

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A LÉGZÉSFUNKCIÓS ELTÉRÉSEK SÚLYOSSÁGÁVAL KORRELÁLÓ  
COPD BIOMARKER JELŐLTEK FELFEDEZÉSE**

**Dr. Csánky Eszter**

Témavezető:  
Prof. Dr. Takács László - akadémikus

**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
VEZETŐJE: PROF. DR. FÉSŰS LÁSZLÓ - AKADÉMIKUS  
Debrecen, 2012.**

**A LÉGZÉSFUNKCIÓS ELTÉRÉSEK SÚLYOSSÁGÁVAL KORRELÁLÓ  
COPD BIOMARKER JELÖLTEK FELFEDEZÉSE**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében elméleti  
orvostudományok tudományágban

**Írta: Dr. Csánky Eszter**

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia  
Doktori Iskola keretében

Témavezető: Prof. Dr. Takács László, akadémikus

**A doktori szigorlati bizottság:**

**elnök:** Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

**tagok:** Prof. Dr. Böszörményi-Nagy György, Ph.D.

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2012. május 31.

**A bírálóbizottság:**

**elnök:** Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

**az értekezés bírálói:** Dr. Bártfai Zoltán, Ph.D.

Dr. Hársfalvi Jolán, Ph.D.

**tagok:** Prof. Dr. Böszörményi-Nagy György, Ph.D.

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2012. május 31. a DEOEC. I. sz.  
Belklinika Tantermében.

## BEVEZETÉS ÉS IRODALMI RÖVID ÁTTEKINTÉS

A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) egy megelőzhető és kezelhető kórállapot, amelyet perzisztáló légúti obstrukció jellemez, amely nem teljesen reverzibilis. A folyamat általában progresszív és a légutak fokozott gyulladással reagálva magyarázható, amelyet káros részecskék, gázok, füst belégzése okoz. A betegség magában foglalja a krónikus bronchitist, subepiteliális fibrózissal, a kislégutak obstrukciójával és az emfizémát, amely a tüdőparenchyma destrukciója következtében jön létre, nagy légterek alakulnak ki, és a tüdő elveszíti rugalmasságát.

A COPD az egyik vezető ok a mortalitási és morbiditási statisztikákban világszerte. A WHO előrejelzése alapján a megelőzhető betegségek sorában 2020-ra a 12. helyről az 5. helyre fog előre ugrani és a 3. leggyakoribb halálok lesz a világon. Mind genetikai, mind környezeti tényezők felelősek a betegség elterjedésében észlelt földrajzi eltérésekért; amelyek között, számunkra az a legfontosabb, az hogy a 35-74 éves magyar férfiak körében volt a világon a legmagasabb a COPD miatti halálozás; egy 2000-ben közzétett WHO felmérés során.

A COPD diagnózisa a jellegzetes klinikai tünetek, és a spirometriával mérhető légzésfunkció romlása alapján mondható ki. Az egyszerű diagnosztika ellenére a legtöbb COPD-s beteget általában a betegség késői fázisban diagnosztizáljuk, amikor a COPD már előrehaladott állapotban van.

A legfőbb rizikótényező a COPD kialakulásában a cigarettázás. Jelen tudásunk szerint a cigarettázás abbahagyása az egyetlen mód, arra, hogy csökkentsük a légzésfunkció romlását. A dohányosok 15-20%-ban fejlődik ki COPD, és a COPD-ben szenvedők 85-90%-a dohányzik. Ebből következik, hogy a dohányzási szokások mellett más, valószínűleg genetikai tényezők játszanak meghatározó szerepet a betegség kialakulásában.

A biomarkerek felfedezése lehetőséget teremthet olyan diagnosztikum kifejlesztésére; amely a tünetmentes dohányos, COPD-sek szűrésére alkalmas. A szűréssel kiemelt korai stádiumú COPD-sek kezelése javíthatja hosszútávon a morbiditási és a COPD-vel kapcsolatos mortalitási statisztikákat. A dohányzásról történő leszokás, emellett egyéb etiológiai tényezők megelőzése egy lehetséges megközelítési módja a mortalitási és morbiditási statisztikák javításának. A dohányos populáció szűrése, a COPD korai tüneteinek felismerése egyelőre több sikerrel kecsegtet a COPD kezelésében, mint a jelenleg rendelkezésünkre álló gyógyszeres kezelési stratégiák, különösen.

Jelenleg nem ismerünk olyan gyógyszert, amely képes lenne csökkenteni a COPD-ben szenvedő betegek hosszú távú légzésfunkció romlását és biztosítani a beteg gyógyulását! Az alkalmazott gyógyszerek a betegség progresszív jellegét nem befolyásolják, és ennek megfelelően a vizsgálatok azt igazolták, hogy az alkalmazott gyógyszerek nem vagy alig befolyásolják a betegek hosszú távú túlélését. Nem rendelkezünk olyan hatékony gyógyszerrel, amely oki kezelést jelentene akár a krónikus bronchitis, akár az emfizéma kórfolyamatában és a betegek folyamatos állapotromlását megakadályozná vagy a várható életkilátásait, növelné. A COPD lassan progrediáló betegség emiatt a klinikai gyógyszervizsgálatok hosszúak, az új gyógyszerek hatékonyságának mérése nagyon sok időt vesz igénybe és nagyon drága.

### **A BIOMARKEREK FELFEDEZÉSÉNEK JELENTŐSÉGE COPD-BEN**

A biológiai, biokémia markerek olyan anyagok, amelyek különböző biológiai mintákban (szövet, vér, nyál, köpet, liquor stb) megtalálhatók, határozottan magasabb vagy alacsonyabb koncentrációban vannak jelen valamilyen betegség fennállása esetén. Ezeknek, az anyagoknak a jelenléte vagy hiánya egyértelműen a betegség fennállására utal, vagy kizárja azt. Az azonosított biomarkerek klinikailag elég specifikusak és szenzitívek ahhoz, hogy az egészséges és a tünetmentes beteg között különbséget tegyenek. A biomarkerek lehetőséget teremtenek a specifikus molekuláris változások patofiziológiai eltérések detektálására, például valamelyik fehérjének a csökkent vagy emelkedett szintje a vérben jellemző lehet valamilyen betegségre. A COPD biomarkereinek kvalifikálása és validálása új diagnosztikus lehetőséget teremthet a COPD korai felismerésében és segítheti a gyógyszerek felfedezését és új terápiás lehetőségek megteremtését.

