

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**D-DIMER-SPECIFIKUS MONOKLONÁLIS
ELLENANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA, JELLEMZÉSE
ÉS DIAGNOSZTIKAI ALKALMAZHATÓSÁGUK
VIZSGÁLATA**

Török-Nagy Beáta

Témavezető: Dr. Dénes Béla



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2020

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Dénes Béla, az állatorvos-tudomány kandidátusa, dr. habil., c. egyetemi tanár

(igazgatóhelyettes, laboratóriumvezető)

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Immunológiai Laboratórium

témavezető

Dr. Antal József, Ph.D.

(minőségügyi szakértő)

Nemzeti Orvostechnikai Eszköz Megfelelőségértékelő és Tanúsító Kft.

témabizottság tagja

Dr. Vajdovich Péter, Ph.D. Dipl. ECVCP

(egyetemi docens, tanszékvezető)

Állatorvostudományi Egyetem,

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n..... sz. példány.

.....

Török-Nagy Beáta

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A D-dimer egy fibrin degradációs fehérje, mely a vér alvadásakor a szekunder fibrinolysis során keletkezik. A szervezet fokozott thrombotikus aktivitásának eredményeképpen koncentrációja a vérben megemelkedik, a pontos értéke D-dimer diagnosztikai próbával határozható meg.

A D-dimer próba legfőbb indikációs területe a humán klinikai gyakorlatban a vénás thromboembóliás betegségek – mélyvénás thrombosis (DVT), tüdőembólia (PE) – kizárása. A negatív teszteredmények esetén a kis kockázatú betegeknél nagy biztonsággal zárható ki mindkét kóros állapot. Ezen kívül a D-dimer koncentráció meghatározásának fontos szerepe van a disseminált intravasculáris coagulatio (DIC) diagnózisának felállításában, illetve a betegség monitorozásában is.

A D-dimer érték meghatározása állatorvosi szempontból is jelentős, ugyanis a hypercoagulatio, fokozott véralvadással járó állapotok az állatokban is emelkedett D-dimer koncentrációt eredményeznek, melynek diagnosztikai értékével több tanulmányban is foglalkoztak, főleg a kutyák, de lovak, macskák esetében is.

Kutyák esetében a D-dimer fehérje mérésének elsősorban a tüdőembólia és a DIC meghatározásában van jelentősége, de a thromboembóliás betegségeken kívül számos más kórkép – vérzés, vese, szív- és májelégtelenség, műtét utáni állapotok és a daganatos megbetegedések – esetén is megemelkedhet a koncentrációja.

A kereskedelmi forgalomban számos, a D-dimer koncentráció meghatározására alkalmas diagnosztikai próba vásárolható, azonban ezeknél általános problémát jelent, hogy az egyes tesztek tulajdonságaikban egymástól jelentősen eltérhetnek. Gyakori, hogy a mintában jelen lévő D-dimert és egyéb degradációs termékeket a különböző tesztek eltérő mértékben képesek azonosítani, gyakran adnak keresztreakciókat, ezáltal specifitásukban is különbözhetnek. Így az egyes próbák eredményei nehezen összehasonlíthatók, s mindezek zavarják a klinikai döntéshozatalt. Mindezek alapján szükségesnek láttuk olyan ellenanyagok, illetve diagnosztikai teszt előállítását, amelyek megfelelő specifitással ismerik fel a mintában lévő D-dimer fehérjét.

A doktori munka során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A doktori munka elsődleges célja egy új D-dimer-specifikus monoklonális ellenanyag előállítása volt, amelyet latex-agglutináción alapuló immunturbidimetriás diagnosztikai próba előállításához kívántunk használni.
2. Ehhez célul tűztük ki az új ellenanyag széleskörű immunológiai jellemzését, különös figyelmet fordítva az ellenanyag specificitását is jelentősen meghatározó keresztreakció vizsgálatokra, illetve a D-dimer antigénezen felismert epitóp meghatározására.
3. További célunk volt egy, a latex-agglutináción alapuló immunturbidimetriás D-dimer diagnosztikai teszt előállítása, mely során az ellenanyagot latex mikroszemcsék felületére rögzítjük.
4. Végző célként az ellenanyagra épült diagnosztikai teszt humán klinikai teljesítményének értékelését, illetve állatorvosi gyakorlati alkalmazását kívántuk vizsgálni.

2. Anyag és módszer

Monoklonális ellenanyag előállítása

A monoklonális ellenanyag előállítását hibridóma technikával végeztük. Az immunizáláshoz szükséges D-dimer antigént előzetesen preparáltuk, oly módon, hogy fibrin alvadékot hoztunk létre, majd plasminnal emésztettük. Az így keletkezett fibrin degradációs termékek molekulatömegét nátrium-dodecil-szulfát gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és Western blottal határoztuk meg. A termék funkcionális aktivitását ELISA módszerrel (Asserachrome D-dimer) és D-dimer latex immunturbidimetriás próbával (DiaSys Diagnostic Systems GmbH) mértük.

A kísérletben 6 db, 8 hetes nőstény Balb/c AnN CrI BR egeret (Charles River) használtunk. Valamennyi állatot szigorúan a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó útmutatójában foglalt ajánlásokkal összhangban tartottunk, illetve a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (MÁB) által jóváhagyott kísérleti munkaterv szerint kezeltünk.

