

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**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.

## Szérum biomarkerek optimalizált felhasználása a sarcoidosis diagnosztikájában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Enyedi Attila okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája

(klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezetők: Dr. Fagyas Miklós, PhD

Dr. Takács István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA Doktora  
tagok: Dr. Brugós László, PhD  
Dr. Szántó Zalán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: (online formában) 2021 február 23., 12:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Müller Veronika, az MTA Doktora  
Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA Doktora  
tagok: Prof. Dr. Müller Veronika, az MTA Doktora  
Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD  
Dr. Brugós László, PhD  
Dr. Szántó Zalán, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2021 február 23., 13:00

A nyilvánosságot online formában biztosítjuk. Amennyiben a vitán rész kíván venni, úgy jelezze a [drenyediattila@gmail.com](mailto:drenyediattila@gmail.com) e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021 február 22.) 12 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.



Kutatásaink második felében pedig célunk volt, hogy összehasonlítsuk a különböző ACE-aktivitást mérő módszerek laboratóriumi hatékonyságát, hogy meghatározzuk különböző szérumbiomarkerek diagnosztikai pontosságát, illetve, hogy kifejlesszünk egy kombinált biomarkert a sarcoidosis diagnosztizálásához.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

1. Az optimalizált fluoreszcens ACE-aktivitás mérő módszer pontosságának hitelesítése egy klinikai tanulmány során.
2. Különböző ACE-aktivást mérő módszerek laboratóriumi hatékonyságának összehasonlítása.
3. Egy kombinált biomarker kifejlesztése a sarcoidosis diagnosztikájához.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

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 megfelelt a Helsinki Deklaráció intelmeinek. A vizsgálatokba minden beteg írásos beleegyezését adta.

#### **3.1. Első fázis**

##### ***3.1.1. Vizsgált alanyok***

Kísérleteink első fázisának 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.

A klinikai vizsgálatba 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 histopathológiai analízist rutinszerűen a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének szakemberei végezték.

##### ***3.1.2. Szérum- és DNS-minták***

A vérmintákat Vacutainer csövekbe (Katalógusszám 368857, 367955, 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.

##### ***3.1.3. ACE-aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetika esszé segítségével***

A szérum ACE-aktivitás meghatározását a Carmona és mtsai által meghatározott protokoll alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Röviden, a reakcióelegy tartalma: 100 mM tris(hydroxymethyl)aminometán hydrochlorid (TRIS) puffer (pH 7,0), 15 µM Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrát (a Peptide 2.0, Chantilly, VA, USA által szintetizálva), 50 mM NaCl, 10 µM ZnCl<sub>2</sub> és szérum, 35-szörös hígításban. A reakcióelegy fluoreszcencia intenzitásának változását NovoStar plate readerrel

(BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország) 96 well-es 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 =  $S \cdot k^{-1} \cdot D$ , 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.

#### **3.1.4 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 instrukcióknak 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 =  $(-A-B) \cdot 8 \cdot 7,5$ , 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.

#### **3.1.5 ACE genotípus**

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

#### **3.1.6 Statisztikai analízis**

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.

## **3.2. Második fázis**

### **3.2.1. Vizsgált alanyok**

Kutatásunk második részébe 104 feltételezeten 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.

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 megjelentek, 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.

### **3.2.2. 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.

### **3.2.3. ACE-aktivitás mérése**

A szérum ACE-aktivitását három különböző módszerrel határoztuk meg. A kísérleteink első felében kidolgozott, és ebben a dolgozatban korábban bemutatott módszer, 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-hidroxibenzoyl-glicil-L-hisztidil-L-leucin szubsztrát hasításán alapul. A teszteket a gyártók utasításai alapján végeztük egy plate reader, (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).

### **3.2.4. A szérum CTO-aktivitás mérése**

A szérum CTO-aktivitást a Hollak és mtsai által leírt módszer alapján határoztuk meg, apróbb módosításokkal. Röviden, a CTO-aktivitást egy mesterséges szubsztrát (4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-N,N',N''-triacetil-kitotriozid; Kat. szám:19715, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA) segítségével mértük egy olyan reakcióelegyben, mely 20  $\mu$ M szubsztrátot, 50-szeres hígítású szérumot és 100 mM / 200 mM citrát / foszfát puffert tartalmazott, 5,2-es pH-n. A méréseket 96 well plate-ben végeztük (Kat. szám: 655-900, Greiner Bio-One GmbH, Németország) 37 °C-n. A fluoreszcencia intenzitásokban bekövetkezett változásokat ( $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 450$ nm) percenként mértük legalább 30 percen keresztül plate reader 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.

