

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Csongrádi Alexandra

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2022

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Csongrádi Alexandra
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD
Dr. Balla András, PhD

A doktori szigorlat helye, időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet B tömb, II. emeleti tárgyalóterem
2022. október 17. 11:00

Az értekezés bírálói: Dr. Péterfalvi Ágnes, PhD
Dr. Vaskó Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD
Dr. Balla András, PhD
Dr. Péterfalvi Ágnes, PhD
Dr. Vaskó Attila, PhD

Az értekezés védésének helye, időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Kardiológiai Intézet, Könyvtár
2022. október 17. 14:00

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

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

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

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

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

1.1. A szarkoidózisról általánosságban

A szarkoidózis egy multiszisztémás gyulladásos megbetegedés, melyet a szervezetben, de elsősorban a tüdőben megjelenő nem nekrotizáló granulómák jellemeznek. Történelme egészen a 19. századig nyúlik vissza, amikor Jonathan Hutchinson angol sebész-bőrgyógyász 1877-ben, Londonban azonosította az első esetet. A szarkoidózis etiológiája korai felfedezése

ellenére a mai napig ismeretlen. Ennek feltárását a különböző megjelenési formái és multiszisztémás jellege is nagyban megnehezíti. Feltételezések alapján a fokozott genetikai hajlam mellett bizonyos környezeti tényezők és antigénekkal történő expozíció, továbbá autoimmun folyamatok aktivációja együttesen járul hozzá a szarkoidózis kialakulásához.

A szarkoidózis epidemiológiai adatainak leírása a tünetmentes betegek számának bizonytalanságából adódóan világszerte szintén kihívást jelent. Gyakorisága a különböző földrajzi térségeken és etnikai csoportoknál jelentős eltérést mutat, incidenciája évente 1-64/100 000 eset közé tehető. Megjelenése az afro-amerikaiaknál, különösen a nők körében és az észak-európai országokban a leggyakoribb, a kaukázusi népcsoportoknál mérsékeltebb míg az ázsiai országokban és spanyol térségben fordul elő a legritkábban. A szarkoidózis előfordulása korosztály és nemek szerint is eltérő. Leggyakrabban a fiatal felnőtteket érinti és jellemző a női predominancia. Az esetek több mint 80%-a 20 és 50 év közötti, azonban a szarkoidózis gyakoriságát tekintve 50 és 65 év között egy második csúcs is megfigyelhető.

1.2. A szarkoidózis manifesztációja

A szarkoidózis klinikai megjelenése a különböző szervek érintettségétől függően nagyfokú variabilitást mutat. A szarkoidózisos páciensek 90%-ban megfigyelhető a tüdő érintettsége. Rendszeresen előforduló légzőszervi tünetek közé tartozik a száraz köhögés, nehézlégzés, illetve a mellkasi diszkomfort érzése. Leggyakoribb megjelenési formája a bilaterális hiláris limfadenopátia és a pulmonális infiltráció, amit általában valamely bőrelváltozás, illetve a szemben megjelenő lézió is kísér. A mellkasröntgenen található eltérések alapján a tüdőszarkoidózis négy stádiumát különítjük el, melyek közül legsúlyosabb a szövet fibrózisos átépülése.

A tüdőérintettség nem kizárólagos, az extrapulmonális manifesztáció (10-30%) a tüdőelváltozások kialakulása előtt, után vagy akár azzal egyidőben is érvényre juthat. A granulómaképződés a szervezetben bárhol előfordulhat, a tüdő után a szem érintettsége a második leggyakoribb (13-79%), mely uveitis és retina gyulladás formájában a látás romlásához, akár elvesztéséhez is vezethet. A bőrelváltozások (20-35%) közül a leggyakrabban előforduló, nem specifikus tünet az erythema nodosum, illetve gyakori a lupus pernio megjelenése az arcon, a fülön és az ízületeken. A májban megjelenő granulómák (10-30%) annak funkcióváltozását, megnagyobbodását okozhatják, ritkán portális hipertenzióhoz vezethet. A kardiális szarkoidózis (20-27%) súlyos szövödményeket okozhat, mely fatális kimenetelű is lehet. A mozgásszervrendszeri tünetek (10-25%) rendszerint az ízületi fájdalom

és gyulladás, mely a mozgás megnehezítettségében nyilvánul meg. Az idegrendszer viszonylag ritkán, az esetek 10%-ban érintett, megjelenése különösen a központi idegrendszerben okozhat nagy károkat. A szarkoidózis legritkábban a veséket érinti (5%). A megváltozott kalcium homeosztázis okozta hiperkalcémia és hiperkalciurea talaján nefrokalcinózis, esetenként veseelégtelenség alakulhat ki.

A szarkoidózis lefolyását tekintve akut, szubakut és krónikus is lehet. A legtöbb beteg számára a szarkoidózis jóindulatú granulomatózus megbetegedés, az esetek egy részében viszont hosszantartó, életet veszélyeztető állapot alakulhat ki. A szarkoidózis prognózisát nagyban befolyásolja a betegség stádiuma, klinikai manifesztációja és a fennálló extrapulmonális érintettség. A prognózis függ továbbá a páciens nemétől, életkorától és etnikai hovatartozásától is. Lőfgren-szindrómában szenvedő betegek prognózisa kifejezetten kedvező, a betegek 80%-a néhány hónapon belül spontán gyógyul. A szarkoidózis mortalitása 1-5%-ra tehető, mely általában a tüdőfibrozis okozta légzési elégtelenség, továbbá a szív, illetve az idegrendszer érintettsége miatt vezet elhalálozáshoz.