A COPD igazolásának egyértelmű klinikai diagnosztikus markere a FEV<sub>1</sub> csökkenés igazolása. A COPD-vel kapcsolatban számos különböző biomarkert írtak már le, amely valamilyen módon kapcsolatban volt a tüdőben zajló gyulladási folyamatokkal és a betegség patofiziológiai jellemzőivel. A tüdővel kapcsolatba hozható új biomarkereket bronchiális biopsziák, bronchoalveolaris lavage (BAL), indukált köpetvizsgálat és kilégzett levegőnek a vizsgálatával próbálták találni. Csaknem valamennyi előbb említett biomarkert hipotézis által vezérelt kutatások során találták. A 600 publikált vizsgálat meta-analízise során azt találták, hogy az irodalomban ismert 600 COPD biomarker közül egyetlen egy sem volt alkalmas, arra, hogy a mindennapi klinikai gyakorlatban elterjedjen. Ennek az volt az egyik oka, az hogy nem volt eléggé specifikus egyik sem magára a COPD-re. Ezért változatlanul a kutatás középpontjában található a COPD biomarkerek felfedezése. Fontos, hogy az azonosított biomarkerek alkalmasak legyenek a

klinikai gyógyszervizsgálatokban a terápia hatékonyságának le mérésére, és akár már a betegség korai stádiumában is diagnózist biztosítsanak. A COPD biomarkerek értékelésénél fontos, hogy a COPD-ben szenvedő dohányost megkülönböztessék a COPD-ben nem szenvedő dohányostól, és hosszú távon a nem dohányzótól. Ezeket a vizsgálatokat nagyon ritkán viszik következetesen végig, így a kapott eredmények értékelése is nehéz. Mostanáig a biomarkerek felfedezése gátolt volt, megfelelően, hatékony validálási folyamatok nélkül. A biomarkerek validálásának szűk keresztmetszete, az hogy a validálási folyamat általában nem jól tervezett, nehezen reprodukálható és nem elég szenzitív. A kívánt érzékenységet a specificitást a biomarker validálás során mérik, a követelmény az, hogy több száz betegen legalább két független vizsgálat eredményes legyen.

### **PROTEIN BIOMARKER FELFEDEZÉSI TECHNIKÁK**

A vérplazma mindennapos gyakorlatban használt és legjobban hozzáférhető vizsgálati specimen. A legfontosabb és legkönnyebben hozzáférhető biomarkerek fehérje alapúak. Mi azt feltételeztük, hogy a COPD egy komplex megbetegedés, amely befolyásolja a humán plazmában található proteomot, ezért valószínűleg használható biomarkereket is találunk benne.

A hipotézis nélküli biomarker felfedezésnek globálisnak kell lenni, és potenciálisan fel kell, hogy ölelje a maximálisan elérhető humán plazma proteomot. Egy időben a biomarker jelöltnek könnyen vizsgálhatóknak kell lenni klinikai assaykben. Az alkalmazott antitest alapú biomarker felfedezési technológiák a plazma proteom mérését célozzák COPD-ben.

A legutóbbi időkig a „standard” biomarker kutatás a kétdimenziós gélektroforézist használta. A fehérje „foltok” melyek változó intenzitást mutattak, az elsőként megvizsgált két betegcsoport között, tömegspektrometriás „ujjlenyomat” analízissel lettek azonosítva. A módszer nem elég érzékeny és nagyüzemi módban kivitelezhetetlen. Ígéretes technológiaként indult a CIPHERGEN Inc. cég által bevezetett „fehérje chip” módszer. A kezdeti sikerek ellenére a mérések nem bizonyultak megfelelően reprodukálhatónak és a biomarkerként identifikált „fehérje csúcsok”-at sem lehetett mindig pontosan egy-egy gén termékeként azonosítani. A késő kilencvenes években a folyadék kromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS) mérési eljárások terjedtek el. Ezekkel, sokkal több fehérjét lehetett azonosítani, mint a kétdimenziós tömegspektrometriás méréssel. Kezdetben a legtöbb kutató protein katalógusokat készített egy-egy szövetről, amíg nyilvánvalóvá nem vált, hogy a módszer globalitása nem kielégítő és így az adatok csak korlátozottan hasznosíthatóak.

Egy másik megközelítési mód, az antitesttermelés, a potenciális biomarkerek ellen és ELISA assayk kifejlesztése. Természetesen ez a módszer időigényes és egyáltalán nem biztos, hogy képes a módszer megfelelő monoklonális antitesteket generálni a potenciális biomarkerek ellen. Mindezek ellenére az ELISA assayk mind a klinikai gyakorlatban, mind a kutatásokban kényelmes, megbízható eszközök, erős kapcsolatuk van az immuno-assay megközelítéssel a validációs vizsgálatok során.

Tekintettel arra, hogy a fehérjéknek több mint 50%-a glikozilált formában van jelen a plazmában, ezért a fehérje biomarker felfedezési technikánkat úgy terveztük, hogy ezen a glikozilált fehérjék ellen készítsünk monoklonális antitest könyvtárat. Ezért olyan teszteket próbáltunk alkalmazni, amelyek könnyen konvertálhatók a mindennapi klinikai gyakorlattá, és az ellenanyag könyvtárakon alapuló eljárásoktól sok új diagnosztikum várható.

### LIPID MEDIÁTOROK

A COPD patológiájában egy gyulladós kaszkád játszik szerepet, amely a dohányfüst hatására kialakuló folyamatokkal indul és a végén a tüdőszövet destrukciója áll. Az irodalom a lipid mediátorok tekintetében igen kiterjedt és nem egyértelmű. A foszfolipázok metabolitjaiból kialakult lipid mediátorok fontos szerepet játszanak a COPD patogenezisében. Többek között lipid ligandok, arachidonsav metabolitok (prostaglandinok, protacyleinek, thromboxanok, leukotriének és az eicosatetraén sav), lysophospholipidek, zsírsavak és endocannabinoidok ligandjaként szerepelnek. Az arachidonsav metabolitok, speciális szerepet játszanak a COPD-ben gyulladós folyamatokban. Az ismert gyógyszer targetek kb. 50%-a a GPCR (G protein-coupled receptor) ligandjai közé tartozik, így lényegesen nagyobb az esély gyógyszer target találására, ha ebben a csoportban végezzük vizsgálatainkat.

*In vitro* és *in vivo* vizsgálatok igazolták az 5-oxo-ETE szerepét az asztmás gyulladós folyamatban, úgy látszik, hogy stimulálja az eozinofil sejteket az asztma patomechanizmusa során. A COPD és az klinikai megjelenése hasonló és az etiológiai tényezők is részben átfedik egymást; ezért találtuk fontosnak azt, hogy a lipid receptor család metabolitjai között keressünk biomarkereket. Ebből a csoportból a  $PgE_2$ , (prostaglandin  $E_2$ )  $PgD_2$  (prostaglandin  $D_2$ ) és az 5 és a 15-oxo-ETE (eicozanoid 5-oxo-6E, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraén sav) különlegesen érdekes mediátor. A fenn említett metabolit család kitüntetett elemeit egyenként vizsgáltuk.

## A COPD KUTATÁS KEZDETEI A DEBRECENI EGYETEMEN

A kísérleteket klinikai munkacsoportom és a Pfizer Fresnes Laboratory COPD munkacsoportja közötti kollaboráció indította el. A vezetésem alatt álló klinikai tudományos csoport kollaboratív tudományos grant-et kapott (1.) a Pfizer gyógyszergyár Genomikai és Bioinformatikai munkacsoportjától, amelyet Dr. Takács László vezetett. A kutatásnak az volt a célja, hogy proteomikai, metabolomikai és genomikai módszerekkel biomarkereket és COPD gyógyszer targeteket találjunk.

