

Miskolci Egyetem

Anyag- és Vegyészmérnöki Kar

Kémiai Intézet



SZAKDOLGOZAT

Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél

2024.

Miskolc

Miskolci Egyetem
Anyag- és Vegyészmérnöki Kar
Kémiai Intézet

**Rheumatoid Arthritis betegség szérum mintából történő
kimutatása UPLC segítségével**
SZAKDOLGOZAT

Készítette: Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél
Konzulens(ek): Dr. Váradi Csaba, Dojcsák Dalma
2024.

Miskolci Egyetem
Anyag- és Vegyészmérnöki Kar
Kémiai Intézet

Szakdolgozat feladatkiírás

Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél-Vegyészmérnök BSc
nappali tagozatos hallgató részére

Dolgozat címe: Rheumatoid Arthritis betegség szérum
mintából történő kimutatása UPLC segítségével

Elvégzendő feladatok:

- Foglalja össze az autoimmunbetegségek diagnosztizálásának nehézségeit, és a lehetséges megoldásokat.
- Mutassa be a vizsgálat folyamatát, jellemzőit.
- Vizsgálja meg a glikozilációs mintázatait a Rheumatoid-Arthritis betegségben érintettek és egészséges emberek esetében.
-

A szakdolgozat leadási határideje: 2024.12.02

A szakdolgozat terjedelme: min. 40, max. 50 A/4 oldal

Belső konzulens(ek): Dr. Váradi Csaba, Egyetemi Docens

Dojcsák Dalma PhD hallgató, Miskolci Egyetem, Kémiai Intézet

Miskolc, 2024.04.12

Dr. Viskolcz Béla
intézetigazgató

Igazolás

Alulírott *Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél* (Neptun kód: HXP88T született: Miskolc, 2001.08.05.) igazolom, és büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a leadott szakdolgozat a saját munkám.

Miskolc, 2024.12.02

Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél, hallgató

Az igazolást átvettem.

Miskolc, 2024.12.02

Dr. Viskolcz Béla, intézetigazgató

Alulírott *Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél* (Neptun kód: HXP88T született: Miskolc, 2001.08.05.) ezúton nyilatkozom, hogy a dolgozat nem tartalmaz a tudományos etikát, valamint vállalatok és intézmények érdekeit sértő bizalmas információkat. Dolgozatom az Egyetemi Könyvtár részére mind elektronikus-, mind nyomtatott formában átadható, és annak tartalma a Szerző nevének és a Dolgozat címének feltüntetésével nyilvános tárhelyre feltölthető.

Miskolc, 2024.12.02

Strázsa-Kriskó Krisztina Abigél, hallgató

Az igazolást átvettem.

Miskolc, 2024.12.02

Dr. Viskolcz Béla, intézetigazgató

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az inspiráló és végtelenül kedves konzulensemnek Dr. Váradi Csabának, aki hatalmas türelemmel felügyelte a munkámat és minden felmerülő problémát segített megoldani. Köszönöm Dojcsák Dalma PhD hallgató segítségét is, aki mindig rugalmasan osztotta be a kutatásra szánt időt, és sok hasznos tanáccsal látott el. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és a férjemnek is az odaadó támogatását, mellyel megkönnyítették a dolgozat elkészültét.

Tartalom

Absztrakt.....	1
Bevezetés.....	1
1. Irodalmi háttér	2
1.1 Proteomika.....	2
1.2 Proteinek	2
1.2.1 Fehérjék csoportosítása	3
1.2.2 A fehérjék felépítése.....	4
1.2.3 A fehérjék szerkezetének tulajdonságai.....	4
1.2.3.1 Elsődleges szerkezet.....	4
1.2.3.2 Másodlagos szerkezet	5
1.2.3.3 Harmadlagos szerkezet	6
1.2.3.4 Negyedlegess szerkezet	6
1.2.4. Fehérjeszintézis	7
1.2.4.1 Transzkripció.....	7
1.2.4.2 Transzláció.....	7
1.3 Oligoszacharidok és szerepük a szervezetben	8
1.3.1 Természetes és szintetikus oligoszacharidok	9
1.4 Glikokonjugátumok	10
1.5 Glikoproteinek és szintetizálódásuk	11
1.5.1 N-glikoziláció	11
1.5.2 O-glikoziláció	11
1.4 Glikolipid szintézis.....	12
1.5 Glikoziláció és poszttranszlációs modifikáció	12
1.6 N-glikoziláció szerepei a gyulladásos és autoimmun betegségekben .	13
1.6.1 Gyakori autoimmunbetegségek jellemzése	13
1.6.2 Rheumatoid Arthritis betegség tulajdonságai	14
1.6.2.1 Érintettség és hajlam	15
1.6.2.2 Kialakulás és a tünetei	16
1.6.2.3 A betegség diagnosztizálása	16
1.7 Glikozilációs mintázat megváltozása autoimmunbetegségekben	17
1.8 A kromatográfia bemutatása	18
1.8.1 Kromatográfia típusok	18
1.8.2 Kromatográfiás módszerek csoportosítása	20

1.8.3 A HPLC története, felhasználási területei	20
1.8.4 A HPLC működése	21
1.8.5 HPLC szerkezeti egységei és azok feladatai.....	22
1.8.6 A mérési eredmények kiértékelésének módja	24
1.9 Kiértékeléshez használt teszt típusok, módszerek	26
1.9.1 Nem parametrikus tesztek.....	26
1.9.1.1 Mann-Whitney teszt	27
1.9.1.2 Kruskal-Wallis teszt	28
1.9.1.3 ROC görbe.....	28
1.9.1.3.1 A ROC görbe összetétele.....	29
1.9.1.3.2 A ROC görbe működése.....	29
1.9.1.3.3 Tökéletes és random modellek	29
1.9.1.3.4 Az AUC (Area Under the Curve) jellemzése	30
1.9.1.3.5 A görbe alakjainak jellemzése	31
1.9.1.3.6 ROC-görbe felhasználási területei	31
2. Kísérleti leírás	32
2.1 Felhasznált szoftverek	35
2.2 Elemzés és kiértékelés.....	35
2.2.1 Mann-Whitney teszt.....	36
2.2.2 Kruskal-Wallis teszt	39
2.2.3 Főkomponens analízis	41
2.3 Összegzés.....	43
Felhasznált Irodalom.....	44

Absztrakt

A kromatográfiás módszerek széleskörű elterjedésével, egyre könnyebbé vált a betegségek azonosítása és ezzel együtt a megelőzése is. A rheumatoid arthritisben szenvedő emberek vizelet, vagy vérmintáit már az 1950-es évektől vizsgálják a kutatók különféle összefüggéseket keresve, melyekkel sikeresen azonosíthatóvá válnak a különféle betegségek.[1] Ebben a mérésben rheumatoid arthritisben szenvedő betegek szérum mintáit, valamint egészséges emberek (kontroll) mintáit is vizsgáltunk, hogy összefüggéseket kereshessünk a mérés után láthatóvá vált cukormintákban. A cukorminták elemzésével és az összefüggések vizsgálatával ugyanis azonosíthatóvá válik a rheumatoid arthritis betegség. A betegségek ily módon történő megismerése értékes adatokkal tudja támogatni a további kutatásokat.

Minden betegségnek más a cukormintája, így, ha már egy mintát megismertünk az megkönnyíti a későbbi betegek azonosítását.[2] Ez megkönnyíti és gyorsabbá is teszi a betegek, vagy a potenciális betegek beazonosítását. Bizonyos betegségek esetén a beteg sokáig tünetmentes lehet, azonban a vérben már ekkor is megtalálható a betegségre jellemző cukormintázat. A rheumatoid arthritis esetében a vérben már a betegség tüneteinek megjelenése előtti években is jelen lehet az autoantitest, például az RF (rheumatoid faktor), vagy az anti-CCP (anticiklus citrullinált peptid antitest).[3]

Bevezetés

A WHO adatai szerint 2019-ben körülbelül 18 millió ember szenvedett világszerte rheumatoid arthritis betegségben, és az érintett emberek közül körülbelül 70%-a volt nő.[4] A rheumatoid arthritis megbetegedések előfordulása általában az iparosodott országokban magasabb. Ezeken a területeken főként a környezeti tényezők azok, melyek gyakoribbá teszik a rheumatoid arthritis megjelenését.

Sajnos napjainkban a reuma specifikus kimutatásokra egyelőre nincs kidolgozva megfelelő diagnosztikai módszer, így egyre nagyobb és nagyobb teret kaphatnak a biomarker kutatások. A biomarkerek ugyanis specifikus szervezetben megtalálható molekula, mely egy adott betegség hatására specifikusan megváltozik. Ilyen változás például a fehérjék glikozilációs mintázatának változása.[5]

1. Irodalmi háttér

1.1 Proteomika

A proteomika átfogóan tanulmányozza a fehérjék szerkezetét, vagy funkcióját. De a fehérjék szélesebb körű vizsgálatával számos biológiai folyamatot is megismerhetünk, legyen az fehérjék közötti kommunikáció, vagy enzimműködés. Ez az ismeret hasznos a biomarker azonosítás területén, vagy a fehérjemódosulások vizsgálatakor is.

A proteomikai vizsgálatokhoz gyakran használt eszköz a tömegspektroszkóp, mely azonosítani képes a fehérjéket, illetve azok mennyiségét is elemzi, illetve a két-dimenziós gélelektroforézis, mely segítségével elválaszthatóak a fehérjék a vizsgált mintában.

1.2 Proteinek

A proteinek, más néven fehérjék, az élő szervezetek alapvető építőkövei, melyek aminosavakból felépülő makromolekulák és nélkülözhetetlenek az élethez. Számos alakban különféle folyamatban vesznek részt. Például enzimekként gyorsítják a kémiai reakciókat, hormonként szabályozzák a sejtműködést, szerkezeti elemeket alkotnak (például: kollagén), és antitestek formájában védelmet nyújtanak.

1.2.1 Fehérjék csoportosítása

A fehérjék csoportosítása számos szempont szerint lehetséges, mivel többféle alakban és típusban lehetnek. Csoportosításuk történhet az alábbiak szerint:

- **Funkció**

- **Enzimek:** katalizálják a kémiai reakciókat (például a nyálban található amiláz enzim)
- **Strukturális fehérjék:** a sejtek és szövetek szerkezetét adják (például kollagén)
- **Szállító fehérjék:** molekulákat szállítanak (például oxigént szállító hemoglobin)
- **Jelátvivő fehérjék:** hormonok és receptorok (például inzulin)
- **Védekező fehérjék:** Az immunrendszer részei (például: antitestek)

- **Szerkezet**

- **Fibrilláris fehérjék:** hosszú, szálas, mechanikai ellenállást biztosító szerkezet (például. kollagén)
- **Globuláris fehérjék:** gömb alak (például albumin)

- **Kémiai összetétel**

- **Egyszerű fehérjék:** csak aminosavak építik fel
- **Összetett fehérjék:** nem csak fehérje részeket, hanem prosztetikus csoportokat is tartalmaznak (például glikoproteinek)

- **Oldhatóság**

- **Vízben oldódó fehérjék:** plazmafehérjék (például albumin)
- **Vízben nem oldódó fehérjék:** sejtvázf fehérjék (például keratin)

- **Forrás**

- **Állati** fehérjék (például kollagén, albumin)
- **Növényi** fehérjék (például gliadin, legumin)
- **Mikrobiális** fehérjék (például toxinok)

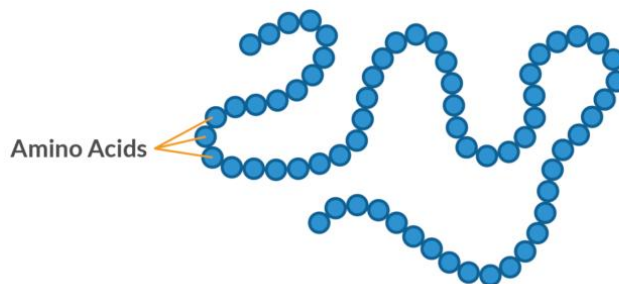
1.2.2 A fehérjék felépítése

Az aminosavak a fehérjék építőkövei, és 20 alapvető aminosav létezik, amelyek különböző oldalláncokkal rendelkeznek. Az aminosavakat az oldalláncuk típusa és tulajdonsága határozza meg. Például lehetnek hidrofób (víztaszító) vagy hidrofil (vízoldékony) oldalláncok, savas vagy bázikus oldalláncok, aromás csoportok stb.