### **3.2.5. A szérum LZM-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 plate readerrel detektáltuk (NovoStar, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország).

### **3.2.6. SAA-koncentráció mérése**

A SAA koncentrációt immunnefelometriás esszé (Kat. szám: OQMP11, Cruinn Diagnostics Limited, Dublin, Írország) alkalmazásával határoztuk meg egy BN ProSec analizátor (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. Referencia intervallumként a 0 -6,4 mg/L tartományt jelöltük meg.

### **3.2.7. A sIL-2R koncentráció mérése**

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

### **3.2.8. Az ACE gén inzerció/deléción, illetve a kitotriozidáz gén duplikációs polimorfizmusainak**

### ***meghatározása***

Az *ACE* gén (rs1799752) *I/D* genotípusát a Rigat és mtsai által leírt protokoll alapján határoztuk meg, az *I* allél jelenlétét pedig egy második polimeráz láncreakció (PCR) segítségével erősítettük meg, Lindpainter és mtsai-nak módszerével. Ezen reakciók amplikonjait 3%-os agaróz gélen szeparáltuk, 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).

### ***3.2.9. Statisztikai analízis***

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.  $\chi^2$ -tesztet alkalmaztunk annak megbecsüléséhez, hogy a genotípus eloszlás a Hardy-Weinberg egyenletnek megfelelően alakult-e. A különböző csoportokon belüli allélmegoszlást kétirányú Fisher teszttel hasonlítottuk össze. A referencia tartományok megállapításához alkalmazott statisztikai vizsgálatok a Klinikai Kémia Nemzetközi Szövetsége ajánlásainak megfeleltek. Ezek az ajánlások a Klinikai és Laboratóriumi Standardok Intézetének útmutatásában jelentek meg. A referencia intervallumokat nem-parametrikus, percentilis módszerrel határoztuk meg. A kieső értékeket Tukey szerint azonosítottuk. A kombinált szenzitivitás és specificitás kiszámításához Kanchanaraksza szimultán tesztjét) alkalmaztuk. A statisztikai analízis elvégzéséhez a GraphPad Prism szoftver 7.2.-es verzióját használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak minősítettük azokat az eredményeket, amelyeknél a  $p < 0,05$  volt.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Első fázis

Munkacsoportunk korábban kidolgozott egy optimalizált fluoreszcens ACE-aktivitás mérő tesztet, melyet nem befolyásol az albumin vagy más szérumban lévő albumin-jelenléte. Ekkor arra az eredményre jutottunk, hogy az albumin-mediált ACE-gátlás elhanyagolhatóvá válik a szérumban 35-szörösére vagy többszörösére történő hígítása esetén. A mintákban lévő bilirubin és hemoglobin zavaró hatásának elkerülése érdekében a szérumban lévő minták további hígítása ajánlott 0,71 g/L hemoglobin koncentráció vagy 150 µM bilirubin koncentráció fölött. Ezeket kivéve genotípus-független, valamint I/D polimorfizmus-függő referencia intervallumokat is létrehoztunk, a genotípus és az enzimaktivitás viszonyának meghatározása érdekében. 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 biopszia vétel céljából történő thoracoscopián estek át a sarcoidosis tüneteinek megjelenését követően. A sarcoidosis diagnózisát ezen minták szövettani analízisét követően állították fel vagy zárták ki. A műtéteket megelőzően minden betegtől vérmintát vettünk a genotípus és az ACE-aktivitás meghatározása érdekében. A steroid terápiaiban részesülő betegek nem vehettek részt a vizsgálatban. 59 betegből 8 került kizárással ACE-gátló kezelés alkalmazására, ezáltal mesterségesen csökkentett ACE-aktivitás miatt. A szövettani analízis 51 betegből 40 esetében specifikus volt sarcoidosisra, míg 11 beteg kapcsán más diagnózis nyert szövettani alátámasztást (lymphoma, carcinom, 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 ACE-aktivitás értéket akkor minősítettük pozitívnak, ha meghaladta a referencia intervallum felső határát. 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. 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). 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, ebben a sorrendben. Az ACE-aktivitási teszt pontosabb volt a genotípus-függő referencia intervallum alkalmazása esetén (54,9% vs. 39,2%).