1.3. A szarkoidózisban alkalmazott terápia

A szarkoidózis kezelésére oki terápia jelenleg nem áll rendelkezésre, ellenben a megfelelő gyógyszerekkel a patológiás granulóma képződés folyamata lassítható, így a tünetek megjelenése mérsékelhető. A szarkoidózisos betegek állapotának folyamatos monitorozása kiemelt fontossággal bír, hiszen a prognózis romlása mellett fennáll a spontán remisszió lehetősége is, mely esetén a páciens állapota nem igényel további gyógyszeres terápiát. Az elsővonalbeli kezelés kortikoszteroidok, rendszerint prednizon alkalmazása, mely csökkenti a perzisztens granulóma formálódásért felelős citokinek, köztük a TNF α és INF γ termelődését. A kortikoszteroidok megbízhatónak bizonyultak a tünetek enyhítésében és a szervi diszfunkciók visszafordításában, azonban alkalmazásuk mindig kockázatos. Tolerálhatatlan mellékhatások (pl. mellékvese-kéreg elégtelenség, diabetes mellitus, hipertónia), továbbá kortikoszteroid refrakter állapot kialakulása második vonalbeli terápiák alkalmazását indokolja. Ilyen gyógyszerek pl. az antimaláriás hatóanyagok, a metotrexát vagy az azatioprin, melyek a szteroid terápiához képest kevésbé hatékonyak, ezért gyakran kiegészítő szerekként vagy kombinációban kerülnek alkalmazásra. Lehetőség van továbbá más hatóanyagok alkalmazására, ilyenek a TNF α antagonisták, mint pl. az infliximab, adalimumab, rituximab de a szarkoidózis kezelésében hatásosnak bizonyult a mikofenolát mofetil, és a leflunomid is.

Krónikus stádiumban lévő betegnél, vagy súlyos szervi elégtelenség fennállásakor a végső terápiát a transzplantáció jelentheti.

1.4. A szarkoidózis diagnosztikája

A szarkoidózis korai és pontos diagnózisa a több szervrendszert érintő tünetek változatossága, valamint a tünetek esetleges hiánya miatt nagy kihívást jelent a klinikusok számára. Az esetek 50%-nál rutin vizsgálat alkalmával a mellkasröntgenen észlelt eltérések alapján még a panaszmentesség ideje alatt merül fel a szarkoidózis lehetősége. További nehézséget okoz, hogy nem áll rendelkezésre olyan specifikus módszer, mely alapján a szarkoidózis diagnózisa egyértelműen kimondható. Ennek következtében a diagnózis felállításához három kritériumnak kell teljesülnie: (1) az egyértelmű klinikai és radiológiai jelek mellett (2) nem nekrotizáló granulómák jelenlétének igazolása szövettani vizsgálattal, valamint (3) az alternatív megbetegedések kizárása is szükséges.

A számottevő tüdő és mellkasi nyirokcsomó érintettség következtében kulcsfontosságú radiológiai lelet a mellkasi röntgenfelvétel. A parenchimális és mediasztinális érintettség vizsgálatában segíthet a nagy felbontású komputertomográfia (HRCT), az extrapulmonális manifesztáció feltárására pedig mágneses rezonancia (MR) vizsgálatra is szükség lehet.

A spontán remisszió magas esélye miatt a szöveti mintavétel alól kivételt képezhet a tünetmentes bilaterális hiláris limfadenopátia (a tüdőszarkoidózis I. stádiuma), valamint a klinikai megjelenés alapján is diagnosztizálható szarkoidózis specifikus tünetegyüttesek. A mintavételezés elsősorban a legkönnyebben hozzáférhető elváltozásokból pl. szubkután léziókból, vagy megnagyobbodott nyirokcsomókból történik. Amennyiben könnyen hozzáférhető granulóma nem elérhető, a tüdő és a mellkasi nyirokcsomók vizsgálata szükséges. A hiláris és mediasztinális nyirokcsomók vizsgálatára alkalmas szöveti minta nyerhető thorakoszkópos és mediasztinoszkópos eljárások során, melyet napjainkban egyre inkább a minimálisan invazív endobronchiális ultrahangos (EBUS) eljárások váltanak fel. Bronchoszkópos nyirokcsomó biopszia végezhető továbbá EBUS nélkül, carinapunctio során.

A biopszia során nyert szöveti mintából hisztokémiai vizsgálatok segítségével kimutatható a szarkoidózisra jellemző jól körülhatárolt, kompakt szerkezetű epitheloid sejtes granulóma, ahol a gyulladással járó folyamatokban résztvevő makrofágok, limfociták, valamint fibroblasztok koncentrikus elrendeződést mutatnak. A makrofágok epitheloid sejtekké differenciálódhatnak, illetve többmagvú óriássejtekké olvadhatnak össze, melyek a CD4⁺ T-limfocitákkal együttesen alkotják a granulóma központi részét. Az óriássejtek citoplazmájában

gyakran tartalmaznak inklúziós testeket, pl. Schaumann vagy aszteroid testet. A perifériás részen jellemző a CD8⁺ T-limfociták és a fibroblasztok jelenléte, ahonnan esetenként megindulhat a granulóma fibrotikus elváltozása mely a centrális rész felé haladva a granulóma teljes átépüléséhez vezethet.