**1. E. Csanky** M.D, L. Nagy MD.Ph.D., P. Gergely Ph.D. DSc.: Identification of disease relevant target and biomarker candidate genes by comprehensive interrogation of the genome and proteome in COPD.

Az eredmények biztatóak voltak, – így ezeknek az eredményeknek az alapján a Pfizernek az előbbi munkacsoportjával indult el 2003-ban a második munkánk (2. grant), amely a COPD monoklonális antitest alapú biomarker kutatását tűzte ki célul. A vizsgálat alapvető célja az volt, hogy a plazma proteinek között COPD-re jellegzetes fehérjéket azonosítsunk, és alkalmassá tegyünk antitest alapú assayk kifejlesztésére.

**2.: E. Csanky M.D.**, L. Nagy MD. Ph.D., P. B. Scholtz PhD, Gergely Ph. D.DSc.: Discovery and validation of biomarkers and drug targets for COPD: a clinical genomics, proteomics and genetics collaboration with the University of Debrecen-2003. – A9001156 – Pfizer grant.

A BioSystems International 2005-ben egy összehasonlító vizsgálatot indított (3.) azzal a hosszú távú céllal, hogy potenciálisan klinikailag alkalmazható markerek és új lipid vagy kemokin mediátorokat azonosítsunk a GPCRS receptor ligandjai közül, amelyek potenciálisan szerepet játszanak a COPD patomechanizmusában. A legbiztonságosabb kutatási irány az volt, hogy a COPD-s betegeknél talált adatainkat dohányos, de nem COPD-s egyének adataival hasonlítsuk össze.

**3.: Dr. Csányk Eszter**: BSI Comprehensive Pilot and Biomarker Early-Validation (50-50) studies for COPD GPCR target and biomarker discovery.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkám hosszabb távú célja az, hogy hipotézis nélküli és hipotézis által vezérelt biomarker kutatással elősegítsem egy új laboratóriumi diagnosztikában használható panel felfedezését, kvalifikációját és validációját.

**I.:** COPD-ben szenvedő dohányos betegek és COPD-ben nem szenvedő dohányosok szérumprotein könyvtárának az összehasonlítása és potenciális biomarkerek azonosítása. Az új paneltől azt várom, hogy segítsen a COPD korai felismerésében, ezzel segítsen a hatékonyabb kezelésben.

Specifikus kérdéseim ezzel kapcsolatban:

1. Tartalmaz-e a plazma proteome új COPD specifikus biomarkereket?
2. Találunk-e a plazmában olyan biomarkereket amelyek, megkülönböztetik az „egészséges” dohányos és a dohányos COPD-s beteget – potenciálisan alkalmas a veszélyeztetett dohányosok kiszűrésére
3. Alkalmazható-e a monoklonális ellenanyag alapú proteomika az új markerek felfedezésére és kvalifikációjára

**II.:** Munkám további célja, hogy a relatíve elhanyagolt metabolom biomarker vizsgálatot is bevezessem a COPD kutatásban. Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a patológiás folyamathoz közeli helyről vett bronchoalveoláris lavage folyadékban, mint a betegség „direkt lenyomatában” sikerrel alkalmazható-e a célzott lipid biomarker kutatás.

Specifikus kérdéseim ezzel kapcsolatban:

1. Célzott (hipotézis vezérelt) metabolom vizsgálattal találunk e lipid mediátorokat, a BAL folyadékban melyek specifikusak COPD-re.
2. Korrelálnak-e a BAL-ban található lipid biomarkerek a COPD-re specifikus légzésfunkciós paraméterekkel?
3. Alkalmazható-e a hipotézis vezérelt metabolom kutatás új markerek felfedezésére és kvalifikációjára COPD-ben?

**III.:** Eredményeink generálnak-e specifikus új hipotéziseket?

A jelen értekezésben munkacsoportunk proteomikai és a lipid metabolom vizsgálatával kapcsolatos kezdeti eredményeinket foglalja össze.



## BETEGEK, MÓDSZEREK

### BETEGEK BEVÁLASZTÁSÁNAK ÁLTALÁNOS ELVEI:

A betegek beválasztása: a vizsgálatba a debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Tüdőgyógyászati klinikáján történt. A klinikai protokoll megfelelt az Európai Unió szabályozásainak és a DE OEC etikai bizottsága jóváhagyta a 2003-as Pfizer vizsgálati protokollt (A9001156, etikai engedély szám 2058-2003 DE OEC), 2003. június 16-án, és a BioSystems vizsgálati protokollt (2422-2005 DE OEC) 2005. november 29-án. Vizsgálatunkba 45 évesnél idősebb a vizsgálat idején is dohányos férfiakat választottunk be, akik több mint 5 csomagév dohányzási anamnézissel bírtak. A betegek részletes orvosi vizsgálaton estek át. Részletes légzésfunkciós vizsgálat, testplethysmográfia történt és ennek alapján soroltuk be a betegeket a COPD stádiumaiba.

Légzés funkciós vizsgálatok és reverzibilitási teszt: Testplethysmográfias vizsgálat során, a statikus, és dinamikus légzésfunkciós volumeneket határoztuk meg és 5% hibahatáron belül levő legalább kétszer megismételt vizsgálat eredményét fogadtuk el, az ERS (European Respiratory Society), 2005-ös légzésfunkciós protokollja alapján végeztük a vizsgálatot.

A légzésfunkciós vizsgálat során, ha a betegnél obstruktív ventilációs zavart találtunk, akkor 400 µg salbutamolt inhaláltattunk vele és 15 perc múlva megismételtük a légzésfunkciós vizsgálatot, ha a reverzibilitás <12%, vagy 200 ml volt, akkor a beteget a légzésfunkció alapján is COPD megfelelő stádiumaiba soroltuk, és megállapítottuk, hogy a légúti obstrukciója irreverzibilis, vagy csak részlegesen reverzibilis-e.

Vérvétel: A bevont betegektől és a kontrolloktól 2x7 ml vért vettünk a felső végtag vénáiból, klinikai rutin szerint, polypropylene csövekbe plazmayerésre. A csöveket azonnal jégre helyeztük és 30 percen belül lecentrifugáltuk, és a vizsgálatig -80°C-on tartottuk. A betegeket felvilágosítottuk a kutatásunk lényegéről, a 2 cső véradásába beleegyeztek, a betegtájékoztatót elolvasták, megértették és a beteg-beleegyező nyilatkozatot, aláírták.

Bronchoalveoláris lavage (BAL): Azoknál a betegeknél, akiknél klinikai szempontok alapján indikált volt, a bronchofiberoscopia, azokat vontuk be a vizsgálatba. A bronchofiberoscopiaét szokásos módon viteleztük ki, a bronchoalveoláris mosást, 6x50 ml fiziológiás konyhasóoldattal végeztünk, az ERS ajánlása alapján. A klinikai, diagnosztikai vizsgálatra nem kerülő folyadékot használtuk a kísérleteinkhez.