1.2.3 A fehérjék szerkezetének tulajdonságai

A fehérjék szerkezete négy szintből áll: elsődleges (aminosav-sorrend), másodlagos (α -hélix vagy β -lemez), harmadlagos (3D szerkezet), és negyedleges (több alegység kapcsolódása). A szerkezetük meghatározza funkciójukat, így már kisebb szerkezeti változások is jelentős hatással lehetnek a működésükre.

1.2.3.1 Elsődleges szerkezet

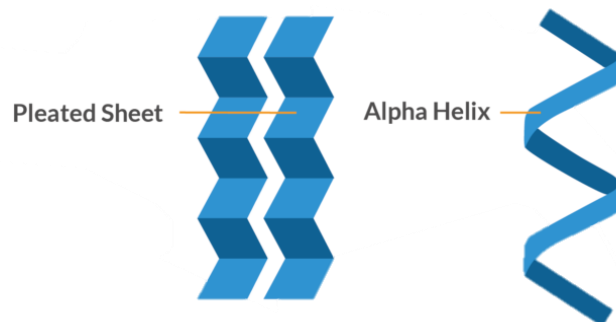


1. ábra Fehérjék elsődleges szerkezete[6]

A fehérjéket felépítő aminosavak sorrendje határozza meg a felépített fehérjék elsődleges szerkezetét. Az elsődleges szerkezet meghatározza a fehérje háromdimenziós alakját és funkcionalitását, a fehérje kémiai

tulajdonságait, illetve, hogy milyen másodlagos és harmadlagos szerkezeteket vehet fel a fehérje. Aminosavak egymás utáni sorrendje és azok közötti peptidkötések lehetővé teszik a fehérje egyedülálló vonásainak kialakulását. Az elsődleges szerkezet kódolja az információt a fehérje szintéziséhez, mivel a DNS-ben található gének aminosavainak sorrendjét határozzák meg.

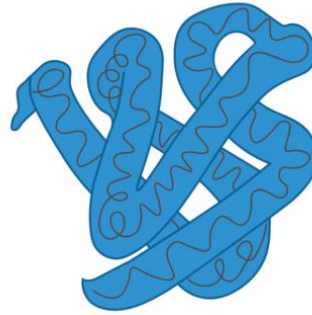
1.2.3.2 Másodlagos szerkezet



2. ábra Fehérjék másodlagos szerkezete[6]

A másodlagos szerkezetek, például a hélixek és béta-hajlítók, az aminosavak közötti hidrogénkötések révén alakulnak ki. A másodlagos struktúrák közé tartoznak a β -hajlítók és a α -hélixek. A β -hajlítokat peptidekötések szakítják meg és az aminosavak mellékláncainak orientációja hozza létre a hajlításokat. Az α -hélixek egy spirál alakú szerkezetet alkotnak, amelyet a peptidek közötti hidrogénkötések tartanak össze.

1.2.3.3 Harmadlagos szerkezet



3. ábra Fehérjék harmadlagos szerkezete[6]

A fehérjék harmadlagos szerkezetei az előző szerkezetek további rendeződéséből alakulnak ki. A hidrogénkötések, a diszulfid hidak és az elektrosztatikus kölcsönhatások aminosavak között hoznak létre olyan hajtogatásokat, amelyek meghatározzák a fehérje 3D alakját és stabilitását. Az α -hélixek és β -hajlítok egyesülhetnek és összetett, globuláris formákat hozhatnak létre.

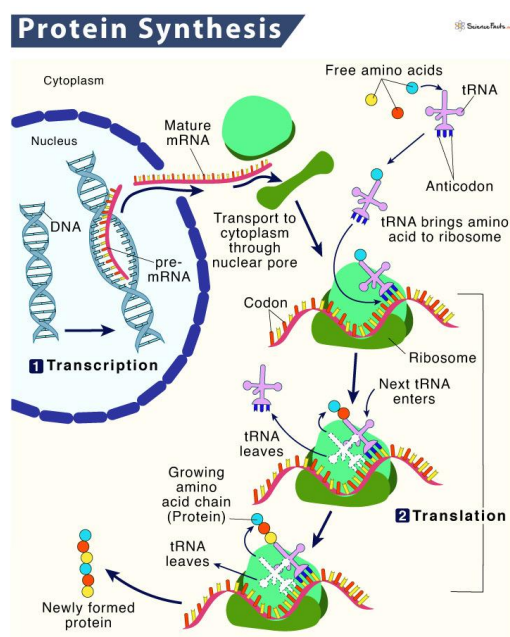
1.2.3.4 Negyedlegess szerkezet

A fehérjék negyedleges szerkezete több együtt működő, különálló polipeptidláncból épül fel és kapcsolódhatnak hidrogénkötéssel, ionos kötéssel, vagy Van der Waals-erővel. Az oxigén szállításáért felelős hemoglobin is ilyen fehérje. Két alfa és két béta lánc segítségével tudja feladatát ellátni.



4. ábra Fehérjék negyedleges szerkezete[6]

1.2.4. Fehérjeszintézis



5. ábra A fehérjeszintézis folyamata[7]

A fehérjeszintézis során állítják elő a sejtek a különféle fehérjéket a DNS-ben található genetikai információ alapján. Ennek a folyamatnak két fő szakasza a transzkripció és transzláció.

1.2.4.1 Transzkripció

Transzkripció vagy átírás alatt a sejtben a DNS-ből származó információ átírása zajlik egy messenger RNS (mRNS) molekulára. Lépései az alábbiak:

1. A DNS kettős spirál kinyílik, és az egyik szála lesz a minta a másoláshoz
2. Az RNS-polimeráz enzim leolvassa a DNS szekvenciát, és mRNS molekulát hoz létre, mely utasításokat tartalmaz a fehérje előállításához

1.2.4.2 Transzláció

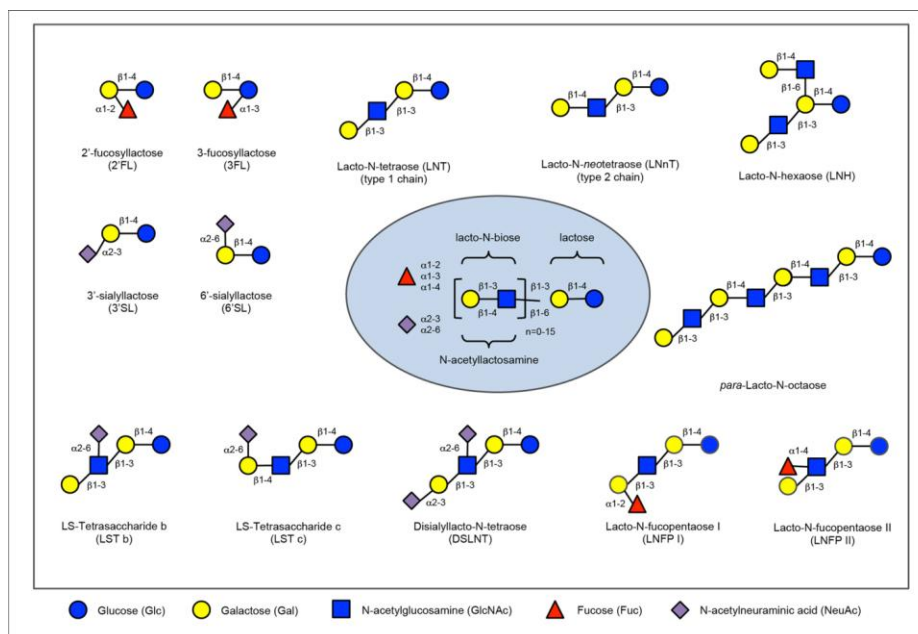
Transzláció vagy fordítás alatt a riboszómák létrehozzák a fehérjét a citoplazmában.

1. Az mRNS kilép a sejtmagból, majd riboszómához kapcsolódik

2. A transzfer RNS (tRNS) molekulák hozzák az aminosavakat a riboszómához. (Minden tRNS egy-egy specifikus aminosavat szállít, amely megfelel az mRNS-en lévő utasításnak, a kodonnak, mely egy három nukleotid bázisból álló kód.)
3. A riboszóma leolvassa az mRNS kodonjait, és hozzáilleszti a megfelelő aminosavat
4. Az aminosavak összekapcsolódnak, és kialakul a polipeptidlánc, amely végül a fehérje lesz
5. Az mRNS leolvasása befejeződik, a polipeptidlánc leválik, és felveszi harmadlagos szerkezetét, így megalkotva a funkcionális fehérjét

1.3 Oligoszacharidok és szerepük a szervezetben

Az oligoszacharidok a sejtek felszínén találhatóak. Glikoproteinekhez vagy glikolipidekhez kapcsolódó 3-10 monoszacharid egységből álló rövid szénhidrátláncok, amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a szervezet különféle biológiai folyamataiban. Az oligoszacharidok egyik legfontosabb szerepe az, hogy elősegítik a sejtek közötti kommunikációt. Lehetővé teszik, hogy a sejtek felismerjék egymást, valamint hozzájárulnak a sejt felszíni receptorokon keresztül közvetített jelek továbbításához is. Ennek különösen nagy jelentősége van az immunválaszokban és a sejtek közötti kölcsönhatásokban, például a fertőzések felismerésében és a gyulladásos válasz szabályozásában. A sejt felszíni glikokonjugátumok, amelyek oligoszacharidokat tartalmaznak, felismerhetik a kórokozókat és fertőzések esetén aktiválhatják az immunsejteket. Emellett bizonyos betegségek, például a rák, kialakulásában is szerepet játszanak, mivel a sejt felszíni oligoszacharidok megváltozott szerkezete befolyásolhatja a sejtek növekedését és differenciálódását. Fontos szerepük van továbbá a szövetek kialakulásában és regenerációjában, valamint a sejtadhézióban, mely során a sejtek egymáshoz, vagy az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódnak.[8]



6. ábra Emberi tej oligoszacharid összetétele[9]

A sejtfelszíni oligoszacharidok szerkezetileg nagyban eltérhetnek egymástól. Ez a szerkezeti változatosság lehetővé teszi számukra, hogy specifikus interakciókat alakítsanak ki különböző fehérjékkel, vírusokkal, baktériumokkal, és más sejtek felszínén található molekulákkal. A szerkezeti eltérések a monoszacharid egységek összekapcsolódási módjainak, valamint az ezekből kialakult szereteoizomerekből ered.

1.3.1 Természetes és szintetikus oligoszacharidok

Az oligoszacharidok természetes és szintetikus formájukban is fontosak a kutatás számára. A természetes oligoszacharidok-mivel közvetlenül biológiai rendszerekben találhatóak meg- ideálisak a valós környezetben történő vizsgálatokhoz, hiszen így azok szerkezete és funkciója teljes egészében érvényesülni tud. Ilyen például a HMOs, azaz a humán tej oligoszacharidja, mely az anyatejben található meg és az immunrendszer támogatásában vesz részt.