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

1.5. Potenciális biomarkerek a szarkoidózis diagnosztikában

Napjainkban egyre nagyobb az igény olyan reprodukciósan meghatározható, a szarkoidózis diagnosztizálására alkalmas biomarkerek iránt, melyek kevésbé invazív mintavétel során is elérhetőek. A szarkoidózis specifikus biomarkerek feltárása azonban több szempontból is problematikus. Kétes etiológiája miatt a szarkoidózis patomechanizmusa pontosan nem ismert, mely jelentősen megnehezíti a megfelelő biomarker leírását. Emellett multiszisztémás jellege és eltérő fenotípusos megjelenése tovább korlátozza egy unikális biomarker azonosítását. Ennek ellenére számos potenciális biomarker segítheti a szarkoidózis diagnosztizálását, melyek alkalmasak lehetnek továbbá a szarkoidózis aktivitásának követésére, a terápia hatékonyságának ellenőrzésére, valamint hasznosak lehetnek a prognózis felállításában is. Ezek a biomarkerek többnyire a granulóma formálódás folyamataiban részt vevő fehérjék, citokinek, kemokinek, melyek elsősorban a CD4⁺ T-sejtek és a makrofágok aktivációja által kiváltott gyulladásos reakciók során szabadulnak fel. Egy részük vérből meghatározható szerológiai marker, mint pl. a szolubilis interleukin 2 receptor (sIL-2R),

szérum amiloid A (SAA), lizozim, kitotriozidáz vagy az angiotenzin-konvertáló enzim, mely az egyetlen olyan marker, ami a klinikai gyakorlatba is bekerült.

1.5.1. Az angiotenzin-konvertáló enzim

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) szarkoidózisban emelkedett aktivitását már 1975-ben leírták. Az ACE egy cink függő metalloproteináz enzim, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) egyik kulcs komponense. Fő funkciója az inaktív angiotenzin I vazopresszor angiotenzin II-é történő átalakítása, illetve az értágító hatású bradikinin inaktiválása, ezáltal fontos szerepet tölt be a vérnyomás szabályozásában és a szervezet só-, és vízháztartásának fenntartásában. Az ACE-nak két izoenzime ismert, melyet egyetlen gén kódol a 17-es kromoszóma hosszú karján (17q23). Nagysága ~21 kb, mely 26 exont és 25 intront tartalmaz. A nagyobb izoforma, a szomatikus ACE ~140 kDa nagyságú fehérje, mely két aktív centrumból (C-, és N-terminális), egy C-terminális transzmembrán régióból, illetve egy intracelluláris szegmensből áll. A két aktív centrum feltehetően génduplikáció eredményeként jött létre. Mindkét katalitikus domén rendelkezik a HEMGH aminosav motívummal, ahol a két hisztidin koordinálja a cink iont. Habár szekvenciájuk nagyban megegyezik, klorid aktivációs profiljuk, szubsztrát specificitásuk, inhibitoraik és fiziológiás funkcióik is eltérőek. Az ACE az I-es típusú transzmembrán fehérjék közé tartozik. Az ACE szekretáz a transzmembrán régió extracelluláris részén hasít, melynek következtében az aktív enzim a keringésbe jut. A szomatikus ACE számos szövetben expresszálódik, köztük pl. az erek endothél sejtjeiben, a tüdőben, vesében, vékonybélben, a szívben továbbá az immunrendszer egyes sejtjei, a makrofágok és a dendritikus sejtek is kifejezik. A kisebb izoenzim a tesztikuláris vagy germinális ACE ~70 kDa nagyságú. Mindössze egy aktív centrummal rendelkezik, ami a szolubilis ACE C-terminális katalitikus doménjának felel meg. Kizárólag a herékben expresszálódik, diszfunkciója csökkent fertilitáshoz vezet, így kiemelten fontos szerepet tölt be a reprodukció során.

A szarkoid granulóma epitheloid sejtjei szintén termelnek ACE-t, melynek aktivitása feltehetően arányos a szervezetben megjelenő granulómák számával. Az ACE diagnosztikai markerként történő alkalmazása azonban a mai napig vitatott kérdés. Az ACE aktivitás a szarkoidózisos betegek 30-80%-ban emelkedett, mely tesztek szenzitivitása 22-86%, specificitása 54-95% közé tehető a korábbi tanulmányok alapján. A tesztek ilyen mértékben eltérő szenzitivitás és specificitás értékeinek több oka is ismert. Habár az eltérés egy része származhat a módszerek közötti különbségekből, az ACE aktivitás genetikailag is

meghatározott. Az ACE gén inzerciós/deléciós (*I/D*) polimorfizmusa befolyásolja a szérumban mérhető ACE aktivitását, mely az egyének közötti aktivitás különbségek akár 50%-ért is felelős lehet. A 16-os intronba ékelődő 287 bp hosszúságú nem kódoló repetitív szekvencia jelenléte (*I* allél) vagy annak hiánya (*D* allél) jelentősen meghatározza az ACE aktivitását. Az *I* allél alacsony, míg a *D* allél magas ACE aktivitással társul, így *II* genotípusnál a legalacsonyabb, *DD* genotípusnál a legmagasabb, míg az *ID* genotípus esetén a két érték közötti ACE aktivitás mérhető. Az *II* és *DD* genotípusok közti eltérés akár kétszeres is lehet. A különböző etnikai csoportokban az *I* és *D* allélok előfordulásának gyakorisága eltérő. Az ázsiai populációban az *I* allél előfordulása jelentősen gyakoribb, mint az európaiaknál, ennél fogva a szarkoidózis diagnosztizálásához célszerű a genotípus függő ACE aktivitás referencia tartományokat az adott populációra vonatkozóan meghatározni. Továbbá fontos megjegyezni, hogy ACE inhibitor terápia során a szérum ACE aktivitás jelentősen lecsökken, ennek következtében diagnosztikai tesztként való alkalmazásakor fals negatív eredményt adhat. Az ACE azonban endogén gátlás alatt is áll, mely szintén befolyásolhatja a keringő enzim aktivitását. Jelentős gátló hatással rendelkezik a szérum albumin (referencia tartomány: 35-52 g/l), melynek félmaximális gátló koncentrációja (IC_{50} érték) 5,7 és 9,5 g/L közé tehető. Az alacsony szenzitivitás oka részben annak is tulajdonítható, hogy az ACE aktivitás más gyulladásos betegségekben is emelkedett lehet, mint pl. intersticiális tüdőbetegségek, tuberkolózis, berilliózis, Gaucher-kór illetve más granulomatózus kórképek.

