

Fehérjevizsgálatok a Crohn-betegség laboratóriumi diagnosztikájában

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Szirmay Balázs

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető: Prof. Dr. Ludány Andrea

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécs, 2021

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	I
Ábrajegyzék	IV
Táblázatjegyzék	V
Rövidítések jegyzéke	VI
I. Bevezetés	1
I.1. Crohn betegség.....	1
I.1.1. Epidemiológia	1
I.1.2. Etiológia, pathomechanizmus	2
I.1.3. Klinikai kép.....	5
I.1.4. Diagnosztika.....	7
I.1.4.1. Aktivitási indexek.....	7
I.1.4.2. Laboratóriumi diagnosztika.....	10
I.1.4.3. Képpalkotó diagnosztika, endoszkópia, kórszövettan.....	12
I.1.5. A terápia irányvonalai	13
I.2. Laboratóriumi markerek szerepe a klinikai diagnosztikában.....	15
I.2.1. Orosomuroid	15
I.2.1.1. Az orosomuroid főbb tulajdonságai.....	15
I.2.1.2. Az orosomuroid biológiai funkciói.....	16
I.2.1.3. Orosomuroid a laboratóriumi medicinában	17
I.2.2. Cystatin-C	19
I.2.2.1. A cystatin-C főbb tulajdonságai	19
I.2.2.2. Cystatin-C a szérumban.....	20
I.2.2.3. Cystatin-C a vizeletben	20
I.2.3. Savoldékony szérumfehérjék	21
II. Célkitűzések	23
III. Anyagok és módszerek	25
III.1. Mintagyűjtés	25
III.2. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása	25
III.2.1. Műszer, reagensek	25
III.2.2. Módszer beállítások, validálási procedúra	26
III.2.3. Vizsgált csoportok	29

III.3. U-ORM szintek vizsgálata Crohn betegeknél	30
III.3.1. Vizsgált csoportok	30
III.3.2. U-ORM mérése automatizált immunturbidimetriás módszerrel	31
III.3.3. Egyéb laboratóriumi paraméterek meghatározása.....	31
III.4. Savoldékony szérumszűrő vizsgálata Crohn betegeknél	32
III.4.1. Vizsgált csoportok	32
III.4.2. A szérumszűrő perklórsavas extrakciója.....	32
III.4.3. Savoldékony szérumszűrő analízise denaturáló SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE).....	33
III.4.4. Savoldékony szérumszűrő analízise microchip gélelektroforézissel (MGE)....	34
III.4.5. Egyéb laboratóriumi paraméterek meghatározása.....	34
III.5. Statisztikai elemzések.....	35
IV. Eredmények.....	36
IV.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása	36
IV.1.1. Módszer validálás, interferencia, stabilitás vizsgálatok	36
IV.1.2. Előzetes referencia tartomány meghatározása	40
IV.1.3. Az u-CYSC teszt alkalmazása különböző betegcsoportok vizsgálatára	41
IV.2. Az u-ORM vizsgálata Crohn betegeknél az aktivitás függvényében.....	41
IV.2.1. A vizsgált egyének demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatai	41
IV.2.2. U-ORM és egyéb gyulladásos laboratóriumi paraméterek mérése	44
IV.2.3. Korrelációs vizsgálatok	46
IV.2.4. ROC analízis	46
IV.3. Savoldékony szérumszűrő vizsgálata Crohn betegeknél	47
IV.3.1. A vizsgált egyének demográfiai és laboratóriumi adatai	47
IV.3.2. A szérumszűrő minták savoldékony fehérjetartalma	48
IV.3.3. A savoldékony szérumszűrő SDS-PAGE mintázata	48
IV.3.4. A savoldékony szérumszűrő MGE analízise	49
V. Megbeszélés	53
V.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer beállítása, validálása, klinikai alkalmazása.....	53
V.2. Az u-ORM, mint a Crohn betegség aktivitásának lehetséges markere	55
V.3. Savoldékony szérumszűrő vizsgálata Crohn betegeknél	57
V.4. Vizsgálataink korlátai	59
VI. Összegzés	61
VII. Irodalomjegyzék	63

VIII. Publikációs lista.....	75
VIII.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények	75
VIII.2. A disszertációhoz nem használt közlemények	75
VIII.3. Könyvfejezetek.....	75
VIII.4. A disszertációhoz kapcsolódó előadások és posztterek.....	76
VIII.5. A disszertációhoz nem kapcsolódó előadások és posztterek	77
IX. Köszönetnyilvánítás	80

Ábrajegyzék

1. Ábra: A hagyományos elv szerinti terápiás szintek Crohn betegségben.....	14
2. Ábra: Az ORM szerkezete.....	16
3. Ábra: A CYSC szerkezete	19
4. Ábra: A Cobas 8000 automata.....	26
5. Ábra: Az 1,0 mg/l CYSC koncentrációjú kalibrációs oldat reakciókinetikája.....	27
6. Ábra: Az LOQ érték meghatározása a CV% – u-CYSC görbe alapján	28
7. Ábra: Az u-CYSC teszt kalibrációs egyenese (A) és linearitása (B)	37
8. Ábra: Az u-CYSC teszt dózis-válasz görbéje.....	37
9. Ábra: Egészséges egyének u-CYSC és u-CYSC/u-CREAT adatai	40
10. Ábra: Crohn betegek és kontroll egyének u-ORM/u-CREAT adatai.....	45
11. Ábra: ROC analízisek a Crohn betegség aktív és inaktív fázisának elkülönítésére	47
12. Ábra: SDS-PAGE során nyert, ezüstözött savoldékony fehérjemintázatok.....	49
13. Ábra: MGE során nyert savoldékony fehérjeprofilok és gélképek	52

Táblázatjegyzék

1. Táblázat: Montreal klasszifikáció.....	6
2. Táblázat: A HBI számítása.....	8
3. Táblázat: A PCDAI számítása.....	9
4. Táblázat: Sorozaton belüli és sorozatok közötti pontatlanság.....	38
5. Táblázat: Az u-CYSC stabilitás vizsgálatának adatai	39
6. Táblázat: A vizsgált csoportok demográfiai és laboratóriumi adatai	41
7. Táblázat: A vizsgált Crohn betegek Montreal klasszifikációja.....	42
8. Táblázat: Fiatalkorú Crohn betegek és kontrollok demográfiai és laboratóriumi adatai	43
9. Táblázat: Felnőttkorú Crohn betegek és kontrollok demográfiai és laboratóriumi adatai ...	44
10. Táblázat: Az u-ORM/u-CREAT korrelációs adatai gyermekkorú Crohn betegeknél.....	46
11. Táblázat: Az u-ORM/u-CREAT korrelációs adatai felnőtt Crohn betegeknél	46
12. Táblázat: A vizsgált csoportok demográfiai és laboratóriumi adatai	48
13. Táblázat: A savoldékony szérumfehérjék MGE-vel nyert profiljának komponensei	50

Rövidítések jegyzéke

AIEC: adherent-invasive *Escherichia coli*

AKI: akut vesekárosodás (acute kidney injury)

ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody

AUC: görbe alatti terület (area under the curve)

BSA: bovine serum albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CD: Crohn betegség (Crohn's disease)

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CRP: C-reaktív protein

CRRT: folyamatos vesepótló kezelés (continuous renal replacement therapy)

CV: variációs koefficiens (coefficient of variation)

CYSC: cystatin-C

DM: diabetes mellitus

DN: diabeteses nephropathia

DMSO: dimetil-szulfoxid

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ESR: vörösvértest-süllyedés (erythrocyte sedimentation rate)

GWAS: genomszintű asszociációs vizsgálat (genom wide association scan)

hsCRP: nagy érzékenységű C-reaktív protein (high sensitivity C-reactive protein)

IBD: gyulladásoos bélbetegség (inflammatory bowel disease)

IL: interleukin

IQR: interkvartilis (interquartile range)

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

LOB: limit of blank

LOD: limit of detection

LOQ: limit of quantification

LPS: lipopoliszacharid

MGE: microchip gel electrophoresis

NO: nitrogén-monoxid

ORM: orosomuroid

p-ANCA: perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis
PCA: perklórsav (perchloric acid)
PLT: trombocitaszám
RA: rheumatoid arthritis
ROC: receiver operating characteristic
SD: szórás (standard deviation)
SDS: nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
se-CYSC: szérumban cystatin-C
se-ORM: szérumban orosomuroid
se-TP: szérumban összfehérje (total protein)
SLE: systemas lupus erythematosus
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
UC: colitis ulcerosa (ulcerative colitis)
u-CREAT: vizelet kreatinin
u-CYSC: vizelet cystatin-C
u-ORM: vizelet orosomuroid
u-TP: vizelet összfehérje (urinary total protein)
WBC: fehérvérsejtszám

I. Bevezetés

I.1. Crohn betegség

A Crohn betegség (Crohn's disease, CD) a colitis ulcerosával (ulcerative colitis, UC) együtt képviselik a gyulladós bélbetegségek (inflammatory bowel diseases, IBD) két fő entitását. A betegség nevét Burril B Crohn (1884 - 1983) amerikai gasztroenterológusról kapta, aki 1932-ben kollégáival (Gordon Oppenheimer és Leon Ginzburg) közölte a betegséggel kapcsolatos megfigyeléseit, melyet regionális ileitisnek nevezett (1).

A CD az emésztőrendszer hullámozó lefolyású, krónikus gyulladós betegsége, melyet aktív (relapszus) és inaktív (remisszió) periódusok jellemeznek. A gasztrointesztinális traktus bármely szakasza érintett lehet a szájüregtől az anusig. A gyulladás szakaszosan, nem összefüggő jelleggel jelenik meg a nyálkahártyán, azonban a bélfal teljes rétegvastagságára kiterjed. A nyálkahártya jellegzetes mintázata az utcakő rajzolat. A CD típusos szövődményei a bél lumen szűkületek, hasüregi és végbéltáji tályogok, sipolyok (2).

I.1.1. Epidemiológia

Az IBD előfordulására világszerte növekvő tendencia jellemző mind a felnőttkori, mind a gyermekkori kezdet vonatkozásában, kisebb különbségeket mutatva a földrajzi elhelyezkedés függvényében. Észak-Amerikát, Nyugat- és Észak-Európát tekintve a 20. század 2. felében meredeken nőtt az IBD incidenciája, azonban az 1990-es évektől kezdve stabilizálódni látszik ez a mutató. Az utóbbi 3 évtizedben egyre inkább stagnáló incidenciáról adnak számot a felmérések, töretlenül emelkedő prevalencia mellett. Ázsia, Dél-Amerika, Kelet-Európa országában viszont az előző évtizedekben indult meg az incidencia rohamos emelkedése – feltehetően az “elnyugatiasodás” folyamatának következtében. A CD legmagasabb incidenciát Ausztráliában regisztrálták (29,3/100 000 lakos), prevalenciája Észak-Amerika és Nyugat-Európa egyes területein már meghaladja a 0,3%-ot. Az IBD bármely életkorban megjelenhet, azonban CD-ben 20-30, UC-ben 30-40 éves kor között incidenciája csúcs figyelhető meg (3, 4).

Magyarországon Veszprém megyéből származó adatok alapján az IBD incidenciája többszörös emelkedést mutat az utóbbi évtizedek alatt. Ennek eredményeként 2002 és 2006 között CD esetében már 8,9; UC-ben 11,9-es értéket tapasztaltak 100 000 lakosra vonatkoztatva, melyek elérik a nyugat-európai országokra jellemző szintet. A megfigyelt

emelkedő tendencia háttérben felmerül környezeti tényezők szerepe, valamint a diagnosztikai eszközök érzékenységének fejlődése (5, 6).

A betegek több mint negyedénél az IBD megállapítása gyermek-, vagy serdülőkorban történik. A 20 évnél fiatalabb korosztályon belül a betegség kezdete leggyakoribb a késői tizenéves korban, azonban a betegek 4%-át 5 éves kor előtt diagnosztizálják (7). Több mint 30 országból származó adatokat feldolgozó tanulmányok arra következtettek, hogy a gyermekkori IBD incidenciájában is általános, nemzetközi emelkedés figyelhető meg, kifejezetten a CD esetében. A legmagasabb értékeket (12-14/ 100 000 lakos) észak-európai, valamint észak-amerikai államokban regisztrálták (8, 9).

I.1.2. Etiológia, pathomechanizmus

A CD még ma is tisztázatlan etiológiájú, multifaktoriális betegség. A rendelkezésre álló ismeretek alapján genetikai és környezeti hatások interakciója jelenti a CD etiológiai háttérét (10). A pathomechanizmust tekintve valószínűleg az immunszabályozás zavara játszik elsődleges szerepet a betegség kifejlődésében, elsősorban a normál bélflórával szembeni kóros immunválasz vezet a krónikus bélgyulladás kialakulásához. Ezek alapján a CD általánosan egy immunmediált állapotként határozható meg, mely genetikailag fogékony egyéneknél alakul ki, akikben a betegség kezdetét környezeti faktorok (pl. táplálkozás, mikrobiológiai ágensek, gyógyszerek) idézik elő. A genetikai adottságok elsősorban az immunrendszer működését befolyásolják. A környezeti összetevők a bél nyálkahártya barrier funkciójára, a bélrendszer mikrobiológiai egyensúlyára gyakorolnak hatást, mely által a bélrendszerhez köthető immunválaszok túlzott stimulációját okozhatják. A betegség háttérben álló tényezők különböző mértékű jelenléte miatt a pathogenezis molekuláris szinten egyedivé válhat az egyes betegeknél, mely a személyre szabott terápiás megoldások szükségességére hívja fel a figyelmet (11).

A családi anamnézis szerepét vizsgálva megállapították, hogy a CD előfordulása első-, másod- valamint harmadfokú rokonok esetében is fokozott kockázatot jelent (12). Azonban az esetek mindössze 13,1%-a magyarázható a CD asszociált génváltozatok öröklődésével, mely tény az epigenetikai és egyéb környezeti faktorok jelentőségét emeli ki (13).

Jelenleg a genetikai mutációk tesztelése CD-ben csupán kutatási célokat szolgál, egyelőre nem bizonyított a hasznosságuk sem a diagnosztika, sem a kezelés szempontjából (10).

A CD-vel kapcsolatos genetikai vizsgálatok egyrészt a betegség pathomechanizmusának megértésére, tisztázására, másrészt új lehetséges terápiás célpontok felfedezésére irányulnak. Genomszintű asszociációs vizsgálatok (GWAS) során 163 locust azonosítottak, melyek összefüggésben állnak az IBD-vel, ezek közül 30 kapcsolódik specifikusan a CD-hez. Az azonosított gének termékei fontos szerepet játszanak az immunrendszer érzékenységének és válaszkészségének szabályozásában a bél nyálkahártyával érintkező mikrobákkal szemben. Az IBD-ben kimutatott bizonyos génvariánsok, polimorfizmusok, mutációk jelenléte a kódolt fehérje diszfunkcióját okozhatja, ami hozzájárul az IBD-hajlam kialakulásához.

A NOD2 egy bélhámsejtek és monocita-szerű immunsejtek által termelt citoszolikus mintázat felismerő receptor, mely az intracelluláris baktériumokkal szembeni immunitást szabályozza. Emellett részt vesz a veleszületett immunfolyamatok modulálásában az interleukin-23 (IL-23) gátlása által. A NOD2-nek szabályozó szerepe lehet a bélrendszer mikrobiológiai összetételére nézve is, humán vizsgálatban kapcsolatot fedtek fel a NOD2 kockázatot jelentő alléljai és az Enterobacteriaceae fajok fokozott jelenléte között (11).

Az autofágia az epithel sejtek mechanizmusa, mely által képesek citoplazmatikus anyagokat lizoszomális úton lebontani. Az autofágia fontos szerepet játszik az invazív baktériumfajok szaporodásának gátlásában (13). A GWAS során az autofágiáért felelős génekben (ATG16L1, IRGM, LRRK2) is felfedeztek polimorfizmusokat Crohn betegeknél. Az autofágia mechanizmusának defektusa kedvező a CD-asszociált adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) baktériumok intracelluláris elszaporodásának, mely hozzájárulhat a CD kialakulásához.

Az IL-23 receptorból kiinduló jelátvitel fokozott Th17 választ eredményez és csökkenti a regulatorikus T-sejtek differenciálódását és az antiinflammatorikus IL-10 termelését. A Th17 válasszal összefüggő citokinek emelkedett szintet mutatnak a gyulladós bélbetegek szérumában. Valószínűsíthetően a Th17 válasz féktelen, szabályozatlan működése játszik szerepet a CD-ben észlelhető gyulladás kialakulásában. Ebből adódóan az IL-10, az IL-23 és receptoraik egyes génvariánsai és mutációi jelentős tényezők lehetnek a CD-re való fogékonyság hátterében.

A bélrendszer mikrobái elengedhetetlenül fontosak a gazdaszervezet immunrendszerének alakításában. A mikrobiológiai összetétel alapvetően befolyásolja a regulatorikus T-sejtek működését. A mikrobák metabolizmusának termékei, kifejezetten a rövid szénlácú zsírsavak (*Faecalibacterium prausnitzii*) és a poliszacharid A (*Bacteroides*) indukálhatják

a regulatorikus T-sejt választ, ezáltal korlátolva a Th17 választ, mely felelős lehet a CD-ben fennálló gyulladásért (11).

Ismert jelenség CD-ben és UC-ben egyaránt a bélrendszer mikrobiális sokféleségének beszűkülése. Crohn betegekénél végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a genetikai adottságok és a betegség lokalizációja összefüggnek a bélnyálkahártya megváltozott mikrobiális összetételével. Elsősorban a Firmicutes törzs (*Faecalibacterium prausnitzii*) arányának csökkenését és az Enterobacteriaceae család (*E. coli*) arányának növekedését figyelték meg. CD-ben gyakrabban fordulnak elő szerzett virulencia faktorok következtében fokozottan adhezív és invazív *E. coli* baktériumok (AIEC). Ezek ellenállóbbak az autofágiával szemben, ezáltal képesek perzisztáló gyulladással válaszreakciót fenntartani nagy mennyiségű tumor necrosis factor- α (TNF- α) termelődése mellett.

A CD aktív fázisában a bél nyálkahártya fokozott permeabilitását figyelték meg, mely által a baktériumok és egyéb antigének bejuthatnak a submucosa rétegébe, kiváltva a veleszületett immunrendszer aktivációját (11, 14).

IBD-ben szenvedő betegek bél nyálkahártyájában eltérő gomba flórát is megfigyeltek egészséges egyénekhez képest. Felmerült a vírusok potenciális szerepe is a CD pathogenezisében. Széklet mintákból betegség specifikus vírus profilt is azonosítottak. A bakteriofágok szerepet játszhatnak a bakteriális bélflóra összetételének megváltozásában.

Az étrend, a dohányzás, az antibiotikum használat olyan környezeti körülmények, melyek magas kockázatot jelentő mikrobiális összetételt eredményezhetnek a CD-re irányuló fogékonyság tekintetében (11). A dohányzás, mintegy megkétszerezi a CD kockázatát, melyben a passzív dohányzás szerepét is leírták. A csecsemőkori antibiotikum-használat szintén növeli a fogékonyságot CD-re. A táplálkozást tekintve az élelmi rostok bevitelének csökkenése és a telített zsírsavak, cukrok túlzott bevitelére mutat kockázatfokozó hatást. Számos egyéb környezeti faktor (pl. non-szteroid gyulladáscsökkentők, nyomelemek, vitaminok) összefüggését is vizsgálták a CD-vel, melyek azonban nem mutattak egyértelmű eredményeket. Az azonosított környezeti összetevők kockázatfokozó hatása viszont nem figyelhető meg egyöntetűen minden populáció esetében (10, 13).

Az életmódbeli tényezők közül az alvászavar, a stressz, a depresszió magasabb kockázatot jelentenek a CD-re nézve, a rendszeres fizikai aktivitás viszont kockázatcsökkentő hatású (10).

Egy nagy esetszámú kohorsz vizsgálat során magasabb CD incidenciát figyeltek meg appendectomián átesett egyének között, ugyanakkor az appendectomia és a CD kapcsolata vitatott (15).

I.1.3. Klinikai kép

A Crohn betegek tipikusan krónikus hasmenés, hasi fájdalom, fogyás, fáradékonyság tünetegyüttesével jelentkeznek. A hasi fájdalom legtöbbször görcsös jellegű és a jobb alsó kvadránsra lokalizálódik. Vastagbél érintettség esetén a széklet véressé, nyákossá válhat, emellett végbélvérzés is megjelenhet. Egyeseknél hányinger, hőemelkedés, láz is felléphet. A betegek több mint felénél megfigyelhetők extraintesztinális manifesztációk, melyek a bőrre (erythema nodosum), száj nyálkahártyára (aphták), ízületekre (arthritis, arthralgia), szemre (uveitis, episcleritis), májra (cholangitis) terjedhetnek ki. A hullámzó, krónikus lefolyás következtében a betegek élethosszig tartó gasztroenterológiai gondozást igényelnek. A CD-re a hullámzó lefolyás mellett progresszivitás is jellemző: a betegség előrehaladtával nő a komplikációk előfordulása, melyek a bélrendszer folyamatos szerkezeti és funkcionális károsodását eredményezik. A bél lumen szűkületek, tályogok, sipolyok a betegek kb. felében idővel kialakulnak, melyek miatt gyakran sebészi beavatkozás válik szükségessé (13). A perianalis fistulák végbélnyílás körüli fájdalmat, folyamatos váladékozást, fájdalmas székletürítést, széklet inkontinenciát okozhatnak, mely panaszok az életminőség további jelentős romlását idézik elő. A perianalis és hasüregi tályogok potenciális szepszisforrást jelentenek. A CD súlyos, elhanyagolt eseteiben a bélfal perforációjával is szembesülhetünk. További lehetséges komplikáció a gyulladás ráterjedése a környező szervekre (pl. húgyhólyag, méh) és következményes hasüregi összenövések képződése.

A kiterjedt és tartósan fennálló bélrendszeri gyulladás, gátolva a tápanyagok felszívódását, sok esetben súlyvesztéshez, hiányállapotokhoz vezet. A legjellemzőbb hiányállapotok közé a kalcium, cink, vas, folsav, B12- és D-vitamin hiány tartoznak. A vas és B12-vitamin hiány gyakori okai a CD-ben kialakuló vérszegénységnek. A malnutríció növeli a fertőzésekre való fogékonyságot és a mortalitást. Crohn betegek között közel kétszer gyakoribb a szorongás és a depresszió előfordulása az egészséges populációhoz képest, melyben szerepet játszanak a krónikus hasi fájdalom és a betegséggel összefüggő alvászavarok (10).

Gyermekkorban figyelemfelhívó lehet a növekedésben és súlygyarapodásban való elmaradás, mely akár évekkkel is megelőzheti az intesztinális tünetek megjelenését. A gyermekkori CD további jellegzetes tünetei a vérszegénység, láz, ízületi panaszok, a pubertás késése, elégtelen csont mineralizáció (7, 16).

A betegek prognosztikai csoportosítására elsősorban a Montreal klasszifikáció használatos, mely a diagnóziskori életkort, a betegség kiterjedését és viselkedését veszi figyelembe (1. táblázat) (17). Gyermekgyógyászati pácienseknél ajánlott a Paris klasszifikáció használata is, mely az előbbi módosított változata (18). A betegség kezdetét tekintve a 9-10 évesnél idősebb gyermekeknél többnyire jellemző – a felnőttkori kezdethez hasonlóan – a terminális ileum gyulladása. Ezzel szemben az 5 évnél fiatalabbaknál sokkal gyakrabban észlelhető a vastagbél izolált érintettsége más korcsoportokhoz képest. A perianalis lokalizáció és a betegség viselkedése viszont nem mutat különbséget a kezdet életkorának függvényében. Nagy esetszámú vizsgálatok alapján arra következtettek, hogy a gyermekkorban és a felnőttkorban kezdődő CD viselkedése és lefolyása nem különbözik szignifikánsan. A diagnózis idején az esetek körülbelül 20%-ánál tapasztalható strikturáló vagy penetráló viselkedés, amely arány folyamatosan növekszik a betegség fennállásának éveivel (7, 18).

életkor a diagnóziskor	A1	<17 év
	A2	17-40 év
	A3	>40 év
a betegség kiterjedése	L1	ileum
	L2	colon
	L3	ileum és colon
	L4*	felső gasztrointesztinális szakasz
a betegség viselkedése	B1	nem strikturáló, nem penetráló
	B2	strikturáló
	B3	penetráló
	p**	perianalis érintettség
*L4 kombinálódhat L1-L3-mal		
**p kombinálódhat B1-B3-mal		

1. Táblázat: Montreal klasszifikáció.

I.1.4. Diagnosztika

A CD diagnózisa a klinikai tünetek mellett laboratóriumi, radiológiai, endoszkópos és szövettani vizsgálatok eredményeinek együttes figyelembevételével születik meg.

A beteg panaszai alapvetően a betegség lokalizációjától, viselkedésétől és a gyulladás súlyosságától függenek. A has fizikális vizsgálata során gyakran észlelhető terime a jobb alsó kvadránsban, mely utalhat megvastagodott bélkacsok vagy tályog jelenlétére is. A perianalis régió vizsgálatával bőrléziók, fissurák, fistulák fedezhetők fel. A betegek gondozása a gyulladásos aktivitásnak, a betegség kiterjedésének és a szövődmények meglétének rendszeres felmérését, értékelését foglalja magába.

A gyulladás kiterjedésének, aktivitásának megítélése, a lehetséges komplikációk prognosztizálása kiemelt jelentőséggel bír a terápiás döntéshozatalban (13).

I.1.4.1. Aktivitási indexek

A CD aktivitásának megítélésére a járóbeteg szakrendeléseken is egyszerűen kiszámítható pontrendszereket fejlesztettek ki, melyek jelentős részben a beteg tüneteinek, szubjektív panaszain alapulnak. A kapott pontszám alapján a betegek aktív (relapszus) vagy inaktív (remisszió) csoportokba sorolhatók, illetve egyes indexek megkülönböztetnek enyhe és közepes-súlyos aktivitású állapotot is. Az index meghatározása jelenti az állapotfelmérés alapját, ezáltal a terápiára adott válasz ellenőrzésére is szolgál.

A Crohn's Disease Activity Index (CDAI) a hasmenés súlyossága, az általános állapot és a komplikációk mellett figyelembe veszi a hematokrit érték és a testsúly eltérését is (19). A Harvey-Bradshaw Index (HBI) számítása csak klinikai paramétereken alapul, mely egyszerű és gyors meghatározást tesz lehetővé (2. táblázat) (20). Számos egyéb pontrendszer is kidolgozásra került (pl. van Hees Index, Inflammatory Bowel Disease Questionnaire), melyek többé-kevésbé terjedtek el a gyakorlatban (21).

Fiatalkorú betegeknél a Paediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) a leginkább alkalmazott pontrendszer, mely számításba vesz laboratóriumi paramétereket, és tényezői között szerepel a testi fejlődésben való elmaradás is (3. táblázat) (22).

Klinikai változók Crohn-betegségben	Pontszám
Általános állapot, közérzet	0: jó, 1: közepes, 2: gyenge, 3: nagyon gyenge, 4: nagyon rossz
Hasi fájdalom erőssége	0: nincs, 1: enyhe, 2: közepes, 3: súlyos
Folyékony vagy laza székletek száma egy nap alatt	1 pont/alkalom
Hasi terime	0: nincs, 1: kérdéses, 2: biztos, 3: biztos és nyomásérzékeny
Komplikációk: <ul style="list-style-type: none"> • arthritis vagy arthralgia • iritis vagy uveitis • erythema nodosum • pyoderma gangrenosum • aphthosus léziók • analis fissura • új fistula • tályog 	1 pont/komplikáció

2. Táblázat: A HBI számítása.

vizsgált paraméterek	Pontszám
anamnézis, panaszok	
Általános állapot, közérzet, korlátozottság az életkornak megfelelő napi cselekvésekben	0: jó, nincs korlátozottság a napi cselekvésekben 5: közepes, alkalmanként korlátozottság a napi cselekvésekben 10: nagyon rossz, gyakori korlátozottság a napi cselekvésekben
Hasi fájdalom erőssége	0: nincs 5: enyhe, 10: közepes-súlyos
székletek száma egy nap alatt	0: 0-1 folyékony, nem véres széklet 5: >2 laza széklet kevés vérrel, vagy 2-5 folyékony széklet 10: jelentős vérzés, vagy >5 folyékony széklet, vagy éjszakai hasmenés
laboratóriumi paraméterek	
hematokrit: <10 éves 11-19 éves lány 11-14 éves fiú 15-19 éves fiú	0: >32%; 2,5: 28-32%; 5: <28% 0: >33%; 2,5: 29-33%; 5: <29% 0: >34%; 2,5: 30-34%; 5: <30% 0: >36%; 2,5: 32-36%; 5: <32%
vörösvértest-süllyedés	0: <20 mm/h 2,5: 20-50 mm/h 5: >50 mm/h
szérum albumin	0: >34 g/l 5: 31-34 g/l 10: <31 g/l
fizikális vizsgálat	
testtömeg	0: súlygyarapodás 5: stagnálás vagy 1-9% súlyvesztés 10: >10% súlyvesztés
a testmagasság percentilis értékének csökkenése diagnóziskor a betegség előtti állapothoz képest	0: nincs, vagy sávon belül 5: 1 sávval lejjebb 10: ≥ 2 sávval lejjebb
a testmagasság növekedésének üteme a követés során	0: ≥ -1SD 5: < -1SD és > -2SD 10: ≤ -2SD
a has tapintási lelete	0: nincs nyomásérzékenység, nincs terime 5: nyomásérzékenység, vagy nem érzékeny terime 10: nyomásérzékenység, izomvédekezés, határozott terime
perianalis tünetek	0: nincs, vagy reakciómentes bőrfüggelékek 5: 1-2 nem aktív fistula, nincs érzékenység 10: aktív váladékozó érzékeny fistula, vagy tályog
extraintesztinális manifesztációk (láz, arthritis, uveitis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum)	0: nincs 5: 1 10: ≥ 2

3. Táblázat: A PCDAI számítása.

I.1.4.2. Laboratóriumi diagnosztika

A laboratóriumi vizsgálatok fontos szerepet játszanak a CD differenciál-diagnosztikájában, a gyulladással kapcsolatos aktivitás felmérésében és a terápiára adott válasz monitorozásában is. Azonban a klinikai laboratóriumi diagnosztikában jelenleg nem ismert olyan paraméter, mely specifikus lenne a CD diagnózisának megalkotására, vagy az aktivitás megítélésére vonatkozóan. Számos markert vizsgáltak már, – elsősorban vérből, de székletből és vizeletből is – melyek jelezhetik a bélrendszer gyulladását CD-ben, azonban eddig csupán néhány vált közülük széleskörűen alkalmazottá a klinikai gyakorlatban (23).

A CD aktivitásának megítélésére a C-reaktív protein (CRP) a legszélesebb körben alkalmazott gyulladást jelző marker (24). A CRP a máj által proinflammatorikus citokinek hatására termelt nem specifikus akut fázis fehérje. A CRP jelentős diagnosztikus értékkel bír az aktív CD és a funkcionális bélbetegségek, továbbá az aktív és inaktív CD elkülönítésében (25). A CRP előnye, hogy viszonylag rövid féleletidejének (~19 óra) köszönhetően gyorsabb válaszkészséggel rendelkezik, mint a legtöbb akut fázis fehérje, ezáltal alkalmas a terápia hatékonyságának szoros ellenőrzésére is (23). Megfigyelték, hogy a CRP gyengén korrelál az endoszkóppal észlelt aktivitással, valamint az enyhe - mérsékelt fokban aktív betegek jelentős hányadánál nem mutat emelkedést. A gyulladással járó bélbetegségek között 15%-ban pedig egyáltalán nem alakul ki CRP válasz. Izolált vékonybél érintettség esetén szintén alacsony szenzitivitást írtak le. Ebből adódóan egy negatív CRP teszteredmény önmagában nem alkalmas az aktív gyulladással járó állapot biztonságos kizárására (26, 27). Módszertanilag a CRP mérésére a nagy érzékenységgel rendelkező hsCRP (high sensitivity CRP) teszt használatos a klinikai laboratóriumokban.

A hsCRP mellett a vörösvértest-süllyedést is széles körben alkalmazzák az IBD aktivitási markereként, különösképpen gyermekeknél, mivel ez a PCDAI számításának egyik eleme is. Előnye, hogy olcsó és egyszerű vizsgálat, értékét azonban számos individuális és pathofiziológiai tényező befolyásolja, emiatt specifikitása meglehetősen alacsony IBD-ben. A hsCRP-nél lassabban reagál a gyulladással járó aktivitás változásaira, ezért kevésbé alkalmas a terápia hatékonyságának ellenőrzésére (25), továbbá a vékonybél gyulladása esetén az érzékenysége sem megfelelő (28).

Megfigyelték, hogy aktív CD-ben emelkedett trombocitaszám jellemző szemben a fertőzőes eredetű hasmenéssel (24, 25). A trombocitaszám viszonylag széles referencia tartománnyal rendelkezik és emelkedéséhez többek között a vashiányos állapot is hozzájárulhat, emiatt kevésbé informatív aktivitási marker (29, 30).

Ismert, hogy az IBD aktív fázisában jellemző a fehérvérsejtszám emelkedése is. Különösen a tályogok jelenléte erőteljesebb granulocitaszám emelkedést eredményezhet. A fehérvérsejtszám specificitása viszont meglehetősen alacsony, emiatt kevésbé hasznos aktivitási markernek tartják (24, 31).

Megfigyelték, hogy a szérum orosomucoid jól korrelál az IBD aktivitásával, ezért hasznos a betegek követésében. Hosszabb féléletideje (5 nap) miatt viszont korlátozottan alkalmazzák a gyakorlatban (31, 32).

Egyes pro- és anti-inflammatorikus citokinek (pl. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) expressziója markánsan emelkedik a gyulladt bélnyálkahártyában az IBD aktív fázisában, azonban szérum szintjük nem mindig változik ezzel összhangban, emiatt diagnosztikus értékük kérdéses (24, 28).

Egyebek mellett felmerült még a szérum β 2-mikroglobulin, a szolubilis adhéziós molekulák és a neutrofil elasztázok potenciális szerepe is a CD laboratóriumi diagnosztikájában. Egyes közlemények hasznosnak találták ezeket az aktivitás értékelésében, de diagnosztikus teljesítményük gyengébbnek bizonyult a klasszikus gyulladási paraméterekéhez képest, megítélésük többnyire ellentmondásos (28).

A krónikus gyulladás okozta felszívódási zavar és vérzés gyakran hiányállapotokhoz, vérszegénységhez vezet. A malnutríció és az anaemia felderítéséhez többek között a vérkép, a vasháztartás paraméterei, a B12 vitamin és folsav szintek, valamint a szérum albumin mérése nyújt információt. Vese- és májfunkciós vizsgálatok, vírus szerológiai vizsgálatok a gyógyszeres terápia tervezéséhez, a mellékhatások ellenőrzéséhez szükségesek (29).

A szerológiai markerek közül az ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody) és p-ANCA (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody) tesztek elvégzik az IBD gyanúja esetén. Segítséget nyújthatnak a CD és az UC differenciálásában, bár alacsony szenzitivitásuk miatt diagnosztikus értékük csak kiegészítő szereppel bír. A pozitív ASCA és negatív p-ANCA eredményeket a CD-re utaló jelnek tekintik (33, 34).

A széklet markerek jelentős teret nyertek a CD laboratóriumi diagnosztikájában az utóbbi egy-két évtizedben. Előnyük, hogy nagyobb specificitást mutatnak a bélrendszeri gyulladási állapotokra nézve (bélrendszerre nézve szelektív gyulladási markerek). Hátrányuk a magas egyéni variabilitás (23). Közülük a calprotectin és a lactoferrin a legtöbbet vizsgált és a gyakorlatban is elterjedt aktivitási markerek, melyek a bélnyálkahártyába migráló fehérvérsejtek által termelt antimikrobiális fehérjék. A széklet markerek kifejezetten hasznosak, ha egy aktivitás tüneteit mutató beteg hsCRP szintje nem

emelkedett. A calprotectin magas negatív prediktív értékkel rendelkezik az IBD és az IBS elkülönítésében, alkalmazható a relapszus prediktoraként is (25). Aktivitási markerként magas érzékenységet mutat a vastagbél gyulladására nézve és korrelál az endoszkópos aktivitással. Ugyanakkor izolált ileum érintettségben kevésbé szenzitívnek tűnik, továbbá nem eléggé specifikus IBD-re: értéke infekciók, colorectalis carcinoma esetén is lehet emelkedett (29, 35, 36). A calprotectin napokig stabil a székletmintában. Méréséhez ELISA és immunkromatográfiás gyorsesztek is rendelkezésre állnak (25). Labortechnikai szempontból azonban a széklet fehérjeszintek interpretálása nehézkes a széklet inhomogenitása, a minták változó víztartalma és az egyezményes cut-off értékek hiánya miatt (35). Hátrányt jelenthetnek a mintavétellel kapcsolatos nehézségek is.

A vizeletfehérjék információs értéke a CD vonatkozásában máig feltérképezetlen területnek számít. A vizeletfehérjék közül eddig a mikroalbuminról számoltak be, mely az aktivitás indikátora lehet IBD-ben (37, 38). Többféle vizeletből mért molekula is kutatások tárgyát képezi jelenleg, melyek a CD potenciális aktivitási markereiként szolgálhatnak a későbbiekben (24). Például a vizelet neopterin korrelációt mutat a CD aktivitásával, ugyanakkor nem specifikus marker (31).