Az immunizálás során 3-3 db egeret intraperitonealisan (i.p.), illetve subcutan (s.c.) oltottunk, D-dimert és komplett Freund adjuvánst (CFA) (Sigma Aldrich Co.) tartalmazó keverékkel. Az első oltást követő 24. napon az egereket ugyanezen módokon (i.p. és s.c.) újra oltottuk

inkomplett Freund-adjuváns (IFA) (Sigma Aldrich Co.) felhasználásával. Tíz nappal a második oltás után vért vettünk az egerek lateralis farokvénájából, és az ellenanyagválasz szintjét saját fejlesztésű indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Négy héttel a második immunizálást követően a legmagasabb szintű ellenanyagválaszt adó egeret intravénásan újra oltottuk, D-dimert és fiziológiás sóoldatot 1:2 arányban tartalmazó szuszpenzióval.

Három nap elteltével az egér lépét steril körülmények között eltávolítottuk, majd szérumentes RPMI-1640 tápoldattal (Sigma Aldrich Co.) mostuk a lépesejteket. Ezt követően polietilén glikol (PEG) jelenlétében az Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejtekkel fuzionáltuk a lépesejteket. A sejtuszuszpenziót 96-lyukú mikrotitráló lemezre mérve 5% CO₂-ot biztosító szén-dioxid inkubátorban, 37 °C-on hagytuk növekedni.

A hibridómák szelektálására hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó (HAT) szelekciós tápoldatot (Sigma Aldrich Co.) mértünk a tenyésztőlemezek vájataiba, egy héttel később a HAT médiumot hipoxantin, timidin (HT) tartalmú tápoldatra cseréltük. Két héttel a fúziót követően a felnövekvő sejtek felülűszoit indirekt ELISA-próbával vizsgáltuk a D-dimer specifikus ellenanyagot termelő hibridómák azonosítása céljából.

Az ellenanyag titer alapján kiválasztott sejtcsoportokat 2-5-alkalommal klónoztuk végponthígítási módszerrel.

Az ellenanyagok vizsgálata

Az előállított ellenanyagok könnyű- és nehézlánc szerinti izotípusát „Mouse monoclonal antibody isotyping test kit” (AbDSerotec) gyorstesztel állapítottuk meg.

Az előállított ellenanyagok lehetséges keresztreakcióit saját fejlesztésű indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Antigénként különböző fibrin degradációs termékeket, úgy, mint fibrin-D monomert, fibrin-E monomert, fibrin-X fragmentumot, fibrin-Y fragmentumot, és fibrinogén degradációs termékeket, mint fibrinogén-D monomert, fibrinogén-E monomert (Biotrend Chemikalien GmbH) és fibrinogént (Sigma Aldrich Co.) alkalmaztunk a D-dimer antigén mellett. Az eredmények vizsgálata során a keresztreakciók intenzitását az optikai denzitások hányadosából számoltuk: $OD_{\text{sejtfelülűszó}} / OD_{\text{negatív kontroll}}$.

Az antigén felszínén lévő, az ellenanyag által felismert epitóp meghatározáshoz enzimatikusan emésztett antigén fragmentumokat hoztunk létre, ehhez a D-dimer fehérjét 70 %-os hangyasavban (Sigma Aldrich Co.) oldottuk, majd cianogén-bromiddal (CNBr) (Sigma Aldrich Co.) inkubáltuk. A cianogén-bromiddal emésztett fragmentumokat tovább

emésztettük kimotripszinnel (Sigma Aldrich Co.). Az emésztett fehérje antigéneket gélelektroforézissel szétválasztottuk, molekulatömegüket meghatároztuk, majd az általunk előállított monoklonális ellenanyag alkalmazásával, Western blot módszerrel vizsgáltuk, végül megszekvenáltuk. Az aktív, D-dimer specifikus ellenanyaggal reagáló fragmentumokat jelölő sávokat kivágtuk a membránból, majd Edman protokolla alapján szekvenáltuk, az ABI 494 fehérje szekvenátorral (Applied Biosystems).

Monoklonális ellenanyag termeltetése, tisztítása

A monoklonális ellenanyag folyamatos termeltetését többféle rendszerben végeztük. Az egyik alkalmazott rendszer a miniPERM[®] bioreaktor (Sarstedt) volt. Ebben a termelési rendszerben a hibridóma sejteket 10% foetális borjúsavót (FCS) (Sigma-Aldrich Co.), Antibiotic-Antimycotic oldatot (Sigma-Aldrich Co.) tartalmazó RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) tápoldatban tenyésztettük. A másik, termelésre használt rendszer a FiberCell[®] hollow fiber reaktor (FiberCell[®] Systems Inc.) volt, amely koncentráltabb ellenanyag előállítást tett lehetővé.

Az összegyűjtött és ellenanyagot tartalmazó sejtfelülúszókat az affinitáskromatográfia elvén működő Protein G Sepharose[®] 4 Fast Flow (GE Healthcare) oszloppal tisztítottuk, illetve nagyobb mennyiségű felülúszó esetén az ÄKTA Pure 150 (GE Healthcare) folyadékkromatográfias készülékkel végeztük a tisztítást, 50/40 HiScale MabSelect SuRe[™] (GE Healthcare) oszlopot alkalmazva.

A felülúszót mélységi szűrővel (Sartorius stedim Biotech) szűrtük le, abból a célból, hogy sejtektől teljesen mentes legyen, majd izopropanolban oldott 1mM fenil-metil-szulfonid-fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich Co.) proteázgátlóval inkubáltuk. A tisztított ellenanyag koncentráálásához tangenciális szűrőt használtunk (Merck Millipore).