1.5.2. A kitotriozidáz

A kitotriozidáz (CTO) a 18-as glikozil-hidroláz család (kitinázok) tagja, mely a kitin és a kitinszerű anyagok bontásában vesz részt. Az emberi szervezetből hiányzik az endogén kitin szubsztrát, ezért a CTO pontos fiziológiai funkciói jelenleg tisztázatlanok. Fagocita-specifikus expressziója révén vélhetően a veleszületett immunrendszer folyamataiban vesz részt, ahol feltételezhető a kitin tartalmú patogének (gombák, ízeltlábúak, rákfélék, fonalféreg) elleni védekezésben betöltött szerepe.

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

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

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

2. Célkitűzés

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

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

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vizsgálati populációk

A kísérletek elvégzéséhez és a normál referencia tartományok meghatározásához kétszázegy felnőtt egyén került bevonásra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai Intézetének járóbeteg ambulanciájáról, valamint az intézet dolgozói közül. A kezelt elsődleges hipertónia nem számított kizárási kritériumnak az egyének beválogatása során. A bevonásra került egyének szarkoidózis tüneteit nem észlelték magukon. A résztvevők közül senki nem kapott ACE gátló vagy szteroid kezelést.

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

Minden beteg írásos beleegyezését adta a kísérletekben való részvételhez.

3.2. Szérum és DNS izolálása

A vérminták gyűjtése rutin vérvételi eljárás során, steril körülmények között történt. A szérumot a vér alvadását követően 15 percig 1500 g-vel 4 °C-on történő centrifugálással választottuk el a sejtes elemektől. Az így nyert szérumot a mérések elvégzéséig -20 °C-on tároltuk.

A hemolízis, ikterusz és lipémia mértékét, mint a szérum minták minőségét jelző paramétereket HIL indexekkel jellemeztük. Amennyiben a betegmintákban a kísérletek eredményeit befolyásoló mértékű hemolízist (H index > 50), ikteruszt (I index > 50), vagy lipémiát (L index > 200) detektáltunk, a mintavételt megismételtük.

Az EDTA-val alvadásgátolt teljes vér genetikai vizsgálatok céljából került levételre, melyet a DNS izolálásának idejéig -20 °C-on tároltunk. A tisztított DNS-t 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.3. ACE aktivitás meghatározása fluoreszcens kinetikai módszerrel

A szérum ACE aktivitást fluoreszcens kinetikai módszerrel, Carmona és munkatársai protokolljának kisebb módosításával határoztuk meg. A méréshez használt, szintetikusan előállított fluoreszcens szubsztrátot (Abz-FRK-(Dnp)-P-OH) az ACE szelektíven képes

hasítani. Mérés során a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitásának növekedését detektáltuk. A reakcióelegyet 96 lyukú fekete platek-ben állítottuk össze, melynek fluoreszcencia jelintenzitás változását 1 perces mérési időközökkel 30 percig követtük 37 °C-on Novostar plate reader készülékkel. A mérések során a gerjesztési hullámhossz $\lambda = 340$ nm, az emissziós hullámhossz pedig $\lambda = 405$ nm volt. Vakra történő korrigálás után a fluoreszcencia jelintenzitás értékeket az idő függvényében ábrázoltuk, majd a pontokra egyenest illesztettünk. Az aktivitás mértékét U/L-ben kifejezve az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

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

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

3.4. Interferencia vizsgálatok

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

A lipémia ACE aktivitásra kifejtett hatását a szérum mintákhoz történő Intralipid hozzáadásával vizsgáltuk. Az így előállított minták triglicerid koncentrációját Cobas C6000 automatával, glicerín vakra korrigált módszerrel határoztuk meg.

Normál szérum mintákhoz különböző koncentrációban konjugátlan bilirubint hozzáadva állítottuk elő az ikteruszos mintákat, melynek összbilirubin koncentrációját azobilirubin módszerrel határoztuk meg.

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

3.5. ACE genetikai polimorfizmusának vizsgálata

Az ACE gén I/D genotípusát a Rigat és munkatársai által korábban leírt protokoll alapján határoztuk meg. Az I allél jelenlétét egy második PCR reakcióval erősítettük meg, mely

módszer Lindpainter és munkatársai munkáján alapszik. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattuk meg, az eredményeket SYBR safe gélfestékkel tettük láthatóvá.