I.1.4.3. Képkalkotó diagnosztika, endoszkópia, kórszövettan

Mind a diagnózis megállapításakor, mind a betegek gondozása során szerepet kapnak a képkalkotó eljárások. A hasi ultrahang a megvastagodott bélszakaszok, tályogok kimutatására szolgálhat, továbbá a hasi szervek általános állapotának megítélését is lehetővé teszi (39). CT és MRI vizsgálatokat általában műtétek előtt végeznek a bélfal elváltozásainak és a tályogok pontos lokalizációjának meghatározására. Az MR-enterográfia a vékonybél érintettség, fistulák felderítésében jelent segítséget. A képkalkotó vizsgálatok szerepe növekszik a betegek gondozása során a komplikációk szűrésében és a terápiára adott válasz követésében (13).

Továbbra is az endoszkópia jelenti a CD diagnosztizálásában és aktivitásának megítélésében is a “gold standard” vizsgálómódszert. Ennek során áttekintő képet kap a szakorvos a gyulladás kiterjedéséről és súlyosságáról, tájékozódhat szűkületek, fistulanyílások jelenlétéről, lehetőség nyílik szövettani mintavételre, valamint daganatszűrésre is. Az endoszkópos indexek számítása segítséget nyújt a nyálkahártya állapotváltozásának időbeli követésében (10). Hátránya, hogy az invazív vizsgálómódszerek közé tartozik, megterhelő a betegek – különösképpen a gyermekek –

számára, továbbá műszerigényes és a vele járó kockázat sem elhanyagolható (pl. iatrogén perforatio) (26).

A kapszula endoszkópiát a vékonybél érintettségének feltérképezésére alkalmazzák, elsősorban olyan esetekben, amikor IBD-re jellegzetes tünetek mellett a hagyományos endoszkópiával áttekinthető tápcsatorna szakaszokon nem észlelhető elváltozás.

A CD szövettani jellegzetességei a bélfal teljes vastagságára kiterjedő gyulladással infiltráció mellett a nyiroktüszők összeolvadása, a mirigy metaplasia és kiemelten az epitheloid granuloma képződés. Granulomák (megkülönböztető jellemző) csak a betegek egy részénél azonosíthatók. A szövettani jegyek támpontot jelenthetnek, de meglétüknek vagy hiányuknak általában kisebb klinikai jelentőséget tulajdonítanak (13).

I.1.5. A terápia irányvonalai

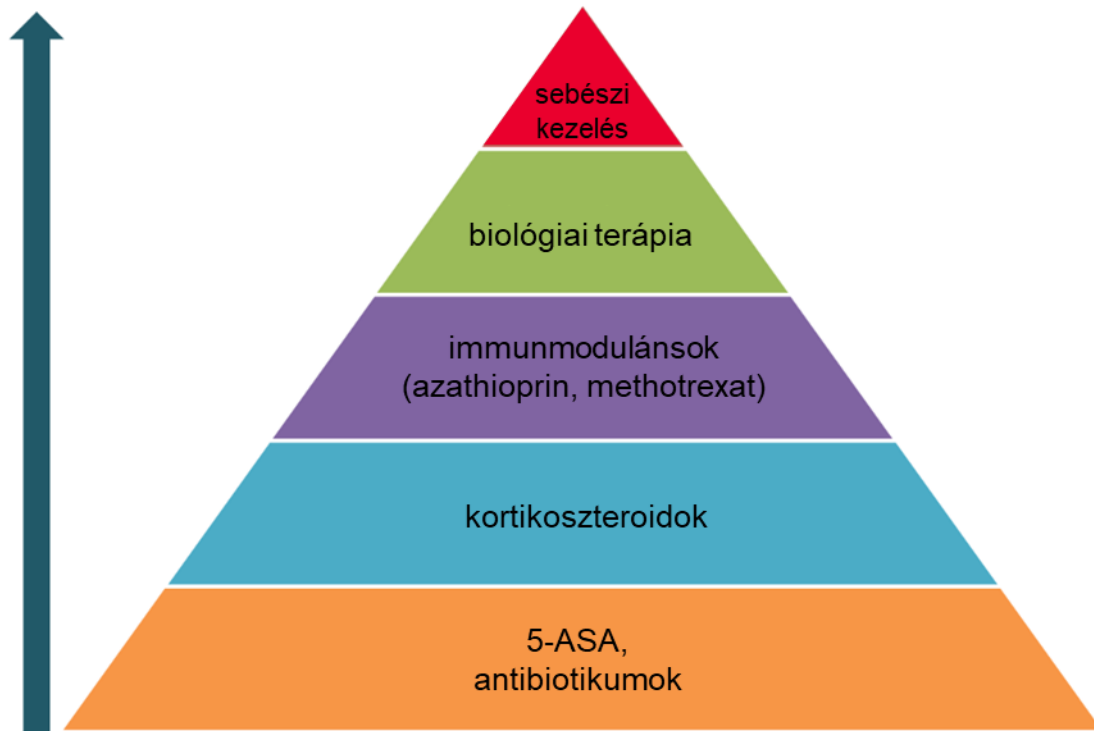
Mivel jelenleg a CD pontos etiológiája nem ismert, kuratív terápia egyelőre nem érhető el. Az alkalmazott terápia elsődleges célja a remisszió elérése (indukció), annak hosszú távú fenntartása és a komplikációk kialakulásának megelőzése (fenntartó kezelés). Napjainkban kétféle kezelési stratégia használatos: a hagyományos, "step-up" stratégia lényege, hogy kezdetben kevésbé agresszív gyógyszerelést alkalmaznak, majd szükség szerint haladnak az erősebb szerek felé. Ezzel szemben a "top-down" stratégia korai erőteljes immunosuppresszív terápia bevezetésével célozza meg a remisszió elérését, majd ezt követően fokozatos leépítés történik (10). Egy multicentrikus randomizált tanulmányban a korai kombinált immunosuppresszív terápia hatékonyabban indukált remissziót, és szteroid dependencia szempontjából is kedvezőbb kimenetelt mutatott, mint a hagyományos kezelési stratégia (40). A konkrét hatóanyagok és dózisok kiválasztása alapvetően a gyulladás súlyosságától, a betegség lokalizációjától, viselkedésétől és a korábbi terápiára adott választól függ. Ezen felül ajánlott az egyénre jellemző prognosztikai faktorok figyelembe vétele és a választandó terápia kockázat/haszon arányának egyedi értékelése (41). A használatos hatóanyag-csoportokat és a klasszikus stratégia terápiai szintjeit az 1. ábra mutatja be.

Gyermekeknél ajánlott az exkluzív speciális tápszeres táplálás (Modulen) is első vonalbeli indukciós kezelésként, melynek előnye a kortikoszteroid mellékhatások kiküszöbölése.

Sebészi beavatkozásra a komplikációk kezelése céljából és a gyógyszeres terápiára nem reagáló esetekben kerül sor (13). A Crohn betegek több mint kétharmada igényel legalább

egyszer sebészi beavatkozást élete során, mely az esetek felében a diagnózist követő 10 éven belül válik szükségessé (10).

A széklet transzplantáció és a probiotikumok alkalmazása – mint az egészséges bélflóra helyreállítására irányuló terápiás eszközök – jelenleg még kutatások tárgyát képezik (13).



1. Ábra: A hagyományos elv szerinti terápiás szintek Crohn betegségben.
(forrás: <http://transition.ibdclinic.ca/medication/treatment-pyramid-capture/>)

I.2. Laboratóriumi markerek szerepe a klinikai diagnosztikában

A laboratóriumi markerek nélkülözhetetlen eszközök napjaink gyógyító tevékenységében. Mind diagnosztikai, mind prognosztikai információkkal segítik a korai és helyes klinikai döntéshozást, hozzájárulva a kedvezőbb kimenetelhez, hosszútávú életminőséghez.

I.2.1. Orosomuroid

I.2.1.1. Az orosomuroid főbb tulajdonságai

Az orosomuroid (ORM) – vagy másnéven α -1 savanyú glikoprotein (AGP) – egy pozitív akut fázis szérumfehérje, melyet K. Schmid izolált először 1950-ben (42). Elnevezése a kémiai tulajdonságaira utal: elektroforetikus mobilitás szempontjából az α -1-globulin frakcióban vándorol, nagyfokban glikozilált és erős negatív töltéssel rendelkezik. Molekulatömege 41-43 kDa, melynek kb. 45%-át a cukorkomponens teszi ki a 183 aminosavból álló fehérje rész mellett (2. ábra). A szénhidrát rész magas szíalsav tartalmának köszönhetően jól oldódik savakban, rendkívül alacsony izoelektromos ponttal (pI: 2,8-3,8) rendelkezik (43). A lipocalin protein-család immunocalin alcsoportjának tagja. A lipocalinok közös tulajdonsága, hogy képesek lipofil struktúrák megkötésére és szállítására, az immunocalinoknak ezen felül az immunrendszer szabályozásában is van szerepük (44, 45). Az ORM-et elsősorban a májsejtek termelik, de kisebb mértékben a fehérvérsejtek, az emlő epithel sejteji és az endothel sejtek is lehetnek szintézisének forrásai. Félélettideje 5-6 nap a keringésben (46).

Az ORM kettő genetikai variáns (ORM1, ORM2) termékeként van jelen egyazon egyén szervezetében, mely variánsok aminosav sorrendjükben eltérőek és nagyfokú polimorfizmust mutatnak (47, 48). Az ORM szénhidrát komponense számos szerkezeti formában képes megjelenni, melyek megoszlása erősen függ a szervezet pathofiziológiai állapotától. Ezáltal a különböző glikoformák alkalmasak lehetnek diagnosztikus ill. prognosztikus célú felhasználásra (49).



2. Ábra: Az ORM szerkezete. (forrás: https://www.researchgate.net/figure/Crystal-structure-of-human-orosomucoid-alpha1-acid-glycoprotein_fig1_318796362)

I.2.1.2. Az orosomucoid biológiai funkciói

Az ORM génexpresszióját és szintézisét glükokortikoidok és gyulladásos mediátorok stimulálják, melyek között az IL-1 β , az IL-6 és a TNF- α az elsődlegesek. Ebből adódóan különböző gyulladásos folyamatok, sérülések, műtétek, bakteriális infekciók az ORM szint emelkedését eredményezik mind a szérumban, mind lokálisan az érintett szövetek környezetében (50, 51). Az ORM fontos szerepet játszik - különösen kóros állapotokban - a kapilláris permeabilitás homeosztatisz szabályozásában. Ennek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de feltételezett, hogy részt vesz az endothel felszín negatív töltésének fenntartásában és a töltés-barrier kialakításában. Ezáltal hozzájárul a létfontosságú szervek perfúziójának megőrzéséhez és egyben a makromolekulák intravazális térben tartásához is (46, 52, 53). Az immunmoduláló funkció további mechanizmusa lehet egy kompetíció az endothel felszíni E-szelektin kötőhelyekért az ORM és a fehérvérsejtek között, mely korlátozza azok extravazációját (54). Az ORM részt vesz az immunválasz kiterjedésének szabályozásában azáltal is, hogy képes indukálni bizonyos pro- és antiinflammatorikus citokinek expresszióját. Immunfolyamatokat szabályozó funkciója végső soron egy védvonalat eredményez a gyulladás-asszociált szövetkárosodással szemben (55).

Az ORM antimikrobiális aktivitással is rendelkezik. Az ORM kezelés, ill. az ORM transzgenikus túltermelésének protektív hatását írták le *Klebsiella pneumoniae*-vel fertőzött egereknél, ahol alacsonyabb bakteriémiát és magasabb túlélési arányt figyeltek

meg (56). Egy egér modellben az ORM és a lipopoliszacharid (LPS) közötti közvetlen interakciót mutattak ki, mely védő hatást mutatott az LPS direkt toxicitásával szemben (57).

Az immunmodulátor működés mellett az ORM másik fő funkciója a transzport. Fizikokémiai tulajdonságainak köszönhetően elsősorban alkalikus és neutrális természetű molekulákat köt meg nem-specifikus transzport proteinként. A legfontosabb endogén ligandjai a heparin, hisztamin, thrombocytá aktiváló faktor (PAF), melatonin, biliverdin, szteroid hormonok (58). Az endogén anyagok mellett több mint 300 féle gyógyszer-molekulát kötő- és szállító képességét írták le. Főképp bázikus és neutrális gyógyszerek (pl. tamoxifen, propranolol, szteroidok, lidocain, verapamil, imipramin, diazepam, carbamazepin) transzportjában vesz részt, és érintett a gyógyszerek közti interakciós folyamatokban is (59). Az akut fázis reakció során mind az emelkedő szérumszintű ORM (se-ORM) koncentráció, mind a glikoformák változó aránya jelentősen befolyásolhatja egyes gyógyszerek szabad plazmaszintjét, farmakokinetikáját. Egyes gyógyszeres terápiák hatástalanságának, hatóanyag-rezisztenciáknak a hátterében oki tényezőként szerepelhet az emelkedett se-ORM szint (60-62).

I.2.1.3. Orosomucoid a laboratóriumi medicinában

Az ORM referencia tartománya a plazmában 0,6-1,2 g/l, mely emelkedhet akut és krónikus gyulladással járó kórképek, daganatos betegségek mellett obstructív icterus, terhesség esetén és posztoperatív állapotokban is. Felmerült, hogy a dohányzás is okozhat emelkedett se-ORM szintet (48, 63).

A klinikai laboratóriumi diagnosztikában a se-ORM-et nem specifikus gyulladással járó markerként tartják számon. Viszonylag hosszabb féléletideje miatt általában másodlagos szerepet kap.

Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy a se-ORM prognosztikus értékkel bírhat bizonyos malignus daganatos betegségek (tüdőrák, emlőrák, glioblastoma) kezelése során (48). A rheumatoid arthritis (RA) aktivitásának értékelésében hasonlóan hasznosnak bizonyult, mint a hsCRP (64). IBD-ben az aktivitás informatív markere, továbbá előre jelezheti a relapszust (32, 65). Szeptikus betegekben végzett vizsgálatok szerint a se-ORM kiemelkedő diagnosztikus és prognosztikus értékkel rendelkezik, és a szepszis súlyosságának megítélésében segítséget nyújt (66, 67).

Az ORM egészséges egyének vizeletéből is kimutatható, a szérumhoz képest jelentősen alacsonyabb koncentrációban. Valószínűleg – méretéből adódóan – filtrálódik a glomerulusokon keresztül, azonban pontos kiválasztási mechanizmusa egyelőre tisztázatlan (68).

Jelenleg limitált ismeretekkel rendelkezünk a vizelet ORM (u-ORM) lehetséges diagnosztikai hasznát illetően. Emelkedett u-ORM szinteket figyeltek meg akut és krónikus gyulladásos állapotokban, mint például szepszisben, cukorbetegségben, systemas lupus erythematosusban (SLE), RA-ban, vagy nyitott szívműtétet követő posztoperatív periódusban (69-73).

2-es típusú diabetes mellitusban (DM) szenvedő betegek körében a diabeteses nephropathia (DN) és a kardiovaszkuláris mortalitás prediktoraként írták le az emelkedett u-ORM szintet, mely a krónikus gyulladásos aktivitással és az endothel diszfunkcióval állhat összefüggésben (73-77). Hou és mtsai. megállapították, hogy az u-ORM a krónikus szívelégtelenséget korai stádiumban jelző potenciális marker lehet (78). Az u-ORM értékes paraméter lehet a pre-eclampsia szűrésében, mivel már a klinikai tünetek megjelenése előtti stádiumban is emelkedést mutat (79, 80). Az u-ORM segítséget nyújthat a húgyhólyagrák korai felismerésében, az emelkedés mértéke korrelál a daganat stádiumával (81, 82). Az u-ORM jelezte a lupus nephritis aktivitását juvenilis SLE-ben, továbbá szerepe lehet az aktivitás megítélésében és a prognózisbecslésben RA betegeknél (71, 72, 83). Korábbi tanulmányaink felvetették az u-ORM lehetséges szerepét a CD diagnosztikájában is (69, 84).

Az eddigi adatok alapján az u-ORM szenzitívebb markere lehet a gyulladásnak, mint a se-ORM (74, 80, 85). Munkacsoportunk tapasztalatai szerint az u-ORM szepszisben akár 200-szoros emelkedést is mutathat, míg a se-ORM szint csupán kétszeresre nő a referencia tartományhoz képest (86).

A rendelkezésünkre álló adatokból arra következtethetünk, hogy az u-ORM bár nem specifikus marker, mégis értékes információval szolgálhat számos betegség vonatkozásában. A korábbi idő- és munkaigényes mérési módszereket (radiális immundiffúzió, ELISA, western blot) felváltva az újabban kidolgozott automatizált teszt lehetőséget teremt az u-ORM rutin diagnosztikai alkalmazására (69, 87).

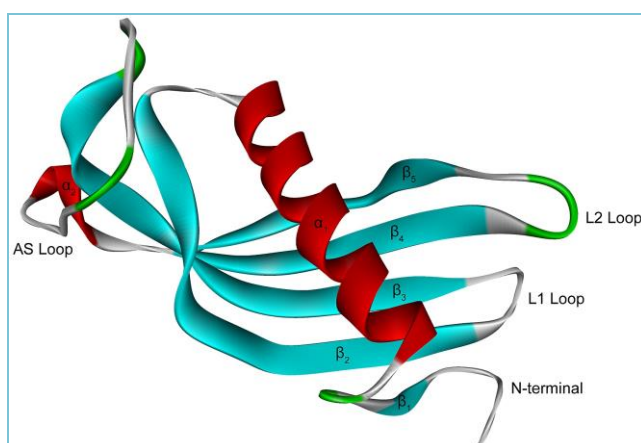
I.2.2. Cystatin-C

I.2.2.1. A cystatin-C főbb tulajdonságai

A cystatin-C (CYSC) egy cisztein-proteázokat gátló, pozitív nettó töltéssel rendelkező, nem glikozilált szérumszfehérje. A legtöbb magvas sejt állandó ütemben termeli, majd szekréción követően a vérkeringésbe kerül, ahonnan kb. 2 óras féléletidő mellett a vesék által eliminálódik (88).

A CYSC-t (magát a fehérjét) 1961-ben azonosították, proteáz gátló funkcióját azonban csak több mint 20 évvel később fedezték fel. A 13 kDa molekulatömegű, 120 aminosavból felépülő fehérjét kódoló gén a 20-as kromoszómán helyezkedik el. Szerkezetrajzát a 3. ábra mutatja be. A CYSC aminosav sorrendjét 1981-ben határozták meg, mely egyben az új cystatin szupercsalád felfedezését is jelentette. Ebbe a csoportba a papain-szerű cisztein-proteázokat gátló 11 fehérje tartozik. Az általuk gátolt proteázok főként lizoszómákban vannak jelen, szerepet játszanak az intracelluláris fehérjék lebontásában, prohormonok és proenzimek proteolitikus hasításában. Ebben a családba tartoznak egyéb cystatinok mellett a vasoaktív kininek prekursorai, a kininogének is, melyek nagy molekulatömegű formája a véralvadási rendszernek is szereplője.

Ismert, hogy a CYSC részt vesz a gyulladásos folyamatok szabályozásában is. A C13 peptidázcsaládba tartozó enzimek gátlásán keresztül képes befolyásolni az MHC II típusú antigén prezentáció folyamatát. Emellett leírták a neutrofil granulociták és makrofágok bizonyos funkcióit (pl. kemotaxis, NO szintézis) szabályozó szerepét is (89-92).



3. Ábra: A CYSC szerkezete. (forrás: (93))

I.2.2.2. Cystatin-C a szérumban

A szérum vagy plazma CYSC-t a GFR megbízható indikátoraként tartják számon. Számos tanulmány megállapította, hogy a szérum CYSC (se-CYSC) jobb markere a GFR-nek, mint a szérum kreatinin érték. Szintje ugyanis nem függ a nemtől, az izomtömegetől, és nem befolyásolják értékét a gyulladások, infekciók és májbetegségek sem. Megfigyelték, hogy a se-CYSC érzékenysége magas, meghatározása így már az enyhe GFR csökkenést mutató állapotok felismerésében is hasznosulhat (89, 94-98). Súlyos állapotú betegeknél már 24-48 órával korábban jelezheti az akut vesekárosodást (acute kidney injury, AKI), mint a kreatinin, továbbá alkalmas lehet a progresszió követésére is (96). Felmerült, hogy a se-CYSC érték felhasználható lehet a reziduális vesefunkció megítélésére folyamatos vesepótló kezelésben (CRRT) részesülő betegeknél (97). A se-CYSC az allograft funkció és az acut rejectio érzékenyebb markerének bizonyult a kreatininhez képest vesetranszplantáción átesett betegeknél (99). Mivel szintje független az izomtömegetől, mérése különösen előnyös lehet gyermekek és csökkent izomtömegettel járó kórképekben szenvedők GFR becslésénél (100).

Az eddigi eredmények nyomán már az újabb guideline-ok is megfogalmazzák ajánlásokat a se-CYSC használatára vonatkozóan (101). Mérése már korábban bevezetésre került a rutin diagnosztikába az automatizált immunkémiai módszer kidolgozásának köszönhetően (89). Elterjedését azonban kétségtelenül lassíthatja, hogy mérése jelentősen költségesebb, mint a kreatininé (102).

I.2.2.3. Cystatin-C a vizeletben

Fizikai tulajdonságainak köszönhetően szabadon filtrálódik a glomerulusokon keresztül, majd a proximális tubulussejtek csaknem a teljes mennyiséget reabszorbeálják és lebontják. A CYSC – egészséges egyéneknél – igen alacsony koncentrációban a vizeletfehérjék között is megjelenik (88, 89, 103).

Tubuluskárosodás esetén a CYSC reabszorpciója és degradációja csökkenhet, mely fokozott vizelet CYSC (u-CYSC) ürítéshez vezet (104). Eddig azonban csak néhány tanulmány foglalkozott az u-CYSC klinikai jelentőségével. Egyesek arra következtettek, hogy az u-CYSC sokkal érzékenyebben jelzi a vesepótló kezelés szükségét AKI-ban, mint a β 2-mikroglobulin, és *in vitro* stabilabbnak is bizonyult (96, 103, 104). Nyitott szívűműtéten átesett betegeknél korai és tartós u-CYSC emelkedést írtak le, mely összefüggött az AKI progressziójával (105). Az akut vesekárosodás mellett az u-CYSC

diagnosztikus információt nyújthat a DN-nel kapcsolatban is. Emelkedett u-CYSC szinteket találtak albuminuriát nem mutató 2-es típusú DM betegeknél is, mely feltételezhetően a tubuláris károsodás következménye lehet, megelőzve a DN glomeruláris manifesztációját. Arra következtettek, hogy a fokozott u-CYSC kiválasztás hamarabb jelezheti a DN-t, mint a mikroalbuminuria (106). Metabolikus szindrómát mutató túlsúlyos betegeknél a vizelet kreatininre vonatkoztatott u-CYSC (u-CYSC/u-CREAT) értékek összefüggését tapasztalták a krónikus vesebetegség súlyosságával és progressziójával (107).

A vesét érintő rendellenességek korai felismerése kiemelt fontossággal bír az adott állapot kimenetele és a kiválasztási funkció hosszú távú megőrzése szempontjából. Ebben jelenthet segítséget az u-CYSC, mely az előbbieik alapján értékes információt szolgáltat a tubuláris károsodásról. Bizonyos vizeletmarkerek vizsgálata kapcsán is hasznos lehet az u-CYSC mérése, hiszen az esetleges tubuláris diszfunkció befolyásoló hatással lehet azok értékeire. Tény, hogy a kereskedelmi forgalomban jelenleg nem érhető el rutin felhasználásra alkalmas, automatizált u-CYSC teszt.

I.2.3. Savoldékony szérumfehérjék

Számos, kis koncentrációban keringő alacsony molekulatömegű szérumfehérjéről ma még nem ismert, hogy rendelkezik-e diagnosztikus jelentőséggel. Analízisük során nehézséget jelenthet a nagy mennyiségben jelen lévő egyéb fehérjék elfedő hatása. Ezért az érzékeny laboratóriumi módszerek gyakran igénylik – mint tisztítási eljárást – a zavaró fehérjék előzetes eltávolítását (108, 109). A perklórsavas (PCA) kezelés régóta ismert eljárás a nagyfokban glikozilált szérumfehérjék és egyéb kismolekulák kinyerésére, miközben a főbb szérumfehérjék - precipitációjukat követően - eltávolíthatóak (110). Az eljárás lehetőséget teremt az oldatban maradó molekulák, mint potenciális biomarkerek további, érzékeny módszerekkel (pl. elektroforetikus technikák, tömegspektrometria) történő célzott vizsgálatára (108, 109, 111, 112).

Habár a PCA kicsapás módszerét eredetileg a savrezisztens szérumfehérjék izolálására dolgozták ki, a későbbiekben főképp malignus kórképekhez kapcsolódóan, szöveti extraktumokon alkalmazták a citoplazmatikus fehérjék közelebbi vizsgálatára céljából. A humán savoldékony szérumfehérjék analízisére irányuló alkalmazásról kevés közlemény számol be. Daganatos betegek szérumát vizsgálva jellegzetességként írták le a savas pH-nak ellenálló mucoproteinek emelkedett koncentrációját (110, 111). Emlőrákos betegeknél

a PCA-oldékony O-glikozilált szérumfehérjék közül a betegség újabb potenciális biomarkereiként azonosították a proteoglycan 4-et és a plazma proteáz C1 inhibitor (113). Felmerült egyes savoldékony frakcióból kimutatható fehérjék diagnosztikus szerepe a kissejtes és a nem-kissejtes tüdőrák vonatkozásában (114, 115).

Túllépve a daganatos betegségeken, patkányoknál pajzsmirigy túlműködés esetén mutatták ki a PCA-oldékony szérumfehérjék mennyiségének emelkedését, míg hypothyreoid állatokban csökkenést igazoltak (116). Egy sertéseken végzett tanulmány hasznosnak találta a savoldékony glikoproteinek mérését az egészséges és a gyulladós állapot elkülönítésében (117).

A kis molekulatömegű (albuminnál kisebb) szérumfehérjék összefüggésben állhatnak az előbbieket mellett cukorbetegséggel, cardiovascularis és fertőző betegségekkel is, tükrözve az érintett sejtek, szövetek állapotát (118-120). Egyes kis molekulatömegű fehérjék megjelenése a keringésben kapcsolatban állhat a sejtek lebontó anyagcsere-folyamataival. Munkacsoportunk korábban fokozott katabolizmussal járó állapotokban – kiterjedt műtéti beavatkozásokon áteső, ill. kemoterápiában részesülő betegeknél – figyelte meg a savoldékony fehérjemennyiség emelkedését (121).

A savoldékony frakció a fehérjéken túl tartalmazhat egyéb kismolekulákat is. *Mycobacterium tuberculosis* fertőzés esetén a baktérium sejtfalának lipoglikán komponense bekerül a keringésbe, mely az aktív fertőzés markere. A molekula oldatban marad a szérum PCA kezelése során, és a savas extraktumból jelentősen magasabb érzékenységgel mutatható ki, mint a natív szérumból (112).

A PCA-oldékony glikoproteinek között fellelhetők gyulladós markerek és akut fázis fehérjék, melyek hasznos információval szolgálhatnak a kiterjedt gyulladással járó állapotok klinikai diagnosztikájában (108). Segíthetik mind a kórképek felismerését, mind a terápia hatékonyságának ellenőrzését, és akár prediktív értékük is lehet a progresszióra vagy a kimenetelre nézve. A savoldékony frakció specifikus analízise a markerkutatás új irányát, lehetőségét jelentheti a gyulladós kórképek területén is.

II. Célkitűzések

Tanulmányunk elsődleges célja volt a Crohn betegség aktivitását jelző új fehérjediagnosztikai lehetőségek keresése. Figyelmünk egyrészt a vizelet ORM diagnosztikus értékének meghatározására irányult. A specifikus vizeletfehérje vizsgálat során felmerült az igény a vese tubuláris funkciójának megbízható ellenőrzésére, mivel e tényező befolyásolhatja a reabszorbeálódó fehérjék vizeletkoncentrációját. Ezt az ellenőrzést a vizelet CYSC – mint ismert tubuláris marker – mérésével kívántuk elérni, melyhez egy új automatizált teszt beállítását terveztük. Emellett vizsgálni kívántuk az új u-CYSC teszt további klinikai felhasználási lehetőségeit is. Ezt követően a savoldékony szérumfehérjék analízisére fókuszáltunk a CD további aktivitási markerei után kutatva.

Konkrét céljainkat az alábbiakban foglaltuk össze:

II.1.

- U-CYSC mérésre alkalmas automata immunturbidimetriás módszer beállítása, analitikai validálása
- A módszerünkhöz tartozó előzetes referencia tartomány meghatározása
- U-CYSC szintek vizsgálata olyan betegcsoportokban, akiknél felmerül akut vagy krónikus renális tubuláris károsodás lehetősége:
 - szepszishez társuló AKI
 - krónikus hipertenzió
 - 2-es típusú DM

II.2.

- Crohn betegek glomeruláris és tubuláris vesefunkciójának ellenőrzése se-CYSC és u-CYSC mérésekkel
- Jelzi-e az u-ORM szint a CD aktivitását felnőtt és gyermekkorú pácienseknél
- Az u-ORM diagnosztikus értékének meghatározása az aktív és inaktív állapot elkülönítésében
- Összefüggések keresése az u-ORM és a hagyományos gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek, valamint a klinikai indexek között

II.3.

- A savoldékony fehérjefrakció kinyerésének standardizálása egészséges egyének és Crohn betegek szérumból perklórsavas precipitációval
 - a savoldékony fehérjekoncentráció mérése
 - a perklórsavas kicsapás protokolljának optimalizálása elektroforetikus analízisekhez
- A savoldékony szérumból elválasztása egydimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE); a mintázatok összehasonlítása és értékelése egészséges egyének, aktív és inaktív állapotú Crohn betegek csoportjaiban
- A savoldékony szérumból microchip gélelektroforézissel (MGE) nyert profiljainak vizsgálata
 - az elkülönülő frakciók relatív arányának meghatározása
 - azonosítható-e a CD aktív fázisát jelző jellegzetes mintázat

III. Anyagok és módszerek

III.1. Mintagyűjtés

Vizsgálataink egyrészt az „Új biomarkerek vizsgálati lehetőségei szeptikus betegeknél” másrészt a „Klinikai biokémiai vizsgálatok Crohn beteg gyermekekben” című klinikai tanulmány keretében zajlottak, melyet időközben felnőttkorú páciensekre is kiterjesztettünk. A tanulmányok kivitelezését a PTE Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyezte (4327/KK15/2011 ill. 5133/KK15/2013), melyeket a rögzített protokolloknak megfelelően, a 2008-as Helsinki Deklarációban foglalt etikai irányelvek betartásával végeztünk. A résztvevőket teljeskörűen tájékoztattuk a kutatás céljáról, a mintavétel és a vizsgálati protokoll részleteiről. Ezután minden résztvevőtől, ill. fiatalkorúak esetén a törvényes képviselőtől írásos beleegyezést kaptunk a vizsgálatban történő részvételhez.

A vizsgálatban résztvevő egyénektől egyszeri mintavétel történt, amely vizeletminta, vagy egyidejűleg vér- és vizeletminták vételét jelentette. A mintavételt az ambuláns vagy osztályos betegellátáshoz szükséges vérvételek alkalmával végeztük, így az nem jelentett újabb megterhelést a betegeknek. A vérmintákat zárt rendszerű (Vacutainer®, Becton Dickinson) alvadásgátlót nem tartalmazó (natív), K₂-EDTA-val alvadásgátlóval, valamint vörösvértest-süllyedés (ESR, erythrocyte sedimentation rate) meghatározásra alkalmas nátrium-citrátot tartalmazó vérvételi csövekbe vettük. A spontán ürített közepsugár vizeletmintákat műanyag mintavételi csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálást követően (1500g, 10 perc) a szérumokat és a vizeletminták felülúszóit további felhasználásig, porciókra osztva -70°C -on tároltuk.

III.2. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása

III.2.1. Műszer, reagensek

Az u-CYSC meghatározásához nem volt kereskedelmi forgalomban elérhető automatizált mérési mód, a szérum CYSC mérésre kapható kitek pedig közvetlenül nem alkalmazhatók vizeletből történő mérésekre, mivel érzékenységük elmarad a szükségestől. Ezért a vizelet mérésekhez szükséges volt adaptálnunk egy, eredetileg a szérum CYSC mérésére kidolgozott polisztrén szemcsék által erősített immunturbidimetriás tesztet (Cystatin C FS kit, Cat. No. 171589910930, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Németország), melyet a Cobas 8000 automata c502 moduljának nyitott fejlesztői csatornájára állítottunk

be (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) (4. ábra). Az u-CYSC meghatározáshoz a kitben található, kecskében termelt poliklonális anti-humán CYSC immunpartikulumokat tartalmazó reagenst és 100 mmol/l koncentrációjú Tris puffert (pH=7,5) használtuk fel. A kalibráció a kithez tartozó kalibrációs oldatokból (TruCal Cystatin C, Cat. No. 171509910059, DiaSys) készített hígítási sor felhasználásával történt, míg kontrollként a TruLab Cystatin C Level 1 és Level 2 kontroll oldatok (Cat. No. 598709910046, 598809910046, DiaSys) megfelelő hígításait alkalmaztuk. A kalibrációs oldat visszavezethető volt az ERM®DA471 IFCC referencia anyagra. A kalibrációs oldatok, kontrollok és humán minták hígítása minden esetben steril fiziológiás sóoldattal (154 mmol/l NaCl) történt. Ugyancsak fiziológiás sóoldatot használtunk vak mintaként a kalibrációkhoz.

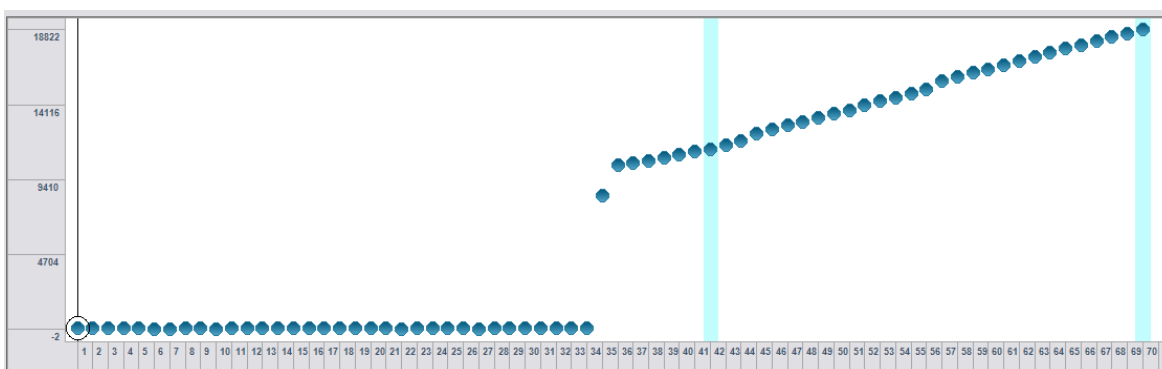


4. Ábra: A Cobas 8000 automata.

III.2.2. Módszer beállítások, validálási procedúra

Ahhoz, hogy nagyobb analitikai érzékenységet érjünk el, az eredeti teszt paramétereit a következőkben változtattuk meg. A reakcióban részt vevő kalibrációs oldat/kontroll/minta térfogatát 12 μ l-re emeltük; a reagens térfogatát 50 μ l-re, a puffer térfogatát 170 μ l-re csökkentettük. A mérendő molekula széles koncentráció-tartományát vizsgálva, az

optimális méréstartományt 0,03 és 1,0 mg/l között állapítottuk meg, mely az antitest többlet zónában helyezkedik el. A 6 pontos kalibrációhoz 0,0; 0,03; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 mg/l CYSC koncentrációjú kalibrációs oldatokat alkalmaztunk. Többféle görbeillesztési módot tesztelve a lineáris regressziós illesztés bizonyult alkalmasnak, ezért a továbbiakban ezt használtuk. A turbidimetriás reakció során 505 nm-es hullámhosszon detektáltuk az abszorbancia változását. A mérés a minta és a puffer inkubálásával kezdődött, ezt követően történt az immunpartikulumok hozzáadása. A készülék a 42-70 mérési pontok közötti abszorbancia-változás alapján számította ki a minta CYSC koncentrációját (5. ábra). A reakció 37 °C-on zajlott 10 perc időtartamban.



5. Ábra: Az 1,0 mg/l CYSC koncentrációjú kalibrációs oldat reakciókinetikája.

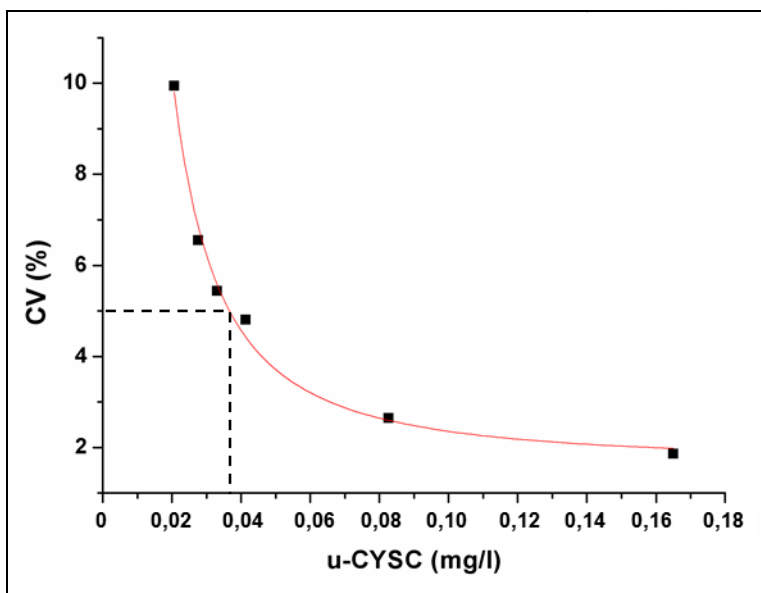
A kalibráció reprodukálhatóságát 30 független kalibráció összevetésével vizsgáltuk. A sorozaton belüli (intra-assay) és a sorozatok közti (inter-assay) precizitás, továbbá a linearitás és az analitikai szenzitivitás paramétereinek értékelése a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlásai alapján történt az alábbiakban részletezett módon (122, 123).