Összehasonlítottuk ennek a fluoreszcens kinetikai esszének a pontosságát egy kereskedelmi forgalomban elérhető diagnosztikai teszt, az 'ACEcolor' pontosságával. Az 51-ből 40 beteg ACE-aktivitása alapján a mi tesztünk diagnosztikai pontossága (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. Amikor a genotípus-függő határértékeket alkalmaztuk, a mi tesztünk felülmúlta az 'ACEcolor' diagnosztikai teszt pontosságát (50% vs. 40%, ebben a sorrendben).

#### 4.2. Második fázis

Kutatásunk második felében a szövettani vizsgálat 104-ből 69 esetben bizonyult specifikusnak sarcoidosisra, míg 35 beteg szövettanilag eltérő diagnózist kapott (sinus histiocytosist, lymphomát, carcinomát anthracosist stb.). 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 ( $40,9 \pm 12,3$ , illetve  $50,5 \pm 14,0$  és  $48,3 \pm 15,0$ , 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 ( $1,56 \text{ G/L}$  ( $1,21-1,85 \text{ G/L}$ ) vs.  $1,82 \text{ G/L}$  ( $1,39-2,38 \text{ G/L}$ ), illetve  $1,89 \text{ G/L}$  ( $1,58-2,25 \text{ G/L}$ , ebben a sorrendben), habár a vér lymphocyta aránya mindkét beteg csoportban 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 populációban (130 (113-165)). A szérum kreatinin koncentráció nem különbözött szignifikánsan a csoportok között, a becsült glomeruláris filtrációs ráta pedig minden csoportban meghaladta a  $90 \text{ mL} \cdot \text{perc} \cdot (1,73 \text{ m}^2)^{-1}$ -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/sdeléción 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 génduplikáció 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.

Az ACE-aktivitást 3 különböző módszerrel mértük. A korábban létrehozott optimalizált fluoreszcens kinetikai esszé diagnosztikai pontosságát 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. Összehasonlítottuk ezen tesztek receiver operating characteristics (ROC) görbéi alatti területeket, és mindhárom teszt esetében egymáshoz hasonló görbe alatti területeket (AUC) találtunk (fluoreszcens kinetikai esszé vs. ACEcolor vs. InfinityACE = 0,8231 vs. 0,8010 vs. 0,8158, ebben a

sorrendben). Mindazonáltal szignifikáns különbségek mutatkoztak a szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek terén. A fluoreszcens kinetikai 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) bírnak. Ezzel ellentétben, az Infinity ACE teszt megközelítőleg 80%-os szenzitivitással, specificitással és pozitív prediktív értékkel rendelkezik. Amikor az adatokat a genotípus-függő ACE-aktivitás referencia tartomány alapján újra elemeztük, azt találtuk, hogy az ACE genotípus ismerete szignifikánsan javította az optimalizált fluoreszcens kinetikai esszé diagnosztikai pontosságát (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.

Következőként meghatároztuk a sIL-2R és lizozim koncentrációkra vonatkozó referencia intervallumokat, mivel a kitek gyártói nem biztosították számunkra ezeket az adatokat. A referencia csoporton belül a sIL-2R esetén  $8 (\geq 0,879 \mu\text{g/L})$ , míg a LZM esetén  $2 (\geq 2,477 \text{ mg/L})$  érték kívül esett a tartományon. A referencia tartományokat a sIL-2R esetén  $0 - 0,6823 \mu\text{g/L}$  koncentrációk között, míg a LZM esetén  $0 - 2,2538 \text{ mg/L}$  koncentrációk között határoztuk meg.

A referencia intervallumok tükrében teszteltük a sIL-2R, LZM és SAA koncentrációk diagnosztikai pontosságát a betegpopulációnkon. 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. Ezen paraméterek szenzitivitása (52,2%, 35%, 47,8% ebben a sorrendben) és specificitása (73,5%, 48,9%, 44,1%, ebben a sorrendben) alacsonynak bizonyult.

Az utóbbi évtizedekben a szérumszintű CTO-aktivitás mérés egy ígéretes eszköznél tűnt a sarcoidosis diagnosztizálására kapcsán. Kidolgoztunk egy módszert a CTO-aktivitás mérésére, és meghatároztunk egy referencia tartományt is.  $0-1233 \text{ mU/L}$  között jelöltük ki a referencia tartományt, melyen 10 alany kívül esett ( $\geq 1423 \text{ mU/L}$ ). A ROC analízis szerint a szérumszintű CTO-aktivitás alapján hatékonyan elkülöníthető a sarcoidosisos beteg a nem sarcoidosisban szenvedőtől ( $\text{AUC}=0,8608$ ,  $p<0,0001$ ). 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.

Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a legmagasabb szenzitivitású és specificitású szérumszintű biomarkerek kombinált vizsgálata javítja-e a sarcoidosis laboratóriumi diagnosztikájának hatékonyságát. A szérumszintű ACE-aktivitás (a fluoreszcens kinetika esszével meghatározva a legmagasabb specificitású) és szérumszintű 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, az úgynevezett szérum ACE- és CTO-aktivitás kettős szorzatot, ezen értékek összeszorzásával. A kettős szorzat referencia intervallumaként 0-10,614 U<sup>2</sup>/L<sup>2</sup>-t jelöltünk meg. A kettős szorzat ROC analízise az eddigi legjobb AUC értéket mutatta, 0,8984-et. 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.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A humán szérumból történő ACE-aktivitásmérés értékes információt szolgáltathat bizonyos betegségek diagnosztizálásához, mint pl. a sarcoidosis, a Gaucher-kór és a granulomatosus fertőzések. Az ACE-aktivitás egy hasznos biomarkernek tűnik a sarcoidosis diagnosztizálásához és monitorizálásához. 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 szubsztátot (Abz-FRK(Dnp)P-OH) alkalmaz.

Munkánk során ezt a fluoreszcens kinetikai esszé tovább tökéletesítettük. Rájöttünk, hogy az albumin-mediált 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 µM bilirubin koncentráció fölött. Mindezeket túl pedig genotípus-független, valamint I/D polimorfizmus-függő referencia intervallumokat is létrehoztunk. Jelen kutatás első felében ennek a tökéletesített fluoreszcens kinetikai esszének a diagnosztikai pontosságát egy klinikai kutatásban vizsgáltuk. Azok a betegek, akik feltételezeten sarcoidosisban szenvedtek, diagnosztikus műtéten estek át, hogy szövetmintát nyerjünk a hisztopatológiai vizsgálatához, 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 pontosságához hasonlítva az állapítható meg, hogy a fluoreszcens kinetikai esszé kismértékben pontosabb a többi kiténél. Másrészt, az ACE I/D genotípus meghatározása szignifikánsan javította a sarcoidosis detektálásának mind szenzitivitását, mind specificitását, az enzimaktivitás mérésének módjától függetlenül.

Következésképpen, tovább tökéletesítettünk egy fluoreszcens kinetikai ACE-aktivitást mérő módszert, amikor is az esszét nem zavarja az endogén ACE-gátló albumin hatása. 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 Mellkasszabészeti 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. 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. Sőt, mi több, 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. Addig pedig a laboratóriumi medicina specialistái új biomarker alapú esszékkel vagy a már elérhető laboratóriumi technikák pontosításával segíthetik a klinikusok munkáját.

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. Ezzel ellentétben, ebben a kutatásban demonstráltuk, hogy az optimalizált fluoreszcens kinetikai esszék 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. 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).

A sIL-2R egy csonkolt fehérje, mely az aktivált T-lymphocytákból szabadul fel, ezáltal a T-sejt aktiváció szerológiai markerének nevezhető. Tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik a sIL-2R diagnosztikai pontosságát vizsgálták pulmonalis sarcoidosisban szenvedő betegek esetében, kontroll csoporthoz viszonyítva. 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, mindeztáig ismeretlen mechanizmusoknak köszönhető, melyek hematológiai malignitásokkal, más granulomatosus betegségekkel vagy különböző autoimmun kórképekkel hozhatók összefüggésbe, amelyek megemelik a sIL-2R szintjét a szérumban. A nem-sarcoidosis csoportban a betegek nagyrésze 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. 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 biopsziával rendelkező csoport között. Fontos megjegyezni, hogy a lizozim a vese glomerulusok által filtrálódik, ezáltal veseelégtelenségben megemelkedhet a keringésben lévő enzim szintje. 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. Korábban már igazoltak emelkedett SAA szinteket a betegségben, habár, semmilyen összefüggést nem találtak a fehérje szérumszintje és a tüdőérintettség mértéke között. Korábbi tanulmányokkal ellentétben, mi nem tudtunk magasabb SAA koncentrációt kimutatni a biopsziával igazolt sarcoidosisos 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. A CTO-t macrophágok termelik, és a kitint előállító mikroorganizmusok eliminációjában játszik szerepet, a kitin degradációja által. A korábbi tanulmányokkal összhangban eredményeink azt sugallják, hogy a szérumban CTO-aktivitás egy jól alkalmazható biomarker a hilaris nyirokcsomókat 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, a betegség intenzitásának felméréséhez vagy a terápiára adott válasz megítéléséhez. 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.