A monoklonális ellenanyag diagnosztikai testben történő alkalmazása

A vizsgálataink alapján kiválasztott monoklonális ellenanyagot latex agglutináción alapuló immunturbidimetriás diagnosztikai próbába építettük be. A folyamat során a latex mikroszemcsék felszínén lévő karboxil csoportokat aktiváltuk, majd a monoklonális ellenanyagot a mikroszemcsékre kapcsoltuk.

A latex-reagenssel történő mérés az immunturbidimetria elvén alapszik. A reakció során a latex szemcsék felszínét borító ellenanyag reagál a mintában található D-dimerrel – amely dimer jellegénél fogva több kötőhellyel rendelkezik –, és mindez a latex szemcsék

agglutinációját eredményezi. Ennek következtében a reakcióelegy turbiditása megváltozik, a mérés kezdeti és végpontja közötti optikai denzitás változása detektálható, amelynek mértéke arányos a kezdeti D-dimer koncentrációval.

A Dia-D-DIMER diagnosztikai teszt humán klinikai vizsgálata

A Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet központi laboratóriumában 158 vénás thromboembolia (VTE) gyanújával vizsgált beteg plazma mintáját mértük meg három immunturbidimetriás teszttel. Az egyik, az általunk előállított monoklonális ellenanyagra épült D-dimer reagens volt (Dia-D-DIMER, Diagon Kft.), és emellett két másik, kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer tesztet (INNOVANCE® D-Dimer (Siemens Medical Solutions), STA®-Liatest® D-Di (Diagnostica Stago)) is alkalmaztunk. Célunk az volt, hogy a próbákat összehasonlítsuk, vizsgáljuk ugyanazon mintán kapott eredmények korrelációját, illetve a küszöbértékek optimalizálásával összehangoljuk a tesztek szenzitivitását és specifitását.

Az értékelés során a küszöbértékek alapján a mintákat pozitív és negatív D-dimer eredményű csoportokba soroltuk. A csoportok közötti összehasonlítást Khí-négyzet statisztikai módszerrel végeztük. Vizsgálatunkban szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. A STA®-Liatest® D-Di és Dia-D-DIMER tesztek esetében a különböző küszöbértékeknél számolt diagnosztikai specifitás és szenzitivitás értékeket vevő működési karakterisztika (ROC)-görbével ábrázoltuk. A tesztek értékeléséhez szükséges „valós pozitív”, illetve „valós negatív” értékek megadásához az INNOVANCE® D-Dimer teszt eredményeit vettük alapul.

A Dia-D-DIMER teszt állatorvosi alkalmazása

A Dia-D-DIMER tesztet állatoktól származó minták D-dimer mérsére is alkalmaztuk. Összesen hetven, kutyáktól származó vérplazma mintát gyűjtöttünk két budapesti helyszínen, az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ, illetve a Budafoki Állatgyógyászati Központ segítségével. A vérmintákat nátrium-citrátos puffer oldatot tartalmazó vérvételi csőbe (VACUETTE®, Greiner AG) vették le, majd a plazmát centrifugálással (2000 g, 10 min.) nyerték ki. A kutyák átlagkora 8 év és 2 hónap (1,5-14 év között) volt. Nemek szerinti megoszlása: hím 52% és nőstény 48%. A minták közül 50, olyan állattól származott, amelynél valamilyen típusú daganatot diagnosztizáltak. A daganatot hordozó kutyák csoportjában a kiindulási szövet szerint az alábbi daganat típusok fordultak elő: mastocytoma (n=6), lymphoma (n=5), sarcoma (n=10), carcinoma (n=17), insulinoma (n=3), lipoma (n=3), adenoma (n=3), illetve további tumortípusok (n=3). A kontrollpopuláció

20, általunk egészségesnek vélt (daganatmentes) kutyából állt, amelyek folyamatos állatorvosi megfigyelés alatt álltak, rendszeresen kaptak oltást, illetve paraziták elleni kezelést. A kutya vérplazmákat a Dia-D-DIMER diagnosztikai teszttel, Coag XL koagulométeren (Diagon Kft.) mértük, és állapítottuk meg a D-dimer koncentrációt.

Az egészségesnek vélt kutyák mintái alapján meghatároztuk a kutyák esetében használható referencia tartományt. Az egyes csoportok (daganatos kutyák, illetve az egyes daganat típusok a kontroll csoporthoz viszonyítva) közötti különbségeket nem paraméteres Wilcoxon-Mann-Whitney próbával vizsgáltuk. A $p < 0,05$ tekintettük szignifikáns különbségnek. A statisztikai számolásokat a Minitab 14.0 statisztikai programmal (Minitab Inc.) végeztük.

3. Eredmények

Monoklonális ellenanyag előállítás

A fibrin emésztésével előállított D-dimer antigént funkcionálisan aktívnak találtuk és koncentrációját 2 mg/ml-nek állapítottuk meg. A Western blot analízissel azonosított sáv alapján az antigén molekulatömege ~180 kDa. Az előállított D-dimer antigént immunizálásra megfelelőnek találtuk.

Összesen hat Balb/c egeret immunizáltunk a D-dimer antigénnel, majd egy kiválasztott egér lépsejtjeit Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejtekkel fúzionáltuk. A sejt-fúzió után keletkezett hibrid sejteket specifikus tápfolyadékban szelektáltuk, és összesen 576 hibridóma sejtcsoportot kaptunk. Indirekt ELISA módszerrel vizsgálva, 38 olyan hibridóma sejtcsoportot találtunk, amelyek a D-dimerre pozitív immunreakciót adtak. Az általuk termelt ellenanyagok magas titerai alapján a következőket választottuk ki: 1B4, 1H12, 2B9, 2F2, 3B3, 4G8 és a 6B9. Ezeket a sejtcsoportokat végponthígításos módszerrel klónoztuk.

