

11. A fehérjekutatás modern módszereinek alkalmazása a klinikai patológiában – Az új módszertanok klinikai hasznosulása az orvosi kutatólaboratóriumban

A vérszérum és a vérplazma fehérjevizsgálatai

TŐKÉS-FÜZESI MARGIT

Az érpályában keringő vér mennyisége felnőttekben 4-5 liter, amely alakos elemeket és plazmát tartalmaz. Vervétel után in vitro körülmények között ezeket centrifugálással választják el. Amennyiben vérévételkor alvadésgátlót használunk (heparin, kalciumkötő kelátképzők, EDTA, citrát), a centrifugálás után kapott vér felülszója a plazma. A natív, alvadásában nem gátolt teljes vér felülszója pedig a szérum.

A plazmában ez idáig több mint 360 fehérjét azonosítottak. Nagy részük a májban termelődik, kivéve az immunglobulinokat, amelyeket plazmasejtek termelnek. Aminosavakból épülnek fel, poszttranszlációs módosuláson esnek át, ennek eredményeként legtöbbször kovalens kötéssel szénhidrátmolekula kapcsolódik hozzájuk (glikozilált fehérjék). Biológiai szerepük szerint két csoportba oszthatók:

- Vannak olyan fehérjék, amelyek szerepüket extracellulárisan töltik be. Ezek mennyisége szerv- vagy szövethárosodáskor csökken.
- A fehérjék másik csoportja sejtalkotó, ezek mennyisége viszont szerv- vagy szövethárosodás esetén általában nő.

A plazmafehérjék általános áttekintése

A plazmafehérjék fő funkciói

1. A plazma *kolloidonkotikus nyomásának fenntartása*, ebben a fő szerep az albuminé.

2. *Transzportáló* szerep, szállítófehérjék révén; a szállítandó anyagok:

- metabolitok (pl. lipidek);
- hormonok (pl. tiroxin);
- fémionok (pl. kalcium, vas, réz);
- bilirubin,
- gyógyszerek, toxikus molekulák.

3. Részvétel a szervezet védekezésében (immunglobulinok, komplementrendszer).

4. A véralvadás és a fibrinolízis fehérjei.

5. Pufferszerep, részvétel a pH-szabályozásban.

6. A plazmában sajátosan betöltött szerep pl. proteázgátlók, enzimek, növekedési faktorok stb.

A plazmafehérjék vizsgálati lehetőségei:

1. Mennyiségi meghatározás:

- Biuret módszer (peptidkötés reakciója rézionokkal).
- Festékkötés (pl. az albumin reakciója brómkrezolöld festékkel).
- Homogén immunoassay:
 - nefelometria;
 - turbidimetria;
 - particle enhanced immunoassay.

2. A plazmafehérjék *elektroforetikus elválasztása* után, különböző detektálási lehetőségekkel:

- Mancini-technika.
- Rocket-elektroforézis.
- Immunelektroforézis.
- Immunfixáció.
- Lipoprotein elektroforézis.
- Izoenzim vizsgálat.

3. *Funkció* szerint: pl. enzimek fotometriás meghatározása.

Plazmafehérje-csoportok és vizsgálatuk

ÖSSZFEHÉRJE

A szérumban található összfehérje (*total protein, TP*) mennyiségének meghatározására általánosan a biuret módszert használjuk. A réz(II)ionok alkalikus közegben kötődnek a peptidkötésekhez, ennek eredményeként fotometriásan jól mérhető ibolyaszínű fémkomplex vegyület keletkezik. A szín intenzitás-erőssége, ill. az 540 nm-en mért fényabszorbancia egyenes arányban van a peptidkötések számával, így a fehérjekoncentrációval. A fehérjékben található aminosavak közül az aromás aminosavak UV fényben 280 nm-en nyelnek el, míg a peptidkötések 220 nm-en. Elméletileg ez is alkalmas a plazmában/szérumban található összfehérje mennyiségi meghatározására, azonban az albuminhoz kötött bilirubin zavarja a mérést, ezért a mindennapi gyakorlatban nem használják a módszert.

A plazmában normál körülmények között 60–80 g/l összfehérje található. Kóros körülmények között szintje emelkedhet vagy csökkenhet.

Emelkedik az összfehérje a következő állapotokban:

- Dehidráció folyamán (ilyen esetekben nő a hematokrit, a nátriumion- és az albuminszint is).
- Emelkedett immunglobulin-szintézis (mono-, poliklonális eredet).

Csökken az összfehérjeszint a következő állapotokban:

- Zavart fehérjeszintézis (pl. malnutritio, krónikus májbetegség, malabsorptio).
- Fokozott fehérjevesztés (történhet a vesén, a gyomor-bél traktuson, ill. a bőrön keresztül).
- Fokozott hidratáció (ez iatrogén körülmények között fordulhat elő).