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* génnek 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 pulmonalis manifesztációjú sarcoidosis diagnosztizálásában.

## 6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Korábbi munkánk során kidolgoztunk egy optimalizált fluoreszcens ACE-aktivitás mérő módszert, melyet nem befolyásol az endogén ACE-gátlók (albumin) jelenléte.
2. Meghatároztuk a különböző zavaró tényezőket (pl. haemolysis, icterus és lipaemia), melyek hatással lehetnek az enzimaktivitás mérésére.
3. Genotípus-független, valamint I/D polimorfizmus-függő referencia intervallumokat hoztunk létre az ACE aktivitás megítéléséhez. Az ACE I/D genotípus meghatározása szignifikánsan javította a sarcoidosis detektálásának mind szenzitivitását, mind specificitását, az enzimaktivitás mérésének módjától függetlenül.
4. Az általunk kidolgozott fluoreszcens kinetikai esszé pontosságát egy kereskedelmi forgalomban elérhető diagnosztikai teszt, az 'ACEcolor' pontosságához hasonlítottuk. Azt az eredményt kaptuk, hogy genotípus-függő határértékek alkalmazása esetén, a mi tesztünk felülmúlta az 'ACEcolor' diagnosztikai teszt pontosságát (50% vs. 40%, ebben a sorrendben).
5. A három különböző ACE-aktivitást mérő technika – Infinity ACE, ACEcolor és az általunk optimalizált fluoreszcens kinetikai esszé – diagnosztikai pontosságát összehasonlítva nem találtunk közöttük szignifikáns különbséget.
6. Lehetséges biomarkerként vizsgáltuk a thrombocyta:lymphocyta arányt, a sIL-2R-t, a SAA-t, a lizozimet, valamint a CTO szintjét, melyek közül egyiket sem tartjuk megfelelő egyedüli szérumbiomarkernek a sarcoidosis általi tüdőérintettség diagnosztizálásához.
7. 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%).

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 pulmonalis manifesztációjú sarcoidosis diagnosztizálásában.



Nyilvántartási szám: DEENK/311/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Enyedi Attila  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10040019

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Enyedi, A.**, Csongrádi, A., Altorjay, I., Beke, G. L., Váradi, C., Enyedi, E. E., Kiss, D. R., Bányai, E., Kalina, E., Kappelmayer, J., Tóth, A., Papp, Z., Takács, I., Fagyas, M.: Combined application of angiotensin converting enzyme and chitotriosidase analysis improves the laboratory diagnosis of sarcoidosis.  
*Clin. Chim. Acta.* 500, 155-162, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.010>  
IF: 2.615 (2019)
2. Csongrádi, A., **Enyedi, A.**, Takács, I., Végh, T., Mányiné Siket, I., Pólik, Z., Altorjay, I., Balla, J., Balla, G., Édes, I., Kappelmayer, J., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis.  
*Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (7), 1117-1125, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2017-0837>  
IF: 3.638

### További közlemények

3. **Enyedi, A.**: Treatment of sternoclavicular joint inflammation with NPWT.  
In: Theoretical knowledge and practical applications negative pressure wound therapy. Ed.: Rashed Aref, et.al, Negative pressure therapy for wound healing association, Biatortó, 130-135, 2019.