Az ellenanyagok vizsgálata

Az izotípus meghatározás során a 2F2 jelölésű ellenanyag bizonyult IgM izotípusúnak. A többi vizsgált ellenanyag, az 1B4, 1H12, 2B9, 3B3, 4G8 és a 6B9 jelölésűek mind IgG izotípusúak, nehézláncuk szerint az IgG1 alosztályba sorolhatóak, könnyűláncuk szerint pedig κ izotípusúak.

A keresztreakciók vizsgálata alapján azt láttuk, hogy mindegyik ellenanyag reagált a D-dimerrel, de legerősebb reakciót az 1B4, 1H12, 2B9 és a 3B3 ellenanyagok mutattak. Ezek az ellenanyagok ugyancsak reagáltak a fibrin-D és fibrinogén-D fragmentumokkal, de egyik

sem keresztreakgált a fibrin-E, illetve a fibrinogén-E fragmentumokkal. A 4G8 és a 6B9 sejtvonalak által termelt ellenanyagok is erősen reagáltak a D-dimerrel, és csak gyenge vagy mérsékelt reakciót mutattak a D-fragmentumokkal. A leggyengébb D-dimer affinitást a 2F2 ellenanyagnál tapasztaltunk, amely a D, X és az Y fragmentumokkal is gyengén reagált, ellenben a fibrinogénnel, közepes erősségű reakciót mutatott. A fibrinogénnel mutatott keresztreakció a 3B3, 1B4, 1H12, 2F2 és a 6B9 ellenanyagoknál többnyire erős vagy közepes, a 4G8 ellenanyagnál gyenge volt. Ezekkel ellentétben a 2B9 ellenanyag egyáltalán nem adott a fibrinogénnel keresztreakciót. Ezen kiemelkedő tulajdonsága miatt ezt a sejtvonalat többször klónoztuk, majd megállapítottuk, hogy az így kapott sejtvonalak is megtartották ezt a tulajdonságukat. A D-dimerhez való affinitásuk alapján kiemelkednek a 2B9/F2, 2B9/B1 és a 2B9/D5 klónok ellenanyagai, melyek a D-dimerrel nagyon erős reakciót mutattak.

A keresztreakciók vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a 2B9 jelölésű ellenanyag affinitásbeli tulajdonságai hasonlóak voltak a referens ellenanyagként alkalmazott anti-D-dimer monoklonális ellenanyaghoz (HyTest Ltd.). Mindkét ellenanyag erős reakciót mutatott a D-dimerrel, ellenben nem adtak keresztreakciót a fibrinogénnel, és csak gyengén reagáltak a fibrin X és az Y fragmentumokkal. Mi több, a fent említett, kiemelt klónok a D-dimerrel erősebben, míg a D-fragmentumokkal gyengébben reagáltak, mint a referensnek tekintett ellenanyag.

Az általunk előállított monoklonális ellenanyag által felismert D-dimer epitóp vizsgálatát a 2B9/D5 klónnal végeztük és ennek során szekvenciális epitóp helyett, összetettebb, térbeli epitóp struktúrát találtunk. A kimotripsinnel emésztett antigén fragmentumokat redukáló, illetve nem-redukáló körülmények között is elektroforetizáltuk, majd Western blotolattal analizáltuk. A blotolás során a nem-redukált mintában a 25, 30 és a 38 kDa molekulatömegeknél található sávok festődtek meg a membránon, jelezve az antigén-ellenanyag interakciót. Ezek közül a 25, illetve a 38 kDa molekulatömegű fragmentumok esetében sikerült szekvenciákat kapnunk, míg a 30 kDa-os fragmentumnál nem. A meghatározott szekvenciák a B-láncon a 94 IQPDSS és a 140 GNVANTNT aminosav szakaszok, illetve a C-láncon a 23 LQEIYNSNNQ és a 93 VYCEID szakaszok.

Az általunk azonosított epitóp felszínek egymástól relatív távol helyezkednek el a fibrin alegységeken, mely alapján az epitóphoz kapcsolódó két ellenanyag között nem, vagy csak kis valószínűséggel léphet fel sztérikus interferencia. Ennek köszönhetően a 2B9 monoklonális ellenanyag megfelelő riporter molekulának bizonyul egy latex agglutinációs immunológiai módszerben történő alkalmazásra.

A 2B9 monoklonális ellenanyag diagnosztikai alkalmazása

A munkánk során előállított 2B9 monoklonális ellenanyagot latex agglutináción alapuló immunturbidimetriás diagnosztikai próbába építettük be. A folyamat során a latex mikroszemcsék felszínén lévő karboxil csoportokat aktiváltuk, majd a monoklonális ellenanyagot a szemcsékre kötöttük fel. Az előállított próba Dia-D-DIMER teszt néven került kereskedelmi forgalomba, a teszt fejlesztése a Diagon Kft.-ben történt.