A szintetikusan előállított oligoszacharidok lehetővé teszik, a pontos kísérleti modellek létrehozását, kontrollált körülmények között zajló

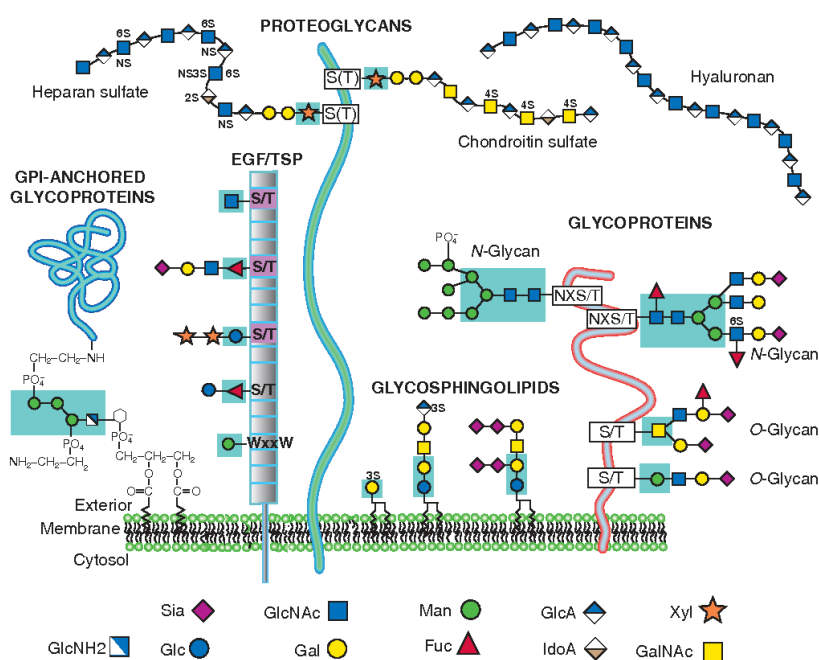
kísérletekhez, például vakcinák fejlesztéséhez, melyben az adott glikozilációs mintázat immunválaszt válthat ki.

1.4 Glikokonjugátumok

A glikokonjugátumok szénhidrátokat tartalmazó biomolekulák, melyek másik, nem cukor alapú molekulához kapcsolódnak. Típusai attól függnek, hogy milyen molekulával kapcsolódnak a szénhidrát részek. Fajtái közé sorolható a peptidoglikán, glikolipid, glikozid a lipopoliszacharid, valamint a glikoprotein.

Egyik típusa a poliszacharid láncokból álló, peptidkötéssel kapcsolódó peptidoglikán, mely a baktériumok sejtfalának egy összetevője.

- glikolipid: lipidhez, azaz zsírhoz kapcsolódnak
- glikozid: a cukormolekula másik vegyülettel kapcsolódik glikozidok kötéssel
- lipopoliszacharid: lipid és poliszacharid részből álló molekulák
- glikoprotein: fehérjékhez kapcsolódó szénhidrátláncok



7. ábra Sejtfelszíni glikánok[10]

1.5 Glikoproteinek és szintetizálódásuk

A glikoproteinek olyan fehérjék, melyekhez szénhidrát láncok, például oligoszacharidok kötődnek kovalensen. A glikoproteinek részt vesznek a sejtadhézióban, azaz a sejtek egymáshoz tapadásában, mely nélkülözhetetlen a szövetek kialakulásához és integritásához. A sejtfelszíni glikoproteinek pedig az immunrendszernek segítenek az idegen kórokozók felismerésében. Szintézisük a sejten belül több lépésben zajlik, és a fehérjeszintézis folyamatával szorosan összefügg. A szintézis fő helyszínei az endoplazmatikus retikulum (ER) és a Golgi-apparátus. A folyamat két fő része az N-glikoziláció, valamint az O-glikoziláció.

1.5.1 N-glikoziláció

Az N-glikoziláció egy enzimatisz folyamat, mely az endoplazmatikus retikulumban veszi kezdetét. Itt egy több monoszacharid egységből álló oligoszacharid kötődik a fehérje N-terminálisán található aszparagin aminosav oldalláncához. Ezt a kapcsolódást a dolikol lipid segíti elő oly módon, hogy az oligoszacharidok először ehhez kapcsolódnak, majd a dolikol foszfát segít átvinni az oligoszacharid láncot a fehérjére. Miután a fehérje elhagyja az endoplazmatikus retikulumot, a Golgi-apparátusban folytatódik a szénhidrát-láncok módosítása, ahol a cukormolekulák tovább épülnek, vagy módosulnak különböző enzimek hatására.

1.5.2 O-glikoziláció

Az O-glikoziláció az N-glikoziláció után történik és főleg a sejtfelszíni, vagy szekretált glikoproteinekre jellemző. A folyamat a Golgi-apparátusban megy végbe, ahol a fehérjék szerin, vagy treonin aminosavaihoz szénhidrátláncok kötődnek.

1.4 Glikolipid szintézis

Glikolipid szintézis a fehérjeszintézissel az endoplazmatikus retikulumban, a citoplazmában kezdődik riboszómák segítségével. Ezután a polipeptidlánc az endoplazmatikus retikulum lumenében kerül, ahol az N-glikoziláció első lépése történik, melyben az oligoszacharid prekursor az aszparaginhoz kapcsolódik.

Ezek után az ER-ből származó fehérjék a Golgi-apparátusba kerülnek, ahol további módosításon mennek keresztül a szénhidrátok. A fehérjékhez újabb cukormolekulák kapcsolódnak, így meghatározzák a glikoprotein végleges szerkezetét. Ekkor történik az O-glikoziláció is. A Golgi-apparátusban elkészült glikoproteinek a sejtmembránba kerülhetnek beépítésre, vagy a külvilágba szekretálódhatnak, ahol további biológiai folyamatokban vehetnek részt.

1.5 Glikoziláció és poszttranszlációs modifikáció

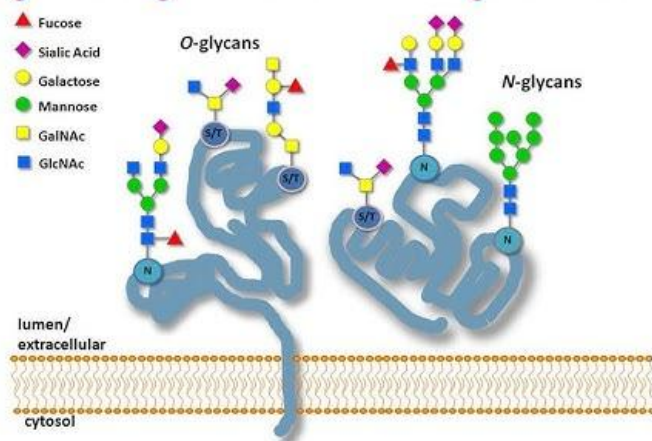
Poszttranszlációs modifikáció (PTM), mely az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi készülékben megy végbe. A folyamat során glikánok, szénhidrátok kötődnek a fehérjékhez, vagy lipidekhez. A glikoziláció attól függően, hogy melyik aminosavhoz kapcsolódik a cukormolekula, lehet N-, vagy O-kötésű.

A fehérjék transzlációja után történő kémiai változások, melyek a fehérjék működését, stabilitását finomítják. Ilyen például a glikoziláció, de a metiláció és a foszforiláció is egy poszttranszlációs folyamat. Ennek a folyamatnak köszönhetően a fehérjék képesek funkciójuk ellátására, képesek reagálni a környezeti ingerekre is, így nagy szerepük van az élő szervezetek pl eukarióták szabályozásában.

A glikoziláció jelentőségének könnyebb megértésére megvizsgálhatjuk az AB0 vércsoport rendszert. A vércsoportok közötti különbség a vörösvérsejtek felszínén lévő glikoproteinek glikánjai miatt van, ugyanis a különböző vércsoportok (A, B, AB és 0) eltérő cukormolekulákkal rendelkeznek.

Például a felszíni antigénekhez az A vércsoportban N-acetil-galaktózamin, míg a B vércsoportban galaktóz kapcsolódik. Ennek a glikozilációs mintázatnak köszönhetően a szervezet immunválasz nélkül tud számára megfelelő vért elfogadni.

Glycosylation explained



[11]

1.6 N-glikoziláció szerepei a gyulladásos és autoimmun betegségekben

Az N-glikoziláció a biológiai folyamatokban betöltött fontos szerepei révén az immunválaszok szabályozásában elengedhetetlen. Azonban ebben a szabályozásban olykor hibák alakulhatnak ki, melyek felelősek az autoimmun betegségek kialakulásában. A glikoziláció eltérései ugyanis befolyásolhatják az antitestek szerkezetét és működését, ami autoimmunitás kialakulását eredményezi.[12]

1.6.1 Gyakori autoimmunbetegségek jellemzése

A gyulladásos betegségek közül manapság jól ismert a Crohn-betegség a sclerosis multiplex, a lupus, cöliákia, illetve a rheumatoid arthritis. A Crohn betegség kialakulását az N-glikozilációs mintázat megváltozása

befolyásolhatja a genetikai hajlam és a környezeti hatások mellett. A citokinek és a kemokinek túlműködnek, így alakul ki a bélfal krónikus gyulladását okozó emésztőrendszeri betegséget.

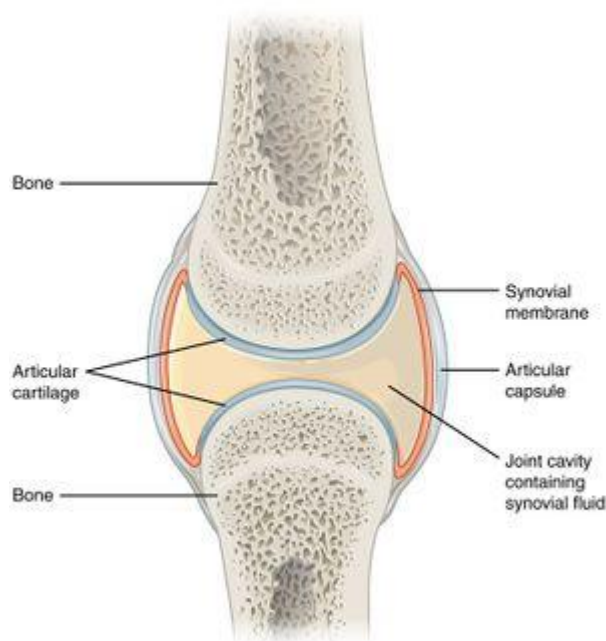
A sclerosis multiplex egy olyan autoimmun betegség, melyben az immunrendszer megtámadja a központi idegrendszer mielinhévelyét, így idegi károsodást okoz. A lupus erythematosus egy az autoantitestek működését érintő immunbetegség. Az autoantitestek a saját szöveteik ellen támadnak, így gyulladást, szövetkárosodást okoznak.

A cöliákia, vagy lisztérzékenység során a glutén autoimmunválaszt vált ki az érintett receptorok glikozilációs mintázatának megváltozása miatt.

A rheumatoid arthritis autoimmunbetegség során az immunrendszer az ízületeket támadja meg, így okozva ízületi károsodást. Az N-glikoziláció hibái az antitestek és az immunglobulinok (például IgG) glikánmintázatában okozhat eltérést, így befolyásolja azok funkcióit, mivel az IgG molekulák csökkent fukozilációja fokozza az immunsejtekhez történő kötődést az Fc receptorokon keresztül, ez pedig erős gyulladásos válaszban nyilvánul meg.[13]

1.6.2 Rheumatoid Arthritis betegség tulajdonságai

A rheumatoid arthritis egy krónikus autoimmun betegség, mely az ízületeket támadja meg, azonban szisztémás gyulladást is képes okozni, így a test más részeit, például a bőrt, vagy az ereket is képes megtámadni. Az autoimmun betegségek esetében a szervezet immunrendszere tévesen támad, és a saját szövetei ellen fordul. Rheumatoid arthritis esetében az ízületek belső bélése, azaz a synoviumot támadja az immunrendszer, így duzzadást és ízületi károsodást okozva.[14], [15]



8. ábra Ízület felépítése[14]

1.6.2.1 Érintettség és hajlam

A rheumatoid arthritis egy viszonylag gyakori autoimmun betegség, mely a felnőtt lakosság körülbelül 1%-át érinti világszerte, tehát napjainkban is több millió embernek kell együtt élnie ezzel a betegséggel. A betegség a nőket és a férfiakat egyaránt érintheti, azonban a rheumatoid arthritis megbetegedés jóval gyakoribb a nők esetében.[16] A nők ugyanis háromszor nagyobb valószínűséggel érintettek, mint a férfiak. Ez elsősorban a hormonális és genetikai tényezők különbsége miatt lehetséges. Ugyanis a nők szervezetében az ösztrogén hormon jóval nagyobb mennyiségben van jelen, illetve az androgén-melynek immunelnyomó tulajdonságai vannak- szintén hozzájárulhat az immunrendszer túlzott működéséhez, így növelve a betegségre való hajlamot. Bizonyos gének, például a HLA-DRB1 megosztott epitóp variációja szintén növelhetik a genetikai hajlamot a rheumatoid arthritisre. Ez a genetikai hajlam örökíthető, így a betegségre való fogékonyság továbbadható a következő generációknak. A megosztott epitóp egy specifikus aminosav-szekvencia, amely a HLA-DRB1 gén egyes alléljaiban

közös. Ez az aminosav-szekvencia a fehérje antigénkötő régiójának részét képezi és befolyásolja, hogy a HLA-molekulák milyen antigéneket ismernek fel és mutatnak be az immunrendszernek.[15]

1.6.2.2 Kialakulás és a tünetei

A korábban már említett genetikai jellemzők mellett a betegség kialakulását segíthetik az egyéb környezeti tényezők, mint például a dohányzás.