ALBUMIN

Az albumin meghatározására a szérumban alkalmazható a bróm-krezol-zöldet (BCG) használó festékkötéses módszer, valamint az immunológiai módszert alkalmazó turbidimetria és nefelometria. Mennyiségét tekintve a legjelentősebb plazmafehérje, szintje 35–50 g/l. Az albumin 66 kDa molekulatömegű, a májban termelődő egyetlen olyan fehérje, amely nem

glikozilált. Félélettideje 20 nap. A legfontosabb kötő- és szállítófehérje (metabolitok, kalciumion, bilirubin, zsírsavak, foszfolipidek, aminosavak, hormonok és gyógyszerek). A kolloidonkotikus nyomás fenntartásában a legjelentősebb, ezen kívül aminosav-„raktár” képez a perifériás szövetek fehérjeszintéziséhez, és antioxidáns szerepe is van.

Hypoalbuminaemia, azaz alacsony albuminszint alakul ki a plazmában a következő állapotokban

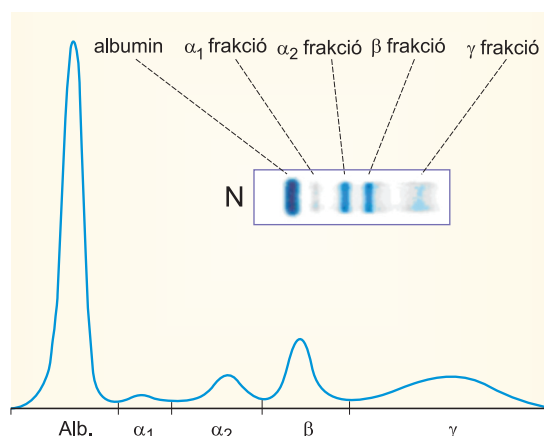
- Csökkent szintézis (akut és krónikus májbetegségekben).
- Analbuminaemia; ritka autoszomális receszíven öröklődő megbetegedés, ahol az albuminkoncentráció maximum 10%-a a normálisnak.
- Megoszlási zavar: oka a fokozott kapillárispermeabilitás, amelynek eredményeként a fehérjék az extravasalis térbe jutnak (pl. égés, ascites).
- Fokozott katabolizmus (pl. trauma, sebészeti beavatkozás, infekció, malignus betegség).
- Fokozott veszteség során, amely történhet:
 - a vesén keresztül (pl. nephrosis-szindróma);
 - a gyomor-bél traktuson át (pl. Crohn-betegség, ulceratív colitis);
 - bőrön át (pl. égés után).

A PLAZMAFEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE

A szérumfehérjék elektroforetikus elválasztása során a fehérjék elektromos térben töltésük és méretük alapján válnak szét. A szérumban található fehérjék izoelektromos pontja (pK) 2,4–6,4 között van, ami azt jelenti, hogy elválasztásukhoz használhatnánk 2,4 pH-nál alacsonyabb savas puffert, azonban ebben a közegben a fehérjék kicsapódnának. Ezért a módszerhez lúgos pH-jú puffert alkalmazunk, amelyben a fehérjék negatív töltést mutatnak, így elektromos térben a katódtól az anód felé vándorolnak. A hordozó szilárd fázis lehet papír, cellulóz-acetát-membrán, agar-, agaróz-, poliakrilamid-gél stb. TISELIUS, az elektroforézis leírója (1930) nem használt hordozót, szabad elektroforézist végzett. Elválasztás után a fehérjéket fixáljuk, majd fehérjefestékkel (Ponceau, amidofekete vagy Coomassie blue) megfestjük. Az így kapott *elektroforetogramot* egyrészt szemikvantitatív módon vizuálisan, másrészt különböző hullámhosszon denzitometriásan értékeljük, így a frakciók százalékos aránya pontosan megadható. Cellulóz-acetát-fólián

vagy agarózgélben való elválasztás után amidofekete festéket használva 5 frakciót kapunk: albumin, α_1 , α_2 , β és γ frakció (11-1. ábra).