Humán minták D-dimer koncentrációjának mérése

A humán vérplazma minták vizsgálata során a Dia-D-DIMER és a STA[®]-Liatest[®] D-Di teszteket az INNOVANCE[®] D-Dimer teszthez viszonyítva vizsgáltuk. A Bland-Altman analízis szerint a STA[®]-Liatest[®] D-Di és az INNOVANCE[®] D-Dimer próbák átlagos eltérése 0,43, a szórás 1,33, az átlagtól való maximum eltérés 11,64 volt. Az INNOVANCE[®] D-Dimer és a Dia-D-DIMER tesztek összehasonlításánál a próbák átlagos eltérése 0,47, a szórás 1,92, az átlagtól való maximum eltérés pedig 13,5 volt. A tesztek regressziós analízise során az R² értékek az INNOVANCE[®] D-Dimer és a STA[®]-Liatest[®] D-Di esetében R²=0,8973, míg az INNOVANCE[®] D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztekénél R²=0,7357.

A három különböző D-dimer teszttel mért koncentráció eredményeket pozitív, illetve negatív D-dimer eredményű csoportokba soroltuk. Kétnégyzet statisztikai elemzéssel vizsgálva a csoportokat, a STA[®]-Liatest[®] D-Di teszt 0,3 és 1 µg/ml FEU között változtatott küszöbértékei mellett nem volt szignifikáns különbség az INNOVANCE[®] D-Dimer teszthez képest (p>0,05). A Dia-D-DIMER teszt esetében 0,2-0,3 µg/ml FEU küszöbértékeknél szignifikáns volt a különbség a két próba között (p<0,05), 0,4 µg/ml FEU -nál határeset (p=0,048), és 0,5-1 µg/ml FEU értékeknél, egyértelműen nem volt különbség a tesztek között.

Meghatároztuk a Dia-D-DIMER és a STA[®]-Liatest[®] D-Di tesztek specifitását és szenzitivitását értékeit a különböző küszöbértékeknél, az INNOVANCE[®] D-Dimer teszt értékeit tekintve referens adatnak. A STA[®]-Liatest[®] D-Di szenzitivitási értékei 0,2 és 1 µg/ml FEU közötti küszöbértékek esetében 82,7-100% között mozogtak, míg a Dia D-Dimer tesztre számolva 92,3 és 100% közöttiek az értékek. A próbák specifitása az előbbi leolvasást követve, 50 és 96,3%, illetve 35,2 és 87% között változik. Ezen adatok alapján megszerkesztettük a két teszt ROC görbéjét. A görbe alatti terület (AUC) jellemzi a teszt hatékonyságát, amelynek értéke a STA[®]-Liatest[®] D-Di tesztnél 0,9804, míg a Dia-D-DIMER tesztnél ez az érték: 0,9707.

A tesztek jellemző legmagasabb osztályozási pontosság (accuracy) (0,962, illetve 0,918) és Youden index (0,925, illetve 0,804) értékek alapján megbecsülhető az alkalmazható optimális küszöbérték, mely a STA[®]-Liatest[®] D-Di tesztnél 0,5-0,6, míg a Dia-D-DIMER tesztnél a 0,7 µg/ml FEU koncentráció értéket jelentett.

Kutyáktól származó minták D-dimer koncentrációjának mérése

A vizsgálatba bevont 20 klinikailag egészséges és 50 valamilyen daganatos megbetegedésben szenvedő állat vérplazma mintáit a Dia-D-DIMER diagnosztikai teszttel mértük le.

A benignus daganattal rendelkező kutyák csoportjának D-dimer értékei nem tértek el szignifikánsan a kontroll csoporttól (medián=0,34 µg/ml FEU; p=0,1310). Ugyanakkor a malignus csoport koncentráció értékei magasabbak voltak, és jelentős, szignifikáns különbséget mutattak a kontroll csoporthoz képest (medián=0,68 µg/ml FEU; p=0,0002).

Az áttétes daganatban szenvedő kutyák mintáiban a D-dimer koncentráció középértéke 1,01 µg/ml FEU volt, ami a malignus tumor csoport értékeinél is magasabb. A kontroll állatokhoz képest ez a csoport szignifikáns különbséget mutatott (p=0,0016).

A mintákat a szövettani vizsgálat alapján, a malignitás foka (grade) és a tumor stádiuma (stage) szerint is besoroltuk. A malignitás foka szerint az I. csoport medián értéke 0,40 µg/ml FEU volt, míg a II-III. csoportoknál magasabb középértéket kaptunk (0,94 µg/ml FEU). Hasonló következtetésre jutottunk a tumor stádiumok vizsgálata során, ugyanis a magasabb stádiumba (IV-V.) tartozó daganatos kutyák D-dimer koncentráció középértéke is jóval magasabbnak bizonyult (1,50 µg/ml FEU), mint az I-II-III. stádiumú csoportok értéke (0,44 µg/ml FEU).

A daganatos csoportokat a daganattípusok szerint is vizsgáltuk. A kontroll csoporthoz viszonyítva a legmagasabb D-dimer középértéket a malignus tumorokhoz tartozó lymphomával diagnosztizált ebek csoportjánál kaptunk (1,72 µg/ml FEU). Vizsgálataink során a carcinomában szenvedő állatok csoportjánál is jelentősen magas 0,83 µg/ml FEU középértéket kaptunk. A lipoma, insulinoma betegcsoportoknál a kontrollhoz hasonlóan alacsony középértéket tapasztaltunk, bár ezekben a csoportokban a mintaszám is alacsony volt. A Mann-Whitney statisztikai próbával vizsgálva, a mastocytoma csoport (p=0,1024) szignifikánsan nem különbözött a kontroll csoporttól. A lymphoma (p=0,0114), sarcoma (p=0,0005), carcinoma (p=0,0022) csoportok ellenben szignifikáns különbséget mutattak.