4. Bertolaccini, L., Batirel, H., Brunelli, A., Gonzalez-Rivas, D., Ismail, M., Ucar, A. M., Ng, C. S. H., Scarci, M., Sihoe, A. D. L., Ugalde, P. A., Abu Akar, F., Bedetti, B., Nadal, S. B., Brandolini, J., Crucitti, P., **Enyedi, A.**, Fernando, H. C., Furák, J., Gallego-Poveda, J., Galvez-Munoz, C., Hanke, I., Janik, M., Juhos, P., Libretti, L., Lucciarini, P., Macri, P., Margaritora, S., Mahoozi, H. R., Nachira, D., Pardolesi, A., Pischik, V., Sagan, D., Schreurs, H., Sekhniaidze, D., Tosi, D., Turna, A., Vannucci, F., Zielinski, M., Rocco, G., Uniportal VATS Interest Group (UVIG): Uniportal video-assisted thoracic surgery lobectomy: a consensus report from the Uniportal VATS Interest Group (UVIG) of the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS).  
*Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 56 (2), 224-229, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezz133>  
IF: 3.486
5. **Enyedi, A.**: A sternoclavicularis ízületi gyulladások NPWT-kezelése.  
In: Elméleti ismeretek és gyakorlati alkalmazás. Szerk.: Szentkereszty Zsolt, Pellek Sándor, Tóth Csaba, Negatívnyomás-terápiával a Sebgyógyulásért Egyesület, Biatorbágy, 130-135, 2018.
6. Lelesz, B., Szilvássy, Z., Tóth, G. K., Tóth, A., **Enyedi, A.**, Felszeghy, E. N., Varga, A., Juhász, B., Németh, J.: Radioanalytical methods for the measurement of melanin concentrating hormone (MCH) and detection its receptor in rat tissues.  
*J. Radioanal. Nucl. Chem.* 310 (3), 1325-1333, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-016-4952-9>  
IF: 1.282
7. Balog, J., Kumar, S., Alexander, J., Golf, O., Huang, J., Wiggins, T., Abbassi-Ghadi, N., **Enyedi, A.**, Kacska, S., Kinross, J., Hanna, G. B., Nicholson, J. K., Takáts, Z.: In Vivo Endoscopic Tissue Identification by Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry (REIMS).  
*Angew. Chem.-Int. Edit.* 54 (38), 11059-11062, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201502770>  
IF: 11.709
8. András, C., Tóth, L., Pósnán, J., Csiki, E., Tanyi, M., Csiki, Z., Garami, Z., **Enyedi, A.**, Flaskó, T., Horváth, Z.: Occurrence of bladder metastasis 10 years after surgical removal of a primary gastric cancer: a case report and review of the literature.  
*J. Med. Case Rep.* 7 (204), 1-8, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1752-1947-7-204>
9. Végh, T., Juhász, M., Szatmári, S., **Enyedi, A.**, Sessler, D. I., Szegedi, L., Fülesdi, B.: A magas és alacsony légzési térfogat hatása az artériás oxigenizációra és intrapulmonális shunt frakcióra egytüdős lélegeztetés során: randomizált crossover vizsgálat.  
*Anaesthesiol. Intenziv Ther.* 42 (2), 85-89, 2012.





10. Végh, T., Juhász, M., **Enyedi, A.**, Takács, I., Kollár, J., Fülesdi, B.: Clinical experience with a new endobronchial blocker: the EZ-blocker.  
*J. Anesth.* 26 (3), 375-380, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00540-011-1315-0>  
IF: 0.867
11. Végh, T., Juhász, M., **Enyedi, A.**, Takács, I., Kollár, J., Fülesdi, B.: Az EZ-Blocker (R) endobronchiális blokkolóval szerzett klinikai tapasztalataink.  
*Anaesthesiol. Intenziv Ther.* 41 (1), 20-26, 2011.
12. Veres, L., Kiss, S. S., Kiss, R., **Enyedi, A.**, Végh, T., Damjanovich, L., Takács, I.: Spontán nyelőcsőruptura komplikált esetének megoldása transgastrius drainage-zsal = A complicated case of spontaneous oesophageal rupture managed by transgastric drainage.  
*Magyar Seb.* 63 (3), 121-124, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MaSeb.63.2010.3.4>
13. Veres, L., Kiss, R., Boros, M., **Enyedi, A.**, Takács, I., Kollár, S., Damjanovich, L., Kiss, S. S.: Kirschner-drótok intrathoracalis vándorlása.  
*Magyar Seb.* 62 (6), 353-356, 2009.
14. András, C., **Enyedi, A.**, Szántó, J.: Colorectalis rák.  
*Orv. Hetil.* 148 (46), 2192-2195, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28245>
15. Árkosy, P., Sasi Szabó, L. A., **Enyedi, A.**, Szántó, J., András, C., Sáy, P.: Inoperábilis pancreas-carcinoma neo-adjuváns kemoterápiát követő kuratív sebészetének korai tapasztalatai.  
*Magyar Seb.* 58 (1), 29-33, 2005.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,597**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,253**

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

Debrecen, 2020.10.21.



## 7. 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 nyitott szakmai segítségét.

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.