Az elsődleges tünetek az ízületekben jelentkeznek. A betegek ízületi fájdalmat és merevséget tapasztalnak először a kisebb ízületekben, például ujjak, csukló. Ezek a tünetek hosszabb inaktív időszakok után fokozódnak, és több óráig is eltarthatnak. További tünetek még a duzzadság és a melegség érzése, mely gyulladásra utal.

A betegség szisztémás jellege miatt az elsődleges tüneteket egyéb más tünetek is kísérhetik, például rossz közérzet vagy fáradtság, étvágytalanság. Illetve súlyosabb esetekben a betegség érintheti az ereket, vagy a szívet is, így egyéb szövődményeket, érrendszeri problémákat is okozhat. Kísérő tünetek lehetnek a bőr alatt jelentkező kemény csomószerű lerakódások is, illetve gyakori, hogy a betegség szimmetrikusan jelentkezik, tehát mindkét testfélén azonos ízületeket támad.

1.6.2.3 A betegség diagnosztizálása

Ebben a szakdolgozatban a betegek véréből készült szérum mintákból mutattuk ki a rheumatoid arthritis betegséget, azonban számos más diagnosztikai vizsgálat is eredményesen tudja detektálni a betegség jelenlétét, azonban fontos megjegyezni, hogy nincsenek minden esetben jelenlévő markerek vagy tünetek, így a diagnózist több vizsgálat, klinikai megfigyelés előzi meg. A fizikai vizsgálat során az orvosok az ízületek ellenőrzését végzi, duzzanatot és melegséget keres. A vér vizsgálatával a gyulladásos markereket lehet kimutatni, ilyen a CRP (C-reaktív protein) is,

vagy az ESR (vörösvérsejt süllyedés), melyek gyulladást jeleznek a szervezetben. Az antitestek vizsgálata során a RF (reumatoid faktort) keresik, illetve az anti CCP-t (anticiklus-citrullinát peptid, melyek gyakran megtalálhatóak a reumatoid arthritisben szenvedő betegek vérében, így alá tudják támasztani a pozitív diagnózist. Az ízületek röntgen, ultrahang, vagy MRI vizsgálatával kimutathatóak az ízületi károsodások, így lehetővé teszik a diagnosztizálást.

1.7 Glikozilációs mintázat megváltozása autoimmunbetegségekben

Az autoimmun reakciók fokozódásában nagy szerepet játszik a glikozilációs mintázat megváltozása. Illetve a betegségek diagnosztizálásában is nagy szerepe van, hiszen biomarkerként szolgálhat. A Sclerosis Multiplex betegség esetén a plazmafehérjék mellett az IgG antitestek N-glikozilációja is megváltozik. Az immunválaszt fokozza az IgG N-glikánok galaktozilációjának csökkenése, valamint a fukoziláció megváltozása, mely proinflammatorikus mintázatot eredményez. A Sclerosis Multiplexet súlyosbíthatják a magas mannóz tartalmú glikánok, melyek megtalálhatóak a plazmafehérjékben.[15]

A Parkinson kór esetében az antitestek glikozilációja megváltozik, főként a fukoziláció és a szialiláció mintázta, melyek az agy immunválaszainak modulálásában, valamint a neurodegeneratív folyamatokban vesznek részt.

A reumatoid arthritis betegségben a glikozilációs mintázat változásában megtalálható az IgG antitestek galaktozilációs hibája. Ez a glikánmintázatban lévő eltérés a galaktoziltranszferáz enzim hibájának köszönhető, mely a gyulladásos folyamatoknak fontos résztvevője. Ez a fajta elváltozás nem csak a reumatoid arthritisre jellemző, hanem más reumatikus betegségeknél is fellelhető.[17]

1.8 A kromatográfia bemutatása

A kromatográfia olyan elválasztástechnikai módszer, amely alapvetően a minta komponenseinek állófázissal és mozgófázissal való eltérő kölcsönhatásán alapszik. Az elválasztás során a minta egy állófázissal érintkezik, amelyben a komponensek eltérő módon és ideig tartózkodnak a mozgófázishoz viszonyítva. A kromatográfiás rendszerben a mozgófázis és az állófázis között kémiai potenciálkülönbség áll fenn, amely az anyagátmenet hajtóerejét képezi. Ez a potenciálkülönbség biztosítja, hogy a komponensek egyik fázisból a másikba átjussanak.

A kromatográfia során a minta minden egyes komponense más-más módon kölcsönhat az álló- és mozgófázissal, attól függően, hogy milyen a kémiai affinitása ezekhez a fázisokhoz. Az állófázissal kialakított kölcsönhatás különféle komponensek esetén eltérő és bizonyos komponensek emiatt jobban vagy épp rosszabbul kötődnek az állófázishoz, más komponensek pedig jobban, vagy épp rosszabbul kötődnek az állófázishoz. Így a komponensek az állófázisban eltérő ideig tartózkodnak, és a rendszerből különböző időpontokban távoznak. Azt az időtartamot mely alatt egy adott komponens áthalad a kromatográfiás rendszeren és a detektorhoz érkezik retenciós időnek hívjuk. Egy több komponensből álló minta összetevői azért mutathatók ki, mert a retenciós idő minden komponensnél specifikus, és függ az állófázis és mozgófázis közötti kölcsönhatástól, illetve a fázisok kémiai és fizikai tulajdonságaitól is.

1.8.1 Kromatográfia típusok

Attól függően, hogy a mozgófázis milyen halmazállapotban van, megkülönböztethetünk gázkromatográfiát, szuperkritikus fluid kromatográfiát, illetve folyadékkromatográfiát.

CSOPORTOSÍTÁS	MOZGÓFÁZIS	ÁLLÓFÁZIS	ELVÁLASZTÁSI TECHNIKA
GC-Gázkromatográfia	gáz	1: szilárd 2: folyadék (szilárd fázison megkötve)	1: (GSC) gáz- szilárd kromatográfia 2: (GLC) gáz- folyadék kromatográfia
SFC-Szuperkritikus fluid kromatográfia	szuperkritikus fluidum	szilárd	(SFC) szuperkritikus fluid kromatográfia
LC- Folyadékkromatográfia	folyadék	1: szilárd 2: folyadék (szilárd fázison megkötve) 3: szilárd 4: szilárd 5: folyadék	1: (LSC) folyadék- szilárd kromatográfia 2: (PC) papírkromatográfia (TLC) vékonyréteg kromatográfia 3: (IC) ionkromatográfia 4: (SEC, GPC) gélkromatográfia 5: (LLC) folyadék- folyadék kromatográfia

[18]



9. ábra Az Miskolci Egyetem UPLC gépe, melyet a kísérleteim során használtam

1.8.2 Kromatográfiás módszerek csoportosítása

A mérés típusa szerint lehet sík, vagy planáris eljárás, mint például a papír- és vékonyréteg kromatográfia, illetve oszlopkromatográfiás eljárás.

A hajtóerő, mely a mozgófázis mozgását hozza létre lehet: elektromos feszültség, kapilláris erő, vagy kényszeráramlású mozgófázis áramoltatása, mely a nyomáskülönbség hatására jön létre. A kromatográfiában az elválasztás történhet frontálisan, kizorítással, illetve elúciós elválasztással.

1.8.3 A HPLC története, felhasználási területei

A folyadékkromatográfia fejlődésével és ezáltal a HPLC (High Performance Liquid Chromatography) létrejöttével lehetségessé vált olyan vegyületek komponensekre való szétválasztására is, melyek például származékképzéssel sem alakíthatóak át elég illékonyá és nem is eléggé

illékonyak ahhoz, hogy gázkromatográfokkal elemezhessek azokat. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia kifejlődése körülbelül az 1960-as évektől vette kezdetét és napjainkban meglehetősen széles területeken alkalmazhatjuk. Legtöbbször az analitikai kémiában használhatjuk, mint elengedhetetlen analitikai eszköz. A droganalízisben, illetve a gyógyszeranalitikai vizsgálatokban is igen nagy szerepe van, felhasználható minőségi-, illetve mennyiségi analízisre is, valamint bomlási folyamatokat is nyomon követhetünk vele. Az élelmiszeriparban hasznát vehetjük vegyszermaradványok azonosítására is, vagy vitamintartalom meghatározására.[18]

1.8.4 A HPLC működése

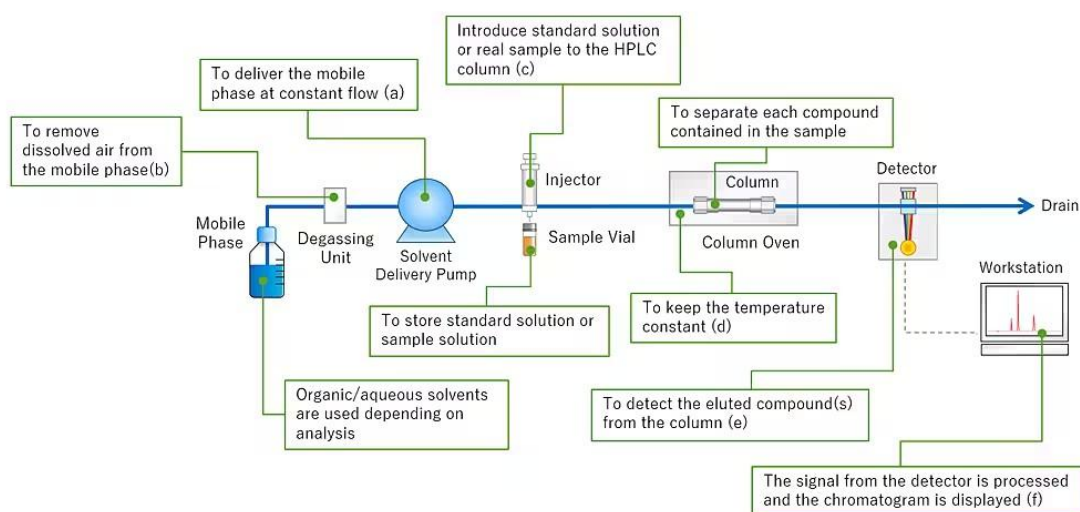
A hagyományos HPLC-k általában 400 baron üzemelnek, a korszerűbbek viszont már 1200-1500 bar nyomásesés mellett is működnek. A HPLC működési elve abból áll, hogy a mintánkat, azaz a mozgó fázist nagy nyomással kényszerítjük át a HPLC állófázis részén. Az, hogy az elválasztás milyen mértékben lesz hatékony nagyban függ a rendszer nyomásesésétől, illetve az álló- és mozgófázis minőségétől.

A HPLC módszereket az álló- és mozgófázis anyagi minősége szerint csoportosíthatjuk.