## MÓDSZEREK

### A BIOMARKEREK FELFEDEZÉSE ÉS KVALIFIKÁLÁSA

COPD-re specifikus monoklonális antitest könyvtárát állítottunk elő nascens (hibridóma felülülőző formában) monoklonális ellenanyag proteomika elveit és a megszokott protokollt követve. Ezzel egy lépésben biomarker jelölteket fedeztünk fel és megindítottuk a kvalifikáció folyamatát is.

A minták előkészítése az antigén preparátumhoz: A tracer és az immunogént azonos módszerrel készítettük elő. Először Agilent MAR6 oszlopot használtunk a gyártó által javasolt technika felhasználásával, azért hogy a plazmában található hat leggyakoribb plazma proteint eltávolítsuk. A következő lépésben a polyclonalis, affinitás kromatográfiás oszlop segítségével, a plazmafehérje koncentráció dinamikus tartományának további csökkentését végeztük, így a COPD-re specifikus fehérjék dúsítása történt.

Monoklonális antitest előállítás: Immunizálásra és monoklonális antitest előállításra Harlow protokollját használtuk, Bristol módosításával. Az immunizált nőtény Balb/c egerek lépsejtjeit polyethylenglikoll segítségével szomatikus hiridizáció során fuzionáltattuk az Sp2/Ag0 myeloma sejtekkel a szokványos protokollt követve. A hibridóma felülülőzőkat standard módszerekkel generáltuk.

A hibridómák szűrése, a COPD-re specifikus monoklonális IgG előállítása és kvalifikálása: A nascens hibridóma felülülőzőkat a „capture” ELISA elv alapján szűrtük. A capture assay biomarkereket talált. Az kísérlet során inhibitorok nélkül végeztük a tracer preparálást a kevert plazmából. A gátlási assay szintén azonosított biomarkereket, annak ellenére, hogy a természete ezeknek a biomarkereknek különbözött azoktól, amelyeket a capture assayvel detektáltunk: A biomarkerek szintjét a gátlás százalékában fejeztük ki.

Fehérje identifikáció LC-MS/MS használatával: A szűrés és a további kvalifikáció után azokat az ellenanyagokat, melyek biomarker aktivitást mutattak további vizsgálatoknak vetettük alá. Az ellenanyagok által felismert vérfehérjéket tömegspektrometriás méréssel azonosítottuk, a mérés elve LC-MS/MS volt, dinamikus kizárási módban. A BioWorks szoftvert használtuk az adatelemzéshez, a SEQUEST algoritmust a Swiss-Prot humán adatbázissal hasonlítottuk össze (<http://www.expasy.org/sprot>).

## LIPID METABOLIT ASSAY

A BAL folyadék előkészítése: A BAL mintákat 1:1 arányban etil-acetáttal (EE) extraháltuk. Az EE extraktumot vákuummal beszárítottuk (Eppendorf koncentrátor 5301, Eppendorf, Germany) 30°C-on. A beszárított anyagot 100 µl etanolban feloldottuk, lecentrifugáltuk és a felülúszót ismételtén, és az előzővel azonos módon beszárítottuk. A beszárított anyagot 60 µl etanolban, feloldottuk, és 6 µl izotóp keveréket adtunk hozzá (izotóp keverék: d<sub>8</sub>-15-HETE és d<sub>4</sub>-PgD<sub>2</sub>), és ebből 10 µl azonnal HPLC-MS analizáltunk.

Lipid HPLC-MS: A HPLC-MS analízist a Waters 2695X HPLC (Waters, Budapest, Hungary) szeparációs módban alkalmaztuk, mint ezt már korábban munkacsoportunk tagjai közölték.

A lipidek azonosítása: Lipid standard törzsoldatokat kereskedelemben vásárolható standard oldatokból készítettük, 15-HETE, dX-15-HETE, dX-PgD<sub>2</sub> és PgD<sub>2</sub> (Cayman chemicals Co., Ann Arbor, USA) és az EPA (Larodan Fine chemicals AB Malmö, Sweden) termékét használtuk, úgy hogy az oldat végső koncentrációja 1000 ng/ml volt. A törzsoldatokat sötétben -80°C-on tároltuk. Többszörös kalibrációt használtunk a referencia retinoidok méréséhez különböző koncentrációjú (1, 10, 100, 1000 ng/ml) etanol befecskendezése mellett, 1 µl injektálva. A mérés érzékenysége 5 ng/ml volt 15-HETE és EPA esetén és 10 ng/ml volt PgD<sub>2</sub> esetén, a lineáris regressziós koefficiens nagyobb volt, mint 0,99.

## EREDMÉNYEK

### A PROTEIN BIOMARKER KUTATÁS

A betegek klinikai adatai a protein biomarker generálási kísérletben: Két, tisztán klinikailag megkülönböztethető betegcsoport plazmáját használtunk a biomarker vizsgálatainkhoz. Dohányos férfiak vettek részt a vizsgálatainkban. Harminc beteg a GOLD COPD II. stádiumába tartozott, és másik harminc dohányos férfi, képezte a kontroll csoportot, akik dohányzási szokásaikat, és életkorukat illetően egyeztek a COPD-s populációval. A COPD diagnózisa alapvetően klinikai alapokon nyugszik, a diagnózis kimondásának az alapja a jellegzetes klinikai tünetek alakulása, amely tünetek megléte mellett légzésfunkciós vizsgálattal obstruktív ventilációs zavar észlelhető. A diagnózis kimondásához elengedhetetlen az irreverzibilis vagy csak részlegesen reverzibilis FEV<sub>1</sub> csökkenés kimutatása, úgy hogy emellett FEV<sub>1</sub>/FVC érték 70% alatt marad, a bronchodilatációs kezelés után is. Ezért olyan beteget

választottunk a vizsgálatunkba, akiknek a betegsége már jól karakterizálható, de várhatóan a közeljövőben még progrediálni fog, de állapotuk még nem végstádiumú. A betegek és a kontrollok életkora, korábbi dohányzási anamnézise, és testtömeg indexe jó korrelációt mutat egymással, aláhúзва azt, hogy a két csoport klinikai adatai is összehasonlíthatóak, így várhatóan a molekuláris paramétereik is összehasonlíthatóak lesznek.