Az egészséges kutyák mintái alapján felállítottuk a kutya vérplazma minták vizsgálata során alkalmazható referencia tartományt (0,06-0,69 µg/ml FEU). A küszöbérték alapján pozitív/negatív D-dimer eredményű csoportokat hoztunk létre.

Változtatott küszöbértékek mellett meghatároztuk a Dia-D-DIMER teszt daganatokra vonatkoztatott szenzitivitás, specificitás, valamint pozitív, illetve negatív prediktív értékeit (PPV és NPV). Eredményeink szerint a 0,3-0,6 µg/ml FEU-ig terjedő küszöbérték mellett, a szenzitivitás 33 és 51%, míg a specificitás 85 és 100% között mozgott.

Az általunk meghatározott 0,69 µg/ml FEU küszöbérték alkalmazásával 33%-os szenzitivitást mellett, 100%-os specificitást értünk el. A PPV 100%, míg a NPV 29% a daganatos minták esetében. Következésképpen a Dia-D-DIMER teszt esetében a 0,69 µg/ml FEU küszöbérték alatti mintákat tekintettük negatív D-dimer értékűnek malignancia szempontjából, míg e fölött pozitívnak ítéltük a vizsgálat eredményét.

4. Megbeszélés

Az előállított ellenanyag tulajdonságai

Az előállított új, 2B9 monoklonális ellenanyag megfelel az immunturbidimetriás D-dimer próba működési elve alapján felállított feltételeknek az alábbiak szerint.

A keresztreakciók vizsgálatának jelentősége

A keresztreakciók vizsgálatának eredménye alapján kijelenthetjük, hogy a 2B9 ellenanyag megfelelő specificitással ismeri fel a D-dimer antigént, nem reagál a fibrinogénnel, mely kiemelkedően fontos jellemzője egy D-dimer diagnosztikai próbában alkalmazható ellenanyagnak. Egy, a D-dimer harmonizációjával foglalkozó közleményben található ajánlás szerint, a D-dimer teszteknek nem kellene fibrinogénnel vagy fibrinogén degradációs termékekkel reagálni, sem olyan fibrin és fibrinogén fragmentumokkal, amelyek – a plazminon kívül – más enzimek által kiváltott proteolízis során keletkeztek. Ez az előnyös tulajdonsága teszi lehetővé, hogy a fibrinogéntartalmú citrátos plazma, vagy akár teljes vérminták mérésére is alkalmas lehessen.

A keresztreakció vizsgálat további pozitív eredményének tekintettük, hogy a 2B9 ellenanyag a nemzetközileg is elismert ellenanyaggyártó cég (HyTest Ltd.), anti-D-dimer monoklonális ellenanyagához, mint referens ellenanyaghoz hasonló tulajdonságokat mutatott a keresztreakciók tekintetében.

Az epitóp térképezés értékelése

Az epitóp analízis alapján elmondhatjuk, hogy a 2B9 ellenanyag szimmetrikusan elhelyezkedő epitópokat ismer fel a D-dimer felszínén, amelyek egymástól relatív távol helyezkednek el, ezáltal pozíciójuk szterikususan lehetővé teszi és megkönnyíti az ellenanyaggal borított latex mikroszemcsék agglutinációját.

A kereskedelmi forgalomban kapható anti-D-dimer monoklonális ellenanyagok a XIIIa faktor által keresztkötött fibrin fragmentum D-doménjének felszínén lévő epitópokat ismerik fel. Ezen monoklonális ellenanyagok mindegyike más és más specificitással rendelkezik.

Az első szabadalmaztatott anti-D-dimer monoklonális ellenanyagnak (DD-3B6/22), illetve egy B4 jelölésű ellenanyagnak az epitóp szekvenciáját meghatározták, és publikálták. Ugyanakkor az elmúlt évek során a kutatók számos D-dimer-specifikus ellenanyagot állítottak elő, de ezek epitóp meghatározása a legjobb tudomásunk szerint, sajnálatos módon a szakirodalomban nem található meg. Az általunk elvégzett epitóp analízis szerint a 2B9 monoklonális ellenanyag eltérő szekvenciákat ismer fel a D-dimer felszínén, mint más, a szakirodalomban fellelhető D-dimer specifikus ellenanyagok.

Az előállított ellenanyag gyakorlati alkalmazása

A jelen értekezésben bemutatott 2B9 D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával a magyarországi tulajdonú Diagon Kft. által egy *in vitro* diagnosztikai (IVD) immunturbidimetriás D-dimer teszt – nevezetesen Dia-D-DIMER teszt – került kifejlesztésre. A termék klinikai teljesítményértékelésen átesett, európai megfeleléség (CE)-jellel ellátott, jelenleg is kereskedelmi forgalomban van.

A Dia-D-DIMER teszt humán vonatkozású eredményeinek értékelése

A 2B9 D-dimer specifikus monoklonális ellenanyagra épülő kereskedelmi teszt klinikai teljesítményértékelése sikerrel zárult, ezen kívül további, a teszt teljesítményének jellemzésére irányuló vizsgálatokat végeztünk humán minták bevonásával.

Munkánk során a humán vérplazma minták vizsgálatokor célunk az volt, hogy a Dia-D-DIMER tesztet és két másik, forgalomban lévő D-dimer tesztet összehasonlítsunk. Egy tesztet közülük referensnek jelöltünk ki, és ehhez képest jellemeztük a többi tesztet.