A módszer precizitásának vizsgálata 3 kontroll minta (a kalibrált tartománynak megfelelően alacsony, közepes és magas szintű) analízisével történt. A sorozaton belüli pontatlanság megállapításához mintánként 10 parallel mérést végeztünk 1 napon belül, míg a sorozatok közötti pontatlanság megállapításához mintánként napi 2 parallel mérés történt 20 napig. Ezután minden esetben kiszámítottuk a variációs koefficiens (CV) értékeket.

A módszer linearitását egy adott vizeletmintából készített 7 tagú hígítási sor duplikált mérésével ellenőriztük. A mért u-CYSC értékeket a teoretikus értékek függvényében ábrázoltuk, melyekre egyenest illesztettünk.

A vak határérték (limit of blank, LOB) megállapításához 5 vak mintát analizáltunk (12 parallel mérés/minta). Az így kapott koncentráció-adathalmaz 95% percentilis értéke adta

meg az LOB értékét. A detektálási határérték (limit of detection, LOD) megállapításához 5 alacsony (az LOB és annak ötszöröse közé eső) koncentrációjú vizeletmintát analizáltunk. 12 parallel mérés történt mintánként. Kiszámítottuk az egyes mintákhoz tartozó szórásokat, majd a szórások átlagát. Az LOD értékét a következő egyenlet alapján határoztuk meg: $LOD = LOB + 1,645 \times [a \text{ szórások átlaga}]$. A kvantifikálási határérték meghatározása (limit of quantification, LOQ) egy vizeletmintából készített 6 tagú hígítási sor sorozatmérésével történt (3 parallel mérés/minta 3 egymást követő napon). Kiszámítottuk az egyes mintákhoz tartozó CV értékeket, majd ábrázoltuk azokat az u-CYSC koncentráció függvényében. Görbeillesztést követően az LOQ értéket abban az u-CYSC értékben állapítottuk meg, amely CV=5% imprecizitási szint mellett volt detektálható (6. ábra).



6. Ábra: Az LOQ érték meghatározása a CV% – u-CYSC görbe alapján.

A high-dose hook (magas dózisú kioltási) effektust a 0,0-8,0 mg/l-es koncentrációtartományban vizsgáltuk a kit legmagasabb koncentrációjú standardjából előállított hígítási sor mérésével.

A visszanyerhetőség (recovery) vizsgálatát a Westgard guidelines ajánlásai alapján végeztük (124). 5 különböző vizeletminta 900 µl térfogatú porcióihoz hozzáadtunk 100 µl TruLab Cystatin C Level 1 kontroll oldatot, valamint újabb azonos térfogatú porciókhoz 100 µl fiziológiás sóoldatot. Az így előállított mintákból duplikált méréseket végeztünk. Kiszámítottuk minden egyes minta esetén a visszanyerhetőséget, majd a kapott értékeket átlagoltuk, melyet 100%-ból kivonva összevetettünk az elfogadható hibahatárral ($\pm 10\%$).

A kalcium, a karbamid, a glükóz, az albumin és a hemoglobin feltételezett interferenciát okozó hatását is teszteltük. Különböző vizeletminták 900 µl térfogatú porcióihoz 100 µl térfogatot adtunk a potenciálisan interferáló anyag oldatából, valamint további azonos térfogatú porciókhoz 100 µl fiziológiás sóoldatot. Ezután u-CYSC koncentrációkat mértünk duplikátumokban. Akkor tekintettük fennállónak az interferenciát, ha a fiziológiás sóoldattal addicionált mintához képest az elfogadható hibahatárnál ($\pm 10\%$) nagyobb eltérést tapasztaltunk (124).

Az u-CYSC stabilitását 10 különböző spontán ürített vizeletmintán vizsgáltuk Odozse és mtsai. protokollja alapján (125). A mintákat adagokra osztottuk és additívum nélkül tároltuk szobahőmérsékleten, valamint hűtőszekrényben (4°C). Duplikált u-CYSC mérések történtek a friss vizeletmintákból, majd 2, 4, 6 és 24 óra elteltével. Az u-CYSC koncentrációkban bekövetkező változást az adott minta kezdeti koncentrációjának %-ában fejeztük ki. Ezután átlagoltuk az egyes tárolási hőmérsékletekhez és időtartamokhoz tartozó, 10-10 db vizeletminta koncentráció-változás adatait. Végül összevetettük ezen átlagértékeket az elfogadhatósági határértékkel, melyet az alkalmazott mérési módszer precizitása határoz meg (a módszerünkhöz tartozó elfogadhatósági határérték: $\pm 7,1\%$ a protokoll alapján számítva). A mérendő molekula stabilnak tekinthető a mintában addig az időpontig, amely esetében az átlagos százalékos eltérés még az elfogadhatósági határértéken belül található.

Ezen felül a -20°C -on 3 hónapig tartó tárolás és a fagyasztási-kiolvasztási ciklusok CYSC stabilitására gyakorolt hatását is vizsgáltuk 5 különböző vizeletmintán, tartósítószer hozzáadása nélkül. Ez utóbbi célhoz a minták fagyasztása -70°C -on, kiolvasztásuk 37°C -on történt. 3 fagyasztási-kiolvasztási ciklust kiviteleztünk, ciklusonkénti duplikált u-CYSC meghatározással.

III.2.3. Vizsgált csoportok

Az u-CYSC módszerünkhöz előzetes referencia tartományt határoztunk meg 117 fő, 10- és 60 év közötti egészséges egyén bevonásával. Ezen egyének csoportját üzemorvosi vizsgálaton megjelent egyetemi dolgozók, hallgatók, valamint kisebb sebészeti beavatkozásra érkező gyulladásmentes páciensek alkották. Az egészséges státusz megállapítása fizikális vizsgálaton és a korábbi egészségügyi dokumentáción alapult. Kizárási kritériumot jelentett bármilyen ismert krónikus betegség, akut betegségekre utaló tünet vagy panasz, referencia tartományon kívüli hsCRP érték ($>5\text{ mg/l}$), illetve proteinuria jelenléte. Az u-CYSC teszt klinikai alkalmazási lehetőségeinek felderítéséhez háromféle

betegcsoport vizeletmintáit vizsgáltuk: szepszishez kapcsolt akut vesekárosodással (AKI) a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben kezelt betegek (n=33), belgyógyászati járóbeteg szakrendelésen megjelent krónikus hipertenzióban szenvedő (n=43), valamint 2-es típusú cukorbeteg (n=41) mintáit. Szeptikus betegek esetében az AKI megállapítása a Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) ajánlásoknak megfelelően történt (101), megerősítve a se-CYSC értékekkel (más szerzőkhöz hasonlóan) (86, 126, 127). A krónikus hipertenzív és cukorbeteg csoportokra vonatkozóan a beválasztási szempontok a következők voltak: klinikailag diagnosztizált és kezelt betegség, valamint akut gyulladásos állapot és egyéb ismert krónikus betegség (autoimmun betegségek, tumor) hiánya.

A vizsgálatban felhasznált minták gyűjtése 2015. április és 2016. szeptember között zajlott. Valamennyi vizeletmintából összefehérje és kreatinin méréseket is végeztünk rutin laboratóriumi módszerekkel Cobas 8000 automatán (Roche). Az u-CYSC értékeket az abszolút koncentráció-adatok (mg/l) mellett vizelet kreatininre vonatkoztatva is megadtuk u-CYSC/u-CREAT hányadosok formájában.

III.3. U-ORM szintek vizsgálata Crohn betegeknél

III.3.1. Vizsgált csoportok

Klinikailag diagnosztizált, a PTE KK I. és II. sz. Belgyógyászati Klinikán gondozott felnőtt (n=55), valamint a PTE KK Gyermekgyógyászati Klinikán gondozott fiatalos (n=31) Crohn betegek alkották vizsgálati csoportjainkat, akiket egészséges kontrollokkal (felnőtt, n=38; gyermek, n=30) hasonlítottunk össze. A vizsgálatba 2014. október és 2016. június között mind járóbeteg, mind fekvőbeteg ellátásban részesült pácienseket bevontunk. A gyermekkorú csoportokba a 18 évnél fiatalabb egyének kerültek. Kizárási kritériumot jelentett a Crohn betegek esetén bármilyen ismert vesebetegség, malignitás, azonosított gyomor-bélrendszeri fertőzés, továbbá a beleegyezés hiánya. A felnőtt kontroll csoportot üzemorvosi vizsgálaton megjelent egyetemi dolgozók és hallgatók alkották, míg a gyermekkorú csoportba kisebb sebészeti beavatkozásra érkező gyulladásmentes páciensek kerültek. Kizárási kritériumnak tekintettük bármilyen akut vagy krónikus betegség fennállását, a referencia tartományon kívüli hsCRP értéket és proteinuria jelenlétét.

A Crohn betegeket aktív és inaktív csoportokba soroltuk a klinikai pontrendszerek alapján. A gyermekgyógyászati betegeket aktívnak tekintettük, amennyiben a Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) pontszámuk 10-nél nagyobb volt (22). A felnőtt betegek

aktivitásának megítélése a Harvey-Bradshaw Index (HBI) alapján történt, a >4 pontszámmal rendelkezők kerültek az aktív csoportba (20). A betegek 77%-a részesült 5-aminoszalicilát, 23%-a topikus kortikoszteroid, 16%-a orális kortikoszteroid, 45%-a azathioprin és 5%-a TNF- α -gátló terápiában.

III.3.2. U-ORM mérése automatizált immunturbidimetriás módszerrel

Kereskedelmi forgalomban nem érhető el automatizált u-ORM teszt, ezért egy általunk előzőleg beállított és validált immunturbidimetriás módszerrel mértük az u-ORM szinteket Cobas 8000/c502 modulon (Roche). Röviden összefoglalva a módszer főbb jellemzőit: a meghatározás latex szemcsékhez kötött anti-humán ORM antitesteket tartalmazó reagens (ref. no. OA504, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia) és a hozzá tartozó reakciós puffer (ref. no. PO1812, Dako) felhasználásával történt. A turbidimetriás reakció detektálásának hullámhossza 546 nm volt. A teszt detektálási határértéke 0,02 mg/l volt, méréstartománya a 0,08–5,25 mg/l-es intervallumot fedte le. Az ennél magasabb koncentrációjú minták mérését megismételtük fiziológiás sóoldattal történő hígítást követően. A módszer sorozaton belüli és sorozatok közti pontatlanságát is 5 CV% alatt találtuk, továbbá a módszer visszanyerhetősége 95-103% közötti értékeket mutatott (69).

Mivel spontán (nem gyűjtött) vizeletmintákat analizáltunk, az u-ORM értékeket vizelet kreatininre vonatkoztattuk (u-ORM/u-CREAT hányados), hogy az ajánlásokat követve csökkentsük a különböző hidráltsági állapotokból és a vizelet koncentráltóságából adódó különbségeket (128, 129). Ezen felül a vizelet összfehérjére vonatkoztattott értékeket is kiszámítottuk (u-ORM/u-TP hányados), hogy vizsgáljuk az ORM %-os arányának változását a vizeletfehérjék között.

III.3.3. Egyéb laboratóriumi paraméterek meghatározása

A vizsgálatban szereplő valamennyi egyén szérum, ill. alvadásgátolt vérmintáiból összfehérje (se-TP), hsCRP, se-ORM, ESR, fehérvérsejtszám (WBC), trombocitaszám (PLT) mérések történtek. A vizeletmintákból összfehérje (u-TP), albumin (u-ALB) és kreatinin (u-CREAT) értékeket határoztunk meg. A vesefunkció ellenőrzése végett szérum és vizelet CYSC méréseket is végeztünk. Minden mérés a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet akkreditált (NAH-1-1553/2016) laboratóriumában történt.

A WBC és PLT meghatározás K₂-EDTA-t tartalmazó csövekből történt ADVIA 2120 hematológiai automatán (Siemens AG, Erlangen, Németország). Az ESR meghatározása az

erre alkalmas, nátrium-citrátot tartalmazó csövekből Sedi-40 automata (Becton Dickinson, NJ, USA) használatával történt. A se-TP, hsCRP, se-CYSC, u-TP, u-ALB, u-CREAT meghatározást Cobas 8000 automatán (Roche) végeztük a rutin diagnosztikában alkalmazott módszerekkel. Az u-ALB esetében - az u-ORM-hez hasonlóan - vizelet kreatininre és összfehérjére vonatkoztatott hányadosokat (u-ALB/u-CREAT és u-ALB/u-TP) határoztunk meg. A se-ORM méréseket Cobas Integra 400 automatán (Roche) végeztük a Roche cég kereskedelmi immunkémiai tesztjével. Az u-CYSC szinteket a III.2. fejezetben ismertetett módszerrel mértük.

III.4. Savoldékony szérumfehérjék vizsgálata Crohn betegeknél

III.4.1. Vizsgált csoportok

Klinikailag diagnosztizált, a PTE KK I. és II. sz. Belgyógyászati Klinikán gondozott felnőtt (n=32), valamint a PTE KK Gyermekgyógyászati Klinikán gondozott fiatalok (n=30) Crohn betegek vettek részt a vizsgálatban, továbbá 14 felnőtt és 11 gyermekkorú egészséges egyén szerepelt kontrollként. A vizsgálat keretében feldolgozott minták gyűjtése 2014. október és 2017. április között zajlott. A kizárási kritériumok megegyeztek az u-ORM szintek vizsgálata kapcsán alkalmazottakkal. A Crohn betegek aktív ill. inaktív csoportba sorolása a klinikai pontrendszerek alapján történt (ld. III.3.1.).

III.4.2. A savoldékony szérumfehérjék perklórsavas extrakciója

A szérumfehérjék PCA extrakciójának intézetünkben korábban kidolgozott protokollját módosítottuk: 1000 µl szérum mintákhoz 1000 µl 1 M-os PCA-t (Reanal Gyógyszer- és Finomvegyszergyár Zrt. Budapest, Magyarország) adtunk, majd vortexelést követően 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk azokat. A precipitálódott fehérjéket centrifugálással ülepítettük (3800g, 6 perc). Neutralizálás céljából a felülúszók 1200 µl térfogatához 800 µl 1,42 M-os NaOH-ot adtunk. 10 perc inkubációt követően az oldatokat ismét centrifugáltuk (3800g, 6 perc), majd a felülúszók 1000 µl térfogatához 300 µl 2 M koncentrációjú Tris-HCl puffert adtunk. Az oldatok végleges pH-ját ellenőriztük 8,5-8,8 között tartottuk. Az extrakció során nyert oldatok összfehérje koncentrációját a peptidkötés fényelnyelő tulajdonsága alapján, spektrofotometriásan határoztuk meg (Hitachi U-2910 UV/VIS) 220 nm-es hullámhosszon. Az abszorbanciaméréshez a mintákat tízszeresre hígítottuk tridesztillált vízzel. A mérés kalibrációját nagy tisztaságú bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA) törzsoldatból készített hígítási sorral végeztük

12,5-200 mg/l-es tartományban. A minták fehérjekoncentrációit a kalibrációs egyenes egyenlete alapján ($R^2 = 0,999$) és az előzetes hígítás figyelembe vételével számítottuk ki, melyeket azután megszorozva a teljes procedúra során végbemenő hígulások mértékével, meghatároztuk a savoldékony fehérjék eredeti szérumkoncentrációját.

III.4.3. Savoldékony szérumfehérjék analízise denaturáló SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE)

A savoldékony szérumfehérjéket molekulatömegük szerint szeparáltuk egydimenziós SDS poliakrilamid gélelektroforézissel Laemmli szerint (130). Az elválasztáshoz egy felső hordozó, és egy alsó szeparáló gélt tartalmazó lemezt készítettünk. A géllemezek kiöntéséhez a Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 készülékhez tartozó üveglemezeket és kiöntő állványt használtuk. A hordozó és a szeparáló gélhez 5% ill. 7,5% akrilamid koncentrációt választottunk, a lemezekben az akrilamid metilén-bisz-akrilammiddal kémiaiilag keresztkötött gél-polimert alkotott.

A PCA extrakció során nyert minták 200 μ l térfogatához 50 μ l (SDS-t és β -merkaptoetanolt tartalmazó) 5-szörös töménységű mintapuffert adtunk, majd 100 °C-os vízfürdőben 3 percig forraltuk azokat. Ezután a hordozó gél mintafelviteli helyeire egységesen 10-10 μ l mintatérfogatokat vittünk fel, melyek 2-12 μ g közötti fehérjemennyiségeket tartalmaztak. Minden géllemezen alacsony molekulásúlyú gyári markert (Pharmacia LMW; Amersham BioSciences UK Ltd. Buckinghamshire, UK) is vándoroltattunk a mintákkal egyidejűleg. Az elektroforézis Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékkel és Bio-Rad Power Pac 1000 tápegység használatával történt, amely 190 V konstans feszültséggel, 45 percig zajlott.

Az elektroforézis során szeparált fehérje frakciók mintázatának detektálásához Coomassie Brilliant Blue (CBB) festést alkalmaztunk, majd a kapott jelet kombinált ezüstözési eljárással intenzifikáltuk Willoughby és mtsai. szerint (131). Röviden: az elektroforézist követően a géllemezeket először CBB R-250 festék (Molar Chemicals Kft. Halásztelek, Magyarország) oldatába helyeztük 2 órára, majd differenciálás következett. Ezután a géllemezeket ezüst-nitrátot tartalmazó elegybe helyeztük, amelyben a hívás a kívánt intenzitás eléréséig zajlott. Az ezüstözési reakció leállítása glicin oldatban történt. Végül digitális képi dokumentációt készítettünk az ezüstözött géllemezekről.

III.4.4. Savoldékony szérumfehérjék analízise microchip gélelektroforézissel (MGE)

Az MGE fehérjeanalízis Agilent 2100 Bioanalyzer készülék segítségével, High Sensitivity Protein 250 LabChip kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország) felhasználásával történt. Az MGE során denaturáló közegben, lineáris akrilamid polimerben történt a fehérjék elválasztása, a detektálás fluoreszcens festékkötésen alapult. A kit jelölőpuffert, dimetil-szulfoxidot (DMSO), ethanolamint, jelölőfestéket, molekulatömeg markert, gél-mátrixot (4,5%-os polidimetil-akrilamid alapú lineáris polimer oldat, pH 8), „destaining” oldatot és mintapuffert tartalmazott. A denaturáló oldatot 3,5 µl 1 M-os dithiothreitol (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) 100 µl mintapufferhez történő hozzáadásával állítottuk elő.

A gyári protokollt optimalizáltuk a savoldékony fehérjék analíziséhez, hogy megfelelő elválasztást és érzékenységet érjünk el. A PCA extrakció során nyert minták pH-ja megfelelt a protokoll által előírt 8-9 közötti tartománynak, így azok nem igényeltek további pH beállítást. Desztillált vízzel tízszeresre hígítottuk a festéket, majd 5 µl mintatérfogathoz 0,5 µl festék-DMSO oldatot adtunk és 10 percig inkubáltuk a mintákat a festékekkel szobahőmérsékleten. A festék felesleget 0,5 µl ethanolamin hozzáadásával kötöttük meg, majd újabb 10 perc inkubáció következett szobahőmérsékleten. A jelölt mintákat desztillált vízzel 5-szörösre hígítottuk, majd azoknak 10 µl térfogatát 5 µl denaturáló oldattal elegyítettük. Ezután 5 perc forralás történt 100°C-os vízfürdőben. A microchip csatornáit polydimethyl-acrylamide alapú lineáris polymer oldattal töltöttük fel. Minden csatornára 6 µl mintát vittünk fel. Az előírásnak megfelelő pozícióba „destaining” oldat került. Az automatikus injektálást követően az elválasztás 1000 V feszültség mellett 30°C hőmérsékleten 60 s-ig zajlott. Minden mintával 3 parallel analízist végeztünk. A fehérjefrakciók detektálása a fluoreszcens festék 680 nm hullámhosszon mérhető fényemissziója alapján történt. Az egyes protein komponensek molekulatömegeit a marker futtatásával nyert kalibrációs görbe alapján határoztuk meg. Mivel a festékkötődés arányos a fehérjemennyiséggel, a görbe alatti területekből (AUC) kiszámítottuk az egyes fehérjefrakciók relatív hányadát és az értékeket a mintára vonatkozó teljes AUC %-ában adtuk meg.

III.4.5. Egyéb laboratóriumi paraméterek meghatározása

A vizsgálatban részt vevő egyének vérmintáiból meghatároztuk a se-TP, hsCRP, se-ORM, WBC értékeket a korábban részletezett módszerek alkalmazásával (ld. III.3.3.).

III.5. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, Version 22) programmal végeztük (IBM Corporation, NY, USA). Adataink eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. Mivel változóink nem normál eloszlást mutattak, nem parametrikus tesztek (Kruskal-Wallis ill. Mann-Whitney U teszt) alkalmaztunk a vizsgálati csoportok összehasonlításához. A folytonos változók közötti kapcsolatok vizsgálatához Spearman-féle korrelációs tesztet használtunk. Az u-CYSC és u-CYSC/u-CREAT paraméterek felső referencia határértékét a 95% percentilis értékben állapítottuk meg a Tencer és mtsai. közleményében szereplő eljárásnak megfelelően (129). A paraméterek diagnosztikus hatékonyságát és prediktív értékét ROC (receiver operating characteristic) görbék alapján ítéltük meg a görbe alatti terület (AUC ROC) kiszámításával. A folytonos változók adatait a medián és interkvartilis (IQR, 25-75% percentilis) értékek megadásával szemléltettük. A statisztikai elemzések során a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

IV. Eredmények

IV.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer validálása és klinikai alkalmazása

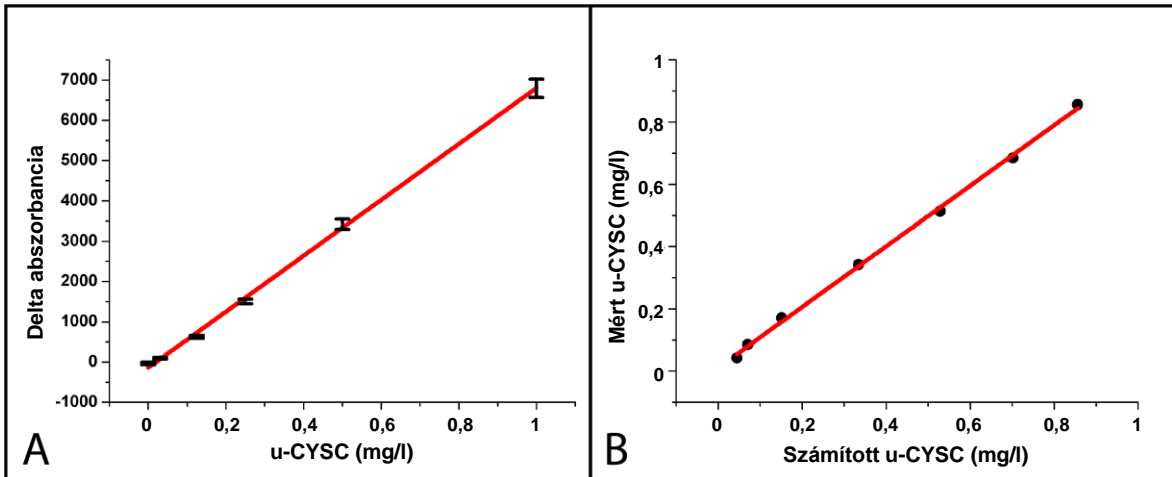
IV.1.1. Módszer validálás, interferencia, stabilitás vizsgálatok

A méréstartományt 0,0-1,0 mg/l közé állítottuk be (kalibrált tartomány), amelyen belül a dózis-válasz görbe lineárisnak bizonyult (7/A ábra). Az 1,0 mg/l-nél magasabb koncentrációjú minták mérését megfelelő mértékű hígítást követően ismételni kellett. A kalibráció reprodukálhatósága megfelelőnek bizonyult, 30 független kalibrálás adatait összegezve $CV < 10\%$ értékeket tapasztaltunk valamennyi kalibrálási pont esetében. A sorozaton belüli és a sorozatok közötti pontatlanság CV értéke is 5% alatt maradt minden vizsgált szint esetén (4. táblázat). Az analitikai szenzitivitás paraméterei is megfelelőek voltak ($LOB = 0,012$ mg/l, $LOD = 0,017$ mg/l, $LOQ = 0,037$ mg/l). A kvantifikálási határérték lehetővé tette a pontos meghatározást 0,037 mg/l legkisebb értéktől a kalibrált tartományon belül. A módszer linearitását jónak találtuk ($R^2 = 0,991$), a 0,04-0,86 mg/l tartományban vizsgálva azt (7/B ábra).

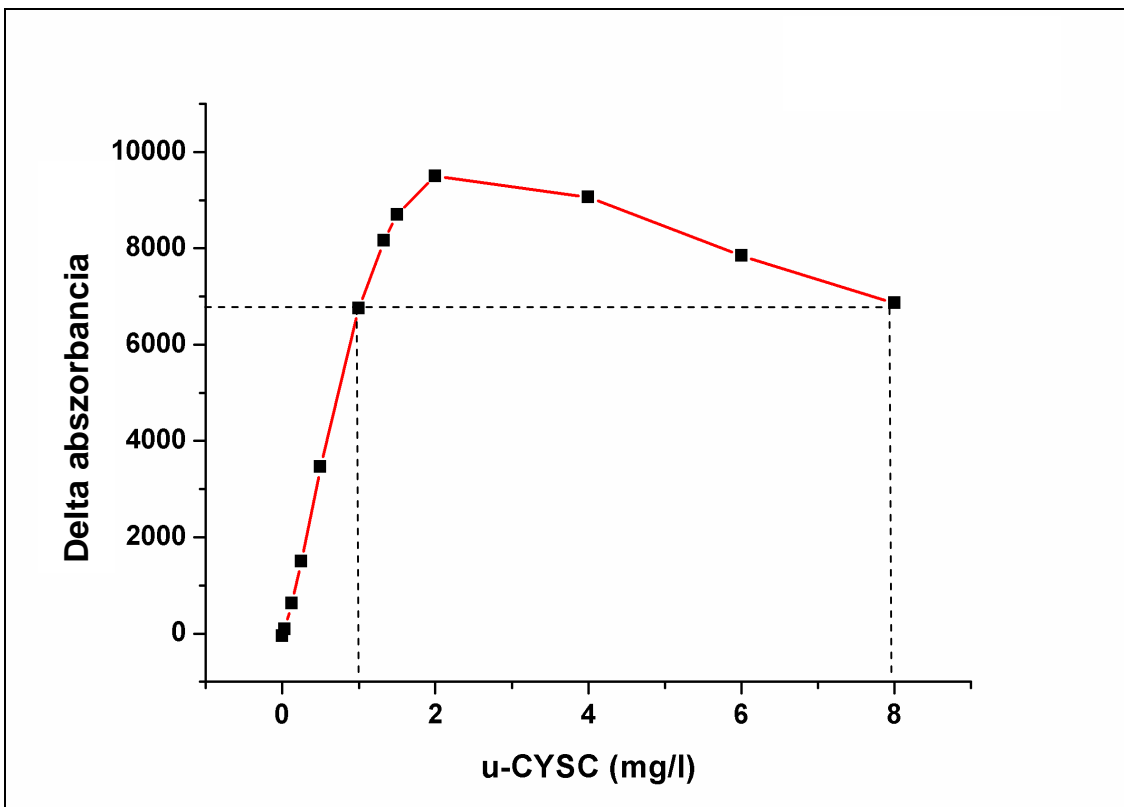
A high dose hook effektus vizsgálata során 2,0 mg/l u-CYSC koncentráció felett már csökkenő jelintenzitást tapasztaltunk, mely az antigén többlet zóna elérését jelezte. A biztonsági zóna határa - melyet az az antigén koncentráció jelöl ki, amely még magasabb jelet ad, mint a kalibráció legnagyobb standardja - 8,0 mg/l u-CYSC értéknél mutatkozott (8. ábra). A visszanyerhetőség vizsgálata során 2,1%-os hibaértékét találtuk, melyet a guideline alapján elfogadhatónak minősítettünk.

Nem tapasztaltunk az u-CYSC méréssel interferáló hatást a minta 15 mmol/l kalcium, 1350 mmol/l urea, 280 mmol/l glükóz, 12 g/l albumin valamint 5 g/l hemoglobin tartalma esetén sem.

Megfigyeltük, hogy az u-CYSC stabil maradt 6 órán keresztül szobahőmérsékleten, és 24 órán keresztül 4°C-on tárolva ($< 7,1\%$ átlagos koncentráció csökkenés). Azonban 2 vizeletminta 15%-ot meghaladó CYSC veszteséget mutatott az előbbi körülmények mellett. 3 hónapig tartó -20°C-on tárolást követően 2, valamint a 3. fagyasztási-kiolvasztási ciklust követően 1 minta mutatott 10%-nál nagyobb mértékű u-CYSC csökkenést, míg a többi minta stabilnak bizonyult (5. táblázat).



7. Ábra. A: Az u-CYSC teszt 6 pontos kalibrációs egyenese a 0,0-1,0 mg/l közötti tartományban (lineáris illesztés). Az ábra az egyes kalibrációs pontok 30 kalibrálás során nyert átlag \pm szórás értékeit szemlélteti ($R^2 = 0,9989$). **B:** A teszt linearitása 0,04 – 0,86 mg/l között. A pontok a mérések átlagait szemléltetik. A regressziós egyenes egyenlete: $y = 1,026x + 0,011$; $R^2 = 0,991$.



8. Ábra: Dózis-válasz görbe 0,0-8,0 mg/l között, valamint a “high dose hook effektus” és a biztonsági zóna meghatározása.

célérték, mg/l	Sorozaton belül (n=10)		Sorozatok között (n=40)	
	átlag±SD, mg/l	pontatlanság, CV%	átlag±SD, mg/l	pontatlanság, CV%
0,728	0,759±0,012	1,52	0,744±0,014	1,94
0,348	0,346±0,006	1,79	0,337±0,006	1,90
0,073	0,070±0,002	3,29	0,069±0,003	4,84

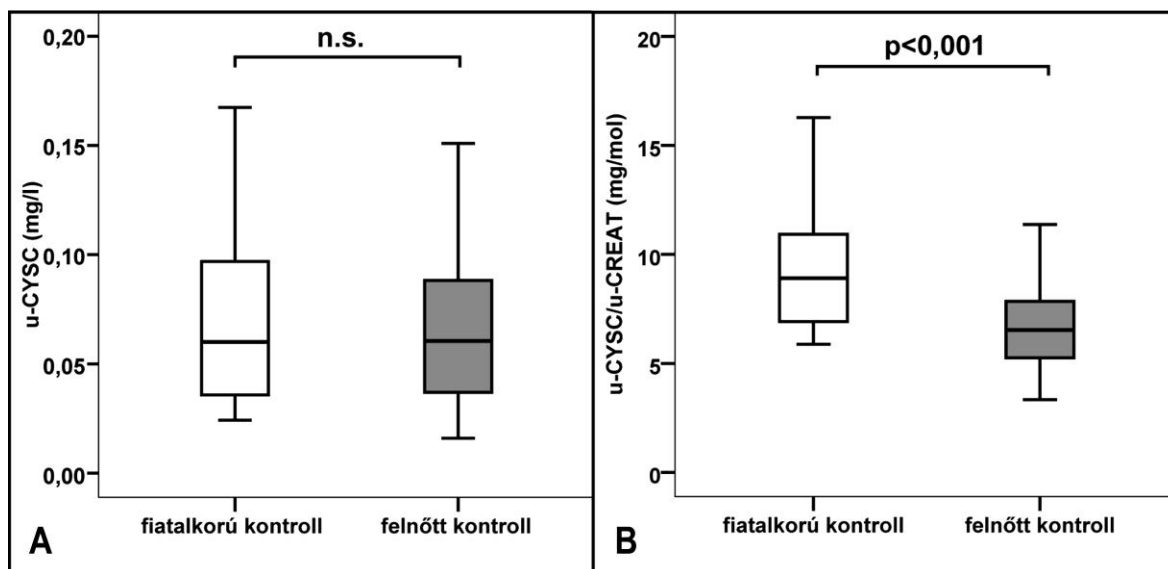
4. Táblázat: Sorozaton belüli és sorozatok közötti pontatlanság

	szobahőmérséklet				hűtőszekrény (4°C)			
	2 h	4 h	6 h	24 h	2 h	4 h	6 h	24 h
kezdeti koncentráció	%	%	%	%	%	%	%	%
mg/l								
0,111	97,7	95,5	99,5	95,9	93,2	98,6	100,0	94,6
0,120	98,8	94,6	97,5	82,1	97,5	95,4	97,5	93,3
0,074	101,4	103,4	104,1	90,5	102,0	101,4	104,1	90,5
0,156	97,4	99,0	97,4	94,2	98,4	98,1	96,1	91,3
0,053	97,1	101,9	98,1	90,5	97,1	97,1	95,2	92,4
0,055	96,3	89,9	97,2	95,4	102,8	93,6	94,5	106,4
0,074	81,6	83,0	81,6	51,7	93,9	89,1	85,0	79,6
0,084	94,6	95,2	94,0	97,6	91,7	98,2	101,8	99,4
0,047	89,2	90,3	84,9	57,0	89,2	84,9	95,7	88,2
0,073	101,4	97,9	104,1	100,0	98,6	97,2	102,8	100,7
	fagyasztási-kiolvasztási ciklusok			-20°C				
	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	3 hónap				
kezdeti koncentráció	%	%	%	%				
mg/l								
0,051	94,1	96,0	91,1	97,0				
0,122	89,7	79,8	66,7	77,4				
0,435	97,1	95,5	93,7	93,8				
0,645	97,8	99,1	98,7	88,4				
0,814	95,0	92,4	91,0	90,8				

5. Táblázat: Az u-CYSC stabilitás vizsgálatának adatai. Az egyes minták tárolást követően mért koncentrációinak a kezdeti koncentrációhoz viszonyított százalékos arányát tüntettük fel.

IV.1.2. Előzetes referencia tartomány meghatározása

Az egészséges egyének csoportján belül nem találtunk különbséget férfiak és nők között sem az u-CYSC sem az u-CYSC/u-CREAT értékek tekintetében. Ezt követően a kontroll csoportot életkor alapján két részre bontva vizsgáltuk. A fiatalok (<18 éves korcsoport) kismértékben, de szignifikánsan magasabb u-CYSC/u-CREAT értékeket mutattak a felnőttekhez képest (medián értékek: 8,9 mg/mol vs. 6,5 mg/mol, $p<0,001$), ugyanakkor az u-CYSC koncentrációik a felnőttekével megegyezően bizonyultak (9. ábra). Néhány kontroll minta esetében az LOQ alatti u-CYSC szintet detektáltunk, ezért csak felső referencia határértéket (<95 percentilis) állapítottunk meg: u-CYSC <0,14 mg/l életkortól függetlenül; u-CYSC/u-CREAT <19,7 mg/mol fiatalok és <12,4 mg/mol felnőttekre vonatkozóan.



9. Ábra: Egészséges egyének u-CYSC és u-CYSC/u-CREAT adatai. **A:** Az u-CYSC értékek összehasonlítása a fiatalokorú és felnőttkorú kontroll csoport között. **B:** Az u-CYSC/u-CREAT értékek összehasonlítása a fiatalokorú és felnőttkorú kontroll csoport között. n.s.: nem szignifikáns.

IV.1.3. Az u-CYSC teszt alkalmazása különböző betegcsoportok vizsgálatára

Szignifikánsan emelkedett ($p < 0,001$) u-CYSC szinteket és u-CYSC/u-CREAT hányadosokat figyeltünk meg szepszis-indukálta AKI-val diagnosztizált betegeknél a felnőtt kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a krónikus hipertenzióban szenvedő valamint a 2-es típusú diabeteses betegek értékei nem különböztek az egészséges csoportban megfigyeltektől (6. táblázat).

	Felnőtt kontroll csoport	Szepszis-indukálta AKI	Krónikus hipertenzió	2-es típusú diabetes mellitus
Elemszám, (n)	84	33	43	41
Nők, n (%)	44 (52)	16 (48)	20 (47)	14 (34)
Életkor, (évek)	40 (21-60)	70 (25-82)	62 (26-79)	66 (45-81)
u-CYSC (mg/l)	0,06 (0,04-0,09)	0,91 ^a (0,28-3,25)	0,05 (0,03-0,09)	0,06 (0,04-0,08)
u-CYSC/u-CREAT (mg/mol)	6,5 (5,3-7,8)	309,6 ^a (123,1-1010,8)	6,9 (5,4-9,1)	6,2 (5,0-8,2)

6. Táblázat: A vizsgált csoportok demográfiai és laboratóriumi adatai. Az egyes betegcsoportokat a kontroll csoporthoz hasonlítottuk Mann-Whitney U tesztek használatával. A medián (25-75% percentilis) értékeket tüntettük fel, kivéve az életkor, ahol medián (min-max) szerepel. ^a $p < 0,001$ a felnőtt kontroll csoporthoz képest.