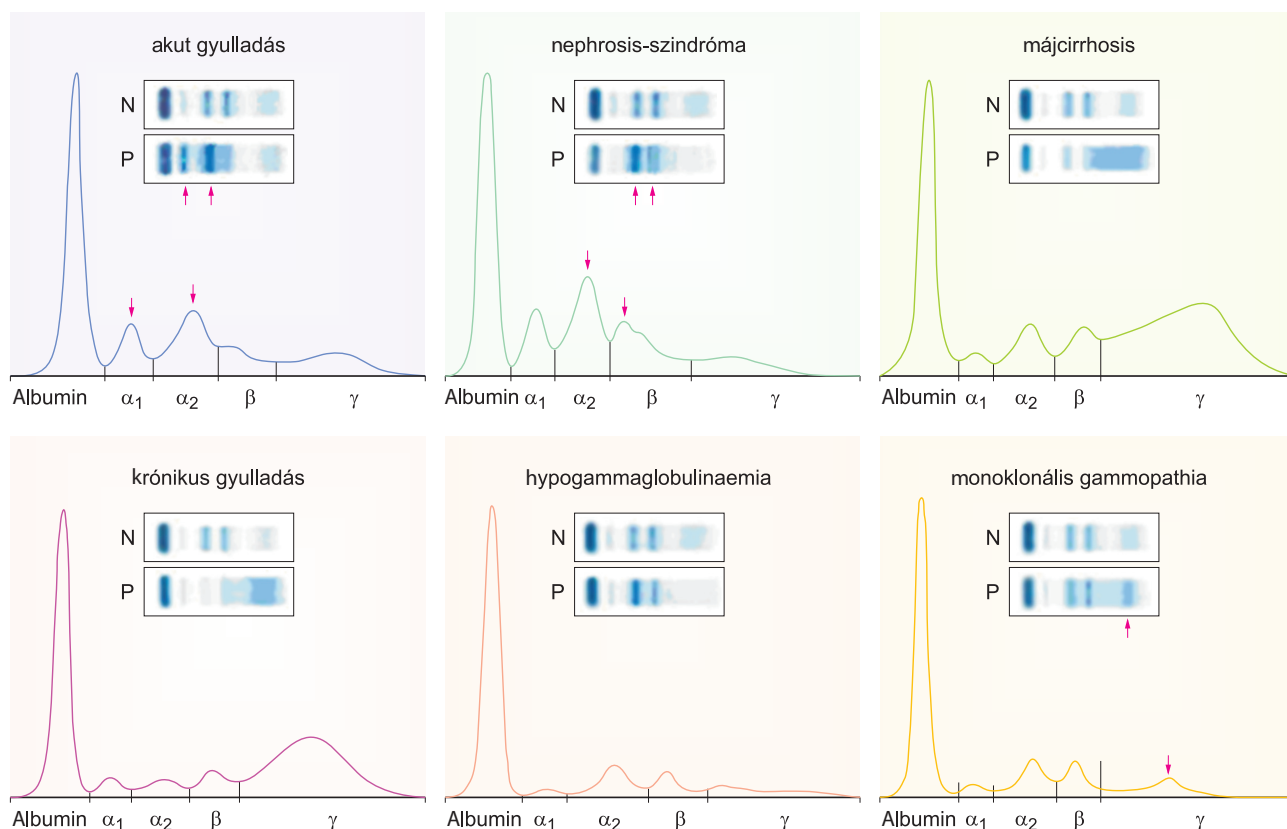
A *dysproteinaemiák* a szérumfehérjék összetételében létrejövő kvalitatív és kvantitatív elváltozások, amelyek szorosan kapcsolódnak a különböző kórképekhez. Ezek különböző fehérjéket vagy fehérjecsoportokat érintenek (mennyiségük a betegség állapotának megfelelően nő vagy csökken), és a szérumfehérje-elektroforetogramon jól felismerhetők (11-1. táblázat). A szérumfehérje-elektroforetogramon látható leggyakoribb patológiás eltéréseket a 11-2. ábra mutatja be.