A tesztek korrelációjának vizsgálatára Bland-Altman analízist végeztük, melynél a Dia-D-DIMER és a STA®Liatest® D-Di tesztet is a referens teszthez viszonyítottuk. A tesztek különbségének, illetve átlagának értékeire illesztett egyenes meredeksége a STA®Liatest® D-Di és a referens teszt között kisebb értéket adott, mint a Dia-D-DIMER teszténél, következésképpen ennél az előbbi tesztpárnál a magasabb D-dimer koncentráció értékek esetén kisebb eltérést láttunk a két teszt között.

Ugyancsak ennek a két tesztpárnak az eredményeit hasonlítottuk össze lineáris regressziós analízist használva. A tesztek illeszkedését jellemző R^2 érték a STA®Liatest® D-Di párnál magasabb értéket ($R^2=0,8973$) adott, mint a Dia-D-DIMER teszt és a referens teszt esetében ($R^2=0,7357$), mely valamivel jobb korrelációt tükröz.

A próbák közötti különbségeket számos tényező okozhatja. A tesztek összehangolására felhasználói szinten ellenanyag, vagy konstrukció-változtatás szintjén természetesen már nincs lehetőség. A küszöbérték változtatásával lehetséges viszont a próbák pozitív-negatív eredményeinek finomhangolása. Az adatok egyértelműen jelzik, hogy a küszöbérték változtatásával jelentősen változnak a szenzitivitás és specificitás értékek is. Kisebb küszöbértéket választva nő az érzékenység, mivel a negatív eredmények száma csökken, ellenben a hamis pozitívaké nőhet. Ezzel ellentétesen, ha a küszöbértéket növeljük, nagyobb specificitást érünk el, több hamis negatív, és kevesebb hamis pozitív esetet eredményez.

Kísérletet téve egy optimális küszöbérték megállapítására, a STA®Liatest® D-Di teszténél a 0,5-0,6 µg/ml FEU koncentráció értékek, míg a Dia-D-DIMER teszténél a 0,7 µg/ml FEU érték az, melyek a legjobban harmonizálnak az INNOVANCE® D-dimer esetében használt 0,5 µg/ml FEU küszöbértékkel. Eredményeink alátámasztják a szakirodalomban is fellelhető ajánlásokat, melyek szerint bár általában 0,5 µg/ml FEU az „univerzális” D-dimer küszöbérték, mégis attól eltérő érték akár alkalmasabb döntési határértéknek bizonyulhat.

A Dia-D-DIMER teszt kutyáktól származó mintákon való alkalmazása

A Dia-D-DIMER tesztet alapvetően humán vérplazma minták D-dimer koncentrációjának mérésére fejlesztettük. Szakirodalmi eredményekre támaszkodva – miszerint a humán D-dimer próbák alkalmassá tehetők állatok mintáinak vizsgálatára is – megkíséreltük kutyáktól származó vérplazma minták D-Dimer szintjét is meghatározni. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a 2B9 ellenanyagra épülő Dia-D-DIMER teszt is alkalmas kutya vérplazma minták D-dimer koncentrációjának mérésére.

A D-dimer és tumorok összefüggései kutyákban

Eredményeink azt mutatják, hogy a daganatos kutyák csoportjában mért D-dimer koncentráció szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Ezek az eredmények összhangban vannak számos más, szakirodalomban fellelhető, főleg emberektől származó minták vizsgálati eredményeivel. Sajnos a kutyákkal kapcsolatban kevesebb ilyen közlemény található.

A daganatokat kiindulási szövettípus alapján csoportosítva azt találtuk, hogy a rosszindulatú lymphoma, sarcoma, carcinoma daganatokkal terhelt ebek csoportjában szignifikánsan magasabb D-dimer értékeket mértünk a kontroll csoporthoz képest. Ugyanakkor, az ugyancsak rosszindulatú mastocytomától szenvedő kutyák csoportjában nem találtunk szignifikáns eltérést.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az áttét megjelenése, illetve a daganatok malignitása is megmutatkozik a D-dimer értékekben. Az egészséges kutyák csoportjához viszonyítva a malignus, illetve az áttétes daganatban szenvedő kutyák vérplazma mintáinak vizsgálata során szignifikánsan magasabb D-dimer értékeket kaptunk. Ugyanakkor a benignus elváltozásokkal diagnosztizált ebek esetében, nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Mindezek az eredmények is alátámasztják a szakirodalomban talált adatokat.

Napjainkban számos tanulmányban számolnak be arról, hogy a vérplazma D-dimer koncentrációja és a daganatok progressziója (malignitási foka és stádiuma) között korreláció áll fenn, amit eredményeink is alátámasztottak. A magas malignitási fokú, valamint az előrehaladott stádiumú beteg kutyák esetében mi is emelkedett D-dimer koncentráció értékeket mértünk.

Az állatorvosi szakirodalomban a daganatos kutyák D-dimer mérésével kapcsolatban a specificitás és a szenzitivitás vonatkozásában sajnos nem találtunk közleményeket. Ugyanakkor a mi vizsgálataink során egy meghatározott küszöbérték (0,69 µg/ml FEU) mellett 33%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást értünk el, míg a PPV ugyancsak 100% volt. A magas specificitás miatt a Dia-D-DIMER teszttel a negatív eredményt mutató kutyák 100%-a valóban klinikailag egészséges volt. Ugyanakkor a teszt alacsony szenzitivitása miatt a daganattal diagnosztizált kutyáknál kisebb számban kapunk pozitív eredményt.