<i>Kromatográfiás módszer</i>	<i>Állófázis minősége</i>	<i>Mozgófázis minősége</i>
<i>Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)</i>	<i>poláris töltet</i>	<i>apoláris</i>
<i>Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)</i>	<i>apoláris töltet</i>	<i>poláris</i>

<i>Ionkromatográfia (IC)</i> Ionpár kromatográfia (MPIC) Ioncserés kromatográfia (HPIC) Ion kizárásos kromatográfia (HPICE)	apoláris töltet töltéssel rendelkező töltet kationcserélő töltet	poláris oldószer + ionpárképző puffer oldat puffer oldat
<i>Méretkizárásos kromatográfia (SEC)</i>	nagy pórusátmérővel rendelkező töltet (gél)	víz vagy szerves oldószer
<i>Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)</i>	hidrofób felületű töltet	sótartalmú oldat, elválasztás során csökkenő só koncentráció
<i>Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HILIC)</i>	Hidrofil	Fordított fázisú

1.táblázat nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerek csoportosítása álló-, és mozgófázis anyagi minőségei szerint[18]



1.8.5 HPLC szerkezeti egységei és azok feladatai

1. **Mozgó fázis tartály:** Az eluensek, azaz mozgó fázisok tárolására szolgálnak az eluentárolók, melyek főként üveg edények. Különböző térfogatú folyadékok tárolására szolgálnak, organikus vagy vizes oldószereket tartalmaz a minta szétválasztásához.
2. **Kigázosító egység:** Eltávolítja az eluensben lévő oldott gázokat. Ez a lépés azért fontos, mert ha gáz marad az eluensben, akkor az nagy valószínűséggel kerülhet bele a szivattyúba, ezzel akadályozva, megnehezítve annak egyenletes működését.
3. **Szivattyú (Solvent Delivery Pump):** A mozgófázist állandó áramlási sebességgel, egyenletesen, pulzálás nélküli szállítja a rendszerbe. A pulzálás olyan módon gátolt a mérő rendszerben, hogy erre a feladatra egy rugalmas szállító csövet használnak, mely szükség esetén tágulni képes.
4. **Mintaadagoló (Injector):** gondoskodik a minták megfelelő adagolásáról az oszlopba.
5. **Minta fiola (Sample Vial):** A standard oldat vagy a valódi minta tárolására szolgál.
6. **Oszlop (Column):** Szétválasztja a minta komponenseit az álló- és mozgófázis közötti kölcsönhatások alapján. A HPLC oszlopok cserélhető részek a készülékben.
7. **Oszlop melegítő (Column Oven):** Fenntartja az állandó hőmérsékletet az oszlop körül. Abban az esetben, ha az analízis hőmérsékletét növeljük a retenciós időt csökkenteni tudjuk, és kis mértékben a szelektivitás is javulhat.
8. **Detektor:** Észleli az oszlopból eluálódott komponenseket.
9. **Munkállomás (Workstation):** A detektorból származó jeleket feldolgozza, illetve kromatogramot készít.

Az injektor 2 állásban lehet, load és inject állásban, vagyis vagy mintát szív, vagy mintát injektál. A felszívott mintát egy meghatározott térfogatú mintahurokba (loopba) tölti. Ebből a mintahurokból a felesleg egy lefolyón

keresztül tud távozni. Manapság elterjedt az autosampler, azaz automata mintaadagoló, melynek segítségével akár 50-100 mintát is lehet már elemezni.

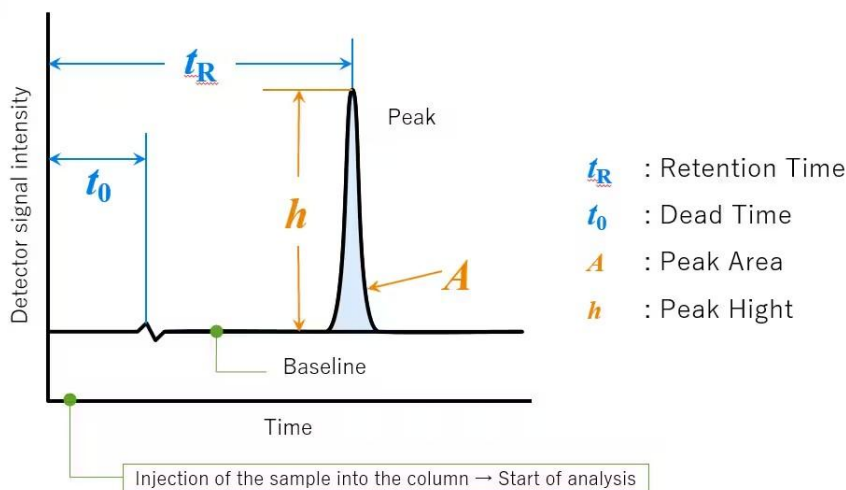
A HPLC-ben alkalmazott detektor típusa attól függ, hogy milyen a vizsgált vegyületek anyagi minősége és abból milyen mennyiséget vizsgálunk. Ezekben a detektorban többnyire 1-10 mikroliter űrtartalmú átfolyós küvettákat használhatunk.

1.8.6 A mérési eredmények kiértékelésének módja

A mérési eredményünket kromatogram formájában kapjuk meg, mely a mérés közben rajzolódik ki. Az eredmények kiértékelésében a retenciós idő, a csúcs magasság és a csúcs terület van segítségünkre. Ezeket a csúcsokat standard minta alapján, vagy tömegspektrométeres detektálással is azonosíthatjuk. A kromatogram, - mely nem más, mint egy detektorjel-idő függvény-, hordozza a retenciós idő, a retenciós térfogat és a relatív retenciós idő információit. A retenciós idő azt mutatja meg, hogy milyen térfogat áramlott át az állófázison a mérés során. A csúcsmagasság, illetve a csúcsterület az adott komponens koncentrációjáról, mennyiségi információt hordoz. A csúcsok száma megmutatja a minimumkomponensek

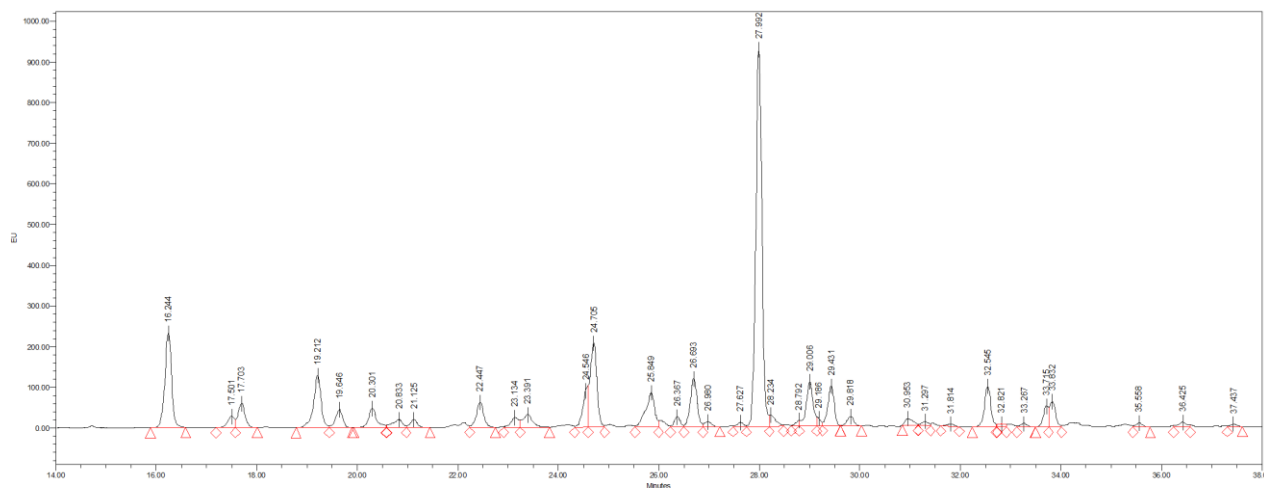
számát, a retenciós idő pedig a minta minőségét jellemzi, minél tisztább a mintánk, annál korábban detektálódik a csúcs.

- **Baseline (alapvonal):** Vonal, ahol nincs jelérzékelés (alapjelet mutat)
- **Peak (csúcs):** Adott komponens elválasztott jele, a detektor érzékeli



10. ábra Kromatogram felépítése

- **t_R (Retention Time, retenciós idő):** Idő, mely alatt a komponens eléri a csúcs maximumát az injektálás pillanatától kezdve
- **t_0 (Dead Time, holtidő):** Idő, mely alatt egy inert marker vagy a mobil fázis áthalad az oszlopon. Ez az idő a rendszer üresjárat ideje
- **A (Peak Area, csúcs területe):** A csúcs alatti terület, mely arányos a minta mennyiségével
- **h (Peak Height, csúcs magassága):** A csúcs magassága az alapvonaltól mérve



11. ábra Mérés után kapott kromatogram

1.9 Kiértékeléshez használt teszt típusok, módszerek

1.9.1 Nem parametrikus tesztek

A nem parametrikus tesztek olyan típusú statisztikai tesztek, melyeket akkor tudunk alkalmazni, ha a vizsgálatok során kapott adatok nem teljesítik a feltételeit a paraméteres teszteknek. Ilyen lehet például a varianciahomogenitás. Ekkor ugyanis az adatok nem követik a megszokott normális eloszlást, azaz nincsenek meghatározott eloszlási paraméterek.

A nem parametrikus tesztek jellemzői az alábbiak:

- Eloszlásfüggetlenség (nincs feltételezve, hogy az adatok adott elosztásból valóak)
- Mediánalapú, vagy rangalapú elemzés (az adatok mediánját, vagy rangsorolását használják az elemzéshez)
- Kevesebb mintaszámnál is használható (ebben az esetben a parametrikus tesztek nem lennének megbízhatóak)

A nem parametrikus tesztek jól alkalmazhatóak amennyiben:

- az adatok nem normális eloszlásúak

- az adatok között vannak kiugró értékek, melyek torzíthatják az eredményeket parametrikus tesztek esetén
- az adatok rangsorolt skálán mértek (az adatokat sorrendbe tudjuk állítani, de különbségük mértéke nem ismert)

Gyakran használt nem parametrikus tesztek:

- **Mann-Whitney teszt:** alkalmazható két független minta mediánjának összehasonlítására
- **Kruskal-Wallis teszt:** alkalmazható több független csoport mediánjának összehasonlítására
- **Friedman próba:** alkalmazható több összetartozó minta összehasonlítására
- **Wilcoxon előjeles rangpróba:** alkalmazható két összetartozó minta közötti különbségek detektálására

1.9.1.1 Mann-Whitney teszt

A Mann–Whitney teszt a nem parametrikus típusú statisztikai próbáknak egy gyakran használt típusa, amelyet két független csoport mediánjának összehasonlítására alkalmaznak. Jól alkalmazható nem normális eloszlású mintáknál, vagy rangsorolt skálán mért adatok esetén. A teszt alapelve, hogy a két csoport adatpontjait közösen rangsorolva vizsgálja. Így láthatóvá válik, ha a két minta között szisztematikus különbség van az elért rangok alapján.

A Mann–Whitney teszt használatakor először mindkét csoport összes adatpontját növekvő sorrendbe kell rendezni, majd minden adatpontnak egy rangértéket kell adni. Ezek után a teszt megméri a két minta közötti rangkülönbséget. A két csoportban akkor lesz hasonló a rangok eloszlása, ha a csoportok között nincs valódi különbség. Figyelembe kell venni a teszt használata során, hogy a Mann–Whitney teszt feltételezi, hogy a két csoport független egymástól, és a vizsgált eloszlás alakja hasonló a két csoportban.

1.9.1.2 Kruskal-Wallis teszt

A Kruskal–Wallis teszt a nem parametrikus típusú statisztikai próbák egyik gyakran használt típusa, amelyet három vagy több független csoport mediánjának összehasonlítására alkalmaznak. A tesztet akkor használják, ha a minta eloszlása nem követi a normális eloszlást, vagy ha a varianciák különbözőek. A Kruskal–Wallis teszt alapelve, hogy rangsorra kell állítani a különböző csoportokhoz tartozó adatpontokat, majd meg kell vizsgálni, hogy a csoportok között van-e szignifikáns különbség a rangok eloszlása alapján.