IV.2. Az u-ORM vizsgálata Crohn betegeknél az aktivitás függvényében

IV.2.1. A vizsgált egyének demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatai

A 86 vizsgált Crohn beteg közül 38 esetében aktív, 48 esetében pedig inaktív fázist állapítottak meg a gasztroenterológus szakorvosok az életkornak megfelelő aktivitási index (HBI vagy PCDAI) alapján. A felnőtt betegek 47%-a, a gyermekek 39%-a volt aktív fázisban. A betegek Montreal klasszifikáció szerinti besorolása a 7. táblázatban látható. Az életkori csoportonként összegzett demográfiai és laboratóriumi adatokat a 8-9. táblázatok tartalmazzák. Az aktív Crohn betegek között magasabb volt a nők aránya mindkét életkori csoportban, ugyanakkor nem találtunk különbséget férfiak és nők u-ORM/u-CREAT

értékei között. Mind a glomeruláris, mind a tubuláris vesefunkciót normálnak találtuk valamennyi vizsgált csoport esetén a szérum és vizelet CYSC mérések alapján. Egyedül az u-CYSC/u-CREAT hányadosok mutattak különbséget a felnőtt kontroll és aktív betegcsoport között, azonban valamennyi egyén a megállapított referencia tartományon belüli u-CYSC/u-CREAT értékkel rendelkezett.

	Inaktív		Aktív	
	Fiatalkorú	Felnőtt	Fiatalkorú	Felnőtt
Életkor a diagnóziskor, n (%)				
A1: <17 év	19 (100)	1 (3)	11 (92)	1 (4)
A2: 17-40 év	-	23 (80)	1 (8)	20 (77)
A3: >40 év	-	5 (17)	-	5 (19)
A betegség kiterjedése, n (%)				
L1: ileum	7 (37)	12 (42)	5 (42)	6 (23)
L2: colon	5 (26)	3 (10)	2 (16)	1 (4)
L3: ileum és colon	7 (37)	14 (48)	5 (42)	19 (73)
L4: felső gasztrointesztinális szakasz	-	-	-	-
A betegség viselkedése, n (%)				
B1: nem strikturáló, nem penetráló	13 (68)	14 (48)	11 (92)	9 (35)
B2: strikturáló	6 (32)	11 (38)	1 (8)	13 (50)
B3: penetráló	-	4 (14)	-	4 (15)
p: perianalis érintettség	7 (37)	8 (28)	5 (42)	9 (35)

7. Táblázat: A vizsgált Crohn betegek Montreal klasszifikációja.

	Kontroll	Inaktív CD	Aktív CD	p érték
Elemzés, n	30	19	12	-
Nők, n (%)	13 (43)	8 (42)	7 (58)	0,631
Életkor, évek	14 (10-17)	15 (9-17)	15 (10-17)	0,207
WBC, G/l	6,3 (5,5-7,2)	6,9 (6,3-7,4)	9,6 (6,1-10,9)	0,039 ^b
PLT, G/l	293,5 (269,0-319,3)	306,0 (268,5-339,0)	331,5 (294,8-406,0)	0,071
ESR, mm/h	3,0 (2,0-6,0)	16 (7,5-22)	32 (27-38)	<0,001 ^{a,b,c}
hsCRP, mg/l	0,3 (0,2-0,6)	3,3 (0,6-6,1)	21,9 (8,1-48,8)	<0,001 ^{a,b,c}
se-ORM, g/l	0,74 (0,59-0,93)	0,96 (0,84-1,31)	1,76 (1,56-2,10)	<0,001 ^{a,b,c}
se-CYSC mg/l	0,94 (0,89-1,01)	0,96 (0,85-1,02)	0,86 (0,82-1,06)	0,827
u-CYSC/u-CREAT mg/mmol	0,009 (0,007-0,011)	0,009 (0,006-0,011)	0,009 (0,007-0,011)	0,703
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0,95 (0,41-1,55)	0,70 (0,42-1,79)	0,52 (0,41-1,09)	0,587
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,09 (0,07-0,15)	0,07 (0,05-0,17)	0,50 (0,33-1,21)	<0,001 ^{b,c}

8. Táblázat: Fiatalok Crohn betegek és kontrollok demográfiai és laboratóriumi adatai. A csoportok összehasonlításához Kruskal Wallis tesztet használtunk. A felső index betűk a post hoc analízis (Mann-Whitney) eredményét jelölik: a: kontroll vs. inaktív CD, $p < 0,05$; b: kontroll vs. aktív CD, $p < 0,05$; c: inaktív CD vs. aktív CD, $p < 0,01$. A medián (25-75% percentilis) értékeket tüntettük fel, kivéve az életkor, ahol medián (min-max) szerepel.

	Kontroll	Inaktív CD	Aktív CD	p érték
Elemszám, n	38	29	26	-
Nők, n (%)	21 (55)	16 (55)	19 (73)	0,292
Életkor, évek	39 (21-58)	41 (21-77)	35 (21-73)	0,447
WBC, G/l	6,4 (5,0-7,4)	6,0 (4,5-8,2)	8,2 (6,7-10,8)	<0,001 ^{b,c}
PLT, G/l	253,5 (216,3-276,3)	273,0 (238,0-325,5)	419,0 (357,8-478,3)	<0,001 ^{b,c}
ESR, mm/h	4,0 (2,0-10)	18 (8,3-26)	30 (18-38)	<0,001 ^{a,b,c}
hsCRP, mg/l	0,8 (0,4-1,7)	2,5 (1,3-6,0)	12,8 (5,8-62,9)	<0,001 ^{a,b,c}
se-ORM, g/l	0,76 (0,67-0,91)	0,94 (0,87-1,10)	1,58 (1,05-2,60)	<0,001 ^{a,b,c}
se-CYSC mg/l	0,88 (0,86-0,94)	0,94 (0,82-0,99)	0,82 (0,78-1,02)	0,291
u-CYSC/u-CREAT mg/mmol	0,006 (0,005-0,007)	0,007 (0,006-0,008)	0,008 (0,007-0,011)	0,013 ^b
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0,41 (0,25-0,59)	0,61 (0,40-1,16)	0,79 (0,31-2,53)	0,014 ^{a,b}
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,07 (0,04-0,15)	0,14 (0,05-0,33)	0,32 (0,16-1,54)	<0,001 ^{b,c}

9. Táblázat: Felnőttkorú Crohn betegek és kontrollok demográfiai és laboratóriumi adatai. A csoportok összehasonlításához Kruskal Wallis tesztet használtunk. A felső index betűk a post hoc analízis (Mann-Whitney) eredményét jelölik: a: kontroll vs. inaktív CD, $p < 0,05$; b: kontroll vs. aktív CD, $p < 0,05$; c: inaktív CD vs. aktív CD, $p < 0,05$. A medián (25-75% percentilis) értékeket tüntettük fel, kivéve az életkor, ahol medián (min-max) szerepel.

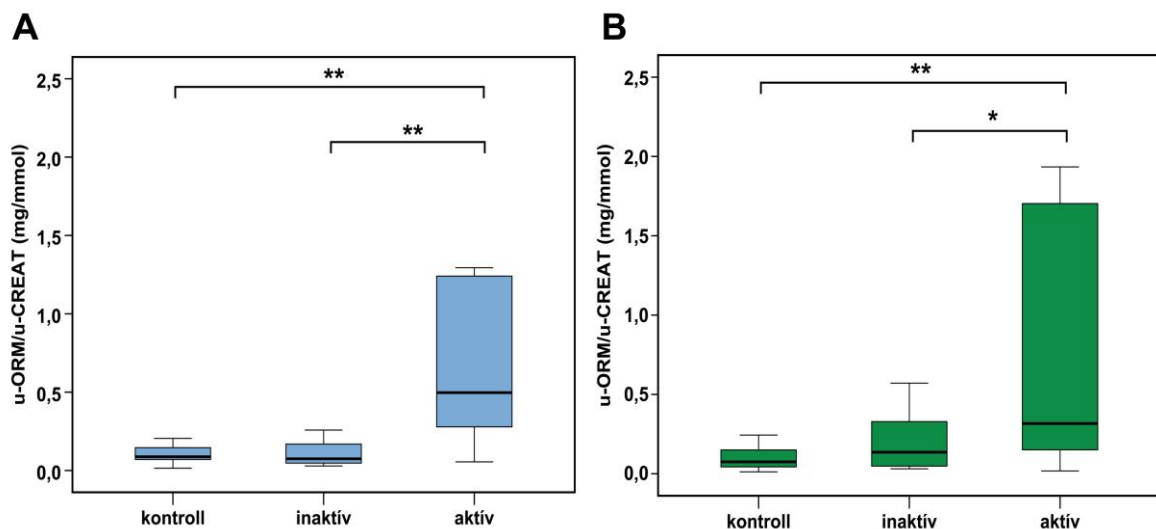
IV.2.2. U-ORM és egyéb gyulladáshoz laboratóriumi paraméterek mérése

A betegcsoportokban jól tükrözta a gyulladás mértékét a hagyományos gyulladási paraméterek mellett (hsCRP, ESR, WBC, PLT, se-ORM) az u-ORM/u-CREAT hányados is. A se-ORM emelkedett volt az aktív betegcsoportokban az inaktívokhoz képest ($p < 0,001$), emelkedésének mértéke azonban arányaiban kisebbnek bizonyult, mint az u-ORM/u-CREAT esetében, különösképpen a gyermekeknél.

Gyermekekori aktív betegeknel hétszer magasabb u-ORM/u-CREAT értékeket találtunk, mint az inaktív csoportban (8. táblázat). A felnőtt aktív betegek esetében viszont csak kétszeres emelkedést figyeltünk meg az inaktívokhoz viszonyítottan (9. táblázat, 10. ábra). Összehasonlítva a gyermekek és felnöttek u-ORM/u-CREAT értékeit, nem találtunk szignifikáns eltérést.

Szemben az u-ORM/u-CREAT értékekkel, az u-ALB/u-CREAT hányados nem mutatott szignifikáns különbséget a fiatalokú vizsgálati csoportok között. Ugyanakkor az u-ALB/u-CREAT szignifikánsan magasabb volt a felnőtt betegcsoportokban a kontrollokhoz képest ($p < 0,05$), de nem tükrözta a betegség aktivitását (aktív vs. inaktív CD).

A vizeletfehérjék összetételét tekintve az u-ORM/u-TP arány szintén emelkedettnek bizonyult aktív CD esetén (medián (IQR) értékek: 3,2 (2,0-6,4) %) mind az inaktív állapothoz (1,0 (0,6-2,8) %, $p < 0,001$), mind az egészséges egyénekhez (1,0 (0,6-1,7) %, $p < 0,001$) viszonyítva. Az u-ALB/u-TP arány viszont nem mutatott különbséget a 3 csoport között (aktív CD: 6,7 (3,4-14,8) % vs. inaktív CD: 8,3 (6,3-10,5) % vs. kontroll csoport: 6,7 (4,9-12,6) %).



10. Ábra: Gyermekek (A) és felnőtt Crohn betegek (B) valamint kontroll egyének u-ORM/u-CREAT adatai. * $p = 0,01$; ** $p < 0,001$

IV.2.3. Korrelációs vizsgálatok

Szignifikáns korrelációt találtunk az u-ORM/u-CREAT hányadosok és a gyulladási markerek, valamint az aktivitási indexek között (10-11. táblázat). A hsCRP-re, ESR-re, se-ORM-re vonatkozó korrelációs kapcsolat kissé gyengébbnek bizonyult a felnőtt betegek esetén, mint a gyermekgyógyászati páciensek csoportjában. Továbbá az u-ORM/u-CREAT szembetűnően gyengébb összefüggést mutatott a felnőtt betegek aktivitási indexével (HBI), mint a gyermekekével (PCDAI).

u-ORM/u-CREAT	Korrelációs együttható	Szignifikancia szint
hsCRP	0,55	p=0,001
se-ORM	0,59	p<0,001
ESR	0,47	p=0,007
WBC	0,27	p=0,149
PLT	0,45	p=0,012
PCDAI	0,59	p<0,001

10. Táblázat: Az u-ORM/u-CREAT korrelációs adatai gyermekkorú Crohn betegeknél. A paraméterek közötti összefüggéseket Spearman-féle korrelációs teszttel vizsgáltuk.

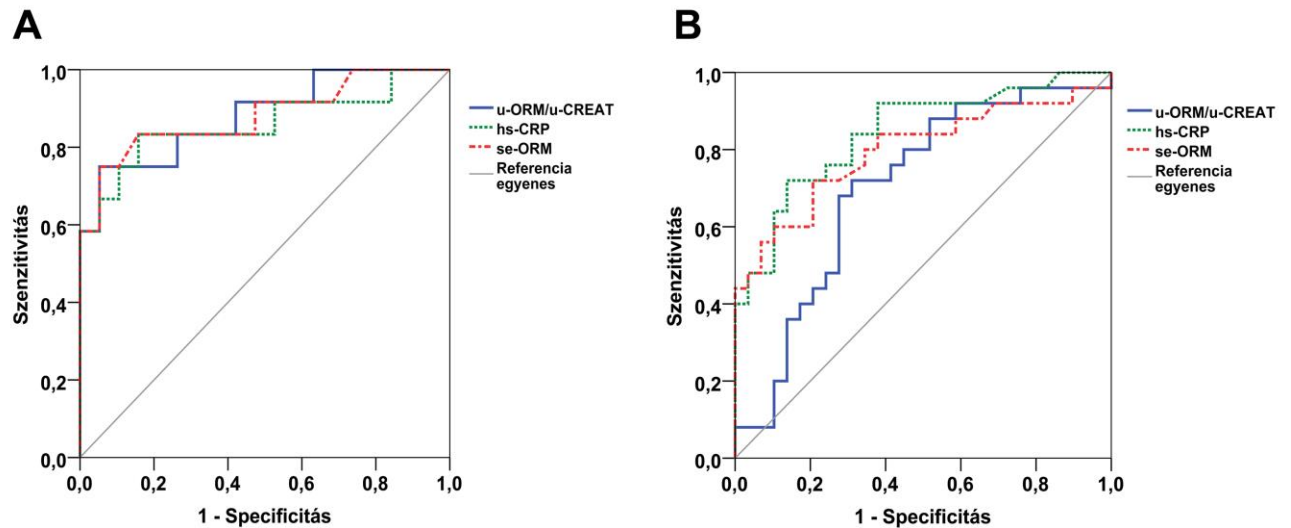
u-ORM/u-CREAT	Korrelációs együttható	Szignifikancia szint
hsCRP	0,44	p=0,001
se-ORM	0,49	p<0,001
ESR	0,37	p=0,01
WBC	0,45	p=0,001
PLT	0,44	p=0,001
HBI	0,33	p=0,018

11. Táblázat: Az u-ORM/u-CREAT korrelációs adatai felnőtt Crohn betegeknél. A paraméterek közötti összefüggéseket Spearman-féle korrelációs teszttel vizsgáltuk.

IV.2.4. ROC analízis

A ROC analízis során nyert eredmények azt mutatták, hogy a hsCRP (AUC: 0,86; p<0,001) és a se-ORM (AUC: 0,88; p<0,001) mellett az u-ORM/u-CREAT (AUC: 0,88; p<0,001) is hasonló szignifikáns diszkriminatív erővel képes különbséget tenni aktív és

inaktív állapot között fiatalokú Crohn betegek esetén (11/A ábra). Felnőtt betegek esetén azonban az u-ORM/u-CREAT AUC értéke (0,70; $p=0,01$) valamelyest elmaradt a hsCRP-re (0,84; $p<0,001$) és a se-ORM-re (0,80; $p<0,001$) kapott értékektől (11/B ábra).



11. Ábra: ROC analízisek a Crohn betegség aktív és inaktív fázisának elkülönítésére gyermekgyógyászati (A) és felnőtt betegeknél (B).

IV.3. Savoldékony szérumfehérjék vizsgálata Crohn betegeknél

IV.3.1. A vizsgált egyének demográfiai és laboratóriumi adatai

Áttekintve a vizsgálatban részt vevő 87 egyén demográfiai adatait, az egyes csoportok életkori és nembeli eloszlása nem mutatott különbséget. Rátérve a laboratóriumi adatokra, a hagyományos gyulladási paraméterek (WBC, hsCRP, se-ORM) szignifikáns emelkedéssel jelezték a gyulladási aktivitás különbségét az aktív és inaktív betegcsoport között. Továbbá az aktív Crohn betegek szérum összfehérje koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott az inaktív betegekhez képest (12. táblázat).

	Kontroll	Inaktív CD	Aktív CD	p érték
Elemszám, n	25	34	28	-
Nők, n (%)	16 (64)	16 (47)	19 (68)	0,211
Életkor, évek	29±16	26±17	26±16	0,814
se-TP, g/l	71 (68-74)	73 (69-77)	69 (65-73)	0,012 ^c
WBC, G/l	6,4 (4,9-7,7)	6,9 (6,0-8,9)	8,9 (6,5-12,3)	0,005 ^{b,c}
hsCRP, mg/l	0,5 (0,2-1,8)	2,7 (0,9-6,1)	21,9 (7,1-71,5)	<0,001 ^{a,b,c}
se-ORM, g/l	0,8 (0,7-0,8)	1,0 (0,8-1,3)	1,7 (1,2-2,6)	<0,001 ^{a,b,c}

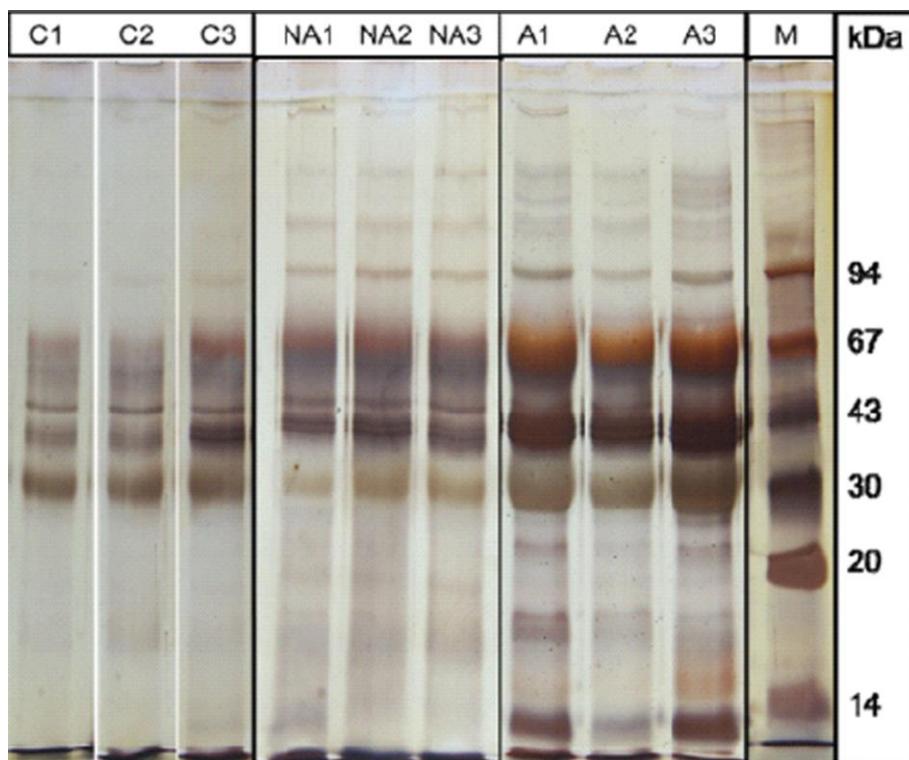
12. Táblázat: A vizsgált csoportok demográfiai és laboratóriumi adatai. A csoportok összehasonlításához Kruskal Wallis tesztekkel használtunk. A felső index betűk a post hoc analízis (Mann-Whitney) eredményét jelölik: a: kontroll vs. inaktív CD, $p < 0,01$; b: kontroll vs. aktív CD, $p < 0,01$; c: inaktív CD vs. aktív CD, $p < 0,05$. A medián (25-75% percentilis) értékeket tüntettük fel, kivéve az életkor, ahol átlag±SD szerepel.

IV.3.2. A szérumból savoldékony fehérjetartalma

Összehasonlítva a kontroll ill. az inaktív betegcsoporttal, az aktív Crohn betegek szérumból savas extraktumaiból szignifikánsan emelkedett összfehérje-koncentrációkat mértünk. (13. táblázat).

IV.3.3. A savoldékony szérumból SDS-PAGE mintázata

A PCA-oldékony szérumból SDS-PAGE analízissel nyert mintázatait kvalitatívan értékeltük. Megtekintve az ezüstözött géllemezeket markáns különbségeket észleltünk a vizsgált csoportok mintázatai között. Összehasonlítva az egészséges egyének mintázatával, az aktív Crohn betegeknél szembetűnően több fehérje frakció volt detektálható - főképp a 30 kDa alatti és a 94 kDa feletti mérettartományban - továbbá a 30-67 kDa közötti régió frakciói erőteljesebb festődést mutattak. Az inaktív stádiumú betegek fehérjeképe a kontrolléhoz volt hasonló, valamint az azonos csoportba tartozó egyének mintázatai között nem tapasztaltunk lényegi különbséget (12. ábra).



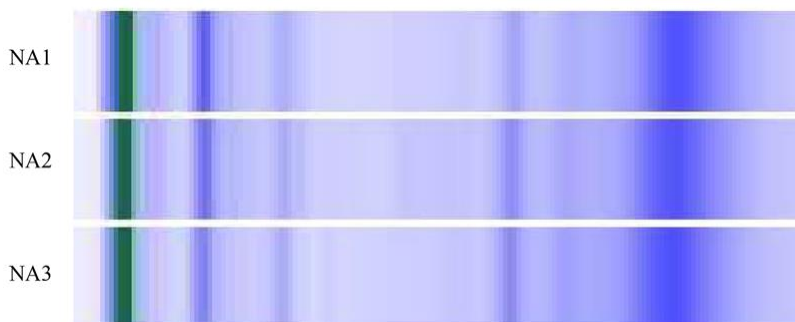
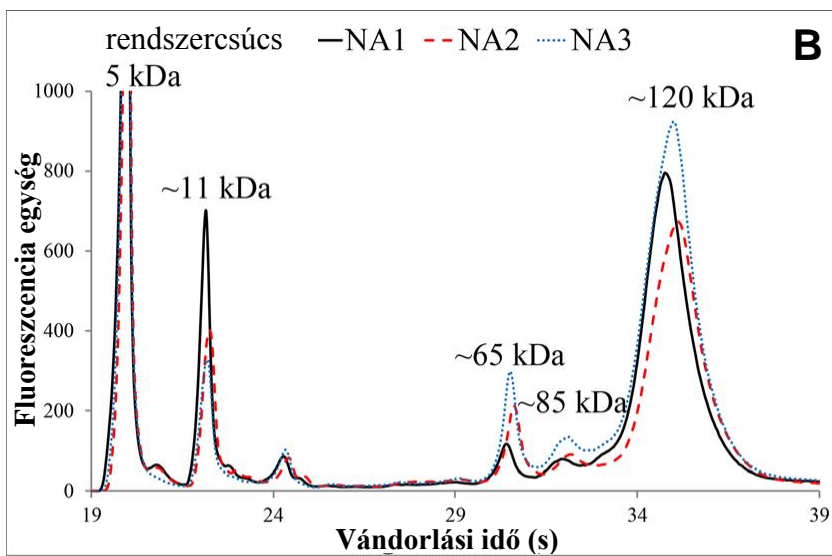
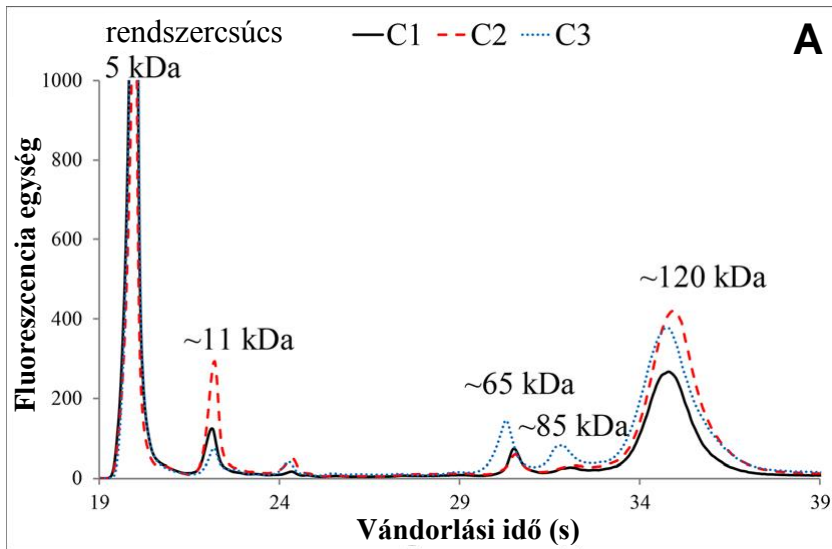
12. Ábra: SDS-PAGE során nyert, ezüst intenzifikálással detektált savoldékony fehérjemintázatok, csoportonként 3-3 reprezentatív minta bemutatásával. C: kontroll csoport. NA: inaktív CD. A: aktív CD. M: molekulásúly marker.

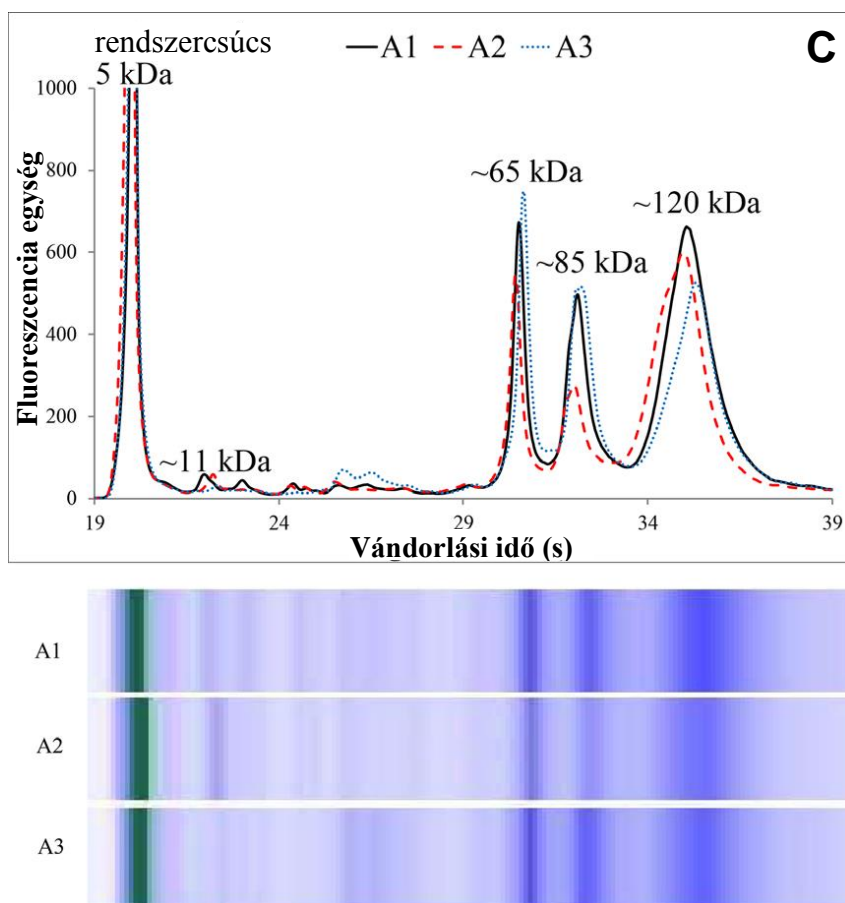
IV.3.4. A savoldékony szérumfrakció MGE analízise

MGE-vel analizálva a savoldékony szérumfehérjéket, jellegzetes profilokat detektáltunk. Mindhárom csoport mintái esetében négy frakció volt jól elkülöníthető, melyek a rendszercsúcsot (ethanolaminhoz kötött fluoreszcens festék) követően a ~11, ~65, ~85 és ~120 kDa körüli régióban jelentek meg a molekulatömeg marker alapján. Megtekintve az MGE-vel nyert savoldékony fehérjeprofilokat, az inaktív Crohn betegek mintázata az egészséges egyénekére hasonlított, míg az aktív periódusban lévő betegek mintázata markánsan eltért az előbbiektől (13. ábra). A számszerű értékeléshez kiszámítva az egyes frakciók relatív arányát, igazolódtak a profilok között látszó különbségek (13. táblázat). A ~11 kDa-nál detektált csúcs relatív aránya mintegy háromszor nagyobb volt a kontroll és az inaktív betegcsoportban, mint az aktív stádiumú betegeknél ($p < 0,001$). A ~65 és ~85 kDa-nál elhelyezkedő frakciók szignifikánsan magasabb értékeket mutattak aktív gyulladásos állapot esetén, összehasonlítva az inaktív, valamint az egészséges állapottal. A ~120 kDa-nál látható komponens relatív aránya alacsonyabb volt az aktív betegcsoportban a többi csoporthoz képest, ez a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak.

	Kontroll	Inaktív CD	Aktív CD	p érték
Összfehérje, g/l	1,2 (1,0-1,5)	1,7 (1,4-2,1)	2,9 (2,2-3,7)	<0,001 ^{a,b}
~11 kDa, %	12,2 (7,2-23,8)	12,1 (9,5-17,2)	4,4 (2,9-9,0)	<0,001 ^{a,b}
~65 kDa, %	5,5 (3,3-10,3)	7,2 (5,3-11,1)	10,8 (6,5-18,5)	0,006 ^{a,b}
~85 kDa, %	1,7 (1,2-2,9)	3,1 (2,5-5,8)	11,7 (8,2-17,5)	<0,001 ^{a,b}
~120 kDa, %	72,3 (62,6-78,3)	70,2 (64,8-76,2)	62,8 (56,8-76,5)	0,122

13. Táblázat: A savoldékony szérumfehérjék MGE-vel nyert profiljának komponensei, az összfehérje %-ában kifejezve. A felső index betűk a post hoc analízis (Mann-Whitney) eredményét jelölik: a: kontroll vs. aktív CD, $p < 0,01$; b: inaktív CD vs. aktív CD, $p < 0,05$. A medián (25-75% percentilis) értékeket tüntettük fel.





13. Ábra: MGE során nyert savoldékony fehérjeprofílok és géleképek, csoportonként 3-3 reprezentatív minta bemutatásával. A: kontroll csoport. B: inaktív CD. C: aktív CD.

V. Megbeszélés

V.1. Automatizált u-CYSC mérési módszer beállítása, validálása, klinikai alkalmazása

Megfelelően gyors, precíz és szenzitív, teljesen automatizált turbidimetriás u-CYSC meghatározási módszert dolgoztunk ki Roche Cobas 8000/c502 készüléken, mely rutin diagnosztikai felhasználásra is ideális. A mérés elvégzéséhez csupán 10 perc szükséges. A tesztet jellemző pontatlansági értékek nem érték el az 5 CV%-ot. A kiemelkedő analitikai szenzitivitásnak köszönhetően az u-CYSC kvantitatívan meghatározható a renális diszfunkcióval rendelkező betegek mellett az egészséges populáció vizeletében is. A detektálási határnál alacsonyabb u-CYSC szinteknek nincs klinikai jelentősége, a kalibrált tartomány feletti (>1 mg/l) u-CYSC érték esetén pedig a minta mérésének ismétlése szükséges megfelelő mértékű hígítást követően. Irodalmi adatok alapján – melyet a méréseink során tapasztaltak is megerősítettek – súlyos AKI esetén előfordulhatnak a biztonsági zóna határértékét (8 mg/l) is meghaladó u-CYSC szintek, emiatt a vizeletminták előhígítása ajánlott ezen betegpopulációnál (132).

Habár az u-CYSC-t a tubuláris diszfunkció megbízható markerének tartják, eddig csak néhány automatizált turbidimetriás vagy nefelometriás szérum CYSC tesztet adaptáltak a vizelet mérésére (88, 103, 104, 133, 134). Az általunk beállított módszer jellemzői hasonlóak, vagy valamelyest előnyösebbek az eddig közölt turbidimetriás tesztekhez viszonyítva (88, 133, 134). Például a Makris és mtsai. által leírt teszthez képest kissé alacsonyabb LOD-t sikerült elérnünk az általunk alkalmazott beállítások mellett, mely lehetővé tette közel valamennyi referencia egyén vizeletéből a pontos CYSC meghatározást (133).

Egyetértésben korábbi vizsgálatokkal, a mi megfigyeléseink során sem mutatott számottevő interferenciát az u-CYSC méréssel sem az albumin, sem a hemoglobin (88, 103). Az előbbieket mellett a vizelet egyéb endogén összetevői (kálcium, karbamid, glükóz) sem befolyásolták az u-CYSC analízisét.

Stabilitás vizsgálataink felfedték, hogy egyes vizeletmintákban a CYSC instabil lehet a tárolási hőmérséklettől függetlenül, megerősítve Sohrabian és mtsai. korábbi megfigyelését (88). Eredményeink alapján célszerű a mérést friss vizeletmintákból (24 órán belül) végezni, és a mérésig hűtve (4°C -on) tárolni. Habár a sporadikusan előforduló instabilitás oki háttere nem tisztázott, másokkal egyetértésben ajánlott proteáz gátlót tartalmazó

tartósítószer hozzáadása a frissen nyert vizeletmintákhoz, amennyiben azok 24 óránál hosszabb ideig történő tárolása szükséges (89, 104).

Mivel a CYSC vizelettel történő exkréciója nem mutat cirkadián ritmust, nem szükséges a vizeletgyűjtés, a spontán ürített egyszeri vizeletminták analízise is alkalmas mind referencia tartomány meghatározásra, mind klinikai diagnosztikai célokra (135). A kontroll csoportot vizsgálva teljes referencia intervallum nem volt megállapítható, mivel néhány kontroll minta az LOQ alatti u-CYSC szintet mutatott, továbbá ezek az igen alacsony u-CYSC szintek tulajdonképpen nem rendelkeznek klinikai jelentőséggel. Az előbbi okokból következően csak felső referencia határértéket határoztunk meg <95 percentilis értéknek megfelelően. Az egészséges egyének körében mért u-CYSC értékeink és referencia tartományunk összhangban állnak a korábban közölt adatokkal: nefelometriás mérési módszerrel Conti és mtsai. 60 egészséges felnőtt vizeletmintáját analizálva 0,03-0,18 mg/l közötti értékeket találtak, Mijušković és mtsai 31 főből álló felnőtt kontroll csoportjának adatai pedig a 0,02-0,15 mg/l közötti tartományban mozogtak (104, 136). Noraddin és mtsai. turbidimetriás módszert alkalmazva 0,16 mg/l-ben állapították meg a referencia tartomány felső határát, mely közel azonos a mi értékünkkel (134).

Mivel spontán ürített vizeletmintákat analizáltunk, indokolt volt az eredményeket vizelet kreatininre vonatkoztatva (u-CYSC/u-CREAT) is kifejezni, az eltérő hidráltsági állapotok befolyásoló hatásának csökkentése érdekében. Az u-CYSC koncentráció adatok, ill. az u-CYSC/u-CREAT arány megbízhatósága jelenleg vita tárgyát képezi. Míg egyes szerzők javasolják az u-CYSC/u-CREAT hányadosok használatát (89, 96, 137-139), mások szerint viszont a tubuláris vesekárosodás érinti a kreatinin kiválasztását is, amely befolyásolhatja a kreatininre vonatkoztatott vizeletfehérje értékeket, csökkentve azok megbízhatóságát (140). Ebből következően tanulmányunkban az abszolút u-CYSC koncentráció és az u-CYSC/u-CREAT arány egyidejű megadása mellett döntöttünk. Az általunk vizsgált egészséges felnőttek u-CYSC/u-CREAT adatai hasonlóan bizonyultak, mint a Grubb által megfigyelték (89). Habár a vizsgált populációnk relatíve kisméretű volt, szignifikáns különbséget tapasztaltunk a tizenévesek és a felnőttek u-CYSC/u-CREAT értékei között, amely megerősít egy nemrég közölt, hasonló megfigyelést (141). Ez az eltérés valószínűleg a vizelet kreatinin kiválasztás életkor függéséből adódhat, amelynek hátterében a kamaszkor alatt végbemenő izomtömeg-növekedés áll (142).

Szignifikánsan emelkedett u-CYSC szinteket és u-CYSC/u-CREAT hányadosokat találtunk az AKI betegek csoportjában a kontroll csoporthoz képest, mely jelezte a szepszishez kapcsolt AKI következtében fellépő tubuláris vesekárosodást. Ugyanakkor az

u-CYSC emelkedése nem volt olyan extrém mértékű, mint amit egy korábbi tanulmány során figyeltek meg (132).

Habár a krónikus magas vérnyomás a nephropathia rizikófaktora, vizsgálati csoportunk adatai azt mutatták, hogy nem volt hatással a krónikus hipertenzió az u-CYSC szintekre. A 2-es típusú diabeteses csoportban mért u-CYSC értékekből arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált betegeknél még nem alakult ki tubuláris károsodás. Korábbi tanulmányok alapján a tubuláris károsodás megelőzheti a mikroalbuminuria megjelenését a cukorbetegség egy kisebb hányadánál, amely esetek korai felismerésében hasznos marker lehet az u-CYSC (140). Albuminuriával járó esetekben viszont fontos lehet azt is figyelembe venni, hogy kompetíció alakulhat ki az albumin és a kis molekulatömegű fehérjék között a receptor-mediálta reabszorpció során, ami fokozhatja az u-CYSC ürítését egy vizsgálat szerint (143).

Eredményeink és a rendelkezésre álló adatok alapján az u-CYSC alkalmas – különösen AKI esetén – a vese tubuláris károsodásának korai jelzésére, igényt teremtve a mindennapi klinikai használatra. Az általunk beállított és validált teszt egyszerűen adaptálható a forgalomban lévő laboratóriumi analizátorokra, elősegítve, hogy az u-CYSC a rutin diagnosztikai paletta részévé válhasson.