3.6. Szérum CTO aktivitás meghatározása

A szérum CTO aktivitás meghatározását Hollak és munkatársai által leírtak kisebb módosításával végeztük el. A szérum CTO aktivitást egy mesterséges szubsztrát (4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacyl-chitotrioside) felhasználásával határoztuk meg. A méréseket 96 lyukú platek-ben végeztük 37 °C-on. A fluoreszcencia intenzitás változását legalább 30 percen keresztül követtük, 1 perces mérési időközökkel Novostar plate readerrel. Az excitációs hullámhossz $\lambda = 340$ nm, az emissziós hullámhossz pedig $\lambda = 405$ nm volt. A fluoreszcencia jelintenzitás értékeit az idő függvényében ábrázolva kapott lineáris egyenes meredeksége alapján határoztuk meg. A CTO aktivitást 4-Methylumbelliferone kalibrációs görbe alapján számítottuk, az aktivitás értékeket U/L-ben adtuk meg.

3.7. Szérum CTO koncentráció meghatározása

A szérum CTO koncentráció meghatározását két, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével végeztük. A szérum mintákat a reagenskészletben megtalálható szérum hígító oldattal hígítottuk a minta CTO aktivitásának megfelelően. A minták abszorbancia értékeit Clariostar plate readerrel mértük, melyek koncentrációját a kitben található standard alapján kalkuláltuk.

3.8. A CHIT1 gén duplikációs polimorfizmusának meghatározása

A CTO gén Dup24 polimorfizmusát (CHIT1, chitinase 1, HGNC:1936) Livnat és munkatársai által publikált protokoll alapján határoztuk meg. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattuk és SYBR safe gélfestékkel tettük láthatóvá.

3.9. A CHIT1 gén direkt DNS-szekvenálása

A kontroll csoport egyik tagjánál a CTO aktivitás hiányát nem magyarázta a Dup24 polimorfizmus. Ebből kifolyólag az érintett egyén CHIT1 gén exonjainak nukleotid szekvenciáját Sanger szekvenálással határoztuk meg. A szekvenálás során felhasznált primer párokat korábban Grace és munkatársai publikálták. A tisztított PCR termékek DNS-szekvenálását a Microsynth AG cég végezte.

3.10. A CHIT1 gén mutációk cisz-transz elhelyezkedésének vizsgálata

A kontroll csoport egyik vizsgálati alanya heterozigóta formában a duplikációs (rs3831317) és a deléciós (rs536102546) mutációt egyaránt hordozza. Ezen mutációk cisz-transz elhelyezkedését PCR reakcióval vizsgáltuk, majd ezt követően a termékek DNS nukleotid szekvenciáját Sanger szekvenálással határoztuk meg. Két primer párt alkalmaztunk, melyek a mutációk közötti DNS-szekvenciát fedik le. Az első PCR primer pár (forward: 5'-AATCCAGGATCAGAAGGGTGGGC-3'; reverse: 5'-CCTTAGCTCCTGCGGGTACAT-3') abban az esetben eredményezett PCR terméket, ha 9. exonon jelen volt a deléciós mutáció. A DNS szegmens felszaporítását Veriti™ 96-well Thermal Cycler készülékkel végeztük. A mintákat a PCR termék tisztításáig 4 °C-ra helyeztük. A második PCR primer pár (forward: 5'-CTCCAGGCTTCCTCAGACAG-3'; reverse: 5'-CCCGCCAGTCCCTAGACCAT-3') a 10. exonon jelenlévő Dup24 mutációt ismeri fel, így csak abban az esetben eredményezett terméket, amennyiben a Dup24 genotípus jelen volt. A mintákat a PCR termék tisztításáig 4 °C-on tartottuk. A megtisztított PCR termékek szekvenálását a MicroSynth AG cég végezte.

3.11. Statisztikai elemzés

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

3.12. Etikai engedély

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

4. Eredmények

4.1. Az albumin-mediált endogén gátlóhatás megszüntetése

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

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

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

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

Az ACE aktivitás genotípus függő és genotípus független referencia tartományainak megállapításához 201 résztvevőt vontunk be a vizsgálatainkba. Összegyűjtöttük a jelentkezők alapvető klinikai adatait, illetve meghatároztuk az ACE *I/D* genotípust és a 35-szörös hígításban mért ACE aktivitást.

A teljes populáció genotípus eloszlása a Hardy-Weinberg szabálynak megfelelően egyensúlyban volt. Az ACE aktivitás értékek Shapiro-Wilk próbával és D'Agostino-Pearson teszttel egyaránt normál eloszlást mutattak. Az *I/D* genotípus jelentős mértékben befolyásolja az ACE aktivitást, az *II* genotípusú egyének ACE aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a *DD* genotípus esetén mért ACE aktivitásoknál, míg az *ID* genotípussal rendelkezők aktivitása a két

érték között helyezkedik el (*II*: $7,30 \pm 1,65$ U/L; *ID*: $8,72 \pm 1,70$ U/L; *DD*: $10,6 \pm 1,70$ U/L; $p < 0,0001$).