A teszt használata során először növekvő sorrendbe kell rendezni az adatpontokat, majd minden adat mellé egy rangértéket kell rendelni. Ezután, ha minden csoportban összegezzük a rangokat akkor megállapíthatjuk a csoportonkénti rangösszegeket. Az, hogy milyen mértékben térnek el egymástól a csoportok rangösszegei a közös átlagtól, megadja a statisztikai számítás alapját.

A Kruskal–Wallis teszt azonban korlátolt módszer, ugyanis nem tudja meghatározni, hogy a szignifikáns különbség mely csoportok között lép fel. Ha a teszt eredménye szignifikáns, akkor lehetőségünk van páronkénti összehasonlítással további elemzéseket végezni. A teszt előnye, hogy független a normális eloszlás és varianciahomogenitás feltételeitől.

1.9.1.3 ROC görbe

A ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe egy statisztikai eszköz, amelyet a klasszifikációs modellek teljesítményének értékelésére használnak, kifejezetten akkor, amikor egy modell két kategória között tesz különbséget. A ROC-görbe segítségével átláthatjuk, hogy a vizsgált modell hogyan teljesít különböző küszöbértékek mellett, valamint mennyire képes megkülönböztetni a pozitív és negatív osztályokat.

1.9.1.3.1 A ROC görbe összetétele

1. True Positive Rate (TPR) vagy Sensitivity (igaz pozitív arány vagy szenzitivitás):

Ez az érték mutatja, hogy hány százalékát azonosította helyesen a modell pozitívnak a valós pozitív esetek közül. Ez az érték a ROC görbe függőleges tengelyén található.

$$TPR = \frac{TP}{TP + FN}$$

2. False Positive Rate (FPR) (hamis pozitív arány):

Ez az arány azt mutatja, hogy hány százalékát azonosította a modell helytelenül pozitívnak a modell a valós negatív esetek közül. Ez az érték a ROC görbe vízszintes tengelyén található.

Az FPR kiszámítása:

$$FPR = \frac{FP}{FP + TN}$$

1.9.1.3.2 A ROC görbe működése

A ROC-görbe készítésekor az egyes küszöbértékeket (threshold) a klasszifikációs modellhez állítjuk és kiszámítjuk minden küszöbnél a TPR és FPR értékeket. A küszöbértékek meghatároznak egy-egy pontot, melyeket utána összeköthetünk a ROC görbén.

1.9.1.3.3 Tökéletes és random modellek

Tökéletes modell

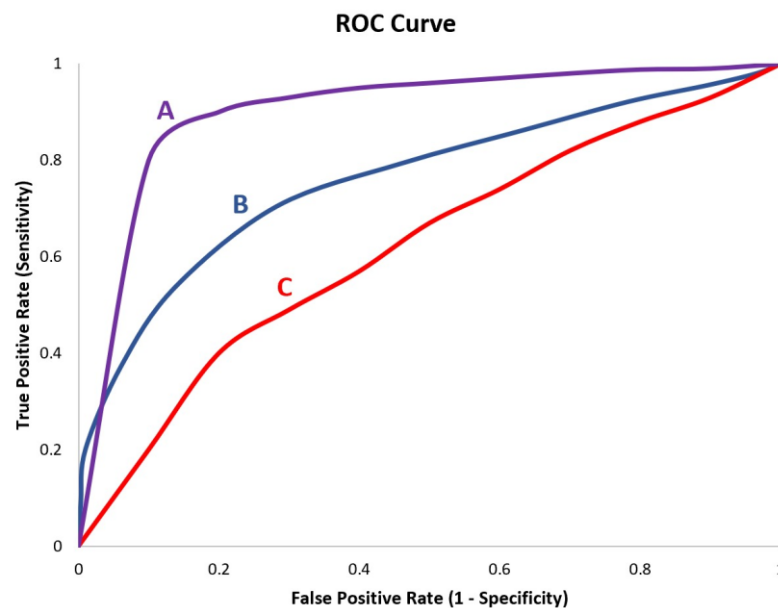
- Akkor mondható tökéletesnek egy modell, ha nincs hamis pozitív eredmény és mindegyik pozitív példát helyesen azonosította. Ez az érték a grafikon bal felső sarkában található (0,1).

Random modell

- Abban az esetben beszélünk random modellről, ha az AUC (Area Under Curve) értéke körülbelül 0,5. Tehát a modell pontossága nem jobb a véletlen találgatásnál, azaz a negatív és pozitív csoportokat ugyanolyan eséllyel találja el. Az értéke a görbe közepén lévő átlón helyezkedik el, tehát $TPR=FPR$. Ez az eset nem tekinthető hasznosnak az adatelemzés céljából.

1.9.1.3.4 Az AUC (Area Under the Curve) jellemzése

Az AUC (Area Under the Curve), azaz a görbe alatti terület, mely kifejezi, hogy a modell mennyire jól képes klasszifikálni a két osztályt. Ennek az értéke 0,5-1 között változik, és ennek függvényében lehet tökéletes, random vagy rossz.



12. ábra „A” görbe-teljes mértékben pontos modell, „B” görbe-véletlenszerűen klasszifikáló modell, „C” -véletlen találgatásnál rosszabb modell)[19]

- $AUC=1$ (teljes mértékben pontos modell, tökéletesen képes a megkülönböztetésre)
- $AUC = 0,5$ (a modell véletlenszerűen klasszifikál)
- $AUC < 0,5$ (a véletlen találgatásnál rosszabb modell)

1.9.1.3.5 A görbe alakjainak jellemzése

- A görbe minél magasabban helyezkedik el a grafikon bal felső sarkához közel, a modell annál jobb, hiszen ez nagy szenzitivitás mellett kevesebb hamis pozitív arányt jelent
- A görbe minél közelebb található az átlóhoz, a 45°-os vonalhoz, a modell annál kevésbé képes jól különbséget tenni a pozitív és negatív értékek között

1.9.1.3.6 ROC-görbe felhasználási területei

A ROC görbével tehát a klasszifikációs modellek különféle küszöbértékeken történő teljesítését vizsgáljuk, mely fontos szerepet tölt be a hamis pozitív és hamis negatív eredmények kiszűrésében. Ez kifejezetten hasznos a diagnosztikai vizsgálatok során, hiszen így könnyebb kizárni a téves következtetéseket, diagnózisokat.

2. Kísérleti leírás

Az első nap a minták összeválogatása történt nem és kor szerint. Ezekből 15 db egészséges kontroll és 15 db rheumatoid arthritisben szenvedő mintája volt.



13. ábra Beteg és kontroll minták kiválasztása a vizsgálat elkezdéséhez

Ezt a 30db mintát kellett emésztetni. A folyamathoz 9 μ l szérum minta kellett, melyeket kimérés előtt vortexelni kellett, hogy homogén legyen. Majd hozzáadtam az 1 μ l denaturáló puffert. Ezután 15 percen keresztül történt az emésztés 65°C-on. Végül 9 μ l 4°C-os 1x PBS-sel oldatot adtunk hozzá, és 1 μ l PNGase enzimet. Ezután egy éjszakán át emésztésre inkubátorba helyeztem 37 °C-fokra.

A második nap történt 7:30 és 11:30 között a szérum minták jelölése, ezután 4 órás emésztés következett 65°C-on.

A jelölő oldat az alábbiakból állt:

- 100 mg borán-2-metilpiridin komplex (funkciója: redukálószer az oligoszacharidok jelöléséhez redukatív aminálással)
- 100 mg prokainamid-hidroklorid (funkciója: glikánok megfelelő jelölése UPLC felhasználás céljából)
- 700 μ l DMSO
- 300 μ l ecetsav (arány: 70/30 = DMSO/ecetsav)



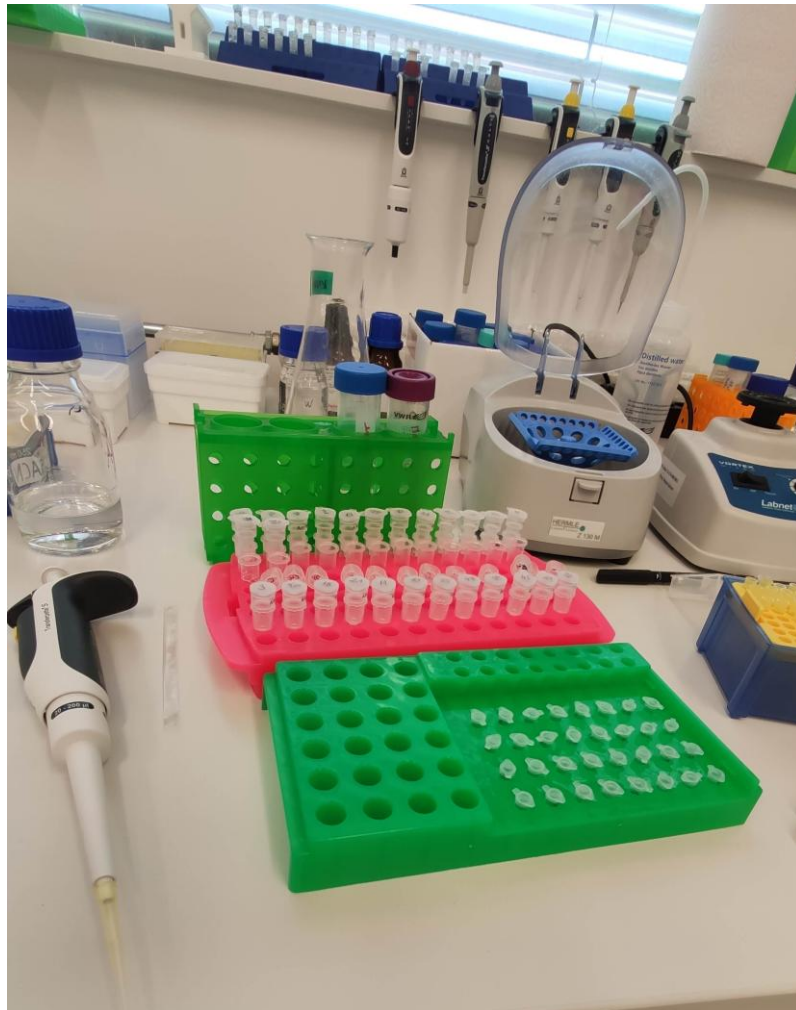
14. ábra Monospin amid oszlopon történő tisztítás centrifuga segítségével (jobbra)

Monospin Amid oszlop (balra)[20]

A minták tisztítása 11:30-kor vette kezdetét. 170 μ l 100%-os acetonitrilt (AcN) adtam a 30 μ l fluoreszcensen jelölt szérum mintákhoz. Ezután monospin amid oszlopon történt a tisztítás. Az oszlop aktiválásának és előkészítésének lépései az alábbiakból álltak:

- oszlop aktiválása 200 μ l eluáló, majd 200 μ l mosó pufferrel (cf: 1 min, 5000 g)
- 200 μ l szérumminta rámerése az oszlopra (cf: 1 min, 5000 g)
- 200 μ l mosó puffer rámerése (cf: 1 min, 5000 g)
- 100 μ l elúciós puffer rámerése (cf: 1 min, 5000 g)

Ezután az eluátumból 50 μ l-t mértem át mintatartókba, majd hozzáadtam minden mintához 150 μ l acetonitrilt. Ezután a mintákat hidrofíli-interakción alapuló UPLC-be helyeztem és elindítottam a futást.