V.2. Az u-ORM, mint a Crohn betegség aktivitásának lehetséges markere

Az IBD napjainkban több mint ötmillió embert érint világszerte, ebből Európában mintegy 3 millió beteg él. A páciensek élethosszig tartó gondozást igényelnek a betegség természetéből adódó periodikus fellángolások, és a hosszú távú komplikációk kockázata miatt. Napjainkban a „treat to target” stratégia elterjedésével – melynek célja a remisszió nyálkahártya szintjén való elérése – egyre inkább felértékelődik az objektív információt nyújtó diagnosztikai módszerek szerepe (144). Ismert, hogy az aktivitási indexek nem tükrözik konzekvensen a bélrendszeri gyulladás súlyosságát (23), gyakran a tünetek hiánya mellett is észlelhető nyálkahártya szintű gyulladás endoszkópos vizsgálat során (36). A leginkább objektív, mind a mai napig gold standardnak számító endoszkópia azonban invazív és drága vizsgálómódszer, amely fokozott megterhelést jelent a betegek – kifejezetten a gyermekek – számára. Ezek a tényezők a laboratóriumi diagnosztikai oldal fejlesztésére teremtnek igényt (28).

Mivel a jelenleg ismert laboratóriumi markerek nem felelnek meg minden elvárásnak, a CD aktivitását megbízhatóan jelző, újabb non-invazív biomarkerek felderítése továbbra is

aktív kutatás tárgyát képezi (24, 25, 30). A vérből és székletből vizsgált számos paraméter mellett a vizeletfehérjék diagnosztikus értéke többnyire felfedetlen területnek számít a CD tekintetében, holott a vizeletfehérje markerek is hasznos információval szolgálhatnak mind akut mind krónikus gyulladásos folyamatokban (145, 146). Az akut fázis fehérjék közé tartozó ORM szérum koncentrációja széleskörűen tanulmányozott CD-ben (31), ugyanakkor a vizeletből mérhető szintek információs értékét – legjobb tudásunk szerint – még nem vizsgálták a CD vonatkozásában.

Vizsgálatunkban az u-ORM/u-CREAT hányados képes volt különbséget tenni a CD aktív és inaktív fázisa között; gyermekkorú betegek körében hasonló teljesítménnyel, mint a hsCRP és a se-ORM. Felnőttkorú Crohn betegeknél viszont valamelyest elmaradt a diagnosztikus ereje a szérum markerekétől. Habár a vizsgálati csoportok viszonylag kis elemszámúak voltak, a korcsoportok között tapasztalt teljesítménybeli különbség összefüggésben állhat a betegek aktivitási index-alapú kategorizálásával: a gyermekeknél alkalmazott PCDAI több objektív összetevőt tartalmaz, mint a felnőttek HBI pontrendszeré. Jóllehet, a CDAI felépítésében közelebb állna a PCDAI-hoz, a felnőtt páciensek aktív vagy inaktív csoportba sorolását a klinikusok a HBI alapján végezték el vizsgálatunk során, mivel egyszerűbb, gyorsabb értékelést tesz lehetővé a szakrendelés keretei között. Ezt a gyakorlatot alátámasztja Vermeire és mtsai. ajánlása, akik szoros korrelációt írtak le a HBI és a CDAI között (147). Az u-ORM/u-TP arányban látott különbség arra enged következtetni, hogy a gyulladásos aktivitás egy bizonyos mértékű változást idéz elő a vizeletfehérjék összetételében. Ezt a hatást már szepszishez kapcsolt súlyos akut gyulladásos állapotban is megfigyeltük, ahol markánsabb változás volt detektálható, mint a CD aktív fázisában (86).

A fokozott u-ORM kiválasztás feltételezhetően az immunrendszer aktivációjával függ össze. Az aktív CD csoportban talált többszörös emelkedés összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, melyek más akut (pl. szepszis, nyitott szívűmütét) és krónikus (pl. SLE, 2-es típusú DM, RA) gyulladásos állapotokban írtak le hasonló, vagy magasabb értékeket (70-73, 86). Ezt a feltevést támogatják az u-ORM és a hagyományos gyulladásos paraméterek között megfigyelt szignifikáns korrelációk is.

Az u-ORM kiválasztásának pontos mechanizmusa és az azt befolyásoló faktorok jelenleg még tisztázatlanok. A szérum és vizelet ORM között tapasztalt közepes erősségű korreláció arra utal, hogy a se-ORM emelkedése önmagában nem magyarázza az emelkedett u-ORM szinteket. Munkacsoportunk korábbi, szepszissel kapcsolatos eredményei azt sugallták, hogy a vesefunkciónak fontos hatása lehet az u-ORM

kiválasztására (86). Ezért a glomeruláris és/vagy tubuláris diszfunkció esetleges fennállásának kizárása céljából se-CYSC és u-CYSC méréseket végeztünk, melyek nem igazoltak vesefunkciós eltéréseket az általunk vizsgált Crohn betegeknek. Christiansen és mtsai. sem találtak glomeruláris és/vagy tubuláris diszfunkcióra utaló jeleket emelkedett u-ORM szinteket mutató 2-es típusú cukorbetegségnek (68). Felmerült, hogy renális szekréció és akár egy vese általi lokális ORM szintézis is hozzájárulhat az u-ORM emelkedéséhez, mely mechanizmusok a krónikus gyulladásos állapottal összefüggő, a szervezet egészére kiterjedő citokin válasz következményei lehetnek (68, 76, 86). Ezt a felvetést támogatja egy egereken végzett vizsgálat, melynek során az intraperitonealis LPS injekció ORM génexpressziót indukált a vesében (43).

Az u-ORM/u-CREAT – kifejezetten a gyermekeknek – arányaiban nagyobb mérvű emelkedést mutatott aktív CD-ben, mint a se-ORM, azt sugallva, hogy az u-ORM/u-CREAT a gyulladásos aktivitásnak egy érzékenyebb markere lehet. Korábbi megfigyelésekkel ellentétben, a mi vizsgálati anyagunkban nem tükrözte az u-ALB/u-CREAT hányados a CD aktivitását (37, 38). Az u-ORM és az u-ALB a CD aktivitására nézve különböző válaszkészséget mutatott, melynek hátterében a két fehérje eltérő kiválasztódási mechanizmusa állhat.

Az u-ORM meghatározása értékes, objektív információt nyújtva egészítheti ki a meglévő diagnosztikus eszköztárat, hozzájárulva a pontosabb állapotfelméréshez. Az új, automatizált mérési módszer alkalmas a gyors és megbízható eredmény-szolgáltatásra, ezáltal az u-ORM teszt megfelel a mai elvárásoknak (23, 29). A mintavétel pedig – non-invazív jellege által – kíméletes a betegek, különösképpen a gyermekek számára. További előnyt jelent, hogy az u-ORM *in vitro* nagyfokú stabilitással rendelkezik, – ahogy arról korábban mi is beszámoltunk, – így a minták szállítása és tárolása nem igényel speciális feltételeket (69).

V.3. Savoldékony szérumszékély vizsgálata Crohn betegeknek

A kis koncentrációban keringő alacsony molekulatömegű szérumszékély csoportja magában foglalhat számos új diagnosztikus lehetőséget a gyulladásos kórképek vonatkozásában. A szérumszékély kezelése alkalmas eljárás olyan kisebb koncentrációban jelenlévő glikoproteinek izolálására, melyek detektálásában nehézséget okoz a főbb székély maszkoló hatása. Ezáltal lehetőséget teremt a savoldékony székélyfrakció további érzékeny analízisére (108-110).

Legjobb tudásunk szerint mi vizsgáltuk először aktív és inaktív stádiumú Crohn betegek vonatkozásában a PCA-oldékony szérumfehérje-frakció diagnosztikus értékét. Jóllehet Cooke és mtsai. ill. Thaw és mtsai. végeztek kezdeti vizsgálatokat IBD-vel diagnosztizált betegek szérumaival, azonban a mi protokollunktól eltérően a PCA-val történő kicsapást foszfowolframsavas precipitációval kombinálták (148, 149).

A hagyományos gyulladási paraméterek (WBC, hsCRP, se-ORM) bár vizsgálatunkban is jelezték a CD-ben perzisztáló gyulladási aktivitást, nem minden esetben alkalmasak annak korai, megbízható felismerésére (26, 27, 31, 150). A se-TP jelzett csökkenése az aktív betegcsoportban jóllehet statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, azonban klinikai relevanciával nem bír, csupán néhány páciensnél találtunk referencia tartomány alatti se-TP értéket.

Az aktív stádiumú Crohn betegeknél tapasztalt emelkedett savoldékony fehérjekoncentráció a generalizált gyulladási állapottal állhat kapcsolatban. Ebben meghatározó tényező lehet, hogy a jelentős szénhidrát komponenssel rendelkező akut fázis fehérjék (pl. ORM, haptoglobin, α -1 antitripszin) képesek oldatban maradni a PCA kezelés során. Régóta ismert, hogy a PCA-oldékony frakcióban számos gyulladási marker lelhető fel (108, 110, 111).

A mennyiségi változás (pozitív akut fázis fehérjék emelkedése) mellett a minőségi változás is szerepet játszhat a savoldékony frakció koncentráció-növekedésében. Korábban leírták, hogy bizonyos betegségek kapcsán megváltozik a glikoproteinek szénhidrát komponensének szerkezete, befolyásolva azok biológiai funkcióit és egyben fizikokémiai tulajdonságait is (49, 58, 151-156). Ezáltal ellenállóbbá válhatnak a PCA-val szemben, nagyobb arányban kerülve a savas extraktumba. A glikozilációban bekövetkező specifikus változások akár gyulladási és daganatos betegségek biomarkereiként is funkcionálhatnak (157-161). Továbbá azt is kimutatták, hogy az akut fázis fehérjék különböző glikozilációs formáinak jelenléte korrelál egyes betegségek súlyosságával (162, 163).

Munkacsoportunk korábbi megfigyelései szerint katabolikus állapotok (kiterjedt műtéti beavatkozások, kemoterápia) is eredményezhetnek emelkedett savoldékony fehérjemennyiséget a keringésben. Az emelkedés hátterében sejttanyacsere-folyamatok degradációs termékeinek, vagy szöveti nekrozisból származó molekuláknak a keringésbe lépése állhat (121). Ennek alapján CD-ben egy krónikus gyulladással asszociált katabolikus állapot is hozzájárulhat a magasabb savoldékony fehérjeszinthez.

Szeptikus betegekkel végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy markánsan csökkent se-TP mellett a savoldékony fehérjék mennyisége az egészségesekre jellemző érték

többszörösére emelkedett. Ebből arra következtethetünk, hogy a savoldékony fehérjekoncentráció változását nem a se-TP változása határozza meg.

Az egyes csoportjaink SDS-PAGE mintázatai között látott különbségek a PCA-oldékony frakciók eltérő fehérjeösszetételéről tanúskodnak. Az ezüst akkumulációja bár nem egyenesen arányos a fehérjemennyiséggel, az aktív betegek 30-67 kDa molekulatömegű frakcióinak erőteljesebb festődése utal a savas extraktumok magasabb fehérjetartalmára. Ebben a tartományban helyezkedik el például az ORM (42 kDa), melyről ismert, hogy szérum szintje emelkedik a CD aktív fázisában, valamint a savoldékony frakció jelentős komponenseként is számon tartják (31, 108, 117).

MGE analízis során a CD gyulladással aktivitásának fokozódásával markáns változásokat észleltünk a savoldékony fehérjeproflokban. Bár az elkülönülő domináns frakciók pontos fehérjeösszetétele nem ismert, valószínűsíthető, hogy nagyfokban glikozilált akut fázis fehérjék (pl. ORM, α -1 antitripszin, complement faktorok) lehetnek alapvetően felelősek a négy frakció relatív arányának változásáért, melyek közül néhányat korábban már azonosítottak is PCA-kezelt mintákból (113). A mennyiségi variabilitás mellett a glikoproteinek szénhidrát struktúráiban gyulladás hatására bekövetkező változások is befolyásolhatják az MGE mintázatokat (152, 154, 155).

Az SDS-PAGE munka- és időigényes módszer, ráadásul az ezüstözött géllemezek nem alkalmasak szemikvantitatív értékelésre sem, az ezüst-intenzifikálás nem lineáris jellege miatt (130, 131). Szemben az SDS-PAGE módszerrel, az MGE egy miniatürizált, lineáris polimert alkalmazó, gyors eljárás, mely lehetővé teszi a relatív arányokon alapuló számszerű értékelést és a nagyfokú reprodukálhatóságot (164, 165). Ezáltal az MGE analízis alkalmasabbnak bizonyul a savoldékony szérumfehérjék eloszlásbeli és intenzitásbeli különbségeinek detektálására. A későbbiekben érdemes lehet proteomikai módszerek segítségével azonosítani az MGE profil változásáért felelős PCA-oldékony fehérjéket, melyek azután potenciális biomarkerekként tovább vizsgálhatók a klinikai alkalmazási lehetőségek irányába.

V.4. Vizsgálataink korlátai

A tanulmányunkból levonható következtetéseket számos tényező limitálja. Monocentrikus jellegű vizsgálatainkat viszonylag kis elemszámú csoportokon végeztük, melyen belül a fiatalok csoportok jelentősen kisebbek voltak a felnőttkorú csoportokhoz képest.

Hivatalos kalibráló és kontroll anyag nem érhető el u-CYSC mérésekhez, ezért a módszerünk validálása és méréseink során se-CYSC tesztekhez gyártott kalibrációs és kontroll anyagok megfelelő hígításait használtuk. Referencia tartományunk csupán előzetesnek tekinthető a vizsgált egészséges populáció mérete miatt. Nem vizsgáltuk az u-CYSC stabilitását proteáz gátló tartalmú additívum alkalmazása mellett, ennek kapcsán korábbi közlemények adataira hivatkoztunk.

A Crohn betegek aktív vagy inaktív státusza a klinikai indexek alapján került meghatározásra, mely a csoportosítás bizonytalanságát hordozza magában az indexek szubjektív tényezői miatt. Ezen bizonytalanság kizárása végett érdemes lenne egy megerősítő vizsgálatot végezni objektív endoszkópos és szövettani leletek alapján kialakított aktivitási csoportokkal. Néhány relapszusban lévő beteg egészséges egyénekre jellemző u-ORM szintet mutatott, melynek hátterében elképzelhető, hogy a gyulladásgátló és immunmoduláns gyógyszerek szuppresszív hatást gyakorolnak az u-ORM exkrécióra. A gyógyszeres terápia és az u-ORM szintek esetleges összefüggései további felderítést igényelnek. Habár a széklet calprotectin a klinikai gyakorlatban is elterjedt aktivitási markerré vált, tanulmányunk nem tartalmazott székletminta gyűjtést és u-ORM – calprotectin összehasonlítást. Ennek kivitelezése egy későbbi kutatás keretei között azonban hasznos információt tehet hozzá az u-ORM-mel kapcsolatos ismereteinkhez.

A szérum minták PCA extrakciójára vonatkozóan nem végeztünk komplett validálási procedúrát. Jelen tanulmányunkban csak az MGE analízis által szeparálódó fehérjefrakciók relatív arányát vizsgáltuk. Kutatási irányvonalunk távlati lehetőségeit képezi az MGE profilt meghatározó specifikus fehérjék azonosítása és mennyiségi mérése, továbbá a savoldékony fehérjék glikozilációs mintázatának vizsgálata mind CD-ben, mind egyéb kórképekben.

VI. Összegzés

U-CYSC mérésére alkalmas automatizált immunturbidimetriás módszert adaptáltunk Cobas 8000/c502 laboratóriumi analizátorra, és elvégeztük annak analitikai validálását az aktuális szakmai ajánlások szerint.

A validálás során megállapított kedvező analitikai tulajdonságok (érzékenység, precizitás) és a rövid reakcióidő alkalmassá teszik a tesztet a rutin klinikai felhasználásra, mely segítheti a gyors döntéshozást a klinikai gyakorlatban.

Gyermek- és felnőttkorú egészséges egyének vizsgálatával a módszerhez tartozó előzetes referencia tartományt határoztunk meg.

Szepszis-indukálta AKI-val diagnosztizált betegeknél markánsan emelkedett u-CYSC ürítést találtunk, mely egyértelműen jelezte a vesekárosodás tubuláris komponensét. 2-es típusú diabeteses és krónikus hipertenzív betegeknél egészséges egyénekre jellemző u-CYSC értékeket detektáltunk, ezáltal nem igazolódott renális tubuláris diszfunkció jelenléte ezekben a csoportokban.

Se-CYSC és u-CYSC mérések alapján megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált Crohn betegek nem rendelkeztek vesefunkciós eltéréssel.

Mind gyermek-, mind felnőttkorú, aktív stádiumban lévő Crohn betegeknél szignifikánsan emelkedett u-ORM/u-CREAT értékeket találtunk az inaktívakhoz képest. Az emelkedés mértéke gyermekeknél hétszeresnek bizonyult, tehát az u-ORM érzékenyebben jelezte a gyulladást, mint a se-ORM.

Az u-ORM/u-CREAT hányados hasonló teljesítménnyel volt képes elkülöníteni a gyermekkori CD aktív és inaktív fázisát, mint a hagyományos gyulladástól. Felnőttek esetén valamelyest alacsonyabb diagnosztikus értéket tapasztaltunk.

Szignifikáns korrelációkat figyeltünk meg az u-ORM/u-CREAT és a hagyományos gyulladástól, valamint a CD klinikai indexei között.

Eredményeink alapján az u-ORM – mint gyulladástól – mérése hozzájárulhat a Crohn betegek aktivitásának pontosabb, objektív megítéléséhez. A vizeletminták non-invazív módon, kíméletesen nyerhetők, mely kifejezetten előnyös a gyermekek kivizsgálása során.

Szignifikánsan emelkedett savoldékony fehérjekoncentrációt mértünk aktív állapotú Crohn betegek szérumból, mely a perzisztáló, generalizált gyulladástól állhat összefüggésben.

A PCA-oldékony szérumból SDS-PAGE analízise során minőségi különbséget tártunk fel aktív és inaktív Crohn betegek mintázatai között.

Elsőként vizsgáltuk a savoldékony szérumból extrahált MGE analízissel, mely során nyert profilkban 4 domináns, jól elkülönülő frakciót detektáltunk. Aktív stádiumú Crohn betegekben jellegzetes mintázatot azonosítottunk, mely markánsan eltért az inaktív betegek, valamint az egészséges kontrollok esetén megfigyelttől. Az elkülönülő frakciók relatív arányának meghatározásával számszerűleg is igazoltuk a mintázatok között észlelt különbségeket.

Megfigyeléseink alapján a savoldékony szérumból mennyisége és összetétele is tükrözi a CD gyulladási aktivitását. Tanulmányunk további biomarker kutatások kiindulópontját képezheti, segítve a CD laboratóriumi diagnosztikájának fejlesztését.

VII. Irodalomjegyzék

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *The American journal of medicine*. 1952;13(5):583-90.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
3. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(8):942-51.
4. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-78.
5. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, et al. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World journal of gastroenterology*. 2004;10(3):404-9.
6. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, et al. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(12):2558-65.
7. Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14 Suppl 2:S9-11.
8. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):423-39.
9. Sykora J, Pomahacova R, Kreslova M, Cvalinova D, Stych P, Schwarz J. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(25):2741-63.
10. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-month : DM*. 2018;64(2):20-57.
11. Boyapati R, Satsangi J, Ho GT. Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000prime reports*. 2015;7:44.
12. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(4):564-71.
13. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017;389(10080):1741-55.
14. Carriere J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(34):12102-17.
15. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(1):40-6.
16. DeBoer MD, Denson LA. Delays in puberty, growth, and accrual of bone mineral density in pediatric Crohn's disease: despite temporal changes in disease severity, the need for monitoring remains. *The Journal of pediatrics*. 2013;163(1):17-22.

17. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2005;19 Suppl A:5A-36A.
18. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(6):1314-21.
19. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70(3):439-44.
20. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
21. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(2):512-30.
22. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1991;12(4):439-47.
23. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1275-85 e2.
24. Iborra M, Beltran B, Nos P. Noninvasive Testing for Mucosal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*. 2016;26(4):641-56.
25. Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;159(4):313-25.
26. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, et al. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(6):802-19; quiz 20.
27. Nancey S, Perret-Liaudet A, Moussata D, Graber I, Boschetti G, Renaud B, et al. Urinary neopterin is a valuable tool in monitoring Crohn's disease activity. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(11):1548-54.
28. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(3):247-55.
29. Cappello M, Morreale GC. The Role of Laboratory Tests in Crohn's Disease. *Clinical medicine insights Gastroenterology*. 2016;9:51-62.
30. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55(3):426-31.
31. Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(2):359-67.

32. Miranda-Garcia P, Chaparro M, Gisbert JP. Correlation between serological biomarkers and endoscopic activity in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2016;39(8):508-15.
33. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2001;96(3):730-4.
34. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(11):2235-41.
35. D'Angelo F, Felley C, Frossard JL. Calprotectin in Daily Practice: Where Do We Stand in 2017? *Digestion*. 2017;95(4):293-301.
36. Papay P, Ignjatovic A, Karmiris K, Amarante H, Milheller P, Feagan B, et al. Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(8):653-69.
37. Mahmud N, Stinson J, O'Connell MA, Mantle TJ, Keeling PW, Feely J, et al. Microalbuminuria in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1994;35(11):1599-604.
38. Szigeti N, Marko L, Molnar GA, Fabian G, Cseh J, Mohas M, et al. Microalbuminuria in inflammatory bowel diseases using immunoturbidimetry and high-performance liquid chromatography. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 2009;72(4):394-401.
39. Pascu M, Roznowski AB, Muller HP, Adler A, Wiedenmann B, Dignass AU. Clinical relevance of transabdominal ultrasonography and magnetic resonance imaging in patients with inflammatory bowel disease of the terminal ileum and large bowel. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(4):373-82.
40. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*. 2008;371(9613):660-7.
41. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *Journal of Crohn's & colitis*. 2020;14(1):4-22.
42. K S. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *J Am Chem Soc*. 1950;72(6):2816.
43. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1482(1-2):157-71.
44. Grzyb J, Latowski D, Strzalka K. Lipocalins - a family portrait. *Journal of plant physiology*. 2006;163(9):895-915.
45. Logdberg L, Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1482(1-2):284-97.
46. Sorensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *The American journal of physiology*. 1999;276(2):H530-4.
47. Merritt CM, Board PG. Structure and characterisation of a duplicated human alpha 1 acid glycoprotein gene. *Gene*. 1988;66(1):97-106.

48. Tesseromatis C AA, Tigka E, Kotsiou A. Acute-Phase Proteins: Alpha -1- Acid Glycoprotein. In: Pascu O, editor. *Gastrointestinal Endoscopy: InTech*; 2011.
49. van Dijk W, Havenaar EC, Brinkman-van der Linden EC. Alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconjugate journal*. 1995;12(3):227-33.
50. Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won KA, Jahreis GP. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989;557:280-95, discussion 95-6.
51. Kulkarni AB, Reinke R, Feigelson P. Acute phase mediators and glucocorticoids elevate alpha 1-acid glycoprotein gene transcription. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(29):15386-9.
52. Haraldsson BS, Johnsson EK, Rippe B. Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomuroid. *Kidney international*. 1992;41(2):310-6.
53. Johnsson E, Haraldsson B. Addition of purified orosomuroid preserves the glomerular permeability for albumin in isolated perfused rat kidneys. *Acta physiologica Scandinavica*. 1993;147(1):1-8.
54. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*. 1992;258(5084):964-9.
55. Hocheplied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(1):25-34.
56. Hocheplied T, Van Molle W, Berger FG, Baumann H, Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(20):14903-9.
57. Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha-1-acid (AAG, orosomuroid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation*. 1997;21(1):69-82.
58. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Current protein & peptide science*. 2007;8(1):91-108.
59. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug metabolism reviews*. 2001;33(2):161-235.
60. Fitos I, Visy J, Zsila F, Mady G, Simonyi M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1760(11):1704-12.
61. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(2):625-32.
62. Jones K, Hoggard PG, Khoo S, Maher B, Back DJ. Effect of alpha1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, zidovudine and zalcitabine in vitro. *British journal of clinical pharmacology*. 2001;51(1):99-102.

63. Duche JC, Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I, Barre J. Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clinical biochemistry*. 2000;33(3):197-202.
64. Cylwik B, Chrostek L, Gindzienska-Sieskiewicz E, Sierakowski S, Szmitkowski M. Relationship between serum acute-phase proteins and high disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Advances in medical sciences*. 2010;55(1):80-5.
65. Kjeldsen J, Lauritsen K, De Muckadell OB. Serum concentrations of orosomucoid: improved decision-making for tapering prednisolone therapy in patients with active inflammatory bowel disease? *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1997;32(9):933-41.
66. Barroso-Sousa R, Lobo RR, Mendonca PR, Memoria RR, Spiller F, Cunha FQ, et al. Decreased levels of alpha-1-acid glycoprotein are related to the mortality of septic patients in the emergency department. *Clinics*. 2013;68(8):1134-9.
67. Xiao K, Su L, Yan P, Han B, Li J, Wang H, et al. alpha-1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. *Journal of critical care*. 2015;30(4):744-51.
68. Christiansen MS, Hommel E, Friberg L, Molvig J, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2010;24(1):28-36.
69. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochemia medica*. 2016;26(3):421-30.
70. Kustan P, Szirmay B, Koszegi T, Ludany A, Kovacs GL, Miseta A, et al. Monitoring urinary orosomucoid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clinical biochemistry*. 2017;50(18):1002-6.
71. Park YJ, Yoo SA, Hwang D, Cho CS, Kim WU. Identification of novel urinary biomarkers for assessing disease activity and prognosis of rheumatoid arthritis. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48:e211.
72. Watson L, Midgley A, Pilkington C, Tullus K, Marks S, Holt R, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 and alpha 1 acid glycoprotein as biomarkers of renal disease activity in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21(5):496-501.
73. Christiansen MS, Iversen K, Larsen CT, Goetze JP, Hommel E, Molvig J, et al. Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2009;69(2):272-81.
74. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine is a powerful predictor of cardiovascular mortality in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes at five years of follow-up. *Diabetologia*. 2005;48(2):386-93.
75. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine predicts cardiovascular and over-all mortality in patients with Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002;45(1):115-20.
76. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Liu H, Hou X, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2009;14(3):332-7.

77. Svendstrup M, Christiansen MS, Magid E, Hommel E, Feldt-Rasmussen B. Increased orosomuroid in urine is an independent predictor of cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes at 10 years of follow-up. *Journal of diabetes and its complications*. 2013;27(6):570-5.
78. Hou LN, Li F, Zeng QC, Su L, Chen PA, Xu ZH, et al. Excretion of urinary orosomuroid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. *PloS one*. 2014;9(9):e107550.
79. Christiansen MS, Hesse D, Ekbom P, Hesse U, Damm P, Hommel E, et al. Increased urinary orosomuroid excretion predicts preeclampsia in pregnant women with pregestational type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;89(1):16-21.
80. Kronborg CS, Allen J, Vittinghus E, Knudsen UB. Pre-symptomatic increase in urine-orosomuroid excretion in pre-eclamptic women. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2007;86(8):930-7.
81. Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, et al. Stage-dependent increase of orosomuroid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics*. 2005;5(16):4296-304.
82. Li F, Yu Z, Chen P, Lin G, Li T, Hou L, et al. The increased excretion of urinary orosomuroid 1 as a useful biomarker for bladder cancer. *American journal of cancer research*. 2016;6(2):331-40.
83. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. *Pediatric research*. 2009;65(5):530-6.
84. Marko L, Szigeti N, Szabo Z, Boddi K, Takatsy A, Ludany A, et al. Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2010;45(12):1440-8.
85. Magid E, Guldager H, Hesse D, Christiansen MS. Monitoring urinary orosomuroid in acute inflammation: observations on urinary excretion of orosomuroid, albumin, alpha1-microglobulin, and IgG. *Clinical chemistry*. 2005;51(11):2052-8.
86. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Kovacs GL, Miseta A, et al. Urinary orosomuroid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(2):299-307.
87. Christiansen MS, Blirup-Jensen S, Foged L, Larsen M, Magid E. A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomuroid in urine: development, validation and reference values. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2004;42(10):1168-77.
88. Sohrabian A, Noraddin FH, Flodin M, Fredricsson A, Larsson A. Particle enhanced turbidimetric immunoassay for the determination of urine cystatin C on Cobas c501. *Clinical biochemistry*. 2012;45(4-5):339-44.
89. Grubb AO. Cystatin C--properties and use as diagnostic marker. *Advances in clinical chemistry*. 2000;35:63-99.
90. Leung-Tack J, Tavera C, Gensac MC, Martinez J, Colle A. Modulation of phagocytosis-associated respiratory burst by human cystatin C: role of the N-terminal tetrapeptide Lys-Pro-Pro-Arg. *Experimental cell research*. 1990;188(1):16-22.

91. Leung-Tack J, Tavera C, Martinez J, Colle A. Neutrophil chemotactic activity is modulated by human cystatin C, an inhibitor of cysteine proteases. *Inflammation*. 1990;14(3):247-58.
92. Verdot L, Lalmanach G, Vercruyse V, Hartmann S, Lucius R, Hoebeke J, et al. Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(45):28077-81.
93. Nandy SK, Seal A. Structural Dynamics Investigation of Human Family 1 & 2 Cystatin-Cathepsin L1 Interaction: A Comparison of Binding Modes. *PloS one*. 2016;11(10):e0164970.
94. Bargnoux AS, Pieroni L, Cristol JP, Kuster N, Delanaye P, Carlier MC, et al. Multicenter Evaluation of Cystatin C Measurement after Assay Standardization. *Clinical chemistry*. 2017;63(4):833-41.
95. Grubb A, Lindstrom V, Jonsson M, Back SE, Ahlund T, Rippe B, et al. Reduction in glomerular pore size is not restricted to pregnant women. Evidence for a new syndrome: 'Shrunken pore syndrome'. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2015;75(4):333-40.
96. Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood purification*. 2010;29(4):357-65.
97. Royackers AA, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Bouman CS, Spronk PE, et al. Serum cystatin C-A useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure? *Current medicinal chemistry*. 2007;14(21):2314-7.
98. Woo KS, Choi JL, Kim BR, Kim JE, Han JY. Clinical usefulness of serum cystatin C as a marker of renal function. *Diabetes & metabolism journal*. 2014;38(4):278-84.
99. Le Bricon T, Thervet E, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C, Erlich D. Changes in plasma cystatin C after renal transplantation and acute rejection in adults. *Clinical chemistry*. 1999;45(12):2243-9.
100. Fox JA, Dudley AG, Bates C, Cannon GM, Jr. Cystatin C as a marker of early renal insufficiency in children with congenital neuropathic bladder. *The Journal of urology*. 2014;191(5 Suppl):1602-7.
101. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. 2012(2):1-138.
102. Schmid M, Dalela D, Tahbaz R, Langetepe J, Randazzo M, Dahlem R, et al. Novel biomarkers of acute kidney injury: Evaluation and evidence in urologic surgery. *World journal of nephrology*. 2015;4(2):160-8.
103. Herget-Rosenthal S, Feldkamp T, Volbracht L, Kribben A. Measurement of urinary cystatin C by particle-enhanced nephelometric immunoassay: precision, interferences, stability and reference range. *Annals of clinical biochemistry*. 2004;41(Pt 2):111-8.
104. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2006;44(3):288-91.

105. Koyner JL, Bennett MR, Worcester EM, Ma Q, Raman J, Jeevanandam V, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney international*. 2008;74(8):1059-69.
106. Jeon YK, Kim MR, Huh JE, Mok JY, Song SH, Kim SS, et al. Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Journal of Korean medical science*. 2011;26(2):258-63.
107. Satoh-Asahara N, Suganami T, Majima T, Kotani K, Kato Y, Araki R, et al. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2011;6(2):265-73.
108. Ongay S, Lacunza I, Diez-Masa JC, Sanz J, de Frutos M. Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis. *Analytica chimica acta*. 2010;663(2):206-12.
109. Stumpe M, Miller C, Morton NS, Bell G, Watson DG. High-performance liquid chromatography determination of alpha1-acid glycoprotein in small volumes of plasma from neonates. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2006;831(1-2):81-4.
110. Winzler RJ, Devor AW, et al. Studies on the mucoproteins of human plasma; determination and isolation. *The Journal of clinical investigation*. 1948;27(5):609-16.
111. Burston D, Tombs MP, Apsey ME, Maclagan NF. The perchloric acid soluble basic and acidic proteins of the cytoplasm: variation in cancer. *British journal of cancer*. 1963;17:162-78.
112. Laurentius LB, Crawford AC, Mulvihill TS, Granger JH, Robinson R, Spencer JS, et al. Importance of specimen pretreatment for the low-level detection of mycobacterial lipoarabinomannan in human serum. *The Analyst*. 2016;142(1):177-85.
113. Lee CS, Taib NA, Ashrafzadeh A, Fadzli F, Harun F, Rahmat K, et al. Unmasking Heavily O-Glycosylated Serum Proteins Using Perchloric Acid: Identification of Serum Proteoglycan 4 and Protease C1 Inhibitor as Molecular Indicators for Screening of Breast Cancer. *PloS one*. 2016;11(2):e0149551.
114. Ganz PA, Baras M, Ma PY, Elashoff RM. Monitoring the therapy of lung cancer with alpha-1-acid glycoprotein. *Cancer research*. 1984;44(11):5415-21.
115. Ma R, Xu H, Wu J, Sharma A, Bai S, Dun B, et al. Identification of serum proteins and multivariate models for diagnosis and therapeutic monitoring of lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(12):18901-13.
116. Drozd M, Kucharz E, Kozlowski A. Perchloric acid-soluble proteins and protein-bound hexoses in serum and tissues of normal, hypo-and hyperthyroid rats. *Acta biologica et medica Germanica*. 1975;34(4):703-6.
117. Tecles F, Martinez-Subiela S, Ceron JJ. Optimization of a spectrophotometric method for quantification of acid-soluble glycoprotein in porcine serum. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2007;71(3):161-4.
118. Basso D, Valerio A, Seraglia R, Mazza S, Piva MG, Greco E, et al. Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 MW peptide. *Pancreas*. 2002;24(1):8-14.

119. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359(9306):572-7.
120. Rubin RB, Merchant M. A rapid protein profiling system that speeds study of cancer and other diseases. *American clinical laboratory*. 2000;19(8):28-9.
121. Kőszegi T KG, Molnár Zs, Mühl D, Nagy Á. Szisztémás fertőzés monitorozása a szérum procalcitonin szint és a keringő kismolekulasúlyú fehérjék analizisével. *Focus Medicinæ*. 2000;(1-2):38-43.
122. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition. CLSI document EP10-A3. Wayne, PA, USA2006.
123. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA, USA2012.
124. Westgard Basic Method Validation. [cited 2017 4 dec]. Available from: www.westgard.com/lesson27.htm.
125. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical biochemistry*. 2012;45(6):464-9.
126. Zappitelli M, Greenberg JH, Coca SG, Krawczeski CD, Li S, Thiessen-Philbrook HR, et al. Association of definition of acute kidney injury by cystatin C rise with biomarkers and clinical outcomes in children undergoing cardiac surgery. *JAMA pediatrics*. 2015;169(6):583-91.
127. Zhou J, Liu Y, Tang Y, Liu F, Zhang L, Zeng X, et al. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. *International urology and nephrology*. 2016;48(1):125-32.
128. Hjorth L, Helin I, Grubb A. Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2000;60(1):65-73.
129. Tencer J, Thysell H, Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1996;56(8):691-700.
130. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
131. Willoughby EW, Lambert A. A sensitive silver stain for proteins in agarose gels. *Analytical biochemistry*. 1983;130(2):353-8.
132. Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Westhuyzen J, Shaw GM, Frampton CM, et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. *Critical care*. 2010;14(3):R85.
133. Makris K, Nikolaki E, Nanopoulos K, Pirgakis KM, Maltezos CK. Measurement of cystatin C in human urine by particle-enhanced turbidimetric immunoassay on an automated biochemistry analyzer. *Clinical biochemistry*. 2013;46(12):1128-30.

134. Noraddin FH, Flodin M, Fredricsson A, Sohrabian A, Larsson A. Measurement of urinary cystatin C with a particle-enhanced turbidimetric immunoassay on Architect ci8200. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2012;26(5):358-64.
135. Conti M, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Moutereau S, Manivet P, et al. Absence of circadian variations in urine cystatin C allows its use on urinary samples. *Clinical chemistry*. 2005;51(1):272-3.
136. Mijuskovic Z, Maksic D, Hrvacevic R, et al. Urinary Cystatin C as a Marker of Tubular Dysfunction. *J. Med. Biochem*. 2007;26(2).
137. Helmersson-Karlqvist J, Arnlov J, Carlsson AC, Harma J, Larsson A. Increased urinary cystatin C indicated higher risk of cardiovascular death in a community cohort. *Atherosclerosis*. 2014;234(1):108-13.
138. Kim SS, Song SH, Kim IJ, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS, et al. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes care*. 2013;36(3):656-61.
139. Uchida K, Gotoh A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2002;323(1-2):121-8.
140. Makris K, Stefani D, Makri E, Panagou I, Lagiou M, Sarli A, et al. Evaluation of a particle enhanced turbidimetric assay for the measurement of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in plasma and urine on Architect-8000: Analytical performance and establishment of reference values. *Clinical biochemistry*. 2015;48(18):1291-7.
141. Pennemans V, Rigo JM, Faes C, Reynders C, Penders J, Swennen Q. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue? *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2013;51(9):1795-802.
142. Remer T, Neubert A, Maser-Gluth C. Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;75(3):561-9.
143. Nejat M, Hill JV, Pickering JW, Edelstein CL, Devarajan P, Endre ZH. Albuminuria increases cystatin C excretion: implications for urinary biomarkers. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27 Suppl 3:iii96-103.
144. Bouguen G, Levesque BG, Feagan BG, Kavanaugh A, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF, et al. Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(6):1042-50 e2.
145. Delles C, Schiffer E, von Zur Muhlen C, Peter K, Rossing P, Parving HH, et al. Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals. *Journal of hypertension*. 2010;28(11):2316-22.
146. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clinical and translational science*. 2008;1(3):200-8.
147. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010;8(4):357-63.