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

Kísérletes munkánk második felében a CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusának CTO aktivitására és mennyiségére kifejtett hatásait vizsgáltuk, melyben 80, hisztopatológiai diagnózissal igazolt szarkoidózisos beteg és 133 egészséges felnőtt vett részt. A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmus a szarkoidózisos és a kontroll csoportban egyaránt Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A szarkoidózisos betegek szignifikánsan fiatalabbak voltak egészséges társaiknál (szarkoidózisos csoport: $42,2 \pm 12,2$ év, kontroll csoport: $48,3 \pm 15,0$ év). A bal kamrai ejekciós frakció, a vérlemezke szám, és a kreatinin koncentráció tekintetében nem volt szignifikáns eltérés a két csoport között, ami arra enged következtetni, hogy a kontroll csoport tagjai nem, vagy legfeljebb enyhe lefolyású kardiovaszkuláris betegségben szenvedtek. A limfocitaszám és a limfociták aránya a vérben szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva a szarkoidózisos betegcsoportban (szarkoidózisos csoport: $1,49$ G/L ($1,23-1,83$ G/L, kontroll csoport: $1,89$ G/L ($1,58-2,45$ G/L); szarkoidózisos csoport: $23,9\% \pm 6,7\%$), kontroll csoport: $29,2\%$ ($24,4-32,6\%$)). A szarkoidózis markerként alkalmazott vérlemezke/limfocita arány a szarkoidózisos betegeknél szignifikánsan magasabb volt (170 ($135-221$)), mint a kontroll populációban (130 ($113-165$)). Az erőltetett vitálkapacitás (FVC) és az erőltetett kilégzési térfogat (1 sec; FEV1) szignifikánsan magasabb volt a Dup24 duplikációt heterozigóta formában hordozó szarkoidózisos betegeknél, mint a homozigóta vad típussal rendelkező egyéneknél. Ezzel ellentétben a Tiffeneau-index a Dup24 duplikációra homozigóta betegeknél szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típust hordozó egyéneknél. Az ACE, a CTO aktivitás és a „kettős szorzat” szintén szignifikánsan magasabbnak bizonyult a szarkoidózisos csoportban a kontroll csoporthoz képest (ACE aktivitás= szarkoidózisos csoport: $11,84$ U/L ($10,1-13,5$ U/L), kontroll csoport: $9,19$ U/L ($7,09-11,29$ U/L), CTO aktivitás= szarkoidózisos csoport: 2882 mU/L ($1497-4166$ mU/L), kontroll csoport: 539 mU/L ($318-884$ mU/L), „kettős szorzat” = szarkoidózisos csoport: $34,19$ U²/L² ($17,4-51,5$ U²/L²), kontroll csoport: $4,86$ U²/L² ($2,66-7,60$ U²/L²)).

A CHIT1 gén Dup24 polimorfizmusa jelentős mértékben befolyásolta a szérumban a CTO aktivitását. A homozigóta vad típusú egyének szérumban a CTO aktivitásának átlagértéke ($838,1 \pm 856$ mU/L, $n = 81$) a kontroll csoportban 1,8-szorosa volt a heterozigótákhoz

viszonyítva ($471,5 \pm 367$ mU/L, $n = 49$, $p < 0,001$). Homozigóta Dup24 genotípussal rendelkező kontroll egyénekénél ($n = 3$) a CTO aktivitás nem volt detektálható. Hasonló mintázatot véltünk felfedezni a szarkoidózisos betegcsoport vad típusú és heterozigóta tagjai között is, azonban a CTO aktivitás átlagértéke csaknem ötszöröse volt a kontroll csoportban mért aktivitás értékekhez képest (vad típus = 5125 ± 4802 mU/L, $n = 48$; heterozigóta: 2300 ± 2105 mU/L, $n = 29$). A homozigóta Dup24 genotípussal rendelkező szarkoidózisos betegekénél a szérumban mért CTO aktivitás szintén nem volt mérhető.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a Dup24 polimorfizmus hogyan befolyásolja a szérumban található CTO mennyiségét. Kísérleteinket egy, a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (1. számú kit) végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy a polimorfizmus jelenléte egyértelműen csökkentette a CTO mennyiségét mind az egészséges, mind pedig a szarkoidózisos populációban. A CTO koncentráció átlagértéke a kontroll csoportban a homozigóta vad genotípusú egyénekénél volt a legmagasabb ($18,9 \pm 13,0$ $\mu\text{g/L}$, $n = 36$), a heterozigóta egyénekénél közepes CTO koncentrációt detektáltunk ($7,2 \pm 1,9$ $\mu\text{g/L}$, $n = 11$), míg a homozigóta Dup24 genotípusú egyének esetén nem volt detektálható a CTO koncentráció. Hasonló mintázatot figyelhetünk meg a szarkoidózisos betegcsoportban, habár az átlag CTO koncentráció szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll populációhoz képest (vad típus = $157,1 \pm 132,4$ $\mu\text{g/L}$, $n = 47$; heterozigóta: $63,16 \pm 56,5$ $\mu\text{g/L}$, $n = 29$). A homozigóta Dup24 genotípussal rendelkező szarkoidózisos betegek szérumban nem volt mérhető a CTO koncentráció ($n = 2$).

Meglepő módon kísérleteink során azonosítottunk egy egészséges fiatalembert, aki a Dup24 polimorfizmus hordozója ugyan, de mégsem rendelkezik detektálható szérumban mért CTO aktivitással sem pedig mérhető szérumban mért CTO koncentrációval.

A meghatározott CTO aktivitás és koncentráció értékek jelentős összefüggést mutattak (az egyenes meredeksége $0,979$ mU/ μg ; az illesztés pontossága: $r^2 = 0,846$; $n = 123$). Ez a látszólag állandó specifikus aktivitás arra enged következtetni, hogy a duplikációs polimorfizmus a CTO aktivitást és a koncentrációt egyaránt befolyásolja, ebből kifolyólag a CTO koncentráció meghatározása nem szolgáltat többlet információt a szarkoidózis laboratóriumi diagnosztikája során. A duplikációs polimorfizmus CTO koncentrációra kifejtett hatását egy második, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (2. számú kit) szintén megerősítettük. A meghatározott koncentráció értékek az előző mérés eredményeivel összhangban voltak (egyenes meredeksége = $0,968$; az illesztés pontossága: $r^2 = 0,954$, $n = 40$; $p < 0,001$).