A COPD-re jellemző specifikus biomarker jelölt monoklonális ellenanyagok és fehérjék felfedezése: A 3500 általunk generált hibridóma felülűszóját szűrtük ELISA „capture” inhibitor assayvel. Az első lépése az ELISA szűrésnek azon alapult, hogy kiválasszuk az IgG-t termelő hibridómákat és meghatározzuk a tracer kötésüket. Az első szűrés után 250 biomarkert találtunk. Mind a 250 biomarkert külön-külön teszteltük gátlási assayvel. A nascens monoklonális ellenanyag könyvtárból a két plazmakeverék (COPD és kontrol) összehasonlító szűrésével „capture” elv alapján hajtottunk végre. Ennek az elvnek a figyelembe vételével választottuk ki azokat a hibridómákat, melyeket a további lépésekben egyedi plazma minták segítségével tovább vizsgáltunk. A második szűrési lépésnél csökkentettük a biomarker jelöltek számát az előzőhöz hasonló módon, és tíz biomarker jelöltet találtunk.

A vizsgálatokat többször elvégeztük az assay szignifikancia szintjét a Mann-Whitney, „non-parametrikus” teszttel határoztuk meg. Erre azért volt szükség, mert előzetes analízis során kiderült, hogy a mért eloszlás nem követi a normál eloszlást.

A fent részletezett vizsgálatunk során bemutattunk egy monoklonális antitest alapú biomarker felfedezési módot, amely új biomarkereket biztosított és igazolt. Ezzel a módszerrel, nagy mennyiségű monoklonális antitest alapú betegség specifikus biomarkert lehet felfedezni, amelynek mérésére hamar klinikai assayvé alakítható. A monoklonális antitest mediálta proteomikai megközelítés rövid időn belül (8 hónap) tíz új olyan monoklonális antitestet eredményezett, amely egyszerűen ELISA módszerrel, statisztikailag szignifikáns módon meg tud különböztetni két populációt a dohányos COPD-ben nem szenvedő és a dohányos COPD-ben szenvedő betegcsoportot. A biomarker felfedezésnek ilyen alkalmazása klinikailag is igazolható. Szemben a tömegspektrometrián alapuló vagy szisztémás biológiai stratégiával, a mi módszerünkkel már a felfedezés során előazonosítottuk a biomarkereinket. A vizsgálat következő lépése az ellenanyag biomarker jelöltek által felismert specifikus antigének identifikációja és jellemzése. Jelenleg leírt módszerünk kiemelkedően és tisztán demonstrál egy hatékony megközelítést a biomarker jelöltek megtalálására.

## A BAL-BÓL MEGHATÁROZOTT LIPID METABOLITOK VIZSGÁLATA

A betegek adatai: A vizgált személyeket, COPD-s beteg, és nem COPD-s dohányzó egyén, dohányzási szokásaik, klinikai és légzésfunkciós jellemzőik alapján választottuk be a vizsgálatba; és ők tisztán két csoportra oszlanak, COPD-ben szenvedő és COPD-ben nem szenvedő csoportra.

A BAL-ban mérhető lipid metabolitok: Az első elképzelés az volt, hogy összefüggést találunk a légzésfunkciós eltérések és a lipid metabolitok (PgD<sub>2</sub>, LPC, 15-HETE, EPA) BAL-ban mérhető szintje között. Annak ellenére, hogy valamennyi betegünkönél azonos mennyiségű folyadékkal (300 ml) végeztük a BAL-t, változó volt a visszanyert folyadék mennyisége. A visszanyert folyadék mennyiség nem mutatott szignifikáns összefüggést BAL-ban mérhető lipid metabolitok koncentrációjával. A légzésfunkciós paraméterek közül visszanyert folyadék mennyisége a TLC-vel mutatott szignifikáns összefüggést, ami valószínűleg a betegeknek az emfizémájával magyarázható. Összefüggést találtunk a teljes visszanyert lipid mennyiség és a visszanyert BAL folyadék mennyiség között R<sup>2</sup> teszttel vizsgálva ez az érték EPA esetén -0,77, 15-HETE -0,75 és PgD<sub>2</sub> -0,57.

A BAL kompartmentalizációja: A talált eredményeink azonnal felvetettek egy hipotetikus modellt, a BAL folyadék kompartmentalizációjáról. Úgy tudjuk ezt összefoglalni, hogy a bevitt folyadék két részre oszlik, az egyik része visszanyerhető, ezt a frakciót látjuk a lavage-ból visszanyerve: Ez frakció gazdag a tüdőben található metabolitokban, és egyensúly alakul ki az oldékony metabolitok BAL folyadéokban és a bronchusban található metabolitok szintje között. Ez a visszanyerhető része a BAL folyadéknak a közepes méretű bronchusokat reprezentálja. Tekintettel arra, hogy egyensúly alakul ki ebben a frakcióban, ennek az összetétele konstans, ezért a teljes visszanyert lipid metabolit mennyiség, és nem a metabolitok koncentrációja, mutathat összefüggést a légzésfunkciós paraméterekkel. A másik frakció nem nyerhető vissza, így nem interferál a visszanyerhető metabolitokkal. A nem visszanyerhető rész valószínűleg a bronchoalveoláris teret reprezentálja. Valószínű, hogy a folyadék nagyobb mennyisége ebből a térből gyorsan felszívódik. Ennek a térnek a variabilitása egyénekenként változik és függ a BAL technika kivitelezésétől és az abszorpció sebességétől. Valószínű, hogy ez a tényező a legfontosabb.

A BAL lipid tartalma és a légzésfunkció összefüggései: A kompartmentalizációról szóló modellünk alapján vizsgáltuk a visszanyert BAL folyadék lipid szintjét a fent említett négy lipidre külön-külön. A teljes visszanyert PgD<sub>2</sub> mennyisége

kiemelkedően negatív korrelációt mutatott a FEV<sub>1</sub>, a FEV<sub>1</sub>% és a PEF értékkel és az R<sup>2</sup> érték ebben az esetben 0,6 volt. Másrészt nem volt összefüggés a PgD<sub>2</sub> szint és a TLC között.

Vegyük az észlelt összefüggést a TLC és a BAL-ban mérhető lipidkoncentrációk között. Normalizáltuk a visszanyert lipid értékeket a légzésfunkciós paraméterekre és így értékeltük eredményeinket. Ennek alapján megállapítható összefüggés a PgD<sub>2</sub> szint és FEV<sub>1</sub>% értékei között, ami független volt a TLC-től. Összefüggést találtunk a PEF érték és az EPA szint között mindazok mellett, hogy valamennyi légzésfunkciós paraméter egymástól független volt analízisünk során. Nem találtunk összefüggést az LPC és az 15-HETE között.

## **MEGBESZÉLÉS**

A munkánk első lépése volt új biomarkerek felfedezésének, és reméljük, hogy új klinikai lehetőséget teremtenek a gyógyszerkivizsgálások, a kezelésre jól reagáló betegcsoportok kivizsgálásában, a betegségnek már a korai stádiumában. Reményeink szerint eredményeink alkalmasak lehetnek tünetmentes COPD-sek szűrésére.

Hipotézis által vezérelt és hipotézistől mentes kutatási módszert alkalmaztunk munkánk során. A hipotézis által vezérelt kutatás a lipid mediátorok válogatott csoportjának vizsgálata volt. A hipotézistől mentes megközelítést a humán plazma proteom kutatására használtuk.