További vizsgálatok indokoltak annak eldöntésére, hogy a kutyák és más állatok D-dimer koncentráció mérésének milyen kiegészítő diagnosztikai jelentősége lehet, különös tekintettel az állatokat sújtó neoplasiák felderítésében és a betegség előrehaladásának és a kezelés eredményességének monitorozásában.

5. Új tudományos eredmények

1, Előállítottunk és jellemeztünk egy, a D-dimert specifikusan felismerő monoklonális ellenanyagot (2B9), amely a D-dimer felszínén egy új, eddig a szakirodalomban nem közölt térbeli epitópot ismer fel.

2, Azonosítottuk a D-domén B-láncán a 94 IQPDSS és a 140 GNVANTNT aminosavakat, valamint a C-láncon a 23 LQEIYNSNNQ és a 93 VYCEID aminosav szekvencia szakaszokat.

3, Az előállított 2B9 ellenanyagot egy hazai fejlesztésű, új, immunturbidimetriás D-dimer diagnosztikai próbába, a Dia-D-DIMER tesztbe építettük, amely CE minősítéssel kereskedelmi forgalomba is került.

4, A Dia-D-DIMER teszt alkalmas az állatorvosi gyakorlatban is a kutyák thrombotikus folyamatokkal és egyes tumorokkal járó megbetegedéseinek vizsgálatára, illetve fontos szerepe lehet a daganatok esetleges klinikai progressziójának nyomonkövetésében is.

6. A doktori kutatás eredményeinek közzései

A témában megjelent tudományos publikációk

TÖRÖK-NAGY, B., ANTAL, J. & DÉNES, B. 2019. Generation and characterization of D-dimer specific monoclonal antibodies for use in latex agglutination test. *PLoS One*, 14, e0212104. IF (2018-2019): 2.776

TÖRÖK-NAGY, B., VAJDA, Z. & VÁSÁRHELYI, B. 2019. Kereskedelmi forgalomban használt D-dimer-tesztek vágóértékének harmonizálása. *Orvosi Hetilap*, 160, 585-592. IF (2018): 0.564

TÖRÖK-NAGY, B., VAJDOVICH, P., BALOGH, L., THURÓCZY, J. & DÉNES, B. 2020. Evaluation of a human D-dimer test for use in plasma samples of dogs with neoplasia. *Acta Veterinaria Hungarica* [közlésre elfogadva] IF (2018): 1.059

A témában előadott konferencia prezentációk

NAGY, B., KERN, A., ANTAL, J., VAJDA, Z. & DÉNES, B.: D-dimer specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása és jellemzése. Akadémiai beszámolók – előadás, 2013.

NAGY, B., KUIK, Á., VAJDOVICH, P. & DÉNES, B.: D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag alkalmazása immunturbidimetrián alapuló diagnosztikai tesztben. Akadémiai beszámolók – előadás, 2014.

NAGY, B., KUIK, Á., SZÉN, L., VAJDA, Z. & DÉNES, B.: Tapasztalatok az új Dia-D-DIMER teszttel. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 57. Nagygyűlése, Nyíregyháza, 2014.

NAGY, B., KUIK, Á., SZÉN, L., VAJDA, Z. & DÉNES, B.: Saját előállítású D-Dimer diagnosztikai teszt jellemzése. Akadémiai beszámolók – előadás, 2015.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Dénes Bélának és asszisztensének, Gáspárné Stoll Annamáriának szeretném megköszönni a sok segítséget, támogatást, az ellenanyag előállítással kapcsolatos gyakorlati tudás átadását.

Külön köszönet illeti Dr. Vajda Zoltánt, aki szakmailag és emberileg is végig támogatott, biztatott a munkám során, illetve a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségért is nagyon hálás vagyok.

Hálás vagyok és szeretném megköszönni Dr. Antal Józsefnek a folyamatos szakmai támogatását és a lektori munkáját.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Diagon Kft. vezetőjének Dr. Kern Józsefnek, aki elindított ezen az úton és biztosította a munkához szükséges hátteret. Ezúton szeretném megköszönni kollégáimnak, akik nem csak támogattak, de részt vettek és segítettek is munkámat: elsősorban Dr. Kuik Árpádnak és Kadarkuti Péternek, továbbá Bányász Borbálának, Kurucz né Dr. Kern Anitának, Jancsó Anitának, Kiss Erikának, Kovács Ágnesnek, Bene Alexandrának, Nemes Lillának, Buhaláné Sándor Erzsébetnek, Szilágyi Gábornénak (Icának) és Császár Gergőnek.

Köszönöm továbbá a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság korábbi vezetőjének Dr. Tekes Lajosnak, valamint jelenlegi igazgatójának Dr. Abonyi Tamásnak, hogy biztosították a doktori munkámhoz elengedhetetlenül szükséges monoklonális ellenanyag előállításának szakmai és laboratóriumi hátterét.

Köszönettel tartozom Dr. Vásárhelyi Barnának, aki lehetőséget adott, hogy a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében a kutatói munka gyakorlati méréseit elvégezhessem, és hálás vagyok szakmai támogatásáért.

A mintagyűjtésben nyújtott segítségért és szakmai támogatásért köszönettel tartozom Dr. Vajdovich Péternek és Dr. Balogh Lajosnak.

Minden egyéb segítséget és támogatást a Családomnak, elsősorban Édesanyámnak és a Férjemnek, illetve a Barátaimnak köszönök meg.