bargagli, E., et al., *Analysis of serum amyloid A in sarcoidosis patients. Respir Med*, 2011. **105**(5): p. 775-80.
 129. Miyoshi, S., et al., *Comparative evaluation of serum markers in pulmonary sarcoidosis. Chest*, 2010. **137**(6): p. 1391-7.
 130. Grosso, S., et al., *Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and*

- clinical stage in sarcoidosis*. Scand J Clin Lab Invest, 2004. **64**(1): p. 57-62.
131. van Eijk, M., et al., *Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(11): p. 1505-12.
 132. Harlander, M., et al., *Serial chitotriosidase measurements in sarcoidosis--two to five year follow-up study*. Respir Med, 2014. **108**(5): p. 775-82.
 133. Bargagli, E., et al., *Chitotriosidase and soluble IL-2 receptor: comparison of two markers of sarcoidosis severity*. Scand J Clin Lab Invest, 2008. **68**(6): p. 479-83.
 134. Selroos, O. and M. Klockars, *Relation between clinical stage of sarcoidosis and serum values of angiotensin converting enzyme and beta2-microglobulin*. Sarcoidosis, 1987. **4**(1): p. 13-7.
 135. Mostard, R.L., et al., *Inflammatory activity assessment by F18 FDG-PET/CT in persistent symptomatic sarcoidosis*. Respir Med, 2011. **105**(12): p. 1917-24.
 136. Loza, M.J., et al., *Inflammatory profile and response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with chronic pulmonary sarcoidosis*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(6): p. 931-9.
 137. Groen-Hakan, F., et al., *Diagnostic Value of Serum-Soluble Interleukin 2 Receptor Levels vs Angiotensin-Converting Enzyme in Patients With Sarcoidosis-Associated Uveitis*. JAMA Ophthalmol, 2017. **135**(12): p. 1352-1358.
 138. Siltzbach LE, Fishman AP, *Sarcoidosis*. McGraw-Hill, 1980
 139. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*, CLSI document C28-A3c., 3rd Edition, 2010.
 140. J.W. Tukey, *Exploratory Data Analysis*, Pearson, 1977.

10. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: sarcoidosis, szérum biomarker, angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), kitotriozidáz (CTO), kettős szorzat, fluoreszcens kinetikai esszé, diagnosztikai pontosság

Angol tárgyszavak: sarcoidosis, serum biomarker, angiotensin-converting enzyme (ACE), chitotriosidase (CTO), double product, fluorescent kinetic assay, diagnostic accuracy

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Takács István egyetemi docens úrnak (DE ÁOK Sebészeti Intézet) a sok segítségért, biztatásért, amikor elakadtam akár a munkában, akár az életben.

Köszönöm továbbá társtémavezetőmnek, Dr. Fagyas Miklós egyetemi adjunktusnak, (DE ÁOK Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) aki szakmai koordinációjával, útmutatásával, hajthatatlan kitartásával a téma megírására ösztönzött.

Külön köszönöm Prof. Dr. Tóth Attila professzor úrnak, (DE ÁOK Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) a kutatásom alapötletét, szakmai kivitelezésének megtervezését-koordinálását és a biztatást, amivel mindvégig segítette munkánkat.

Köszönöm a két bírálómnak Dr. Bagoly Zsuzsa egyetemi adjunktus nőnek (DE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék) és dr. Brugós László klinikai főorvosnak (DE ÁOK Tüdőgyógyászati Klinika) a phd munkám bírálatában nyújtott szakmai segítséget.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Damjanovich László professzor úrnak (DE ÁOK Sebészeti Intézet), hogy lehetővé tette számomra a kutatás elvégzését az általa vezetett intézetben.

Köszönetemet fejezem ki továbbá Prof. Dr. Papp Zoltán tanszékvezető úrnak, (DE ÁOK Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) hogy hozzájárult, hogy az általa vezetett tanszéken tudományos munkát végezzek.

Köszönöm a munkacsoportom tagjainak, Csongrádi Alexandrának társszerzőmnek, Beke Gergőnek, Mányiné Siket Ivettának (DE ÁOK Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) a jó tanácsokat, a mérésekben, a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítséget.

Köszönetemet fejezem ki továbbá, Dr. Győry Ferenc adjunktus Úrnak, (DE ÁOK Sebészeti Intézet) aki fáradtságot nem kímélve instrukcióival segítette munkámat és előadásomat

Köszönetemet fejezem ki a DE KK Sebészeti Klinika mellkassebészeti munkacsoportjának, közvetlen munkatársaimnak és Fekete Mariannak a sok türelmet és segítséget az idő alatt, amíg a kutatási tevékenységemet végeztem.

Köszönöm feleségemnek Dr. Domján Andreának, családomnak, barátaimnak, hogy a PhD évek alatt szerető támogatást nyújtottak.