4.5. A CHIT1 gén Del29 mutációjának azonosítása a magyar populációban

Kísérletes munkánk következő részében arra az egészséges egyénre koncentráltunk, aki csak hordozója a Dup24 duplikációs polimorfizmusnak, azonban szérum mintájából CTO aktivitás nem volt detektálható. A CHIT1 gén 10. exon szekvenciájának meghatározása megerősítette a Dup24 duplikációs polimorfizmus heterozigóta formáját, azonban ezzel továbbra sem magyarázható a CTO aktivitás hiánya.

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

A Del29 mutáció jelenléte egy 10 aminosav hosszúságú szakasz (322-331) delécióját eredményezi a CTO fehérjében, így egy trunkált CTO fehérje képződik. Amennyiben az egyén összetett heterozigóta formájában hordozza mindkét mutációt, ezen genetikai vizsgálatok eredményei magyarázattal szolgálhatnak a CTO aktivitás hiányára. A mutációk cisz-transz irányú elhelyezkedését PCR reakcióval, majd azt követően a PCR termékek Sanger szekvenálásával állapítottuk meg. Elsőként olyan PCR reakciót terveztünk, mely csak abban az esetben eredményez terméket, amennyiben a 9-es exon Del29 mutációja jelen van. Ekkor a PCR termék tartalmazza a teljes 10-es exont, mely nukleotid szekvenciája szekvenálással vizsgálható. Ez a PCR termék a gélelektroforézis során csak a vizsgált személy esetén volt megfigyelhető, míg a szekvenálás a vad típusú allél jelenlétét erősítette meg. A Dup24 polimorfizmus jelenlétét szintén egy PCR reakció segítségével igazoltuk, amelynek a terméke a teljes 9-es exont tartalmazta. A második PCR a Dup24 heterozigóta, homozigóta kontroll és a vizsgált egyén esetén is terméket eredményezett. A szekvenálás megerősítette a vad allél jelenlétét a vizsgált egyén 9-es exonjában, ezzel alátámasztva a Del29 és Dup24 mutációk transz elhelyezkedését.

5. Megbeszélés

Az ACE aktivitás a szarkoidózis diagnózisának felállítása és annak monitorozása során potenciális biomarkerként szolgálhat. Az ACE aktivitás meghatározható radioaktívan jelölt szubsztráttal, kolorimetriás és fluorometriás módszerekkel egyaránt, azonban nemrégiben kifejlesztésre került egy gyors, érzékeny fluoreszcens kinetikus esszé, mely egy quenched fluoreszcens szubsztrátot (Abz-FRK(Dnp)P-OH) alkalmazva méri az ACE aktivitását.

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

Annak ellenére, hogy Lieberman és Sastre már 1986-ban felhívta a figyelmet a szérums hígításának fontosságára, a jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő ACE aktivitás meghatározásához használható diagnosztikai reagensek gyártói a szérums minta csupán 5-, illetve 10-szeres hígítását javasolják. Lieberman és Sastre kísérleteik során arra a meglátásra jutottak, hogy az endogén gátló hatás megszüntetéséhez a szérums minta 48-szoros hígítása szükséges. Ez a megállapítás összhangban van az általunk mért eredményekkel, melyek szerint a 24-szeres hígítás alkalmazásakor az ACE még részben gátlás alatt áll, míg a 35-szörös hígítás esetén a gátló hatás látszólag teljesen megszűnik.

Endogén interferenciáról szóló tanulmányokban leírták, hogy a hemolízis és a bilirubin jelenléte interferenciát okozhat a fluoreszcens kinetikus aktivitásmérés során. Figyelembe véve az ACE aktivitás egyének közti enyhe variabilitását, illetve azt a tényt, hogy egyes szarkoidózisos betegeknél az ACE aktivitás csak kismértékben növekszik, az interferenciából adódó 10%-os ACE aktivitás csökkenés véleményünk szerint szignifikánsnak tekinthető. Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a bilirubin csökkenti az ACE aktivitást spektrofotometriás módszer alkalmazásakor, míg a radionukleotid-alapú meghatározást nem befolyásolja. A bilirubin képes közvetlenül hozzákötődni az ACE-hoz, ezáltal megváltoztatni annak konformációját, melynek következtében befolyásolhatja az ACE endothél sejtekről történő lehasadásának folyamatát, és talán az ACE aktivitást is. Hemolízis során a vörösvértestekből nagy mennyiségű hemoglobin szabadul fel. A hemoglobin 415 nm, 540 nm és 570 nm hullámhosszokon erős abszorbanciát mutat. A fluoreszcens kinetikai meghatározás során a fluoreszcencia intenzitást 405 nm-en mérjük, ebből kifolyólag a hemolizált szérums minták esetén a szabad hemoglobin részben elnyelheti az emittált fényt, mely az ACE aktivitás

látszólagos csökkenését eredményezheti. Másrészt azonban nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a hemoglobin közvetlen hatást gyakorol az ACE-ra. A lipémia 16 mM triglicerid koncentrációig nem befolyásolja a fluoreszcens ACE aktivitásmérést, tehát az éhgyomri mintavétel nem szükséges a meghatározás előtt. Ezen megállapítások alapján 0,71 g/L hemoglobin, illetve 150 μ M-nál magasabb bilirubin koncentráció esetén a szérum minták további hígítása szükséges annak érdekében, hogy ezen interferáló faktorok lehetséges hatásait kiküszöbölhessük az ACE aktivitás mérés során.