## **PROTEIN BIOMARKER KUTATÁS**

COPD-re specifikus protein biomarker felfedezhető és validálható egy lépésben. Nyolc hónap alatt a monoklonális antitest mediálta proteomikai megközelítésünk tíz olyan monoklonális antitest előállítását tette lehetővé, amely képes magas statisztikai szignifikanciával megkülönböztetni a normál és a COPD-ben szenvedő beteg populációt, egyszerű ELISA teszttel. Ez módszer pontosabb, mint a népszerű tömegspektroszkópia alapján történő meghatározás. Néhány azonosított protein úgy tűnik, hogy betegség specifikus és más klinikai vizsgálatban is azonosítottak már (Pfizer bizalmas adat).

A monoklonális antitest termelési stratégia a protein természetű biomarkerek felfedezésére alkalmas, és az ELISA teszt alkalmazása azonnali klinikai

alkalmazást tesz lehetővé. Ez az új biomarker teszt lehetővé teszi a COPD korai diagnózisát, a kezelés hatására bekövetkező változások detektálását.

A vizsgálataink alapján monoklonális antitest könyvtárát találtunk proteomikai módszerrel. Munkánk során négy antitest biomarkereket mutatunk be az antitest csoportból, amelyeket ezzel a technológiával fedeztünk fel. Ezt az új módszert alkalmazva, a nagy monoklonális antitest könyvtár meg tudja különböztetni a COPD-s beteget a dohányzó, de COPD-ben nem szenvedő kontrolltól. Ennek a módszernek a kifejlesztése és azonnal klinikai tesztté történő alakítása kiküszöböli a hipotézis által vezérelt, tömegspektrometrián alapuló biomarker felfedezési technikának a validálási szűk keresztmetszetét. Az új módszerünk kihívás, ugyanis a biomarker felfedezést és a validálás első lépcsőfokát egy lépésben végzi el. A gátlási, „capture” ELISA assayt első alkalommal mi közöltük. Azóta alkalmazásra került klinikai diagnosztikumok piacán. A BioSystems International és a Randox által kifejlesztett diagnosztikumot sikeresen tesztelik a DEOEC területén.

Kifejlesztettünk egy módszert, amely képes a humán plazmában található glikoproteinek ellen betegség specifikus monoklonális antitestet generálni. Szintén fontos eredménye ennek a vizsgálatnak, hogy jó minőségű monoklonális antitestet állítottunk elő. Immunológiai alapú assayk nagyszámú minta esetén fontos eszközök a biomarker validálási vizsgálatokban. Annak ellenére, hogy a COPD-re specifikus monoklonális antitestek jellemzésére az antigén azonosítása a vizsgálatban relatíve nagy számú proteint eredményezett, a kezdeti vizsgálat korai sikere azt sugallta, hogy ez a módszer egy hatékony megközelítés a gyors monoklonális antitest generáláshoz.

Ez a módszer nagyon hatékony és nagyszámú pozitív klónt eredményezett, amely alkalmas a COPD-s beteget megkülönböztetni a normáltól. Csábító, folytatni az antigének azonosítását a megmaradt IgG-t szekretáló hibridómáknál. Azonban más módszerek is ismertek antigének azonosítására, például epitop térképezés talaján létrehozott peptid könyvtárak, fág technológiák, amelyek jobban alkalmasak nagy hatékonyságú antigén szűrésre és felfedezésre. Ennek az előzetes kutatásnak a kísérletes eredményinek az áttekintése azt sugallja, hogy ez a technika igen ígéretes, és nagy mennyiségű COPD-re specifikus nagy affinitású monoklonális antitest generálására alkalmas. Ezért a monoklonális antitest kiváló reagens az immunológiai alapú proteomikai kutatásokban és biomarker azonosításokban.

A protein biomarker vizsgálatokkal kapcsolatos célkitűzéseink és kérdéseink közül mindet megvalósítottuk:

**I/1:** A humán plazma tartalmaz COPD-re specifikus fehérje biomarkereket.

**I/2:** A bemutatott kísérleti eredmények alapján a biomarkereink alkalmasak a dohányos de nem COPD-s egyének és a dohányos COPD-s betegek elkülönítésére. A későbbiekben ezt további kvalifikációs és validációs vizsgálatokban tervezzük megválaszolni. Eredményeink alapján racionális alapon új kísérleteket tudunk tervezni, melyek az eddig felfedezett fehérje biomarkerek klinikai jelentőségét fogják tisztázni.

**I/3:** A fentiek alapján a monoklonális ellenanyag proteomikán alapuló módszerünket szélesebb körben történő alkalmazásra is jónak tartjuk, és a fent leírt módszerrel kifejlesztett assay klinikai kipróbálás alatt van.

### LIPID BIOMARKER VIZSGÁLAT

Elsőként bizonyítottuk azt, hogy a BAL-ban található néhány lipid biomarker (EPA, 15-HETE, LPC, PgD<sub>2</sub>) LC-MS-sel mérhető szintje és TLC (Total Lung Capacity) között egyenes arányosság van. A BAL-ból visszanyert folyadékban található PgD<sub>2</sub> összes mennyisége, lineáris, de fordított összefüggést mutat a COPD-re specifikus légzésfunkciós értékekkel (FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>%) a BAL kompartmentalizációjára vonatkozó hipotézisünk alkalmazása után.

Kiemelendő, hogy munkám dokumentálhatóan az egyik kiindulópontja lett a PgD<sub>2</sub> receptor gátló gyógyszerfejlesztésnek. A BAL kompartmentalizációjára vonatkozó hipotézisünk szerint a bevitt mosófolyadék egy variábilis része gyorsan felszívódik, de a kimosott mediátorok nem szívódnak fel. Az itt elsőként közlésre került hipotézisünk helyességét nagymértékben támogatja a kapott eredmény és annak irodalmi reprodukciója. A biomarker vizsgálat eredményei alapján a munkánkat tovább folytatjuk különös tekintettel a PgD<sub>2</sub> és COPD kapcsolatára.

Összefüggést találtunk a légzésfunkciós paraméterek és a biológiailag meghatározó lipid metabolitok BAL-ban mérhető szintje között. Annak ellenére, hogy relatív kis számú mintát analizáltunk, jó, inverz összefüggést találtunk a PgD<sub>2</sub> és az EPA BAL-ban tömegspektrometriával mérhető szintje és számos légzésfunkciós paraméter között, mint például a FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>% és a PEF érték között, valamint a FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>% értéke között, EPA esetén. Továbbiakban lineáris összefüggés látható a FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>% és a PgD<sub>2</sub> érték között, amely független a TLC értéktől, mindez azt sugallja, hogy erős összefüggés van a mért légzésfunkciós paraméterekkel.