15. ábra Minták készítése az UPLC méréshez

Az UPLC felépítése az alábbiakból állt:

- Álló fázis/oszlop
 - Glycan BEH Amide oszlop
 - 1,7 μ m-es részecskeméret
 - 130 Å pórusméret
 - Oszlop méretei: 2,1 mm x 150 mm
 - 1K - 150K molekulatömegű glikánokhoz alkalmas
- Eluens: 75-25% gradiens elúciót alkalmaztam acetonitrillel (AcN) 50 perces idejű szeparációkhoz
- Mobilis vagy mozgó fázis: 50 mM ammonium-formiát (pH 4.4) puffer-oldat
- A futásra a mintákból 5-5 μ l-t injektáltam be

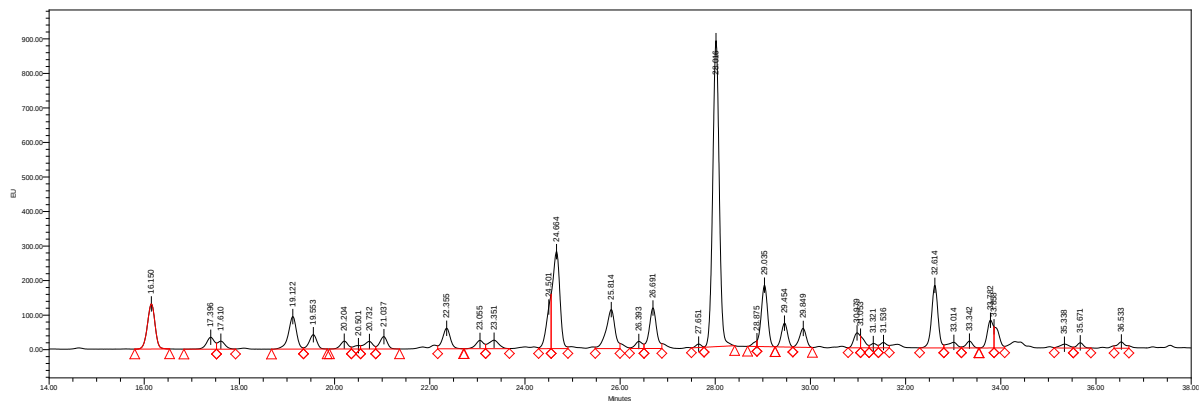
- Detektor: fluoreszcens detektor
 - excitációs hullámhossz: 309 nm
 - emissziós hullámhossz: 359 nm

2.1 Felhasznált szoftverek

A kiértékeléshez az IBM SPSS STATISTIC (2023), az Empower (2002), valamint a Microsoft Excel (2019) programok voltak segítségemre.

2.2 Elemzés és kiértékelés

A minták UPLC-n történő lefuttatása után a kapott értékeket és a kromatogramot elemeztük ki. Az adatok rendszerezése után a kromatogramokat integráltuk, így meghatározhatóak lettek a vizsgált komponensek mennyiségei a mintában. Az integrálás elvégzéséhez az Empower (2002) szoftver volt segítségemre. Az integrált adatokat az IBM SPSS STATISTIC (2023) szoftverben elemeztem tovább több teszt segítségével is.



16. ábra Mérési kromatogram

2.2.1 Mann-Whitney teszt

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
17	The distribution of 17 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.985 ¹	Retain the null hypothesis.
18	The distribution of 18 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.897 ¹	Retain the null hypothesis.
19	The distribution of 19 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.341 ¹	Retain the null hypothesis.
20	The distribution of 20 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.305 ¹	Retain the null hypothesis.
21	The distribution of 21 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.897 ¹	Retain the null hypothesis.
22	The distribution of 22 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.752 ¹	Retain the null hypothesis.
23	The distribution of 23 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.926 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

¹Exact significance is displayed for this test.

17. ábra 17-23 számú csúcsok elemzése Mann-Whitney tesztel

A 4. ábrából leolvashatóak az alábbi következtetések:

- A szignifikancia szintje minden vizsgált változó esetében jóval meghaladja a 0,05-ös szintet.
- A 17-23 csúcsok esetében nincs szignifikáns különbség a Pk kategóriák közötti eloszlásokban, tehát ezek a csúcsok beteg és egészséges embereknél is hasonlóak.

Hypothesis Test Summary			
	Null Hypothesis	Test	Sig. Decision
1	The distribution of 1 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.149 ¹ Retain the null hypothesis.
2	The distribution of 2 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.287 ¹ Retain the null hypothesis.
3	The distribution of 3 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.035 ¹ Reject the null hypothesis.
4	The distribution of 4 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.616 ¹ Retain the null hypothesis.
5	The distribution of 5 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.305 ¹ Retain the null hypothesis.
6	The distribution of 6 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.067 ¹ Retain the null hypothesis.
7	The distribution of 7 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.086 ¹ Retain the null hypothesis.
8	The distribution of 8 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.926 ¹ Retain the null hypothesis.
9	The distribution of 9 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.305 ¹ Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

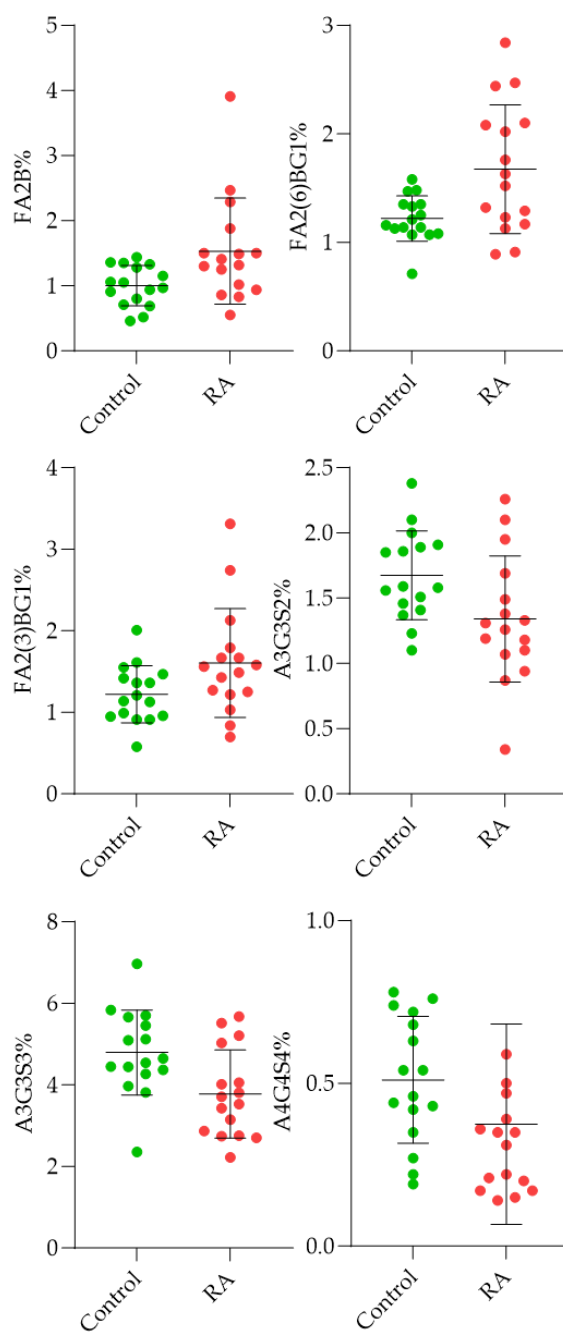
¹Exact significance is displayed for this test.

18. ábra 1-9 számú csúcsok elemzése Mann-Whitney teszttel

Az 5. ábrából leolvashatóak az alábbi következtetések:

- A legtöbb változót nézve (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 és 9) a szignifikanciaszint magasabb, mint 0,05, így ezeknél a nullhipotézist megtartottuk.
- A 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 és 9 csúcsok esetében nincs szignifikáns különbség a Pk kategóriák közötti eloszlásokban, tehát ezek a csúcsok beteg és egészséges embereknél is hasonlóak.
- Az egyetlen kivétel a 3-as változó. Itt a szignifikanciaszint 0,035, ami kisebb, mint 0,05. Ennél a változónál elutasítjuk a nullhipotézist, tehát a 3-as változó eloszlása szignifikáns különbséget mutat a Pk kategóriák között és ez a csúcs eltérő beteg és egészséges embereknél.

A vizsgálat lefuttatása során az alábbi csúcsok mutattak eltérést:
3,16,25,29



2.2.2 Kruskal-Wallis teszt

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of 1 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.142	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of 2 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.282	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of 3 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.036	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of 4 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.598	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of 5 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.300	Retain the null hypothesis.
6	The distribution of 6 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.065	Retain the null hypothesis.
7	The distribution of 7 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.086	Retain the null hypothesis.
8	The distribution of 8 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.925	Retain the null hypothesis.
9	The distribution of 9 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.291	Retain the null hypothesis.
10	The distribution of 10 is the same across categories of Pk.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.283	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

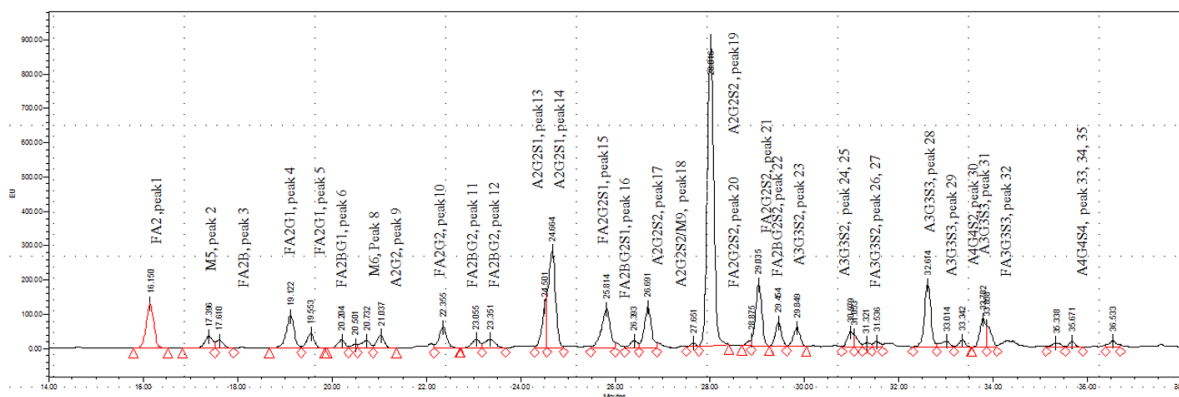
19. ábra 1-10 csúcsok elemzése Kruskal-Wallis teszttel

A 6. ábrából leolvashatóak az alábbi következtetések:

- A legtöbb változót nézve (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) a szignifikanciaszint magasabb, mint 0,05, így ezeknél a nullhipotézist megtartottuk.
- A 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 csúcsok esetében nincs szignifikáns különbség a Pk kategóriák közötti eloszlásokban, tehát ezek a csúcsok beteg és egészséges embereknél is hasonlóak.
- Az egyetlen kivétel a 3-as változó. Itt a szignifikanciaszint 0,036, ami kisebb, mint 0,05. Ennél a változónál elutasítjuk a nullhipotézist, tehát a 3-as változó eloszlása szignifikáns különbséget mutat a Pk kategóriák között és ez a csúcs eltérő beteg és egészséges embereknél.

A vizsgálat lefuttatása során az alábbi csúcsok mutattak eltérést:
3,16,25,29

Tehát a Kruskal-Wallis, illetve a Mann-Whitney tesztek is hasonló eredménnyel zárultak, igazolták egymást.