Kétszázegy magyar személy adatai alapján meghatároztuk az ACE aktivitás genotípus függő, és genotípus független referencia tartományait. Tudomásunk szerint, korábban még nem publikáltak ACE aktivitás referencia tartományokat fluoreszcens módszer alapján. A Klinikai és Laboratóriumi Szabványügyi Intézet és a Laboratóriumi Medicina Európai Szövetsége jelenlegi irányelvei szerint a referencia csoportba legalább 120 egyén beválogatása szükséges. Habár a genotípus független referencia csoport esetén teljesül ez a feltétel ($n = 201$), mindhárom genotípus függő csoportban kevesebb egyén van, mely limitáló tényező volt a referencia értékek meghatározása során. A referencia populáció *I/D* genotípus eloszlása (*II* = 19,4%; *ID* = 44,8%; *DD* = 72%) összhangban volt a korábban publikált kaukázusi csoportok adataival, illetve az ACE aktivitás átlag értékei szintén szignifikánsan különböztek a három genotípus között ($p < 0,0001$). Az általunk meghatározott genotípus függő referencia értékek 7,19 U/L (a *DD* genotípus alsó értékhatára) és 11,25 U/L (az *II* genotípus felső értékhatára) között átfednek egymással. Véleményünk szerint az ACE *I/D* genotípus meghatározása csak abban az esetben szükséges, amennyiben az ACE aktivitás értéke meghaladja a 11,25 U/L-t. A magasabb aktivitás értékkel rendelkező egyéneknél nagy előnyt jelent a genotípus meghatározása és a genotípus függő referencia értékek alkalmazása.

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

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

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

Az ACE gén *I/D* polimorfizmusa nem okoz aminosav változást az expresszált ACE fehérjében, mert a mutáció a gén introni szakaszában található. Az *I* allél jelenléte csökkenti a keringő ACE aktivitást, mellyel arányosan csökken az ACE fehérje mennyisége is. Ez azonban nem mondható el a Dup24 mutációról, ami egy viszonylag gyakori CTO polimorfizmus. A Dup24 duplikációs mutáció a CHIT1 gén 10-es exonjában található, melynek jelenléte a fehérjeszintézis korai terminálódását okozza. Ennek következtében a szintetizálódott CTO fehérje 29 aminosavval megrövidül és teljesen inaktív lesz. Kísérleteink során vizsgáltuk azt a felvetést, mely szerint az ELISA módszerrel meghatározott keringő CTO mennyiség növeli-e a CTO meghatározások pontosságát szarkoidózisban. Két különböző, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit-et alkalmaztunk, melyben az elfogó antitest nem a CTO fehérje katalitikus doménjéhez (a polimorfizmus által érintett terület) kötődik. Egyik ELISA teszt segítségével sem tudtuk kimutatni az inaktív fehérjét, így a keringő CTO koncentrációjának meghatározása annak aktivitása helyett nem javította a teszt diagnosztikai teljesítő képességét.

A Dup24 allél frekvenciája a kontinensek, továbbá az országok között is szignifikáns eltérést mutat. Kísérleteink során meghatároztuk a Dup24 allél előfordulásának gyakoriságát a magyar populációra vonatkozóan, mely más európai országok eredményeivel összehangban 21%-nak bizonyult. A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy fennáll annak a lehetősége, miszerint a Dup24 allélt hordozó szarkoidózisos betegek vizsgálata során a CTO alapú tesztek fals negatív eredményt adnak. A Dup24 genotipizálás és a genotípus függő CTO aktivitás referencia tartományok alkalmazása jelentős mértékben megnövelheti a CTO

diagnosztikai hatékonyságát (a heterozigóták esetén), mellyel jobban alátámasztható a szarkoidózis diagnózisa.

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

Kísérleteink során azonosítottunk egy olyan egészséges fiatal egyént, aki heterozigóta formában hordozza a Dup24 mutációt, azonban szérumban a CTO aktivitás nem volt meghatározható. A DNS szekvenálás során megállapítottuk, hogy ez a magyar férfi egy ritka mutációt hordoz a CHIT1 gén 9-es exonjában, mely szintén inaktív CTO enzim expresszióját eredményezi. Ebben az esetben sikeresen igazoltuk, hogy a Dup24 és Del29-es allélok a vizsgált személy esetében összetett heterozigóta formában vannak jelen, melynek következtében nincs mérhető CTO aktivitás.

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

A doktori értekezésben bemutatott új eredmények:

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

6. Összefoglalás

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

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

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

Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Csongrádi Alexandra
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csongrádi, A.**, Altorjay, I., Fülöp, G. Á., Enyedi, A., Enyedi, E. E., Hajnal, P., Takács, I., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Chitotriosidase gene polymorphisms and mutations limit the determination of chitotriosidase expression in sarcoidosis.
Clin. Chim. Acta. 513, 50-56, 2021.
IF: 3.786 (2020)
2. **Csongrádi, A.**, Enyedi, A., Takács, I., Végh, T., Mányiné Siket, I., Pólik, Z., 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. Soós, B., Fagyas, M., Horváth, Á., Végh, E., Pusztai, A., Czókolyová, M., **Csongrádi, A.**, Hamar, A. B., Pethő, Z., Bodnár, N., Kerekes, G., Hódosi, K., Szekanecz, É., Szamosi, S., Szántó, S., Szűcs, G., Papp, Z., Szekanecz, Z.: Angiotensin Converting Enzyme Activity in Anti-TNF-Treated Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis Patients.
Front. Med. 8, 1-11, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.785744>
IF: 5.091 (2020)





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,901

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

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

Debrecen, 2022.04.01.



Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

Jelen munkámat nagy szeretettel Szüleimnek ajánlom.

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