Számos különböző gyulladáshoz vezető mediátorról ismert, hogy szerepet játszik a COPD patogenezisében, ezek között ismertek lipid mediátorok, kemokinek és különböző



cytokinek is. Sok szempontból az asthma és a COPD patomechanizmusa hasonló, míg speciális pontokon a korfolyamat jellegzetes az egyik vagy a másik megbetegedésre. Ezek a mediátorok részben szerepet játszanak a gyulladásoos sejtek toborzásában a tüdőbe, másrésztől ezen sejtek aktiválásában. Ezek közül a COPD esetén a makrofágok, a neutrofilek és a CD<sup>8+</sup>T sejtek játszanak meghatározó szerepet a korfolyamatokban, míg az asthma esetén a domináló gyulladásoos sejtek az eozinofil sejtek, hízósejtek és a CD<sup>4+</sup>T sejtek, amelyek mintegy indikátorai a széles körű allergiás folyamatoknak.

A hipotézis vezérelt biomarker vizsgálatokkal kapcsolatos célkitűzéseink megoldottuk illetőleg pozitív eredménnyel tudtuk meg válaszolni:

**II/1.:** A humán BAL tartalmaz COPD specifikus lipid biomarkereket.

**II/2.:** A biomarkerek közül a PgD<sub>2</sub> mennyisége – jól korrelál a COPD specifikus légzésfunkciós paraméterekkel

**II/3.:** Eredményeink a biológiai kvalifikáció követelményeinek megfelelnek amennyiben eredményünk az ismert klinikai és kísérletes adatok alapján nem meglepő és alátámasztja azt a feltételezést, hogy a COPD obstruktív komponense az asztmához hasonló patomechanizmussal fejlődik ki.

**III.:** Váratlan új hipotézisünk a BAL kompartmentalizációjáról jól illusztrálja a biomarker kutatás jelentőségét.

## A LÉGZÉSFUNKCIÓS ELTÉRÉSEK SÚLYOSSÁGÁVAL KORRELÁLÓ COPD BIOMARKER JELÖLTEK FELFEDEZÉSE

Dr. Csányk Eszter

Témavezető: Prof. Dr. Takács László – akadémikus

### ÖSSZEFOGLALÁS

**Előzmények:** A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) az egyik vezető tényező a mortalitási és morbiditási statisztikákban világszerte. A COPD-t általában előrehaladott stádiumban diagnosztizáljuk. A COPD biomarkerek felfedezése segíthet a tünetmentes COPD-sek felfedezésében, és új terápiás célpontokat jelölhet ki.

**A vizsgálat célja:** Munkám hosszabb távú célja az, hogy hipotézis nélküli és hipotézis által vezérelt biomarker kutatással elősegítsem egy új, diagnosztikus panel felfedezését, kvalifikációját és validációját. Munkám további célja, hogy a relatíve elhanyagolt metabolom biomarker vizsgálatot is bevezessem a COPD kutatásban.

### **Eredmények, megbeszélés:**

***Szérum – protein – biomarkerek:*** Vizsgálatunkban meghatároztunk és alkalmasnak találtunk egy széleskörű monoklonális ellenanyag könyvtárakon alapuló proteomikai módszert, amely képes betegség specifikus biomarkerek előállítására. Az új módszerrel felfedezett tíz biomarker közül négyet mutattam be. Az új marker ellenanyagok a vizsgált klinikai kohorton COPD specifikusnak bizonyultak. Ebből a szempontból vizsgálva módszerünk egy lépésben megvalósítja a felfedezést az új biomarkerek kvalifikációjának egy fontos elemét szemben a tömegspektrometriával vagy biológiai alapú hipotézis vezérelt stratégiákkal. Az itt először leírt „gátlási” teszt általánosabban alkalmazható változata a QuantiPlasma biocsip már forgalomban van, amelyet a Biosystems International és a Randox cégek közösen fejlesztettek ki, és a DEOEC-en sikerrel került kipróbálásra.

***BAL – lipid – biomarkerek:*** Mi bizonyítottuk elsőként, hogy a BAL-ban található néhány lipid biomarker (EPA, 15-HETE, LPC, PgD<sub>2</sub>) LC-MS-sel mérhető szintje és a betegek TLC-je között egyenes arányosság van. A BAL-ból visszanyert folyadékban található PgD<sub>2</sub> összes mennyisége, lineáris de fordított összefüggést mutat a COPD súlyosságával. Kiemelendő, hogy munkám dokumentálhatóan az egyik kiindulópontja lett a PgD<sub>2</sub> receptor gátló gyógyszerfejlesztésnek a gyógyszeriparban.

Iktatószám: DEENKÉTK/128/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Csánky Eszter

Neptun kód: B7ZF2J

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csánky E.:** A krónikus obstruktív tüdőbetegség patogenezise: Legfontosabb ismereteink 2011-ben.  
*Orvostovábbk. Szle.* 18 (10), 11-18, 2011.
2. **Csánky, E.,** Rühl, R., Scholtz, B., Vaskó, A., Takács, L., Hempel, W.: Lipid metabolite levels of prostaglandin D2 and eicosapentaenoic acid recovered from bronchoalveolar lavage fluid correlate with lung function of chronic obstructive pulmonary disease patients controls.  
*Electrophoresis.* 30 (7), 1228-1234, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800722>  
IF:3.077
3. **Csánky E.,** Takács L.: A biomarkerek szerepe a COPD patogenezisében és diagnosztikájában.  
*Tüdőgyógyászat* 1 (12), 3-11, 2007.
4. **Csánky, E.,** Olivova, P., Rajnavölgyi, É., Hempel, W., Tardieu, N., Élesné Tóth, K., Jullien, A., Malderez-Bloes, C., Kuras, M., Duval, M.X., Nagy, L., Scholtz, B., Hancock, W., Karger, B., Guttman, A., Takács, L.: Monoclonal antibody proteomics: Discovery and prevalidation of chronic obstructive pulmonary disease biomarkers in a single step.  
*Electrophoresis.* 28 (23), 4401-4406, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700256>  
IF:3.609
5. **Csánky E.:** A betegek kiválasztása tüdőtranszplantációra és kezelésük a várólistán töltött idő alatt.  
*Orv. Hetil.* 147 (43), 2069-2074, 2006.
6. **Csánky E.:** A COPD gyógyszeres kezelése napjainkban és a jövőben.  
*Családorv. F.* 9, 12-18, 2006.

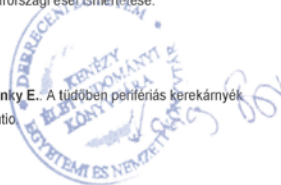


7. Vaskó A., Kiss S.S., Dévényi K., Ördög C., Szilasi M., **Csánky E.**: A volumenredukációs műtét, mint kezelési lehetőség a korai stádiumú krónikus obstruktív tüdőbetegség terápiájában.  
*Orv. Hetil.* 147 (43), 2091-2096, 2006.