148. Cooke WT, Fowler DI, Cox EV, Gaddie R, Meynell MJ. The clinical significance of seromucoids in regional ileitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1958;34(5):910-9.
149. Thaw PA, Albutt EC. A critical evaluation of a serum sermucoid assay and its replacement by a serum alpha 1 acid glycoprotein assay. *Annals of clinical biochemistry*. 1980;17(3):140-3.
150. Magro F, Sousa P, Ministro P. C-reactive protein in Crohn's disease: how informative is it? *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2014;8(4):393-408.
151. Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconjugate journal*. 1998;15(2):177-82.
152. Chavan MM, Kawle PD, Mehta NG. Increased sialylation and defucosylation of plasma proteins are early events in the acute phase response. *Glycobiology*. 2005;15(9):838-48.
153. Higai K, Azuma Y, Aoki Y, Matsumoto K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;329(1-2):117-25.
154. Joenvaara S, Saraswat M, Kuusela P, Saraswat S, Agarwal R, Kaartinen J, et al. Quantitative N-glycoproteomics reveals altered glycosylation levels of various plasma proteins in bloodstream infected patients. *PloS one*. 2018;13(3):e0195006.
155. McCarthy C, Saldova R, Wormald MR, Rudd PM, McElvaney NG, Reeves EP. The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1 antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions. *Journal of proteome research*. 2014;13(7):3131-43.
156. Turner GA. Haptoglobin. A potential reporter molecule for glycosylation changes in disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 1995;376:231-8.
157. Banazadeh A, Veillon L, Wooding KM, Zabet-Moghaddam M, Mechref Y. Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. *Electrophoresis*. 2017;38(1):162-89.
158. Fanayan S, Hincapie M, Hancock WS. Using lectins to harvest the plasma/serum glycoproteome. *Electrophoresis*. 2012;33(12):1746-54.
159. Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis*. 1999;20(2):362-71.
160. Balmana M, Gimenez E, Puerta A, Llop E, Figueras J, Fort E, et al. Increased alpha1-3 fucosylation of alpha-1-acid glycoprotein (AGP) in pancreatic cancer. *Journal of proteomics*. 2016;132:144-54.
161. Mackiewicz A, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconjugate journal*. 1995;12(3):241-7.
162. Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi AR, et al. alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer*. 2004;101(12):2825-36.
163. Ryden I, Pahlsson P, Lundblad A, Skogh T. Fucosylation of alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent

onset rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2002;317(1-2):221-9.

164. Engel N, Weiss VU, Wenz C, Rufer A, Kratzmeier M, Gluck S, et al. Challenges of glycoprotein analysis by microchip capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2015;36(15):1754-8.

165. Makszin L, Kilar A, Felso P, Peterfi Z, Kocsis B, Kilar F. Quantitative microfluidic analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2012;33(22):3351-60.

VIII. Publikációs lista

VIII.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Wittmann I, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis*. 2018 Mar 1;10(6):377-384. doi: 10.4155/bio-2017-0228. **IF: 2,321**

Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Miseta A, Kőszegi T. Elevated urinary orosomuroid excretion as a novel biomarker in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest*. 2019 Mar;49(3):e13054. doi: 10.1111/eci.13054. **IF: 3,481**

Makszin L, Kustán P, **Szirmay B**, Páger C, Mező E, Kalács KI, Pászthy V, Györgyi E, Kilar F, Ludány A, Kőszegi T. Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders. *Electrophoresis*. 2019 Feb;40(3):447-454. doi: 10.1002/elps.201800378. **IF: 3,081**

VIII.2. A disszertációhoz nem kapcsolt közlemények

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Christensen PH, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Urinary orosomuroid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016 Oct 15;26(3):421-430. doi: 10.11613/BM.2016.044. **IF: 2,934**

Kustán P, **Szirmay B**, Kőszegi T, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Mühl D, Németh B, Kiss I, Németh Á, Szabados S, Ajtay Z. Monitoring urinary orosomuroid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clin Biochem*. 2017 Dec;50(18):1002-1006. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.010. **IF: 2,584**

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Kőszegi T, Mühl D. Urinary orosomuroid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Feb 1;55(2):299-307. doi: 10.1515/cclm-2016-0840. **IF: 3,556**

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis. *J Clin Lab Anal*. 2018 Mar;32(3). doi: 10.1002/jcla.22321. **IF: 1,728**

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Jul 26;56(8):1373-1382. doi: 10.1515/cclm-2017-0782. **IF: 3,638**

VIII.3. Könyvfejezetek

Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Ludány A. Human orosomuroid in the clinical laboratory. In: *Laboratory techniques with applicability in medical practice*. Editors: Tamás Kőszegi,

Antonella Chesca. Lambert Academic Publishing, 2015. ISBN-13: 978-3-659-31724-8, ISBN-10: 3659317241.

VIII.4. A disszertációhoz kapcsolódó előadások és poszterek

Ludány A, **Szirmay B**, Györgyi E, Szigeti N, Kőszegi T, Kovács GL. Urinary orosomuroid as an activity marker in Crohn's disease. 56th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. Budapest, August 30–September 1, 2012. Clin Chem Lab Med. 50:(8) pp. eA1-eA46. (2012).

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Módszer a vizelet és könny orosomuroid vizsgálatára (2013) PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, 2013.02.07-08.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Módszer a vizelet és könny orosomuroid vizsgálatára. In: Rakonczay Z, Boros M (szerk.) XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Orvos- és Egészségtudományi Szekció : Előadáskivonatok. Szeged, Magyarország, Szegedi Tudományegyetem, (2013) pp. 294-294, 1 p.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Method for the examination of urinary and tear orosomuroid. HMAA Summer Conference, Balatonfüred, August 16-17, 2013. In: Somkúti István (szerk.) Archives of the Hungarian Medical Association of America. (2013) p. 52 Paper: P/3.

Szirmay B, Kustán P, Ludány A. Humán orosomuroid a klinikai laboratóriumi diagnosztikában. In: Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavaszi szél konferencia: Absztraktkötet 2015, Budapest, Magyarország, Publio Kiadó, (2015) p. 397.

Szirmay B, Kustán P. Human orosomuroid in the clinical laboratory. 7th International Student Medical Congress in Kosice, Slovakia, June 24-26, 2015. FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA 70 : 1/2015 pp. 125-126. Paper: 179 , 2 p. (2015)
ISBN: 9788081522499.

Szirmay B, Kövér A, Kustán P. Informational value of orosomuroid in acute and chronic inflammatory diseases. In: Irena Prodan Žitnik, Janja Marc (szerk.) International CEEPUS Summer School on Complex Diseases 2015 - Hematologic Diseases, Hormonal Dysfunction, Neurodegenerative Diseases. University of Ljubljana, (2015) p. 32.

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Miseta A, Mühl D, Kőszegi T. Urinary orosomuroid- automated immunoturbidimetric test and its clinical relevance. The 8th Conference of PhD Students, Marosvásárhely, Románia, December 9 -10, 2015. Acta Medica Marisiensis 61:(7) p. 8. (2015).

Szirmay B, Tárnok A, Kőszegi T, Ludány A. A Crohn betegség aktivitásának laboratóriumi markerei a gyermekgyógyászatban. In: Keresztes Gábor (szerk.) Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavaszi szél 2016, Nemzetközi multidiszciplináris konferencia: Absztraktkötet. Budapest, Magyarország, (2016) pp. 377-377, 1 p.

Szijártó A, Kustán P, **Szirmay B**, Györgyi E, Kilár F, Kőszegi T, Ludány A, Makszin L. Microchip electrophoretic analysis of acid soluble serum proteins of patients. Magyar

Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA207-eA208. (2016).

Szirmay B, Kustán P, Christensen PH, Ludány A, Kőszegi T. An automated immune turbidimetric test for urinary orosomuroid: validation and clinical usage. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA186 Paper: YF12 (2016).

Szirmay B, Kustán P, Christensen PH, Ludány A, Kőszegi T. An automated particle-enhanced immune turbidimetric test for urinary orosomuroid: validation and clinical usage. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA365 Paper: 0123 (2016).

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kőszegi T. Urinary cystatin-C: a new automated particle-enhanced immune turbidimetric test for the routine evaluation of kidney tubular function. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S803. (2017).

Makszin L, Páger C, Mező E, Kustán P, **Szirmay B**, Györgyi E, Kőszegi T, Ludány A, Kilar F. Electrophoretic Analyses of Perchloric Acid Soluble Serum Proteins of Patients. In: Felinger Attila (szerk.) 11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Ernő Tyihák: Book of abstracts. Pécs, Magyarország: Hungarian Society for Separation Sciences, (2017) Paper: P-50.

Szirmay B, Páger C, Kustán P, Györgyi E, Kőszegi T, Ludány A, Kilar F, Makszin L. Electrophoretic analyses of perchloric acid soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) pp. eA151-eA151. Paper: P16, 1 p. (2018).

Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kőszegi T. Urinary orosomuroid as a novel laboratory marker of the inflammatory activity in Crohn's disease. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) pp. eA124-eA124. Paper: SE1.2, 1 p. (2018).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Miseta A, Mühl D, Kőszegi T. A novel urinary cystatin-C assay for monitoring kidney function in sepsis. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA144 Paper: SE7.6, 1 p. (2018).

Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Kőszegi T. Urinary orosomuroid: A new approach for the assessment of Crohn's disease activity. 23rd IFCC-EFLM EuroMedLab Barcelona, Spain, May 19-23, 2019. Clin. Chim. Acta 493 pp. S369-S370. (2019).

VIII.5. A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó előadások és posztterek

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as sepsis markers. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság

58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA200. (2016).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Novel urinary protein markers in sepsis. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése, Szeged, August 25-27, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA199-eA200. (2016).

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Synergistic, predictive protein markers in sepsis: serum Gc globulin and gelsolin. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) p. eA365. (2016).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw, Poland, September 21 -24, 2016. Clin Chem Lab Med. 54:(10) pp. eA324-eA325. (2016).

Kustán P, Horváth-Szalai Z, **Szirmay B**. Urinary Orosomuroid as a Potential Diagnostic Marker of Sepsis. 13th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Kralove, Czech Republic, November 24-25, 2016.

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Németh B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Vizelet orosomuroid: új, gyulladáso biomarker szepszisben. In: Bódog Ferenc, Csizsár Beáta, Hegyi Dávid, Pónusz Róbert (szerk.) DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban: Absztraktkötet. Pécs, Magyarország, Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, (2017) p. 37.

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as potential early predictors of sepsis. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S585. (2017).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens, Greece, June 11-15, 2017. Clin Chem Lab Med. 55:(s1) p. S588. (2017).

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Mühl D, Kőszegi T. Aktinkötő fehérjék szepszisben. III. Mediterrán Intenzíves Randevú (MIRA), Pécs, október 20-21, 2017.

Horváth-Szalai Z, Kustán P, **Szirmay B**, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kőszegi T. Novel immune turbidimetric detection and predictive values of serum actin-binding proteins in sepsis. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs, August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA127 Paper: 10.1515/cclm-2018-0718, 1 p. (2018).

Kustán P, **Szirmay B**, Horváth-Szalai Z, Ragán D, Ludány A, Miseta A, Németh B, Mühl D, Kőszegi T. Orosomuroid in urine: a promising novel marker for monitoring systemic acute inflammation. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése, Pécs,

August 30 – September 1, 2018. Clin Chem Lab Med. 56:(9) p. eA152 Paper: P20, 1 p. (2018).

IX. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Ludány Andreának, aki már tudományos diákkörösként bevezetett a laboratóriumi kutatások világába és munkámat kezdettől fogva mindvégig irányította. Kiemelt köszönettel tartozom Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak, aki mentorként folyamatosan támogatta munkámat, szakmai útmutatásokkal és hasznos tanácsokkal látott el.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Miseta Attilának, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, valamint Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, a Szentágotthai Kutatóközpont korábbi igazgatójának, hogy lehetőséget és háttérrel biztosítottak intézeti munkámhoz és vizsgálataim elvégzéséhez. Hálás vagyok Györgyi Erzsébet tudományos segédmunkatársnak, aki bevezetett a laboratóriumi munka gyakorlatába és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a mintagyűjtés és mintafeldolgozás folyamataiban. Köszönet illeti Dr. Lakatos Ágnes és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait, kiemelten Rózsai Ágnes, akik a turbidimetriás módszerbeállítások és mérések kivitelezését technikailag segítették. Hálás vagyok a fehérjekutatásokkal foglalkozó közvetlen munkatársaimnak, Dr. Kustán Péternek és Dr. Horváth-Szalai Zoltánnak, akik értékes ötletekkel, sok biztatással, baráti légkör megteremtésével járultak hozzá munkám egészéhez.

Hálával tartozom Dr. Makszin Lillának és Prof. Dr. Kilár Ferencnek a microchip elektroforézis kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Tárnok András, Dr. Sarlós Patrícia és Dr. Szigeti Nóra gasztroenterológusoknak, valamint Prof. Dr. Mühl Diána intenzív terápiás osztályvezetőnek a betegek beválogatásában nyújtott szakmai irányításukért és tanácsaikért.

Köszönöm családomnak és páromnak a sok bátorítást és támogatást.

A vizelet cystatin-C mérési módszer beállítása és a mérések, továbbá a vizelet orosomuroid mérések a DiaSys Diagnostic Systems GmbH, a Dako-Agilent A/S vállalat, valamint a Roche Magyarország Kft. támogatásával valósultak meg.

Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations

Balázs Szirmay¹, Péter Kustán^{1,2}, Zoltán Horváth-Szalai¹, Andrea Ludány¹, Ágnes Lakatos¹, Diána Mühl², István Wittmann³, Attila Miseta¹, Gábor L. Kovács^{1,4} & Tamás Kőszegi^{*,1,4}

¹Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary

²Department of Anaesthesiology & Intensive Therapy, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary

³2nd Department of Internal Medicine & Nephrology Centre, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Pacsirta u. 1, Hungary

⁴János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Ifjúság u. 20, Hungary

* Author for correspondence: Tel.: +36 30 491 7719; Fax: +36 72 536 121; tamas.koszegi@aok.pte.hu

Aim: There is no commercially available urinary cystatin-C (u-CYSC) test in the market. Therefore, we optimized and validated an automated immune turbidimetric test for u-CYSC measurements and investigated u-CYSC concentrations in acute and chronic diseases which might lead to renal tubular disorders.

Materials & methods: A particle-enhanced immune turbidimetric assay was adapted and validated on a Cobas 8000/c502 analyzer. Urine samples of different patient groups were also analyzed. **Results:** Our method showed excellent analytical performance. U-CYSC/u-creatinine (u-CREAT) was higher in sepsis-related acute kidney injury group ($p < 0.001$) compared with controls and to patients with chronic hypertension and Type 2 diabetes. **Conclusion:** We validated a fast, sensitive, fully automated u-CYSC assay which is ideal for routine use and might be a potential complementary laboratory test to evaluate renal tubular function.

First draft submitted: 14 October 2017; Accepted for publication: 22 December 2017; Published online: 16 February 2018

Keywords: acute kidney injury • cystatin-C • tubular damage • turbidimetry • urine • validation

Recently, intense investigation has been focused on finding novel laboratory markers with high diagnostic capability for predicting renal dysfunction, since early diagnosis of renal disorders is of utmost importance. Urinary cystatin-C seems to be a promising protein marker that can provide clinically useful data on tubular dysfunctions [1,2].

It is widely known, that cystatin-C (CYSC) found in plasma is a nonglycosylated inhibitor of cysteine proteases with a molecular mass of 13 kDa. It is produced by most nucleated cells at a constant rate and is secreted into the blood [2]. Due to its physical properties CYSC is freely filtered by the glomeruli; then it is reabsorbed and almost completely catabolized by the proximal tubular cells. Therefore, CYSC is a normal component of urinary proteins at very low concentrations [2–4]. In case of tubular injury the reabsorption and degradation of CYSC might be reduced, leading to increased urinary CYSC (u-CYSC) excretion [5].

In contrast to u-CYSC, serum/plasma CYSC has already been introduced as a reliable marker for estimating GFR with better performance than serum creatinine [6,7]. Serum CYSC seems to be a good marker of glomerular function in acute kidney injury (AKI), while u-CYSC is thought to be an optimal indicator of tubular lesions [8]. However, only few trials have been performed on the clinical utility of u-CYSC. These trials suggested that u-CYSC was a more sensitive predictor of the need of renal replacement therapy in AKI than β_2 -microglobulin, and it showed a higher *in vitro* stability too [3,5,8].

Among patients who underwent cardiac surgery, early and persistent increase of u-CYSC was described correlating with the progression of AKI [9]. Besides acute renal impairment, u-CYSC may provide diagnostic information on diabetic nephropathy (DN) as well. Increased u-CYSC concentrations were found among Type 2 diabetic patients without albuminuria presumably as a result of the tubular damage prior to glomerular manifestation of DN. Consequently, elevated excretion of u-CYSC may predict DN earlier than microalbuminuria [10]. Moreover, it has

been shown that u-CYSC, referred to urinary creatinine is associated with the severity and progression of chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome [11].

U-CYSC seems to be an appropriate and a highly reliable marker for the early diagnosis of renal tubular dysfunction. However, at present no commercial automated u-CYSC kit is available in the clinical laboratory. Commercial serum CYSC kits cannot be directly applied for u-CYSC measurements because of their inappropriate measuring range. Therefore, in our work we optimized and validated a serum immune turbidimetric test for u-CYSC measurements. The present study also aimed to determine preliminary reference ranges for our assay and to provide u-CYSC data in various patient groups which can be potentially related to acute or chronic renal tubular disorders.

Materials & methods

Subjects

Our analyses were done from April 2015 to September 2016. The study was performed according to the Declaration of Helsinki 2008, and was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs, Medical School (no. 4327.316–2900/KK15/2011). Every volunteer was fully informed and a written consent was obtained from all of them.

To determine a preliminary reference range of our u-CYSC method, 117 healthy individuals between the age of 10 and 60 years were enrolled. The healthy state was established based on physical examination and on medical records. Exclusion criteria were any kind of acute or chronic diseases and proteinuria. In order to investigate the potential clinical utility of u-CYSC measurements, a group of patients with sepsis-related AKI ($n = 33$), patients with chronic hypertension ($n = 43$) and Type 2 diabetic patients ($n = 41$), were also included. AKI in septic patients was established using the Kidney Disease Improving Global Outcomes guideline [12] supported by serum CYSC concentrations, similarly to others [13–15]. Inclusion criteria for the chronic hypertension and diabetic patient groups were: established clinical diagnosis of their treated disease, the lack of acute inflammatory conditions and other chronic disorders such as autoimmune diseases or tumors.

Sampling & laboratory testing

Spot urine samples were obtained from all participants. After centrifugation (1500 g, 10 min) supernatants were collected into aliquots and stored at -70°C until use. Urinary total protein and creatinine (u-CREAT) were determined on a Cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by standard routine laboratory procedures. U-CYSC data of patients' samples were referred to urinary creatinine and were given as u-CYSC/u-CREAT ratio; however, absolute u-CYSC concentrations were also reported.

Reagents & instrumentation

For u-CYSC method adaptation, validation and measurements a particle-enhanced turbidimetric assay was carried out using an open developmental channel of the Cobas 8000/c502 analyzer (Roche Diagnostics GmbH).

The determinations of u-CYSC were performed by using the Cystatin C FS kit (Cat. No. 171589910930, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany), which was originally developed for serum CYSC measurements within a range of 0.1–8.0 mg/l. The kit contained polyclonal goat antihuman CYSC antibodies bound to polystyrene particles and a 100 mmol/l TRIS buffer, pH 7.5.

Dilution series of TruCal Cystatin C calibrator set (Cat. No. 171509910059, DiaSys) were used for calibrations and proper dilutions of TruLab Cystatin C Level 1 and Level 2 (Cat. No. 598709910046, 598809910046, DiaSys) were applied as controls. TruCal Cystatin C was traceable to the IFCC reference material ERM®DA471. For the dilution of the calibrators, controls, patient samples and for blank samples sterile 154 mmol/l NaCl solution was used.

Assay conditions & validation procedures

In order to obtain better analytical sensitivity compared with the original serum assay, the test conditions were completely changed. The calibrator/control/sample volume was increased to 12 μl , the reagent volume was decreased to 50 μl and the buffer volume to 170 μl . The optimal working range for u-CYSC determinations (0.03–1.0 mg/l) was chosen in the antibody excess zone by testing a wide concentration range of the analyte.

Full calibration was performed by applying six standards: 0.0; 0.03; 0.125; 0.25; 0.5; 1.0 mg/l CYSC solutions by diluting the 1 mg/l calibrator with saline. The linear regression fitting was applied. For the turbidimetric reaction

Table 1. Imprecision data of the urinary cystatin-C assay.

Sample	Target value mg/l	Intra-assay (n = 10)		Interassay (n = 40)	
		Mean \pm SD mg/l	CV %	Mean \pm SD mg/l	CV %
c1 [†]	0.728	0.759 \pm 0.012	1.52	0.744 \pm 0.014	1.94
c2 [†]	0.348	0.346 \pm 0.006	1.79	0.337 \pm 0.006	1.90
c3 [†]	0.073	0.070 \pm 0.002	3.29	0.069 \pm 0.003	4.84

[†]Samples were diluted from TruLab Cystatin C Level 2 control.
CV: Coefficient of variation; u-CYSC: Urinary cystatin-C.

a two-point end assay type was used at the wavelength of 505 nm and delta absorbance was calculated between 42–70 measuring points. The assay was performed at 37°C with 10 min of reaction time.

The stability of calibration was checked by summarizing 30 independent calibrations. Intra- and interassay imprecisions, parameters of analytical sensitivity and linearity were assessed based on the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [16–18]. For determining the limit of blank (LoB) and limit of detection (LoD) five blank and five low-concentration (expected to be very close to the limit of detection) samples (12 replicates/sample) were analyzed. LoQ was determined as the lowest amount of u-CYSC that could be reliably detected with a coefficient of variation (CV) \leq 5% by measuring a dilution series of a urine sample in triplicates in three different runs.

High-dose hook effect was examined in the concentration range of CYSC between 0.0 and 8.0 mg/l. Recovery was examined based on Westgard guidelines by measuring aliquots of five different urine samples spiked with TruLab Cystatin C Level 1 control material (CYSC = 0.844 mg/l) or saline and proportional error was calculated [19].

Interference & stability studies

Potential interference was tested with calcium, urea, glucose, albumin and hemoglobin. Aliquots of different urine samples spiked with the interferer solution or saline (in 1:9 ratio) were measured in duplicates. Interference was declared when the deviation exceeded the acceptable error (10%) [19].

To examine analyte stability ten spot urine samples were studied. Specimens were aliquoted and stored without any additives at room temperature and at 4°C. U-CYSC was determined in duplicates from freshly obtained urine samples and after 2, 4, 6, 24 h of storage [20]. Additionally, the effects of 3 months' storage at -20°C and freezing–thawing cycles on analyte stability were also assessed by investigating five spot urine samples without any preservatives added. For the latter purpose, aliquots of the samples were frozen at -70°C and subsequently thawed at 37°C, then three freezing–thawing cycles were performed with a simultaneous u-CYSC determination. Mean percentage deviation was calculated and compared with the acceptable change limit (\pm 7.1% in our case).

Statistical analyses

The distribution of our variables was determined by Shapiro-Wilk analyses. The data showed nonnormal distribution, therefore, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were performed for assessment of the differences between groups. After excluding outliers (only one patient from the adult control group) upper reference limit for u-CYSC and u-CYSC/u-CREAT were determined as 95 percentiles similarly to others [21]. A p-value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant. Statistical analyses were carried out by IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 (IBM Corporation, NY, USA).

Results & discussion

Analytical performance

The calibrated range for u-CYSC measurements was linear between 0.0 and 1.0 mg/l, as shown on Figure 1A. Samples at above 1.0 mg/l u-CYSC concentration had to be remeasured using an appropriate dilution. Calibration showed good stability with a CV $<$ 10% obtained from 30 independent data. Both intra- and interassay imprecision at different concentration levels did not exceed 5% of CV (Table 1). LoB, LoD and LoQ of our u-CYSC assay were found to be 0.012, 0.017 and 0.037 mg/l, respectively. The quantification limit allowed the accurate determination of samples at a concentration down to 0.037 mg/l. The assay showed good linearity ($R^2 = 0.991$) in the range of 0.04–0.86 mg/l (Figure 1B). High-dose hook effect was experienced from 3.0 mg/l u-CYSC concentration; however, the security range expands up to 8.0 mg/l. The recovery study showed the proportional error to be 2.1% which is within the acceptable error limit.

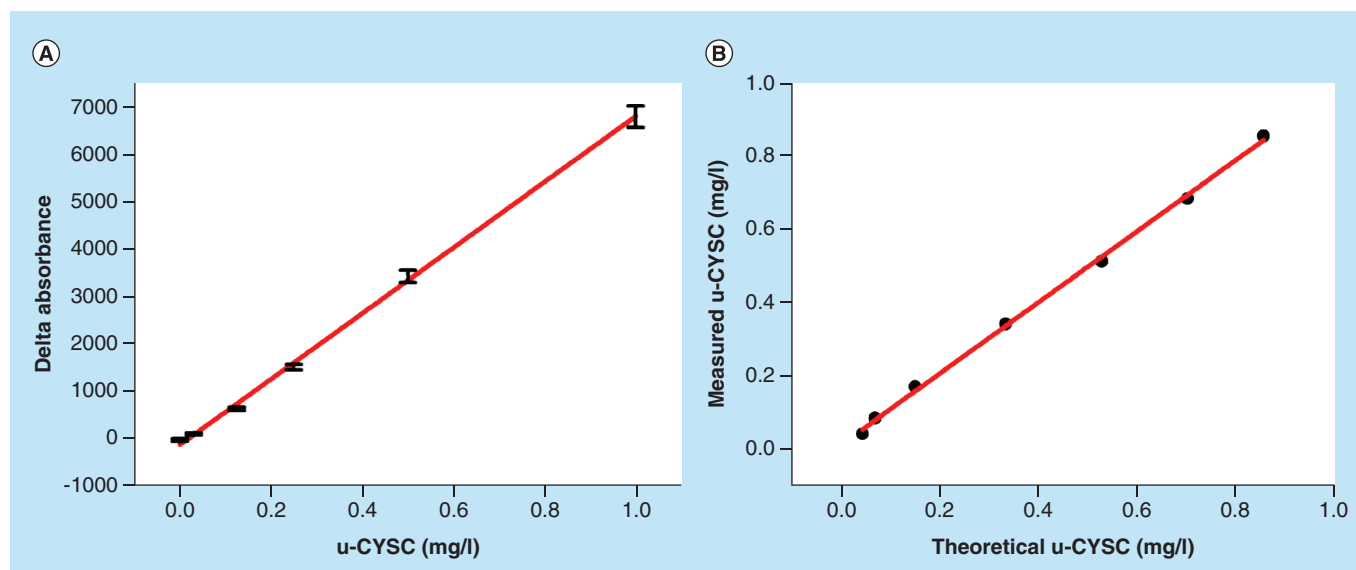


Figure 1. Calibration and linearity graph of urinary cystatin-C. (A) Cumulative graph of the assay in the range of 0.0–1.0 mg/l with 6 points of calibration ($n = 30$ separate calibrations, mean values of calibrators represented by dots and \pm SDs shown as bars; $R^2 = 0.9989$). **(B)** Linearity was studied by diluting a urine sample. Good linearity was found in the range of 0.86–0.04 mg/l. The equation of the regression line is: $y = 1.026x + 0.011$, $R^2 = 0.991$. Mean values of parallel measurements are represented by dots. u-CYSC: Urinary cystatin-C.

The assay time of our fully automated new turbidimetric u-CYSC test is only 10 min with an overall imprecision less than 5 CV% within the whole measuring range. The very low LoD (0.017 mg/l) enables u-CYSC determination in almost all healthy individuals. U-CYSC concentrations of samples less than 0.017 mg/l have no clinical relevance. On the other hand, in severe cases of renal tubular damage but practically for all urine samples above 1.0 mg/l of u-CYSC (that is the calibrated range) the test should be repeated after a proper dilution of the urine samples due to the experienced high-dose hook effect. Although u-CYSC is reported to be a reliable marker of tubular dysfunction, up to now only a few automated turbidimetric or nephelometric serum CYSC assays were adapted for urinary measurements [2–3,5,22–23]. Our assay properties seem to be similar or even better than those of others [2,22–23]. Our LoD is slightly lower than that of the turbidimetric method reported by Makris *et al.* [23].

Interference & stability studies

We found no interference with u-CYSC measurements in spiked urine samples up to 15 mmol/l calcium, 1350 mmol/l urea, 280 mmol/l glucose, 12 g/l albumin and 5 g/l hemoglobin, respectively. In accordance with our results, former studies did not report considerable interference with albumin and hemoglobin [2,3]. Other endogenous substances that are present in the urine such as calcium, urea and glucose also did not have impact on u-CYSC analysis.

We observed that u-CYSC was stable for 24 h stored at 4°C and for 6 h stored at room temperature (<5% average decrease). However, two samples showed up to 15% loss of CYSC under identical conditions. After a 3-month storage at -20°C and after the third freezing–thawing cycle in case of two samples the reduction of u-CYSC concentration exceeded the acceptable change limit while the other samples remained stable.

The favorable analytical performance and the short reaction time make our u-CYSC assay to be proper for routine clinical use which can help rapid decision making in the clinical practice. However, as a limitation we should emphasize that our stability studies revealed CYSC being unstable in some urine samples. The instability seems to be independent of storage temperature as it was previously suggested by others too [2]. Our data support the recommendation that proteinase inhibitor preservatives should be added to freshly voided urine samples [4,5].

Preliminary reference ranges, patients' data

In the group of healthy individuals, we observed no significant differences in u-CYSC excretion between genders. Healthy adolescents (age group 10–18 years) showed slightly but significantly elevated u-CYSC/u-CREAT values

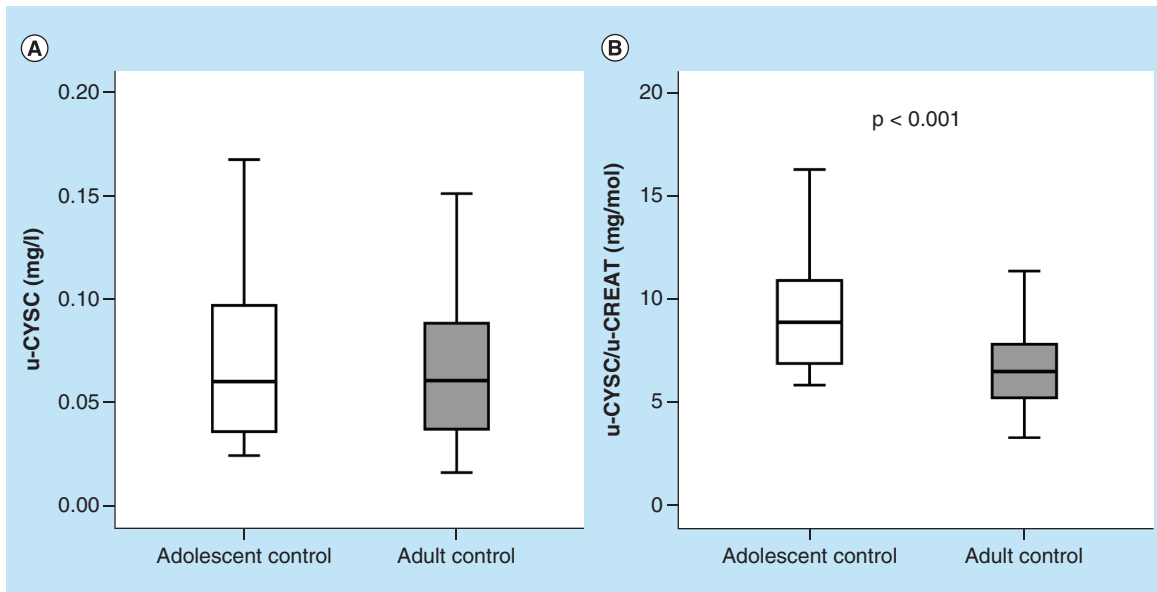


Figure 2. Urinary cystatin-C and urinary cystatin-C/urinary creatinine data of healthy individuals. Mann–Whitney U test was used to compare the variables of groups. **(A)** Comparison of u-CYSC concentrations between adolescent and adult control groups. **(B)** Comparison of u-CYSC/u-CREAT values between adolescent and adult control groups. u-CYSC: Urinary cystatin-C; u-CYSC/u-CREAT: Urinary cystatin-C/urinary creatinine.

Table 2. Demographic and laboratory data of the studied patient groups.

Parameters	Adult control group	Sepsis-related AKI patients	Patients with chronic hypertension	Patients with Type 2 DM
Number (n)	84	33	43	41
Females n (ratio)	44 (0.52)	16 (0.48)	20 (0.47)	14 (0.34)
Age (years)	40 (21–60)	70 (25–82)	62 (26–79)	66 (45–81)
u-CYSC (mg/l)	0.06 (0.04–0.09)	0.91 [†] (0.28–3.25)	0.05 (0.03–0.09)	0.06 (0.04–0.08)
u-CYSC/u-CREAT (mg/mol)	6.5 (5.3–7.8)	309.6 [†] (123.1–1010.8)	6.9 (5.4–9.1)	6.2 (5.0–8.2)

[†]p < 0.001 compared with healthy adult controls. Median (25–75% percentiles) are presented except for age: median (min–max). Mann–Whitney U test was used to compare each patient groups to control group.

AKI: Acute kidney injury; DM: Diabetes mellitus; u-CYSC: Urinary cystatin-C; u-CYSC/u-CREAT: Urinary cystatin-C/urinary creatinine.

(8.9 mg/mol) compared with adults (6.5 mg/mol, $p < 0.001$) but their u-CYSC concentrations (expressed as mg/l) appeared to be similar to adults (Figure 2). U-CYSC concentrations of a few healthy controls were found to be below the LoQ thus only upper reference limits (<95 percentiles) were defined: <0.14 mg/l for u-CYSC independently of age, <19.7 mg/mol for u-CYSC/u-CREAT for the adolescents and <12.4 mg/mol for adults.

We found significantly ($p < 0.001$) elevated u-CYSC concentrations and u-CYSC/u-CREAT ratios in patients with sepsis-related AKI compared with adult controls. In contrast to these data, values of patients with chronic hypertension and Type 2 diabetes did not differ at all from those of the healthy group (Table 2).

Urinary CYSC does not show circadian rhythm, therefore spontaneous urine samples can be used for both establishing reference ranges and for clinical application as well [24]. The observed u-CYSC values among healthy people are in agreement with previously reported data [25]. We determined the upper reference limit only as 95th percentiles. Complete reference interval could not be calculated since several urine samples showed lower CYSC concentrations than the LoQ and the very low values have no clinical relevance. Similarly to us, Conti *et al.* determined the upper reference limit of u-CYSC at 0.18 mg/l by nephelometry; furthermore, Noraddin and coworkers calculated that as 0.16 mg/l by turbidimetry [5,22].

Since spot urine samples were analyzed, it was reasonable to express results also as u-CYSC/u-CREAT ratio in order to exclude the effect of different hydration states (as it is reported by others) [4,8,26–28]. However, it is

known that in case of tubular damage the excretion of creatinine is also affected which may influence the urinary protein/u-CREAT values [29]. Therefore, giving both the absolute concentrations of u-CYSC and the u-CYSC/u-CREAT values is suggested. Even if both data are given, it is still an open problem if absolute u-CYSC values or u-CYSC/u-CREAT or both are preferred. In order to give a proper answer, the study should be extended in the future to include more patient groups and to largely increase the number of patients in each group. Our u-CYSC/u-CREAT data of healthy adults were also similar to that reported by Grubb [4]. Although our study population was relatively small, we found significant differences in u-CYSC/u-CREAT values between adolescents and adults which confirms a recent observation [30]. This finding might be due to the age dependency of urinary creatinine excretion associated with the growth of muscle mass during adolescence [31].

We detected significant elevation of u-CYSC and u-CYSC/u-CREAT ratio in AKI patients compared with the control group, indicating the renal tubular damage in sepsis-related AKI. However, the observed increase of u-CYSC was not as extreme as that was described in a former paper [1]. Although chronic hypertension is a risk factor for nephropathy, our results suggest that u-CYSC seems not to be affected by chronic hypertension. In the diabetic patient group u-CYSC, data suggest that tubular damage has not been developed yet. Tubular damage might precede the appearance of microalbuminuria only in a few cases of diabetes where increased u-CYSC may be useful for the recognition of these patients [26]. Moreover, in certain cases with proteinuria it should be taken into consideration, that the competition between albumin and low molecular weight proteins for receptor-mediated reabsorption could elevate the urinary levels of CYSC as well [32].

The current study has some limitations. Our major focus was on the analytical validation of the u-CYSC assay, therefore it cannot be considered as a clinical study. However, the presented data on healthy individuals and on patient groups support our suggestion that u-CYSC determination is recommended for clinical utilization. Unfortunately, calibrators, control materials and a reference method are available only for serum samples and not for u-CYSC measurements. The described preliminary reference ranges were established by investigation of a relatively small healthy population and our adolescent group was remarkably smaller than the adult group. Another limitation of our work is that number of patients in the different disease groups was smaller than that in the control group. Also, during our stability studies samples with protease inhibitor were not analyzed.