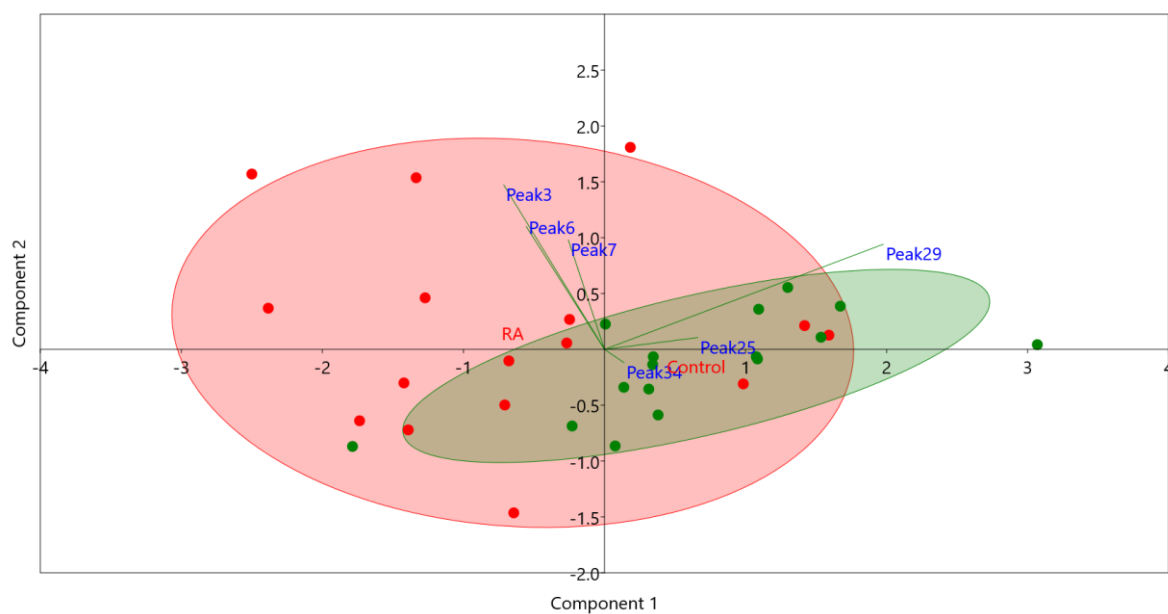


20. ábra Csúcsok azonosítása

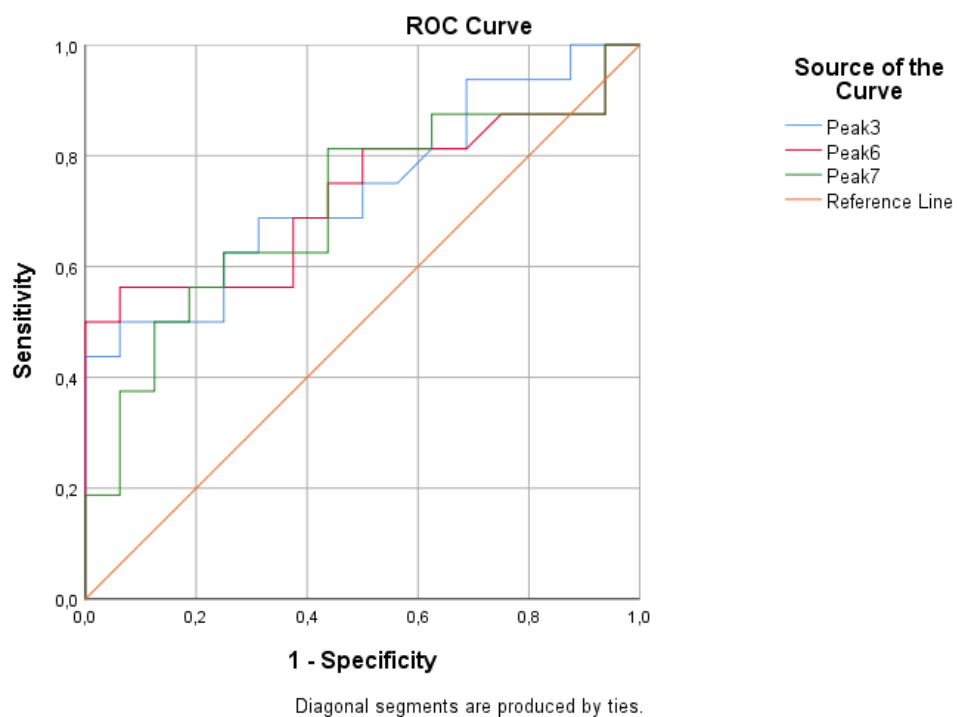
A csúcsok azonosítása után megvizsgáltam a szerkezetek összetételét is, melyek az alábbiak voltak:

- **FA2B**: fukózt galaktózt és szialinsavat is tartalmaz
- **FA2BG2S1**: két galaktózt és egy szialinsavat tartalmaz
- **A3G3S2**: három galaktóz molekulát és három szialinsavat tartalmaz
- **A3G3S3**: három szialinsavat és 3 galaktózt tartalmaz

2.2.3 Főkomponens analízis



21. ábra Főkomponens analízis

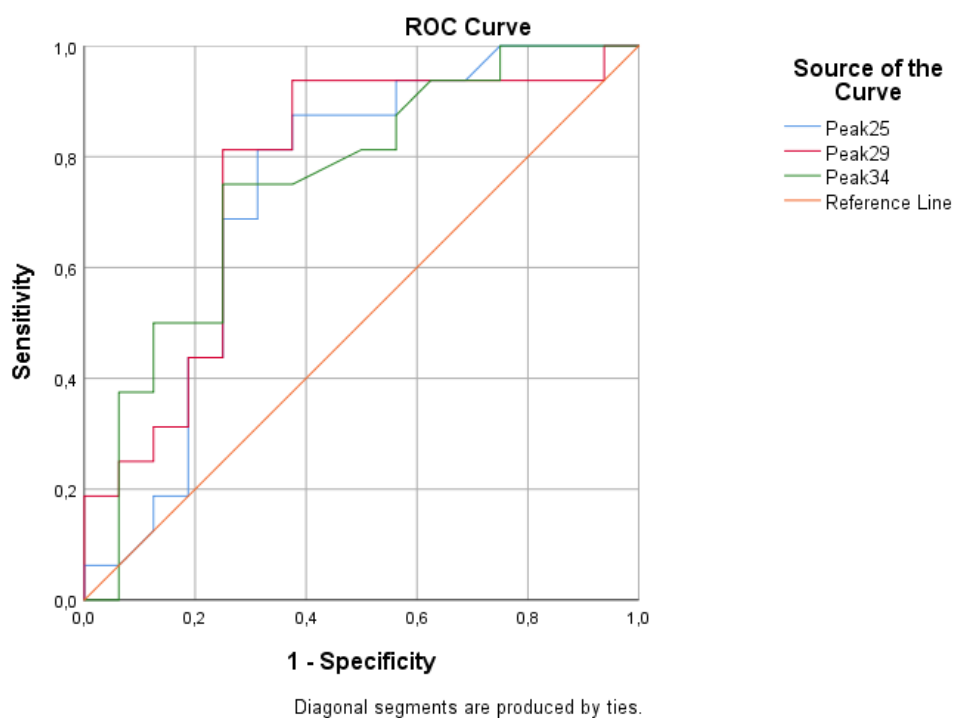


22. ábra ROC-görbe a 3-as, 6-os és 7-es csúcs vizsgálatával

Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area
Peak3	,736
Peak6	,729
Peak7	,707

A csúcs alatti területek értéke 0,5 és 1 közé esik, így ez mérésenként jó osztályozó teljesítménynek felel meg. Ez azt jelenti, hogy a kapott eredmények inkább jellemzőek az RA csoportra, de az osztályok között előfordulnak átfedések, így az osztályozás nem a legpontosabb eredményt nyújtja.



23. ábra ROC-görbe a 25, 29 és 34-es csúcsok vizsgálatával

Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area
Peak25	,734
Peak29	,766
Peak34	,752

Ebben az esetben is elmondható, hogy a csúcs alatti területek értéke 0,5 és 1 közé esik, tehát ez egy mérésenként jó osztályozó teljesítménynek. A kapott eredmények inkább jellemzőek a kontroll csoportra, de nem nyújt pontos eredményt, mert átfedések lehetnek az osztályok között.

2.3 Összegzés

A dolgozat készítése során alkalmazott módszerek és elemzések használatával számos következtetés levonható. Az UPLC segítségével meghatározható lett a minták összetétele, majd a kromatogram elemzésével a komponensek minőségi és mennyiségi analízise is lehetővé vált.

A statisztikai tesztek közül a Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztek szignifikáns különbségeket mutattak bizonyos csúcsok között, amelyek a beteg és egészséges minták különbségeire világítottak rá. Kiemelkedő volt a 3-as csúcs, mely szignifikáns eltéréseket mutatott a két csoport között.

A ROC-görbék elemzése mérsékelten jó osztályozó teljesítményt mutatott, tehát az eredmények elsősorban az RA csoport jellemzőit tükrözték, ám az osztályozás nem nyújt tökéletes pontosságot. Az elemzések eredményei alapján tehát elmondható, hogy a használt módszerek alkalmasak a vizsgált minták osztályozására, bár további finomítások és kiegészítő vizsgálatok szükségesek lehetnek a pontosság növelése érdekében.

Felhasznált Irodalom

- [1] P. Entezami, D. A. Fox, P. J. Clapham, and K. C. Chung, "Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis," *Hand Clin*, vol. 27, no. 1, p. 1, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.HCL.2010.09.006.
- [2] H. Hall *et al.*, "Glucotypes reveal new patterns of glucose dysregulation," *PLoS Biol*, vol. 16, no. 7, p. e2005143, Jul. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.2005143.
- [3] "RA and Anti-CCP: What is the Purpose of an Anti-CCP Test? - RheumatoidArthritis.org." Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.rheumatoidarthritis.org/ra/diagnosis/anti-ccp/index.html>
- [4] "Rheumatoid Arthritis Symptoms : Johns Hopkins Arthritis Center." Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-symptoms/>
- [5] H. Hall *et al.*, "Glucotypes reveal new patterns of glucose dysregulation," *PLoS Biol*, vol. 16, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2005143.
- [6] "What Are Amino Acids? | The Science Blog." Accessed: Nov. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.reagent.co.uk/blog/what-are-amino-acids/>
- [7] "Protein Synthesis – Location, Process, Steps, & Diagram." Accessed: Nov. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencefacts.net/protein-synthesis.html>
- [8] Dr. Borbás Anikó, "Biológiailag aktív oligoszacharidok és analogonjaik szintézise," 2012.
- [9] V. Triantis, L. Bode, and J. R. J. van Neerven, "Immunological effects of human milk oligosaccharides," *Front Pediatr*, vol. 6, 2018, doi: 10.3389/FPED.2018.00190/PDF.
- [10] "Cell Surface Glycans in Mammals. The diagram depicts one or more... | Download Scientific Diagram." Accessed: Nov. 10, 2024. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Cell-Surface-Glycans-in-Mammals-The-diagram-depicts-one-or-more-glycans-from-each-class_fig1_333999640
- [11] "Glycoproteomics UNDERSTANDING PROTEIN MODIFICATIONS Now includes O-Glycoprotease (IMPa)." [Online]. Available: www.NEBglycosidase.com
- [12] A. Cvetko *et al.*, "Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential," *Biomedicines 2020, Vol. 8, Page 410*, vol. 8, no. 10, p. 410, Oct. 2020, doi: 10.3390/BIOMEDICINES8100410.
- [13] G. Dekkers, T. Rispen, and G. Vidarsson, "Novel concepts of altered immunoglobulin G galactosylation in autoimmune diseases," *Front Immunol*, vol. 9, no. MAR, p. 335415, Mar. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00553/BIBTEX.
- [14] "Synovium & Synovial Fluid - Physiopedia." Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: https://www.physio-pedia.com/Synovium_%26_Synovial_Fluid

- [15] T. Kissel, R. E. M. Toes, T. W. J. Huizinga, and M. Wuhrer, “Glycobiology of rheumatic diseases,” *Nature Reviews Rheumatology* 2022 19:1, vol. 19, no. 1, pp. 28–43, Nov. 2022, doi: 10.1038/s41584-022-00867-4.
- [16] “Rheumatoid Arthritis Gender Differences.” Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.verywellhealth.com/rheumatoid-arthritis-gender-differences-5070797>
- [17] J. S. Axford, “Glycosylation and rheumatic disease,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1455, no. 2–3, pp. 219–229, Oct. 1999, doi: 10.1016/S0925-4439(99)00057-5.
- [18] “Nagyhatékonyágú folyadékkromatográfia (HPLC).” Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: <https://tamop412a.ttk.pte.hu/files/kemia7/www/ch07s03.html>
- [19] “How to Interpret a ROC Curve (With Examples).” Accessed: Nov. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.statology.org/interpret-roc-curve/>
- [20] “MonoSpin Amide (50 pieces).” Accessed: Nov. 11, 2024. [Online]. Available: <https://diagnocine.com/Product/MonoSpin-Amide-50-pieces/75044>