#### További Közlemények

8. Guergova-Kuras, M., Kurucz, I., Hempel, W., Tardieu, N., Kádas, J., Malderez-Bloes, C., Jullien, A., Kieffer, Y., Hincapie, M., Guttman, A., **Csánky, E.**, Dezső, B., Karger, B., Takács, L.: Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries.  
*Mol. Cell. Proteomics.* 9 (2011), p. 1-48, 1-48 (2011), 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.010298>  
IF:8.354 (2010)
9. Pólska, S., **Csánky, E.**, Szántó, A., Szatmári, I., Meskó, B., Széles, L., Dezső, B., Scholtz, B., Podani, J., Kilty, I., Takács, L., Nagy, L.: Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Specific Gene Expression Signatures of Alveolar Macrophages as well as Peripheral Blood Monocytes Overlap and Correlate with Lung Function.  
*Respiration.* 81 (6), 499-510, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000324297>  
IF:2.543 (2010)
10. Penyige, A., Pólska, S., **Csánky, E.**, Scholtz, B., Dezső, B., Schmelczer, I., Kilty, I., Takács, L., Nagy, L.: Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study.  
*BMC Med. Genet.* 11, 152, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-11-152>  
IF:2.439
11. Miko, E., Czimmerer, Z., **Csánky, E.**, Boros, G., Buslig, J., Dezső, B., Scholtz, B.: Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer.  
*Exp. Lung Res.* 35 (8), 646-664, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/01902140902822312>  
IF:1.177
12. Vestbo, J., Tan, L., Atkinson, G., Ward, J., **UK-500,001 Global Study Team**: A controlled trial of 6-weeks' treatment with a novel inhaled phosphodiesterase type 4 inhibitor in COPD.  
*Eur. Respir. J.* 33 (5), 1039-1044, 2009.

13. **Csányk E.**: Cysticus fibrosis (mucoviscidosis).  
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 79-82, 2008.
14. **Csányk E., Vaskó A.**: Az idiopathiás tüdőfibrosis kivizsgálása és kezelése.  
*Tüdőgyógyászat 2 (7)*, 34-42, 2008.
15. **Csányk E.**: Képzővizsgálatok.  
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 37-46, 2008.
16. **Csányk E.**: A tüdő gombás és egyéb fertőző betegségei.  
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 209-213, 2008.
17. **Csányk E.**: Alvási apnoe szindróma.  
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 304-306, 2008.
18. **Csányk E.**: Disseminált tüdőbetegségek.  
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 213-247, 2008.
19. **Csányk E., Szilasi M., Dévényi K., Sz. Kiss S.**: Empyema és echinococcus-fertőzés.  
*Med. Thorac.* 60 (3), 162-169, 2007.
20. **Csányk E., Asztalos L., Vaskó A., Szűcs I., Dévényi K., Szilasi M., Balla J.**: Succesful renal transplantation following lung transplantation: A survey of the first hungarian case.  
*Hung. Med. J.* 1 (4), 509-515, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/HMJ.1.2007.28129>
21. **Csányk E., Asztalos L., Vaskó A., Szűcs I., Dévényi K., Szilasi M., Balla J.**: Sikeres vesetranszplantáció tüdőátültetés után: Az első magyarországi eset ismertetése.  
*Orv. Hetil.* 148 (45), 2147-2151, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28129>
22. **Vaskó A., Kovács J., Fodor A., Szilasi M., Árkossy P., Csányk E.**: A tüdőben periferiás kerekármék formájában jelentkező cysticus adenomatoid malformatio.  
*Orv. Hetil.* 146 (17), 803-806, 2005.



23. Csányk E., Andrejkovics I., Szilasi M.: Méh- és darázscsipés-allergia miatt végzett specifikus immunterápia hatékonysága.  
*Allerg. Klin. Immun.* 7 (5), 198-205, 2004.
24. Csányk E.: Szén-monoxid- (CO-) mérgezés.  
In: Gyermekgyógyászati kézikönyv 1. kötet. Szerk.: Oláh Éva. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 926-928, 2004.
25. Csányk E., Szabó P., Vaskó A., Szilasi M., Lang G., Klepetko W.: Végstádiumú tüdőbetegségen szenvedő betegek kezelése: Áttekintés a tüdőtranszplantációról négy eset kapcsán.  
*Orv. Hetil.* 144 (15), 691-699, 2003.
26. Majoros, L., Kardos, G., Belak, A., Maráz, A., Asztalos, L., Csányk, E., Barta, Z., Szabó, B.: Restriction Enzyme Analysis of Ribosomal DNA Shows that *Candida inconspicua* Clinical Isolates Can Be Misidentified as *Candida norvegensis* with Traditional Diagnostic Procedures.  
*J. Clin. Microbiol.* 41 (11), 5250-5253, 2003.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.11.5250-5253.2003>  
IF:3.489
27. Csontos Z., Kappelmayer J., Csányk E.: Az optimális serum theophyllin szint beállítása és számítógépes programmal való tervezése asthma bronchiales betegek kezelése során.  
*Med. Thor.* 19, 237-244, 1996.
28. Monos, D.S., Csányk, E., Ono, S.J., Radka, S.F., Kappes, D., Strominger, J.L.: L cells expressing DQ molecules of the DR3 and DR4 haplotypes: Reactivity patterns with mAbs.  
*Immunogenetics.* 42 (3), 172-180, 1995.  
IF:3.373
29. Monos, D.S., Kamoun, M., Udalova, I.A., Csányk, E., Cizman, B., Turetskaya, R.L., Smirnova, J.B., Zharkov, V.G., Gasser, D., Zmijewski, C.M., Spielman, R.S., Nedospasov, S.A.: Genetic polymorphism of the human tumor necrosis factor region in insulin-dependent diabetes mellitus. Linkage disequilibrium of TNF $\alpha$  microsatellite alleles with HLA haplotypes.  
*Hum. Immunol.* 44 (2), 70-79, 1995.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0198-8859\(95\)00060-H](http://dx.doi.org/10.1016/0198-8859(95)00060-H)  
IF:2.7
30. Kováts, E., Somlyó, B., Csányk, E., Shi, X., Zhang, Y., Coughlin, R.T., Nowotny, A.: Potentiation of HIV envelope glycoprotein and other immunogens by endotoxin (ET) and its molecular fragments.  
*Int. J. Immunopharmacol.* 14 (4), 573-581, 1992.  
IF:1.093

31. Somlyó, B., Csánky, E., Shi, X., Zhang, Y., Kováts, E., Bona-Lipták, E., Nowotny, A.M., Tripodi, D., Nowotny, A.: Molecular requirements of endotoxin actions, changes the immune adjuvant, TNF liberating and toxic properties of endotoxin during alkaline hydrolysis.  
*Int. J. Immunopharmacol.* 14 (2), 131-142, 1992.  
IF:1.093

Összesített impakt faktor: 32.947

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.686

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.20



**Dr. Csányk Eszter**  
Osztályvezető főorvos  
MISEK Miskolci Semmelweis Ignác Egészségügyi Központ és  
Egyetemi Oktató Kórház Non Profit Kft  
Tüdőgyógyászati Osztály  
3529. Miskolc Csabai Kapu 9-11  
[ecsanky@misek.hu](mailto:ecsanky@misek.hu)