Conclusion

The present study describes a novel validated particle-enhanced immune turbidimetric assay for u-CYSC determination which can easily be adapted to other commercial fully automated analyzers. It is sensitive, precise, rapid and offers a short turnaround time, therefore it seems to be ideal for routine clinical utilization. U-CYSC reference range seems to be age-dependent when data are referred to urinary creatinine. For discrimination between glomerular and tubular renal injury, both serum and u-CYSC measurement is suggested. The analytical performance of our method enables to detect subtle changes in u-CYSC concentrations with a potential positive predictive value for timely diagnosis of renal tubular damage. In septic patients with AKI, our data further supports the findings of the relatively few studies that u-CYSC might be a reliable marker of renal tubular injury.

Future perspective

Urinary cystatin-C determinations are rare, even nowadays and there is no commercially available automated method for its quantification as a diagnostic tool. While serum CYSC is widely used for the estimation of glomerular function in AKI patients, serum CYSC is not suitable for predicting severe tubular damage. Therefore, the major goal of determining u-CYSC is the fact that it reflects and predicts tubular type acute kidney failure. Our automated method with its short assay time seems to be an ideal lab test that might be introduced into the routine laboratory palette. The analytical sensitivity of the test enables u-CYSC determination in practically all healthy individuals. On the other hand, in critically ill patients (e.g., in sepsis) u-CYSC values increase dramatically when development of tubular damage and occurrence of AKI is expected. We think, that in the future, diagnostic kits for u-CYSC determination will be produced. In order to add u-CYSC to the diagnostic arsenal, proper quality control is required which is also to be developed. Most probably, stabilizers should be added to the urine samples in order to prevent potential preanalytical degradation of u-CYSC. Our method is easy to adapt to common laboratory automats and u-CYSC quantification is expected to help rapid decision-making regarding critically ill patients.

Executive summary

- Urinary cystatin-C (u-CYSC) is considered to be a promising protein marker that can provide clinically useful data on renal tubular dysfunctions. Especially in acute kidney injury of tubular origin u-CYSC levels might increase dramatically. However, there is no commercial kit available for u-CYSC determination.
- In our work, a novel automated particle enhanced immune turbidimetric assay for measurement of u-CYSC was developed and adapted to a commercial laboratory analyzer. Our assay was fully validated and preliminary reference ranges were also established. The test is rapid (10 min) with a limit of quantification of 0.037 mg/l u-CYSC. The high analytical sensitivity makes the test being suitable for measurement of u-CYSC levels practically in all healthy individuals.
- When reporting u-CYSC data, it is suggested to give both u-CYSC concentrations and u-CYSC/u-CREAT ratios as well.
- In our studied patient groups (Type 2 diabetes, hypertension, control and septic patients) a dramatic increase was found in septic patients with acute kidney injury. The largely increased u-CYSC values indicated renal tubular damage.
- The u-CYSC assay is strongly suggested to be part of the laboratory palette when dealing with critically ill patients. Development of a commercially available u-CYSC diagnostic kit with effective quality control is of utmost importance.

Acknowledgements

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Financial & competing interests disclosure

The work was financially supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00021 'The use of chip-technology in increasing the effectiveness of human *in vitro* fertilization'; NKFI-EPR K/115394/2015 'Early biochemical indicators of embryo viability'; KA-2016-04 (University of Pécs, Medical School); and 'ÚNKP-17-3-III New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities' grants. The authors express their special thanks to DiaSys Diagnostic Systems GmbH for providing the CYSC reagent and to Roche Magyarország Kft, for the invaluable technical help. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. Nejat M, Pickering JW, Walker RJ *et al.* Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. *Crit. Care* 14(3), R85 (2010).
- **The potential clinical benefit of measuring urinary cystatin-C in critically ill patients.**
2. Sohrabian A, Noraddin FH, Flodin M, Fredricsson A, Larsson A. Particle enhanced turbidimetric immunoassay for the determination of urine cystatin C on Cobas c501. *Clin. Biochem.* 45(4-5), 339-344 (2012).
3. Herget-Rosenthal S, Feldkamp T, Volbracht L, Kribben A. Measurement of urinary cystatin C by particle-enhanced nephelometric immunoassay: precision, interferences, stability and reference range. *Ann. Clin. Biochem.* 41(Pt 2), 111-118 (2004).
4. Grubb AO. Cystatin C – properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 35, 63-99 (2000).
- **Summarizes the basic properties and initial investigations on cystatin-C.**
5. Conti M, Moutereau S, Zater M *et al.* Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44(3), 288-291 (2006).

6. Bargnoux AS, Pieroni L, Cristol JP *et al.* Multicenter evaluation of cystatin C measurement after assay standardization. *Clin. Chem.* 63(4), 833–841 (2017).
7. Grubb A, Lindstrom V, Jonsson M *et al.* Reduction in glomerular pore size is not restricted to pregnant women. Evidence for a new syndrome: ‘Shrunken pore syndrome’. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 75(4), 333–340 (2015).
8. Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif.* 29(4), 357–365 (2010).
- **The potential clinical benefit of measuring urinary cystatin-C in critically ill patients.**
9. Koynert JL, Bennett MR, Worcester EM *et al.* Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int.* 74(8), 1059–1069 (2008).
- **The potential clinical benefit of measuring urinary cystatin-C in critically ill patients.**
10. Jeon YK, Kim MR, Huh JE *et al.* Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *J. Korean Med. Sci.* 26(2), 258–263 (2011).
- **Evaluates the usefulness of urinary cystatin-C as a biomarker in the recognition of diabetic nephropathy.**
11. Satoh-Asahara N, Suganami T, Majima T *et al.* Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6(2), 265–273 (2011).
12. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for acute kidney injury. *Kidney Int. Suppl.* 2, 1–138 (2012).
13. Zappitelli M, Greenberg JH, Coca SG *et al.* Association of definition of acute kidney injury by cystatin C rise with biomarkers and clinical outcomes in children undergoing cardiac surgery. *JAMA Pediatr.* 169(6), 583–591 (2015).
14. Zhou J, Liu Y, Tang Y *et al.* A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. *Int. Urol. Nephrol.* 48(1), 125–132 (2016).
15. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z *et al.* Urinary orosomuroid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55(2), 299–307 (2017).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline (3rd Edition)*. CLSI document EP10-A3. Wayne, PA, USA (2006).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Evaluation of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*. CLSI document EP06-A. Wayne, PA, USA, 2003.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline (2nd Edition)*. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA, USA, 2012.
19. Westgard Basic Method Validation. www.westgard.com/lesson27.htm
20. Oddezo C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin. Biochem.* 45(6), 464–469 (2012).
21. Tencer J, Thysell H, Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomuroid and alpha 1-antitrypsin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56(8), 691–700 (1996).
22. Noraddin FH, Flodin M, Fredricsson A, Sohrabian A, Larsson A. Measurement of urinary cystatin C with a particle-enhanced turbidimetric immunoassay on Architect ci8200. *J. Clin. Lab. Anal.* 26(5), 358–364 (2012).
23. Makris K, Nikolaki E, Nanopoulos K, Pirkakis KM, Maltezos CK. Measurement of cystatin C in human urine by particle-enhanced turbidimetric immunoassay on an automated biochemistry analyzer. *Clin. Biochem.* 46(12), 1128–1130 (2013).
24. Conti M, Zater M, Lallali K *et al.* Absence of circadian variations in urine cystatin C allows its use on urinary samples. *Clin. Chem.* 51(1), 272–273 (2005).
25. Mijušković Z, Maksić Đ, Hrvačević R *et al.* Urinary cystatin C as a marker of tubular dysfunction. *J. Med. Biochem.* 26(2), (2007).
26. Kim SS, Song SH, Kim IJ *et al.* Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 36(3), 656–661 (2013).
27. Uchida K, Gotoh A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin. Chim. Acta* 323(1–2), 121–128 (2002).
28. Helmersson-Karlqvist J, Arnlov J, Carlsson AC, Harma J, Larsson A. Increased urinary cystatin C indicated higher risk of cardiovascular death in a community cohort. *Atherosclerosis* 234(1), 108–113 (2014).
29. Makris K, Stefani D, Makri E *et al.* Evaluation of a particle enhanced turbidimetric assay for the measurement of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in plasma and urine on Architect-8000: analytical performance and establishment of reference values. *Clin. Biochem.* 48(18), 1291–1297 (2015).
30. Pennemans V, Rigo JM, Faes C, Reynders C, Penders J, Swennen Q. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue? *Clin. Chem. Lab. Med.* 51(9), 1795–1802 (2013).
31. Remer T, Neubert A, Maser-Gluth C. Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *Am. J. Clin. Nutr.* 75(3), 561–569 (2002).
32. Nejat M, Hill JV, Pickering JW, Edelstein CL, Devarajan P, Endre ZH. Albuminuria increases cystatin C excretion: implications for urinary biomarkers. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27(Suppl. 3), iii96–iii103 (2012).

ORIGINAL PAPER

Elevated urinary orosomuroid excretion as a novel biomarker in Crohn's disease

Balázs Szirmay¹ | András Tárnok² | Patrícia Sarlós³ | Nóra Szigeti⁴ | Andrea Ludány¹ | Péter Kustán¹ | Zoltán Horváth-Szalai¹ | Attila Miseta¹ | Tamás Kőszegi^{1,5} ¹Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary²Department of Pediatrics, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary³1st Department of Internal Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary⁴2nd Department of Internal Medicine and Nephrology Centre, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary⁵János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

Correspondence

Tamás Kőszegi, Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary.
Email: tamas.koszegi@aok.pte.hu

Funding information

National Research, Development and Innovation Office, Grant/Award Number: NKFI-EPR K/115394/2015; Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program, Grant/Award Number: GINOP-2.3.2-15-2016-00021; New National Excellence Program of The Ministry of Human Capacities, Grant/Award Number: ÚNKP-17-3-III

Abstract

Background: Laboratory markers are essential tools in the follow-up of patients with Crohn's disease (CD). Our aim was to investigate urinary concentrations of orosomuroid in relation to the inflammatory activity of CD and to compare it with clinical indices and conventional laboratory parameters.**Materials and methods:** Blood and urine samples of 86 patients (55 adults and 31 children) with CD and 68 healthy individuals (38 adults and 30 children) as controls were analysed. Patients were categorized according to their clinical scores (Harvey-Bradshaw Index [HBI] or Pediatric Crohn's Disease Activity Index [PCDAI]). Urinary orosomuroid (u-ORM) was determined by automated immune turbidimetric assay, and values were referred to urinary creatinine (u-ORM/u-CREAT, mg/mmol).**Results:** U-ORM/u-CREAT values were seven times higher in children with active CD (0.50 vs 0.07 mg/mmol, $P < 0.001$) and two times higher in adults (0.32 vs 0.14 mg/mmol, $P = 0.01$) compared with patients with inactive disease. U-ORM/u-CREAT showed good correlation with conventional inflammatory markers (hs-CRP, serum ORM; $P < 0.01$) and activity indices (HBI, $P = 0.018$; PCDAI, $P < 0.001$). U-ORM/u-CREAT had similar discriminative performance to hs-CRP and serum ORM in the differentiation of active from inactive paediatric CD patients.**Conclusions:** Our findings suggest that u-ORM/u-CREAT might serve as a valuable additional marker in the follow-up of CD patients, especially in children for whom the non-invasive sampling is a further advantage.

KEYWORDS

children, Crohn's disease, inflammation, orosomuroid, urine

1 | INTRODUCTION

In the last few decades, Crohn's disease (CD) has become an illness with one of the most increasing prevalence. Due to the rapidly rising overall incidence of CD and the growing tendency of its childhood-onset, management of CD is especially challenging in children.^{1,2}

Crohn's disease, as an inflammatory bowel disease (IBD), is characterized by a chronic course with relapse

and remission periods causing a serious decrease in quality of life. Monitoring disease activity is substantial to specify the most appropriate treatment for patients. However, the commonly used clinical indices of CD activity might be influenced by subjective complaints thus may not accurately reflect inflammatory activity. Endoscopic examination with histological sampling can provide objective and specific information, but these procedures are invasive and rather stressful especially for paediatric patients.³⁻⁶

Laboratory tests may give accurate information on the inflammatory activity and have a growing role during the last few years due to the adaptation of treat to target strategy for CD.⁷ In spite of the efforts in laboratory approaches, so far just a few markers proved to be clinically useful in CD. Besides the widely applied non-specific inflammatory parameters (high-sensitivity C-reactive protein [hs-CRP], erythrocyte sedimentation rate [ESR], white blood cell count [WBC]), the diagnostic benefit of urinary proteins has not been well revealed yet.^{4,8,9} Among urinary proteins, albumin was reported to be a potential marker of IBD activity.^{10,11}

Orosomuroid (ORM, also called as α -1-acid glycoprotein) is an approximately 43 kDa, highly glycosylated, lipocalin-type protein. As a major acute-phase protein, it might provide information on inflammatory states. Serum orosomuroid (se-ORM) has been considered as an activity marker of CD; however, its clinical utility is ambiguous.⁵ ORM is normally excreted into the urine in low amounts, and recent studies suggested that urinary orosomuroid (u-ORM) vs se-ORM might provide more valuable information on the course of inflammatory disorders and is a non-invasive tool. Elevated u-ORM levels were reported in acute and chronic diseases related to inflammatory activation such as sepsis, diabetes, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and even following cardiac surgery.^{12–16} Previously, we identified increased ORM levels in urine samples of CD patients as well.^{15,17}

In the present work, we studied u-ORM excretion in adult and paediatric CD patients to assess u-ORM as a possible objective activity marker of CD. Our further aim was to investigate possible correlations between u-ORM and the currently available activity markers.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and sampling

Previously diagnosed adult ($n = 55$) and paediatric ($n = 31$) CD patients and healthy individuals as controls (adults, $n = 38$; children, $n = 30$) were involved in this cross-sectional study. Participants below 18 years of age formed the paediatric groups. Exclusion criteria at CD patients were any kind of underlying kidney disease, malignancy; any identified gastrointestinal infection or the lack of consent. Exclusion criteria at controls were any kind of acute or chronic diseases, and healthy state was assessed based on physical examination and medical records.

Seventy-seven per cent of patients were treated with 5-aminosalicylates, 23% with topical corticosteroids, 16% with oral corticosteroids, 45% with azathioprine and 5% with TNF- α inhibitors.

Patients were classified by their activity indices. Paediatric CD patients were considered to be active if their Paediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) was higher than 10.¹⁸ Disease activity of adult patients was assessed using the Harvey-Bradshaw Index (HBI) with a cut-off value of >4 .¹⁹

Our study was performed from October 2014 to June 2016 and was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs, Medical School in accordance with the Helsinki declaration (no. 5133/KK15/2013). Volunteers were fully informed, and written consent was obtained from all of them. Reporting of the study conforms to STROBE statement along with references to STROBE statement and the broader EQUATOR guidelines.²⁰

Single blood and spot urine samples were simultaneously obtained from each patient during the morning hours. Venous blood was collected in plastic tubes using a closed blood sampling system (BD Vacutainer[®]; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). After centrifugation of urine and clotted blood samples (10 min, 1500 g), serum specimens and supernatants of urine were stored in aliquots at -70°C until analyses. Anticoagulated blood samples for blood cell count and ESR were analysed immediately.

2.2 | Laboratory measurements

Laboratory tests were performed at our accredited university laboratory (accreditation no.: NAH-1-1553/2016). Hs-CRP, ESR, WBC, platelet count (PLT), se-ORM, urinary total protein (u-TP), urinary albumin (u-ALB) and urinary creatinine (u-CREAT) were measured by routine procedures. U-ORM was determined on Cobas 8000/c502 analyzer (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using our novel immune turbidimetric assay as was previously reported.¹⁵ U-ORM and u-ALB levels were expressed as u-ORM/u-CREAT and u-ALB/u-CREAT ratios to reduce the effect of different hydration states as recommended by others.^{21,22} Additionally, u-ORM/u-TP and u-ALB/u-TP ratios were also determined to examine the proportional change of ORM and albumin among urinary proteins. To check renal glomerular and tubular function, cystatin-c was measured from serum samples by a commercial kit (Roche, Diagnostics GmbH) and from urine by our recently described automated turbidimetric assay.²³

2.3 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed by IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22 (IBM Corporation, New York, NY). Since our variables showed non-normal distribution by Shapiro-Wilk analyses, nonparametric statistical tests were used. To assess the differences between groups,

Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests were performed. For analysis of relationship between continuous variables, Spearman's rank correlation test was applied. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted for analysing the diagnostic performance and area under the curves (AUC) were determined. A *P* value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3 | RESULTS

From the total of 86 CD patients, 38 were defined with active disease and 48 with inactive disease based on the HBI or the PCDAI, respectively. Forty-seven per cent of adults and 39% of children were in active phase. Montreal classification of patients is shown in Table 1. Merged demographic and laboratory data are presented for paediatric and adult patients separately in Tables 2 and 3. Interestingly, the proportion of females among active CD patients were higher in both age groups, however, we found no differences between females and males in u-ORM/u-CREAT values. Renal function (glomerular and tubular) was normal in each group based on serum and urinary cystatin-c (u-CYSC) measurements. U-CYSC/u-CREAT showed difference only between adult control and active CD groups; however, all patients had u-CYSC/u-CREAT values within the reported reference range.²³

The grade of inflammation was estimated by the conventional inflammatory parameters (hs-CRP, ESR, WBC, PLT, se-ORM) and by u-ORM/u-CREAT as well among our patient groups. Se-ORM was also increased in the

active CD group compared to inactive patients ($P < 0.001$); however, its proportional increase was milder than that of u-ORM/u-CREAT particularly in children. In contrast to u-ORM/u-CREAT, u-ALB/u-CREAT values did not alter significantly in children among the examined groups. On the other hand, in adults, u-ALB/u-CREAT showed significant difference ($P < 0.05$) between controls and patient groups but it did not reflect disease activity (active vs inactive groups).

U-ORM/u-CREAT values were found seven times higher in paediatric CD patients with active disease compared with inactive ones (Table 2). On the other hand, in adult CD patients with active disease, only a two-fold elevation was observed when compared with inactive ones (Table 3, Figure 1). No differences were found between children and adults regarding u-ORM/u-CREAT.

Additionally, taken all patient groups, the u-ORM/u-TP ratio was also higher in CD patients with active disease (expressed as median [IQR], 3.2 [2.0-6.4]%) compared with inactive ones (1.0 [0.6-2.8]%, $P < 0.001$) or controls (1.0 [0.6-1.7]%, $P < 0.001$). On the other hand, u-ALB/u-TP did not show any difference among the three groups (active CD patients, 6.7 [3.4-14.8]% vs inactive ones, 8.3 [6.3-10.5]% vs controls, 6.7 [4.9-12.6]%).

U-ORM/u-CREAT showed significant correlations with inflammatory markers and activity indices (Tables 4 and 5). The correlation coefficients for hs-CRP, se-ORM and ESR were slightly lower in adults than in children; moreover, the association with HBI was found to be considerably weaker than with PCDAI.

Receiver operating characteristic analysis showed that besides hs-CRP (AUC: 0.86, $P < 0.001$) and se-ORM (AUC: 0.88, $P < 0.001$), u-ORM/u-CREAT also had similar significant (AUC: 0.88, $P < 0.001$) discriminative power in children to differentiate between active and inactive CD patients (Figure 2A). However, among adults, the AUC ROC for u-ORM/u-CREAT (0.70, $P = 0.01$) was mildly lower than that of hs-CRP (0.84, $P < 0.001$) and se-ORM (0.80, $P < 0.001$) (Figure 2B).

TABLE 1 Montreal classification of patients

	Inactive		Active	
	Paediatric	Adult	Paediatric	Adult
Age at diagnosis, n (%)				
A1: <17 y	19 (100)	1 (3)	11 (92)	1 (4)
A2: 17-40 y	–	23 (80)	1 (8)	20 (77)
A3: >40 y	–	5 (17)	–	5 (19)
Location, n (%)				
L1: ileal	7 (37)	12 (42)	5 (42)	6 (23)
L2: colonic	5 (26)	3 (10)	2 (16)	1 (4)
L3: ileocolonic	7 (37)	14 (48)	5 (42)	19 (73)
L4: isolated upper disease	–	–	–	–
Disease behaviour, n (%)				
B1: nonstricturing, nonpenetrating	13 (68)	14 (48)	11 (92)	9 (35)
B2: stricturing	6 (32)	11 (38)	1 (8)	13 (50)
B3: penetrating	–	4 (14)	–	4 (15)
p: perianal disease	7 (37)	8 (28)	5 (42)	9 (35)

4 | DISCUSSION

The present study demonstrated elevated u-ORM excretion in CD patients with active disease compared with inactive ones with significant diagnostic performance. Furthermore, performing Spearman's statistical analysis, we observed significant correlations between u-ORM/u-CREAT and conventional inflammatory markers and activity scores.

Crohn's disease as a chronic inflammatory disorder requires a lifelong gastroenterological care due to the risk of periodical relapses. Clinical scores and laboratory markers are essential tools in monitoring inflammatory activity and thus help in decision making to choose proper changes

TABLE 2 Paediatric patients' characteristics and baseline laboratory data

	Control	Inactive CD	Active CD	P value
Number, n	30	19	12	–
Females, n (%)	13 (43)	8 (42)	7 (58)	0.631
Age, y	14 (10-17)	15 (9-17)	15 (10-17)	0.207
WBC, G/L	6.3 (5.5-7.2)	6.9 (6.3-7.4)	9.6 (6.1-10.9)	0.039 ^b
PLT, G/L	293.5 (269.0-319.3)	306.0 (268.5-339.0)	331.5 (294.8-406.0)	0.071
ESR, mm/h	3.0 (2.0-6.0)	16 (7.5-22)	32 (27-38)	<0.001 ^{a,b,c}
hs-CRP, mg/L	0.3 (0.2-0.6)	3.3 (0.6-6.1)	21.9 (8.1-48.8)	<0.001 ^{a,b,c}
se-ORM, g/L	0.74 (0.59-0.93)	0.96 (0.84-1.31)	1.76 (1.56-2.10)	<0.001 ^{a,b,c}
se-CYSC, mg/L	0.94 (0.89-1.01)	0.96 (0.85-1.02)	0.86 (0.82-1.06)	0.827
u-CYSC/u-CREAT, mg/mmol	0.009 (0.007-0.011)	0.009 (0.006-0.011)	0.009 (0.007-0.011)	0.703
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0.95 (0.41-1.55)	0.70 (0.42-1.79)	0.52 (0.41-1.09)	0.587
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.09 (0.07-0.15)	0.07 (0.05-0.17)	0.50 (0.33-1.21)	<0.001 ^{b,c}

Data are expressed as median (IQR) except for age: median (range). Superscript lowercase letters show post hoc analysis at the significance level of $P < 0.05$. a: control-inactive CD; b: control-active CD; c: inactive CD-active CD.

CD, Crohn's disease; ESR, erythrocyte sedimentation rate; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PLT, platelet count; se-CYSC, serum cystatin-c; se-ORM, serum orosomuroid; u-ALB, urinary albumin; u-CREAT, urinary creatinine; u-CYSC, urinary cystatin-c; u-ORM, urinary orosomuroid; WBC, white blood cell count.

TABLE 3 Adult patients' characteristics and baseline laboratory data

	Control	Inactive CD	Active CD	P value
Number, n	38	29	26	–
Females, n (%)	21 (55)	16 (55)	19 (73)	0.292
Age, y	39 (21-58)	41 (21-77)	35 (21-73)	0.447
WBC, G/L	6.4 (5.0-7.4)	6.0 (4.5-8.2)	8.2 (6.7-10.8)	<0.001 ^{b,c}
PLT, G/L	253.5 (216.3-276.3)	273.0 (238.0-325.5)	419.0 (357.8-478.3)	<0.001 ^{b,c}
ESR, mm/h	4.0 (2.0-10)	18 (8.3-26)	30 (18-38)	<0.001 ^{a,b,c}
hs-CRP, mg/L	0.8 (0.4-1.7)	2.5 (1.3-6.0)	12.8 (5.8-62.9)	<0.001 ^{a,b,c}
se-ORM, g/L	0.76 (0.67-0.91)	0.94 (0.87-1.10)	1.58 (1.05-2.60)	<0.001 ^{a,b,c}
se-CYSC, mg/L	0.88 (0.86-0.94)	0.94 (0.82-0.99)	0.82 (0.78-1.02)	0.291
u-CYSC/u-CREAT, mg/mmol	0.006 (0.005-0.007)	0.007 (0.006-0.008)	0.008 (0.007-0.011)	0.013 ^b
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0.41 (0.25-0.59)	0.61 (0.40-1.16)	0.79 (0.31-2.53)	0.014 ^{a,b}
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.07 (0.04-0.15)	0.14 (0.05-0.33)	0.32 (0.16-1.54)	<0.001 ^{b,c}

Data are expressed as median (IQR) except for age: median (range). Superscript lowercase letters show post hoc analysis at the significance level of $P < 0.05$. a: control-inactive CD; b: control-active CD; c: inactive CD-active CD.

CD, Crohn's disease; ESR, erythrocyte sedimentation rate; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PLT, platelet count; se-CYSC, serum cystatin-c; se-ORM, serum orosomuroid; u-ALB, urinary albumin; u-CREAT, urinary creatinine; u-CYSC, urinary cystatin-c; u-ORM, urinary orosomuroid; WBC, white blood cell count.

in treatment.³ Besides blood parameters, faecal proteins such as calprotectin and lactoferrin are also applied in the assessment of CD activity. Faecal calprotectin is proved to be a sensitive marker primarily in colonic CD; however, in a recent meta-analysis, it showed significant diagnostic accuracy in small bowel CD as well.²⁴ On the other hand, from the laboratory side, interpretation of faecal protein levels has some limitations due to the inhomogeneity, the altering water content of stool samples and the lack of clear

cut-off values.²⁵ Because the presently known markers do not meet all requirements, the investigation of novel potential IBD biomarkers is still an area of active research.^{4,8,9}

Orosomuroid can be produced by hepatocytes, leucocytes and endothelial cells in response to cytokine stimuli, and it exhibits anti-inflammatory and immunomodulatory function during inflammatory processes.²⁶ Serum concentration of ORM is well studied in CD; however, besides our recent initial experience, the benefit of u-ORM as an

FIGURE 1 Separately presented u-ORM/u-CREAT data of paediatric CD patients and controls (A), and adult CD patients and controls (B). Boxplots represent median values with interquartile ranges. * $P = 0.01$; ** $P < 0.001$; CD: Crohn's disease u-CREAT: urinary creatinine; u-ORM: urinary orosomuroid

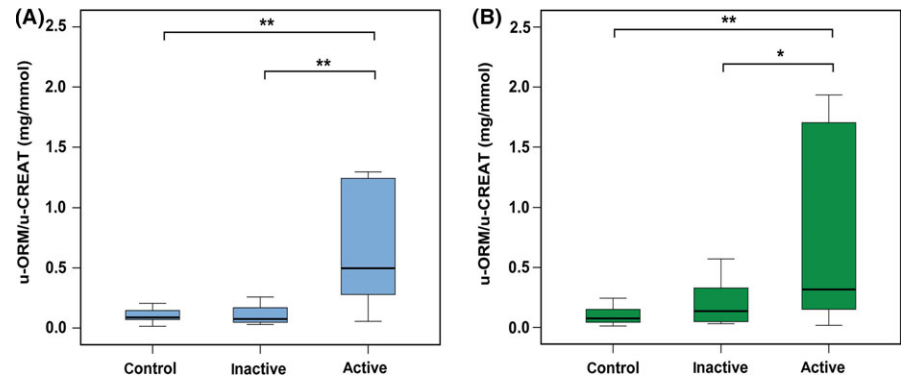


TABLE 4 Data of correlation analyses of u-ORM/u-CREAT in paediatric patients

u-ORM/u-CREAT	Spearman's rho	Significance level
Serum hs-CRP	0.55	$P = 0.001$
Serum ORM	0.59	$P < 0.001$
ESR	0.47	$P = 0.007$
WBC	0.27	$P = 0.149$
PLT	0.45	$P = 0.012$
PCDAI	0.59	$P < 0.001$

Spearman's rank correlation test was used for correlation analyses. ESR, erythrocyte sedimentation rate; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PCDAI, Pediatric Crohn's Disease Activity Index; PLT, platelet count; u-CREAT, urinary creatinine; u-ORM, urinary orosomuroid; WBC, white blood cell count.

TABLE 5 Data of correlation analyses of u-ORM/u-CREAT in adult patients

u-ORM/u-CREAT	Spearman's rho	Significance level
Serum hs-CRP	0.44	$P = 0.001$
Serum ORM	0.49	$P < 0.001$
ESR	0.37	$P = 0.01$
WBC	0.45	$P = 0.001$
PLT	0.44	$P = 0.001$
HBI	0.33	$P = 0.018$

Spearman's rank correlation test was used for correlation analyses. ESR, erythrocyte sedimentation rate; HBI, Harvey-Bradshaw Index; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PLT, platelet count; u-CREAT, urinary creatinine; u-ORM, urinary orosomuroid; WBC, white blood cell count.

inflammatory marker has not been investigated yet in association with CD.^{15,17}

We found that u-ORM/u-CREAT had an ability to discriminate between active and inactive CD and its performance is similar to hs-CRP and se-ORM in children. However, its power seems to be mildly less than that of the serum markers in adult CD patients. Although the groups of patients are rather small, probably this difference may also be related to the score-based categorizing since

PCDAI includes more objective factors than HBI. Regarding adult patients, HBI allows a simpler assessment of CD activity and close correlation was reported between HBI and CDAI.²⁷ The change of u-ORM/u-TP suggests a mild alteration in the pattern of urinary proteins in relation to CD activity.

Elevated u-ORM excretion is supposed to be in association with the activation of the immune system. The several-fold elevation found in active CD might be in accordance with the former observations related to other inflammatory disorders.^{12–14,16,28} This assumption is confirmed by the significant correlations of u-ORM with conventional inflammatory parameters.

The exact mechanism and factors influencing u-ORM excretion have not been revealed completely. The moderate correlation with se-ORM suggests that besides se-ORM concentration, other factors may have impact on u-ORM levels too. Based on serum and urinary CYSC analyses, decreased renal function generally does not occur in patients with CD. Renal secretion of ORM was previously hypothesized^{29,30}; however, increased local renal production of ORM might also contribute to its elevated levels in urine. Local renal ORM production could also be associated with the consistent cytokine response and the consequent chronic systemic inflammatory process.

We found that the proportional increase in u-ORM was higher than that of se-ORM; therefore, u-ORM seems to be more sensitive for assessment of inflammatory activity in CD than se-ORM.

In contrast to former observations, in our study, u-ALB/u-CREAT did not reflect the activity of CD suggesting that u-ORM and u-ALB are excreted into the urine by different mechanisms.^{10,11}

Urinary orosomuroid can be easily applicable for routine clinical procedures by applying the novel fully automated immune turbidimetric method. Thereby, u-ORM fulfils today's general medical demands: the measurement is simple, rapid, cheap and accurate.^{31,32} Moreover, high stability of u-ORM was noted in our previous paper.¹⁵

There are some limitations to our findings. The size of the patients' groups was relatively small, particularly the

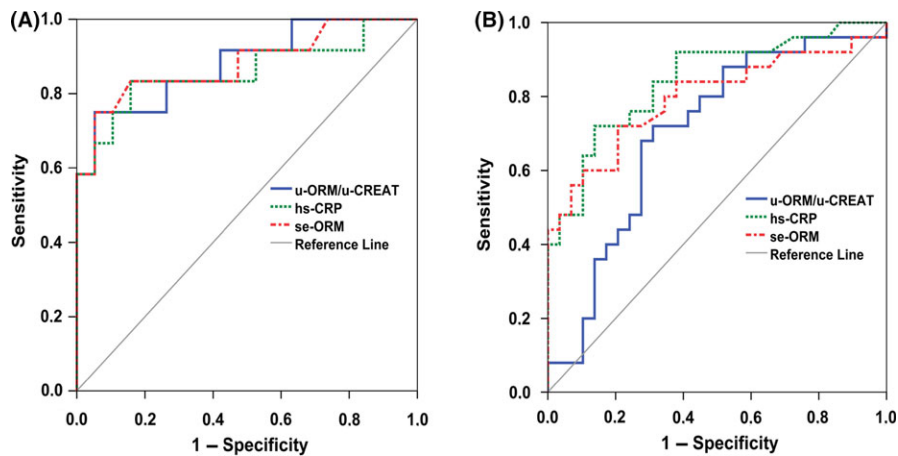


FIGURE 2 Receiver operating characteristic curves of u-ORM/u-CREAT, hs-CRP and serum ORM for discriminating active from inactive phase in children (A), and in adults with Crohn's disease (B). hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; se-ORM: serum orosomucoid; u-CREAT: urinary creatinine; u-ORM: urinary orosomucoid

number of paediatric patients. Active or inactive disease status was established by using clinical scores, which involves an uncertainty due to its subjective elements. To rule out this uncertainty, further evaluation would be worthwhile based on objective colonoscopic and histologic findings, which may offer more reliable results. Some of the patients with relapse had normal u-ORM levels. Immunomodulatory medications may have a suppressing effect on u-ORM in certain cases that needs further exploration. Although differences were reported between u-ORM concentrations of first morning urine samples and those of randomly collected samples in healthy individuals,²¹ we did not investigate the presence of diurnal variation of u-ORM in our patient groups. Faecal calprotectin is an emerging marker of CD activity, but this study did not include stool sample collection.

In conclusion, our findings support that quantification of urinary ORM can provide valuable information to add in CD management, although it is also a non-specific inflammatory marker. The automated measurement can give results rapidly, and the non-invasive property of sampling is especially advantageous for children.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the New National Excellence Program Of The Ministry Of Human Capacities [ÚNKP-17-3-III] and partially supported by Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program [GINOP-2.3.2-15-2016-00021] and National Research, Development and Innovation Office [NKFI-EPR K/115394/2015] grants. Hereby, we express our special thanks to Roche Magyarország Kft. and to Dako A/S Glostrup Denmark Company for providing the reagents and for their technical support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AL and TK designed the study. AT, PS and NS recruited patients and assessed clinical disease activity. BS, PK and ZHS performed laboratory measurements and statistical analysis. ZHS, AM, AL, AT, PS and NS participated in the discussion. BS, PK and TK wrote the manuscript.

ORCID

Tamás Kőszegi  <https://orcid.org/0000-0002-3910-5745>

REFERENCES

- Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(8):942-951.
- Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):423-439.
- Papay P, Ignjatovic A, Karmiris K, et al. Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. *J Crohns Colitis.* 2013;7(8):653-669.
- Iborra M, Beltran B, Nos P. noninvasive testing for mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2016;26(4):641-656.
- Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(3):247-255.
- Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(2):359-367.
- Bouguen G, Levesque BG, Feagan BG, et al. Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(6):1042.e1042-1050.e1042.
- Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.* 2006;55(3):426-431.
- Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res.* 2012;159(4):313-325.

10. Mahmud N, Stinson J, O'Connell MA, et al. Microalbuminuria in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1994;35(11):1599-1604.
11. Szigeti N, Marko L, Molnar GA, et al. Microalbuminuria in inflammatory bowel diseases using immunoturbidimetry and high-performance liquid chromatography. *Acta Gastroenterol Belg*. 2009;72(4):394-401.
12. Watson L, Midgley A, Pilkington C, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 and alpha 1 acid glycoprotein as biomarkers of renal disease activity in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21(5):496-501.
13. Christiansen MS, Iversen K, Larsen CT, et al. Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(2):272-281.
14. Park YJ, Yoo SA, Hwang D, Cho CS, Kim WU. Identification of novel urinary biomarkers for assessing disease activity and prognosis of rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med*. 2016;48:e211.
15. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, et al. Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochem Med*. 2016;26(3):421-430.
16. Kustan P, Szirmay B, Koszegi T, et al. Monitoring urinary orosomucoid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clin Biochem*. 2017;50(18):1002-1006.
17. Marko L, Szigeti N, Szabo Z, et al. Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45(12):1440-1448.
18. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1991;12(4):439-447.
19. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
20. Simera I, Moher D, Hoey J, Schulz KF, Altman DG. A catalogue of reporting guidelines for health research. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(1):35-53.
21. Tencer J, Thysell H, Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1996;56(8):691-700.
22. Hjorth L, Helin I, Grubb A. Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60(1):65-73.
23. Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, et al. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis*. 2018;10(6):377-384.
24. Kopylov U, Yung DE, Engel T, et al. Fecal calprotectin for the prediction of small-bowel Crohn's disease by capsule endoscopy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28(10):1137-1144.
25. D'Angelo F, Felley C, Frossard JL. Calprotectin in daily practice: where do we stand in 2017? *Digestion*. 2017;95(4):293-301.
26. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):157-171.
27. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(4):357-363.
28. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, et al. Urinary orosomucoid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(2):299-307.
29. Jiang H, Guan G, Zhang R, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2009;14(3):332-337.
30. Christiansen MS, Hommel E, Friberg L, Molvig J, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010;24(1):28-36.
31. Cappello M, Morreale GC. The role of laboratory tests in Crohn's disease. *Clin Med Insight Gastroenterol*. 2016;9:51-62.
32. Sands BE. Biomarkers of inflammation in inflammatory Bowel disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5): 1275-1285.e1272.

How to cite this article: Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, et al. Elevated urinary orosomucoid excretion as a novel biomarker in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest*. 2018;e13054. <https://doi.org/10.1111/eci.13054>

Lilla Makszin^{1,3} 
 Péter Kustán²
 Balázs Szirmay²
 Csilla Páger^{1,3}
 Emerencia Mező^{1,3}
 Krisztina I. Kalács^{2,3}
 Vera Pászthy²
 Erzsébet Györgyi²
 Ferenc Kilár^{1,3} 
 Andrea Ludány²
 Tamás Kőszegi^{2,3}

¹Institute of Bioanalysis, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

²Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

³János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

Received September 7, 2018

Revised October 17, 2018

Accepted October 18, 2018

Research Article

Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders

Perchloric acid (PCA) precipitation is a well-known method for the separation of heavily glycosylated proteins and for reducing the masking effect of major serum proteins. The aim of this study is to characterize PCA-soluble serum proteins in healthy individuals and in patients with systemic inflammatory diseases, such as Crohn's disease and sepsis. A PCA precipitation protocol was prepared and adapted to the analytical methods. After PCA treatment of the serum, the soluble proteins in the supernatant were analyzed by SDS-PAGE and by microchip gel electrophoresis (MGE). Characteristic changes of the electrophoretic patterns of the PCA-soluble fractions were observed. Four characteristic bands (at ~11, ~65, ~85, and ~120 kDa) with varying intensity were detected by MGE. The proportion of the ~65, ~85, and ~120 kDa bands were significantly higher in systemic inflammatory conditions than in healthy individuals ($p < 0.001$), and characteristic patterns were observed in patients with acute inflammation. The marked differences in the acid-soluble protein patterns, which were observed in patients with ongoing systemic inflammation, might be a good indicator of inflammation. The MGE analysis is a fast screening and quantification method for the detection of characteristic changes among acid-soluble serum proteins.

Keywords:

Acid-soluble serum proteins / Inflammation / Microchip gel electrophoresis / Perchloric acid precipitation / Systemic inflammatory diseases

DOI 10.1002/elps.201800378

1 Introduction

Laboratory analyses are essential for the diagnosis and monitoring of systemic inflammatory diseases; however, conventional laboratory tests have limited specificity and sensitivity, therefore, the identification of disease-specific molecules is of utmost importance [1, 2]. The roles of several proteins present in low amounts in the serum are still unrevealed because the masking effect of major serum proteins generates difficulties in the analysis [3].

Many assays require removal of the abundant proteins from the samples prior to analysis. Perchloric acid (PCA) precipitation is one of the most extensively used deproteinization protocols; however, certain proteins and small molecules might remain soluble [4]. PCA is used for the denaturation and precipitation of major serum proteins except for glycoproteins and for alkaline proteins, which remain soluble. PCA precipitation is a traditional method to solubilize and isolate

serum mucoproteins—heavily glycosylated serum proteins—to enrich glycoproteins in serum samples and to remove redundant proteins from the samples [5, 6]. This method provides a useful tool to prepare samples for the analysis of a variety of small molecules and glycoproteins as potential biomarkers of disease progression [1, 4, 5].

Acid-soluble serum proteins have been studied, mostly in malignant diseases [7]. Among others, the spectra of proteins in breast cancer [8] and lung cancer [9, 10] were studied by PCA extraction. In early stage breast cancer, mucin-type O-glycosylated proteins were identified [8]. Experiments were conducted to detect acid-soluble proteins not only in human tumor diagnostics but also in rats with an underactive or overactive thyroid gland. In animals with hyperthyroidism, the amount of proteins soluble in PCA was elevated, and the level of protein-bound hexoses was also higher. In the case of hypothyroidism, the total glycoprotein content decreased [11].

Low molecular mass human serum proteins, peptides, and other small components have been associated with pathological conditions such as cancer [12], diabetes [13], and cardiovascular and infectious diseases [14], most likely reflecting the state of the underlying cells or tissues.

Correspondence: Dr. Lilla Makszin, Institute of Bioanalysis, University of Pécs, H-7624 Pécs Szigeti u. 12, Hungary
E-mail: lilla.makszin@aok.pte.hu

Abbreviations: CD, Crohn's disease; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; MGE, microchip gel electrophoresis; ORM, orosomucoid; PCA, perchloric acid; WBC, white blood cell

Color Online: See the article online to view Figs. 1–5 in color.

Several inflammatory markers and acute phase proteins (orosomuroid, haptoglobin, alpha-1-anti trypsin, etc.) as glycoproteins might occur in the PCA-soluble serum fraction [2, 4, 5]. These glycoproteins could provide clinically relevant information for the early recognition and monitoring of systemic inflammatory conditions, which may improve the outcome and may predict progression.

Glycoproteomics has been chosen as a tool for the investigation of novel diagnostic possibilities [15, 16]; however, besides the mass spectrometry-based methods, different electrophoretic techniques are commonly used in daily routine diagnostics. Specific electrophoretic patterns might also serve as useful parameters for the assessment of disease activity [17, 18].

Beside SDS-PAGE, microchip gel electrophoresis (MGE) was the method to separate and characterize glycoprotein samples according to their molecular mass. Engel et al. analyzed five proteins using the MGE method: bovine alpha-1-acid glycoprotein, human alpha-1-antitrypsin, recombinant human erythropoietin beta, hen egg white ovalbumin, and human serum transferrin with different degrees and patterns of glycosylation, and the results were compared to SDS-PAGE. Their applied MGE method is highly standardized, rapid, and sensitive for glycoprotein analysis [19].

The aim of this study is to optimize the PCA precipitation method of serum proteins for MGE measurements, to investigate the electrophoretic profiles of PCA-soluble serum fraction in systemic inflammatory conditions, and to identify inflammation-specific patterns, which may be applicable in the detection of different inflammatory states.

2 Materials and methods

2.1 Sample collection

Several patient groups with acute and chronic inflammatory disorders were studied to reveal characteristic patterns in the PCA-soluble protein fraction of the serum. Septic patients admitted to the intensive care unit (Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs) served as

severe acute inflammatory group ($n = 56$). Since Crohn's disease (CD) is considered to be a chronic inflammatory condition with altering activity, CD patients ($n = 62$) were enrolled (2nd Department of Internal Medicine and Nephrology Centre, University of Pécs) as well. Based on clinical classification of CD patients, active ($n = 28$) and nonactive ($n = 34$) groups were created. Healthy volunteers served as controls ($n = 25$). Venous blood was obtained from the individuals using clot activator containing plain Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). After centrifugation of the coagulated blood ($1500 \times g$, 10 min) the serum fractions were stored at -70°C until analyses.

The study protocol was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs, Hungary in accordance with the 2008 Helsinki declaration (Permission No.: 4327/KK/15/2011 and 5133/KK/15/2013). Written consent was obtained from all participants prior to sample collection. The patients' parameters and demographic data are shown in Table 1. White blood cell (WBC) counts were determined using a Sysmex XN-3000 automated hematology analyzer (Sysmex, Kobe, Japan); high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and orosomuroid (ORM) concentrations were determined with a fully automated particle-enhanced immune turbidimetric assay by Cobas 8000/c502 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

2.2 Extraction of PA-soluble proteins

The extraction of PCA-soluble proteins was performed as it follows. Serum samples were mixed with an equal volume of 1.0 M PCA for 10 min at 4°C . Precipitated proteins were sedimented by centrifugation at $3800 \times g$ for 6 min. Supernatant was collected and neutralized by adding 1.42 M NaOH in a ratio of 3:2. After 10 min incubation in room temperature, the mixture was centrifuged at $3800 \times g$ for 6 min, and 2 M Tris-HCl (pH 8.1) buffer was added to the supernatant in a ratio of 3.3:1. The final pH of the solution was between 8.5 and 8.8. The total protein concentration (serum total protein in Table 1 and total protein in Table 2) of the samples was determined by spectrophotometry at 220 nm (Hitachi U-2910 UV/VIS).

Table 1. Patients' parameters (demographic data and routine serum tests)

	Controls ($n = 25$)	Nonactive CD patients ($n = 34$)	Active CD patients ($n = 28$)	Septic patients ($n = 56$)	<i>p</i> -value
Males, <i>n</i> (%)	9 (36.0)	18 (52.9)	9 (32.1)	21 (37.5)	–
Age (years)	29 ± 16	26 ± 17	26 ± 16	67 ± 10 ^{a),b),c)}	<0.001
Serum TP (g/L)	71 (68–74)	73 (69–77)	69 (65–73)	47 (42–51) ^{a),b),c)}	<0.001
WBC count (G/L)	6.4 (4.9–7.7)	6.9 (6.0–8.9)	8.9 (6.5–12.3) ^{a)}	12.7 (8.9–17.8) ^{a),b)}	<0.001
hs-CRP (mg/L)	0.5 (0.2–1.8)	2.7 (0.9–6.1)	21.9 (7.1–71.5) ^{a),b)}	171.4 (91.9–247.4) ^{a),b),c)}	<0.001
Orosomuroid (g/L)	0.8 (0.7–0.8)	1.0 (0.8–1.3)	1.7 (1.2–2.6) ^{a),b)}	1.8 (1.4–2.0) ^{a),b)}	<0.001

Medians (interquartiles) are presented except for age: mean \pm SD.

TP, total protein; WBC, white blood cell; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; CD, Crohn's disease; Kruskal-Wallis test with post hoc analysis was used to compare groups. Superscript lowercase letters indicate the significance level of post hoc analysis.

a) $p < 0.01$ compared to controls.

b) $p < 0.01$ compared to nonactive CD.

c) $p < 0.01$ compared to active CD.

Table 2. MGE protein profiles of PCA-soluble components (percent (%) of total AUC)

	Controls (<i>n</i> = 25)	Nonactive CD patients (<i>n</i> = 34)	Active CD patients (<i>n</i> = 28)	Septic patients (<i>n</i> = 56)	<i>p</i> -value
TP (g/L)	1.2 (1.0–1.5)	1.7 (1.4–2.1)	2.9 (2.2–3.7) ^{a),b)}	4.8 (3.9–6.0) ^{a),b),c)}	<0.001
~11 kDa	12.2 (7.2–23.8)	12.1 (9.5–17.2)	4.4 (2.9–9.0) ^{a),b)}	1.2 (0.6–2.1) ^{a),b),c)}	<0.001
~65 kDa	5.5 (3.3–10.3)	7.2 (5.3–11.1)	10.8 (6.5–18.5) ^{a)}	14.8 (9.2–19.3) ^{a),b)}	<0.001
~85 kDa	1.7 (1.2–2.9)	3.1 (2.5–5.8)	11.7 (8.2–17.5) ^{a),b)}	24.4 (16.2–35.5) ^{a),b),c)}	<0.001
~120 kDa	72.3 (62.6–78.3)	70.2 (64.8–76.2)	62.8 (56.8–76.5)	51.5 (41.1–65.8) ^{a),b)}	<0.001

Medians (interquartiles) are presented.

PCA, perchloric acid; TP, total protein; CD, Crohn's disease; Kruskal-Wallis test with post hoc analysis was used to compare groups.

Superscript lowercase letters indicate the significance of post hoc analysis.

a) *p* < 0.01 when compared to controls.

b) *p* < 0.01 when compared to nonactive CD.

c) *p* < 0.01 when compared to active CD patients.

For UV absorbance measurements, samples were diluted ten times with distilled water. Bovine serum albumin standard solution was used for calibration ($y = 0.0105x + 0.0076$, $R^2 = 1$).

2.3 SDS electrophoresis

Electrophoretic separation of PCA-soluble proteins was carried out by 1-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) according to the method of Laemmli [20]. The stacking and resolving gels contained 5 and 7.5% (w/v) acrylamide/methylene-bis-acrylamide (30:0.8) solution, respectively. Briefly, 10 μ L sample volumes were loaded and run at 190 V for 45 min in Mini-PROTEAN[®] 3 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, the protein patterns were detected on gel by silver staining using the method of Willoughby and Lambert [21].

2.4 Microchip gel electrophoresis

Electrophoresis in microchips was performed with the High Sensitivity Protein 250 LabChip kit in the commercially available Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode laser for fluorescence detection with 630 nm excitation and 680 emission wavelengths, as described previously [22]. The kit included microchips and reagents, such as High Sensitivity Protein 250 Labeling Dye, DMSO, ethanolamine, Protein 250 Standard Labeling Buffer (300 mM Tris/HCl, pH >8.5), Gel Matrix (4.5% polydimethyl acrylamide-based linear polymer solution at pH 8), Destaining Solution, and Sample Buffer. The denaturing solution containing SDS and dithiothreitol (DTT) was prepared by adding 3.5 μ L 1 M DTT (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) to 100 μ L Sample Buffer. The protocol was optimized for PCA-soluble proteins to achieve good separation and sensitivity. Briefly, fluorescently labeled proteins were prepared by mixing 5 μ L sample volume with 0.5 μ L diluted fluorescent dye/DMSO solution

(the dye was 10 times diluted with water compared to the original protocol) and incubated for 10 min at room temperature (instead of the 30 min incubation on ice in the original protocol). The excess dye (i.e., the unbound dye) was quenched by adding 0.5 μ L ethanolamine and incubated for 10 min at room temperature. The labeled samples were diluted five times by adding 24 μ L deionized water (instead of a 200 times dilution in the protocol). Briefly, 4 μ L of this diluted sample solutions were combined with 2 μ L denaturing solution, incubated at 100°C for 5 min, and centrifuged. Briefly, 6 μ L of each sample were loaded on the microchip channels filled with a polydimethyl-acrylamide-based linear polymer solution (pH 8). The respective well was loaded with the Destaining Solution.

Samples were injected with 1000 V for 80 s (injection volume was ca. 40 pL), and the separation was continued toward the anode at 1000 V for 60 s at 30°C. Each sample was analyzed at least three times. The molecular masses of the protein components were determined by using the calibration curves in [22]. From the area under the curve (AUC) of the components, relative proportions were calculated and expressed as a percentage of the total AUC.

2.5 Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS statistical software version 22 (IBM, New York, NY, USA). The Kruskal–Wallis test with post hoc analyses was used for the comparison of the groups. The *p*-values less than 0.05 were considered to be significant. All data were expressed as median (interquartiles).

3 Results and discussion

Examining the demographic, clinical, and laboratory data of the study population, we found that Crohn's patients and the healthy control group were similar in age and gender distribution (Table 1). In contrast, the mean age of the septic patients was higher compared with the other groups. The main reason

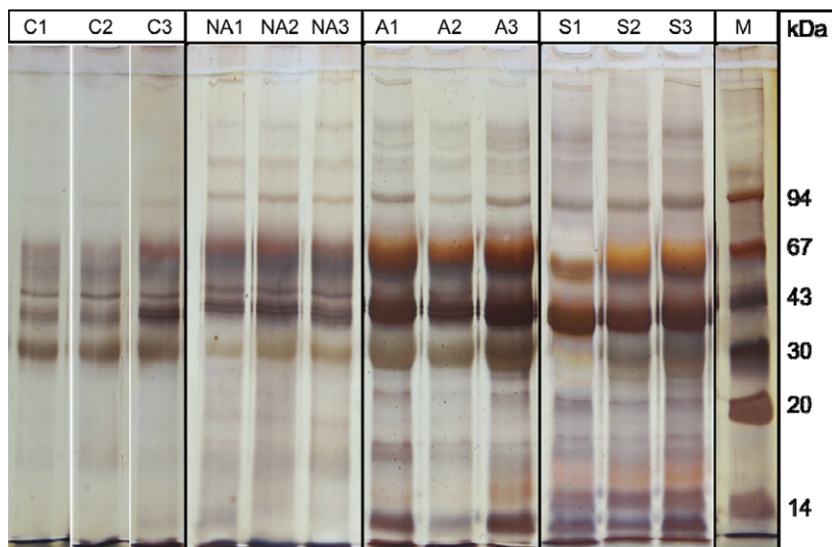


Figure 1. SDS-PAGE gel images with silver staining of PCA-soluble proteins. (A) control (C1–3), (B) nonactive Crohn's disease (NA1–3), (C) active CD (A1–3), and (D) sepsis (S1–3). The SDS-PAGE was run at 190V for 45 min; 10 μ L sample was loaded. M, molecular mass marker.

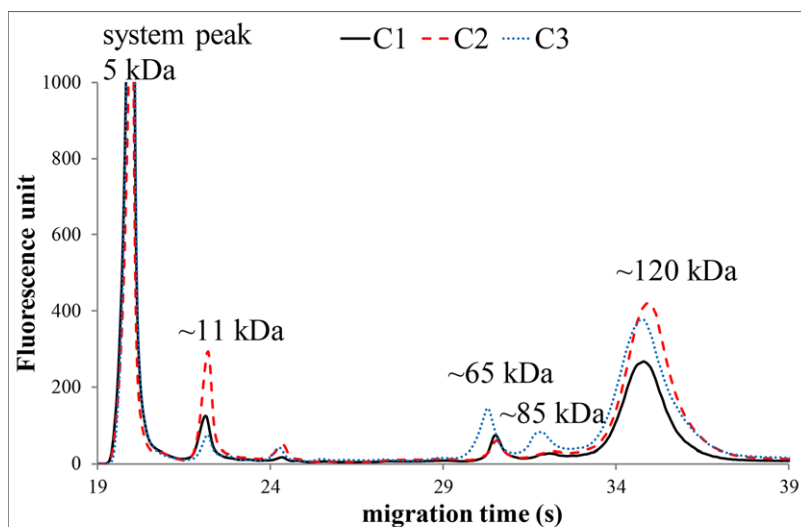


Figure 2. MGE electrophoretic profiles and gel-like images of PCA-soluble proteins in healthy controls (C1–3). Experimental conditions of the electrophoresis with the HSP 250 Protein Chip are described in the Materials and methods. The total protein concentration applied in the chip well was roughly 0.1 μ g/ μ L.

for this is that sepsis is more common in the elderly subjects, who suffer from comorbidities, have poorer immune status, and require surgical interventions more frequently [23]. The total protein content of the PCA extracts of healthy individuals does not depend on age and serum protein concentration; also, there is no correlation with creatinine, uric acid, and albumin levels (unpublished observations). It cannot be

excluded that there might be some minor individual differences in the protein patterns even among healthy people; however, in systemic inflammation, both the amount of PCA soluble proteins and the MGE profiles show marked changes when compared with those of the controls.

Laboratory analysis is necessary for monitoring systemic inflammation, and it is of utmost importance to

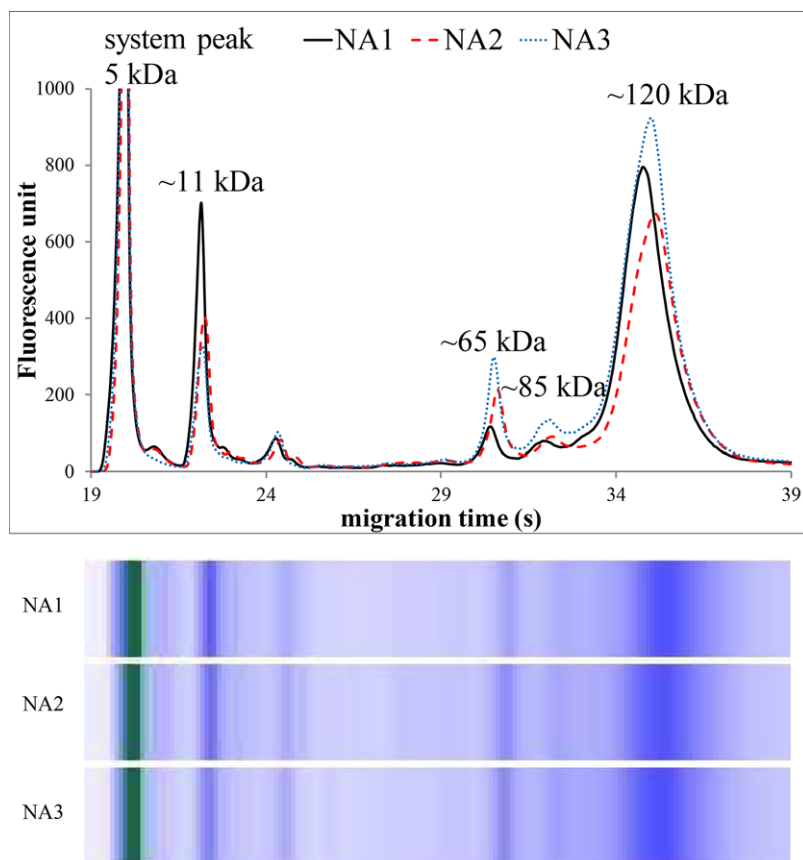


Figure 3. MGE electrophoretic profiles and gel-like images of PCA-soluble proteins in patients with nonactive Crohn's disease (NA1–3). The experimental conditions were the same as in Fig. 2. The total protein concentration applied in the chip well was roughly 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

help clinical decision-making, and for early recognition of complications [24, 25]. Conventional inflammatory parameters (WBC, hs-CRP, and ORM) are tested widely in daily routine. As expected, we found significant differences in these parameters between the four groups, as shown in Table 1. However, these parameters are not always capable for the early recognition of inflammatory activation. WBC is not sensitive enough and hs-CRP and ORM are nonspecific [25, 26], therefore, novel laboratory approaches can have an important place in managing systemic diseases.

The PCA precipitation method is able to isolate and enrich low abundant molecules and glycoproteins, which are not detected usually in serum by performing other methods [2, 4, 27, 28].

According to our knowledge, this is the first study that investigates the PCA-soluble proteins by high-sensitivity electrophoretic methods in systemic inflammatory disorders and compares them with those of healthy individuals. This method, however, has no opportunity to associate the PCA-soluble proteins with diseases as it has been shown in [2, 4, 5]. Previously, we have verified by western blot technique that traces of albumin may occur in the acid soluble protein samples; however, the amount of the immune reactive albumin was negligible when compared with that of the untreated serum samples (data not shown). The total protein analyses of PCA-soluble serum fractions showed higher concentrations

in inflammatory conditions (Table 2). The amount of the PCA-soluble proteins was significantly ($p < 0.001$) increased in active CD patients and in septic patients compared with nonactive CD and control individuals; however, data of nonactive CD patients did not differ from the control group. The elevated PCA-soluble protein concentration might be related to systemic inflammation, since several heavily glycosylated serum proteins (ORM, haptoglobin, and alpha-1-antitrypsin) can remain soluble in PCA, and the PCA-soluble fraction is presumably rich in inflammatory markers [5, 7]. Also, previous studies have reported elevated PCA-soluble proteins in malignancies [7]. These results correlate well with the observations of altering glycosylation of acute phase proteins during diseases, which influence both the physicochemical properties and the immunomodulatory function [29–36]. Specific changes in glycosylation have been used as novel potential markers of inflammation and cancer [15, 37–40]. Moreover, previous studies demonstrated that various glycoforms of acute phase proteins correlate with the severity of the disease in certain pathophysiological conditions [41–44].

In our study, the qualitative analyses of the PCA-soluble serum fractions showed marked differences in the protein composition (healthy and inflammatory conditions). We observed striking differences of SDS-PAGE patterns between healthy controls and patients with active systemic inflammation (active CD and sepsis) as seen on Fig. 1. More fractions

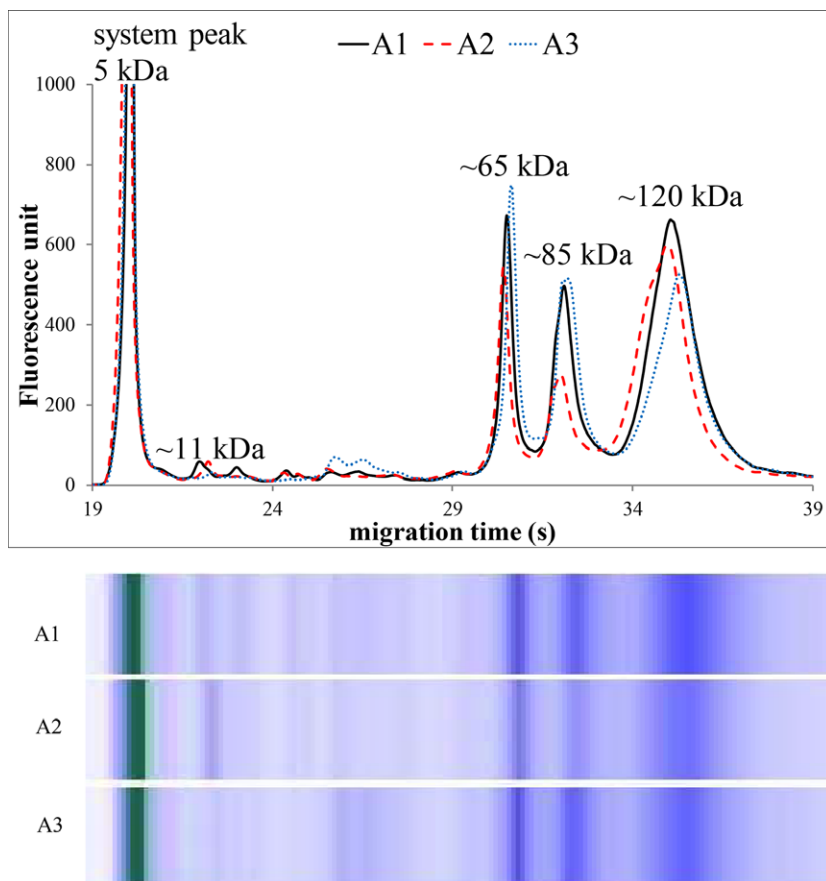


Figure 4. MGE electrophoretic profiles and gel-like images of PCA-soluble proteins in patients with active Crohn's disease (A1–3). The experimental conditions were the same as in Fig. 2. The total protein concentration applied in the chip well was roughly $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

could be detected on SDS-PAGE by silver staining in the cases of active CD and in sepsis than in the cases of healthy individuals, and the gel images of nonactive CD patients seemed to be very similar to the controls. Nevertheless, there were no marked differences between the individual patterns within the groups (control, nonactive CD, active CD, and sepsis).

The SDS-PAGE profiles show that a variation in the relative amounts exists between the different protein components. However, the SDS-PAGE with silver staining is a laborious and time-consuming method; moreover, the silver-stained gels are not suitable even for semiquantitative evaluation because of the nonlinear nature of silver accumulation on the surface of the proteins [20].

In contrast to SDS-PAGE, MGE is a miniaturized, rapid method allowing quantitative evaluation and high reproducibility [19,22]. Thus, the fine differences in the distribution and intensity of the PCA-soluble bands could be detected and evaluated better by MGE analysis.

Figures 2–5 illustrate three representative samples for PCA-soluble proteins from each patient-group and the control group to show the characteristic patterns of the diseases.

The MGE of the labeled PCA-soluble proteins showed characteristic profiles after the system peak (the fluorescent dye bound to ethanolamine) both for healthy controls and for patients suffering from inflammation.

Significant differences were found in the relative amounts of the protein components on MGE patterns, and we observed four characteristic bands with varying intensity at the ~ 11 , ~ 65 , ~ 85 , and ~ 120 kDa regions (Figs. 2–5, Table 2).

The relative amount of ~ 11 kDa band (given as the percentage of the total protein content) was about three times higher in patients without inflammation (control and nonactive CD patients) compared with active CD patients. Moreover, this band was much less detectable in severe sepsis ($p < 0.001$). On the other hand, the proportions of the ~ 65 , ~ 85 , and ~ 120 kDa bands were significantly higher in patients with acute active inflammation (active CD and septic patients) compared to nonactive and healthy patients ($p < 0.001$), as shown in Table 2 and Figs. 2–5. The MGE profiles of patients with nonactive CD seem to be very similar to those of control individuals (Figs. 2 and 3), while the patterns of active CD patients show similarity to those of septic patients (Figs. 4 and 5).

The profiles in the MGE, similarly to SDS-PAGE, show the quantitative and qualitative differences in the PCA-soluble protein composition in systemic inflammatory conditions; however, to date, there is only limited evidence for the exact constituents and characterization of the proteins. Probably, different heavily glycosylated serum acute phase proteins,

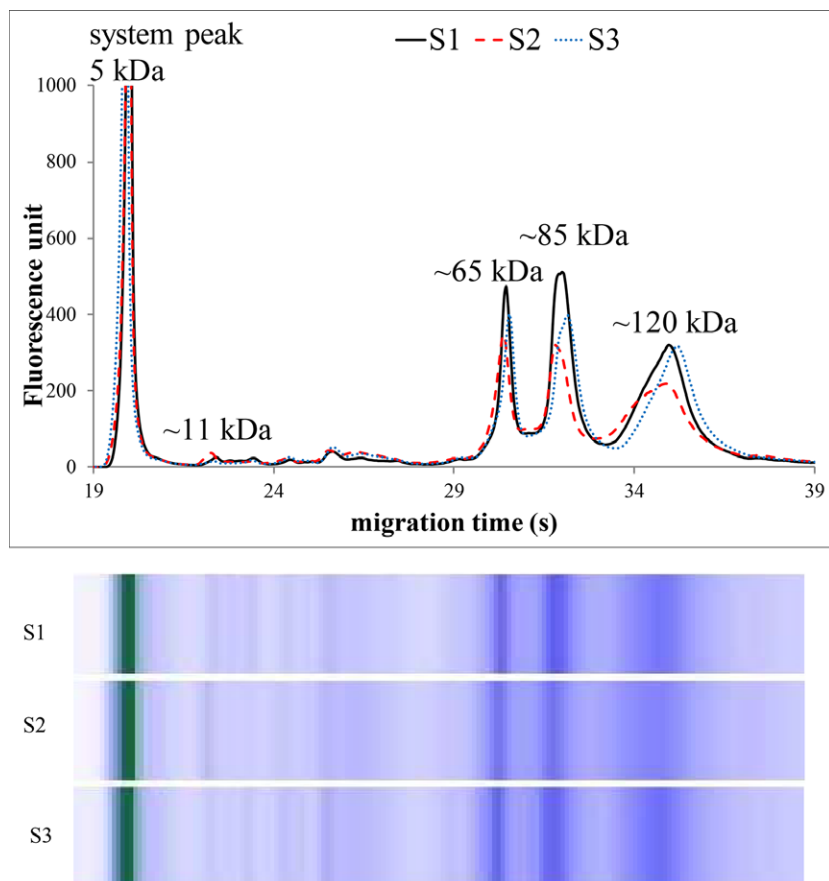


Figure 5. MGE electrophoretic profiles and gel-like images of PCA-soluble proteins in septic patients (S1–3). The experimental conditions were the same as in Fig. 2. The total protein concentration applied in the chip well was roughly $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

such as ORM, alpha-1-antitrypsin, complement factors, etc., might be responsible for the observed electrophoretic patterns in inflammation, as it has been demonstrated in cancer patients recently [5]. Furthermore, the changes in the carbohydrate structures of glycoproteins during inflammation might also cause diverse electrophoretic profiles [29, 31, 33].

4 Concluding remarks

To conclude, the marked differences in acid-soluble proteins observed in patients with ongoing systemic inflammation might be a good indicator of inflammation and can be of high importance in medical laboratory practice. The amounts of acid-soluble proteins increased, and characteristic protein patterns were observed, which seem to be capable of monitoring systemic inflammatory activation. However, the exact protein composition of PCA-soluble serum fraction has not been explored yet, and further proteomic studies should investigate and identify PCA-soluble protein markers, which can be useful in daily patient care.

This work was supported by the grants OTKA K-125275 and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009. Lilla Makszin acknowledges the financial support of the PTE ÁOK-Post-Doc Grant. Péter Kustán acknowledges the financial support of the

ÚNKP-17-3-III New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities. Hereby we express our special thanks to our colleagues for their invaluable help.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Yu, C. W., Juan, L. I., Wu, M. H., Shen, C. J., Wu, J. Y., Lee, C. C., *Br. J. Surg.* 2013, 100, 322–329.
- [2] Pepys, M. B., Hirschfield, G. M., *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 1805–1812.
- [3] Stumpe, M., Miller, C., Morton, N. S., Bell, G., Watson, D. G., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006, 831, 81–84.
- [4] Ongay, S., Lacunza, I., Díez-Masa, J. C., Sanz, J., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2010, 663, 206–212.
- [5] Winzler, R. J., Devor, A. W., Mehl, J. W., Smyth, I. M., *J. Clin. Invest.* 1948, 27, 609–616.
- [6] Anderson, A. J., *Nature* 1965, 208, 491–492.
- [7] Burston, D., Tombs, M. P., Apsey, M. E., Maclagan, N. F., *Br. J. Cancer* 1963, 17, 162–178.
- [8] Lee, C. S., Taib, N. A., Ashrafzadeh, A., Fadzli, F., Harun, F., Rahmat, K., Hoong, S. M., Abdul-Rahman, P. S., Hashim, O. H., *PLoS One* 2016, 11, e0149551.

- [9] Ma, R., Xu, H., Wu, J., Sharma, A., Bai, S., Dun, B., Jing, C., Cao, H., Wang, Z., She, J. X., Feng, J., *Oncotarget* 2017, 8, 18901–18913.
- [10] Ganz, P. A., Baras, M., Ma, P. Y., Elashoff, R. M., *Cancer Res.* 1984, 44, 5415–5421.
- [11] Drózd, M., Kucharz, E., Kozłowski, A., *Acta Biol. Med. Ger.* 1975, 34, 703–706.
- [12] Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C., Liotta, L. A., *Lancet* 2002, 359, 572–577.
- [13] Basso, D., Valerio, A., Seraglia, R., Mazza, S., Piva, M. G., Greco, E., Fogar, P., Gallo, N., Pedrazzoli, S., Tiengo, A., Plebani, M., *Pancreas* 2002, 24, 8–14.
- [14] Rubin, R. B., Merchant, M., *Am. Clin. Lab.* 2000, 19, 28–29.
- [15] Banazadeh, A., Veillon, L., Wooding, K. M., Zabet-Moghaddam, M., Mechref, Y., *Electrophoresis* 2017, 38, 162–189.
- [16] Mechref, Y., Hu, Y., Garcia, A., Hussein, A., *Electrophoresis* 2012, 33, 1755–1767.
- [17] Lehmann, R., Liebich, H., Grübler, G., Voelter, W., *Electrophoresis* 1995, 16, 998–1001.
- [18] Wijnen, P. A., van Dieijen-Visser, M. P., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996, 34, 535–545.
- [19] Engel, N., Weiss, V. U., Wenz, C., Rüfer, A., Kratzmeier, M., Glück, S., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., *Electrophoresis* 2015, 36, 1754–1758.
- [20] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [21] Willoughby, E. W., Lambert, A., *Anal. Biochem.* 1983, 130, 353–358.
- [22] Makszin, L., Kilár, A., Felső, P., Péterfi, Z., Kocsis, B., Kilár, F., *Electrophoresis* 2012, 33, 3351–3360.
- [23] Nasa, P., Juneja, D., Singh, O., *World J. Crit. Care. Med.* 2012, 1, 23–30.
- [24] Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I., Lopes, A., *Inflammation* 2018, 41, 1115–1127.
- [25] Schrödl, W., Büchler, R., Wendler, S., Reinhold, P., Muckova, P., Reindl, J., Rhode, H., *Proteomics Clin. Appl.* 2016, 10, 1077–1092.
- [26] Cecilian, F., Giordano, A., Spagnolo, V., *Protein Pept. Lett.* 2002, 9, 211–223.
- [27] Ongay, S., Neusübeta, C., Vaas, S., Díez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, 31, 1796–1804.
- [28] Inada, K., Endo, S., Takahashi, K., Suzuki, M., Narita, T., Yoshida, T., Suda, H., Komuro, T., Yoshida, M., *Microbiol. Immunol.* 1991, 35, 303–314.
- [29] Chavan, M. M., Kawle, P. D., Mehta, N. G., *Glycobiology* 2005, 15, 838–848.
- [30] Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y., Matsumoto, K., *Clin. Chim. Acta* 2003, 329, 117–125.
- [31] McCarthy, C., Saldova, R., Wormald, M. R., Rudd, P. M., McElvaney, N. G., Reeves, E. P., *J. Proteome Res.* 2014, 13, 3131–3143.
- [32] Turner, G. A., *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 376, 231–238.
- [33] Joenvaara, S., Saraswat, M., Kuusela, P., Saraswat, S., Agarwal, R., Kaartinen, J., Järvinen, A., Renkonen, R., *PLoS One* 2018, 13, e0195006.
- [34] van Dijk, W., Havenaar, E. C., Brinkman-van der Linden, E. C., *Glycoconj. J.* 1995, 12, 227–233.
- [35] Cecilian, F., Pocacqua, V., *Curr. Protein Pept. Sci.* 2007, 8, 91–108.
- [36] Orntoft, T. F., Vestergaard, E. M., *Electrophoresis* 1999, 20, 362–371.
- [37] Fanayan, S., Hincapie, M., Hancock, W. S., *Electrophoresis* 2012, 33, 1746–1754.
- [38] Rodrigues, E., Macauley, M. S., *Cancers* 2018, 10, E207
- [39] Mackiewicz, A., Mackiewicz, K., *Glycoconj. J.* 1995, 12, 241–247.
- [40] Brinkman-van der Linden, E. C., de Haan, P. F., Havenaar, E. C., van Dijk, W., *Glycoconj. J.* 1998, 15, 177–182.
- [41] Shiyan, S. D., Bovin, N. V., *Glycoconj. J.* 1997, 14, 631–638.
- [42] Rydén, I., Pålsson, P., Lundblad, A., Skogh, T., *Clin. Chim. Acta* 2002, 317, 221–229.
- [43] Balmaña, M., Giménez, E., Puerta, A., Llop, E., Figueras, J., Fort, E., Sanz-Nebot, V., de Bolós, C., Rizzi, A., Barrabés, S., de Frutos, M., Peracaula, R., *J Proteomics* 2016, 132, 144–154.
- [44] Hashimoto, S., Asao, T., Takahashi, J., Yagihashi, Y., Nishimura, T., Saniabadi, A. R., Poland, D. C., van Dijk, W., Kuwano, H., Kochibe, N., Yazawa, S., *Cancer* 2004, 101, 2825–2836.