11-1. ábra. Normál szérumfehérje-elektroforetogram

11-1. táblázat. Dysproteinaemiák

Fehérje vagy fehérjecsoport	Kvalitatív vagy kvantitatív elváltozás
albumin	koncentrációja minden olyan esetben csökken, amikor a globulinok abszolút mennyisége nő, annak ellenére, hogy az összfehérjeszint általában a referenciatartományon belül marad
akut fázis fehérjék	az α_1 - és α_2 -frakcióban vándorolnak; mennyiségük akut gyulladásban 50–300%-kal is emelkedhet, csökken viszont akut hepatitisben, krónikus aktív májbetegségben és fehérjevesztéses állapotban
prealbumin-transzferrin csoport	a <i>prealbumin</i> (transztiretin) az albumin előtt vándorol, 50–70%-a a retinolkötő fehérjével komplexben található; fehérje- és energiahányos állapotban mennyiségük csökken; a <i>transzferrin</i> a β -frakcióban található, vashiányban mennyisége nő; a transztiretin-transzferrin fehérjecsoport mennyisége akut és krónikus gyulladásokban csökken – ún. <i>negatív akut fázisfehérjék</i>
immunglobulinok	a γ -frakcióban, ill. bizonyos mértékben a β -frakcióban vándorolnak, a szervezet védekezésében vesznek részt; az immunglobulinszint emelkedését <i>gammopathiának</i> nevezzük
poliklonális gammopathia	a γ -globulin-szint emelkedése a humorális immunválaszt aktiváló betegségek hatására
monoklonális gammopathia	monoklonális, éles határú M-csík (extrafrakció) a globulinrégióban; a háttérben egy plazmasejtklón által túlzott mértékben termelt immunglobulin (Ig) vagy immunglobulin-fragmentum áll
oligoklonális gammopathia	egy vagy több Ig-osztály vagy -alosztály mennyiségének szelektív növekedése; a γ -globulin-frakcióban egy vagy több extrafrakció található (fűrészfog-mintázat)
izolált fehérjeelváltozás	ritkán detektálható, kivéve az albumint, az α_1 -antitripsint és az IgG-t
extrafrakciók	ezek a normál fehérjeképben megjelenő „extra” fehérjecsúcsok atípusosan a normál csúcsok között vagy azokra rátevődve jelenhetnek meg, akkor válnak láthatóvá, ha mennyiségük meghaladja a 2 g/l-t; az éles határú fehérjecsúcsok és -sávok háttérben monoklonális immunglobulinok, szabad könnyűláncok, ill. nehézláncok állnak; ezek a γ - és a β -régióban találhatóak, és M-proteinnek (monoklonális) vagy régi szóhasználatnál paraproteinnek nevezzük őket



11-2. ábra. Kóros szérumfehérje-elektroforetogramok

A KÜLÖNBÖZŐ FRAKCIÓKBAN VÁNDORLÓ JELENTŐSEBB FEHÉRJÉK RENDELLENESÉGEI BETEGSÉGEKBE

AZ ALBUMINFRAKCIÓBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉ

Lényegében az albumin, amelyet az előzőekben mutattunk be.

AZ α_1 -FRAKCIÓBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉK

α_1 -antitripszin (α_1 -AT)

Szerin-proteáz-inhibitor (serpin, α_1 -proteáz-inhibitor), irreverzibilis komplexet képez az elasztázzal, a kimotripsinnel, a tripsinnel, valamint a trombinnal, és inaktiválja őket. Több mint 75 genetikai variáns ismert, ezek közül azonban csak néhány jár együtt klinikailag releváns α_1 -antitripszin-hiánnyal. Az elektroforetikus mobilitás alapján is több variánst azonosítottak, F, M, S és Z betűvel jelölve ezeket.

Az α_1 -AT akut fázis fehérje. Plazmakoncentrációja a genotípustól függ. A Pi MM variáns, amely az európai populáció 93%-ában fordul elő, normál

α_1 -AT-szinttel jár együtt. A populáció kb. 7%-ában mutatható ki genetikai eltérés, amely közepesen súlyos vagy súlyos α_1 -AT-hiánnyal jár együtt. Ezek közül a Pi ZZ variáns a legjelentősebb, prevalenciája 1:1600 (a „Pi” rövidítés a proteáz-inhibitorra utal). Az α_1 -antitripszin-hiány pulmonalis emphysemával és májbetegséggel jár együtt. Az emphysema oka, hogy az α_1 -AT nem gátolja a neutrophil granulocytákból felszabaduló elasztáz működését, és ez károsítja a tüdő állományát.

α -fetoprotein (AFP)

A magzati élet során a máj által termelt fehérje, a magzati albuminnak felel meg. Születés után szintje csökken, és a 8–12 hónapos korra éri el a felnőttben is mérhető szintet ($< 10 \mu\text{g/l}$). Szerepe nem ismert. Terhességben az anya véréből, ill. az amnionfolyadékból meghatározva alkalmas velőcső-záródási rendellenességek (az AFP-szint nő), valamint Down-szindróma (az AFP-szint csökken) kiszűrésére. Felnőttkorban az AFP tumormarkerként használható nagy rizikójú betegcsoportokban, így hepatitis C- és krónikus hepatitis B-fertőzésben szenvedő betegeknél hepatocel-

lularis carcinománál. Szintje magasabb lehet a gonadokból kiinduló tumorok esetén is.

AZ α_2 -FRAKCIÓBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉK

Cöruloplazmin (Cp)

A májban termelődő és redoxi sajátossággal rendelkező metalloprotein, amely a rézionokat szállítja. Ferroxidáz aktivitása révén befolyásolja más fémek, így a vasion státusát, antioxidáns hatást fejt ki azáltal, hogy gátolja a sejtmembránlipidek fémion katalizálta oxidációját. Akut fázis fehérje. Szintje a szérumban csökken veleszületett cöruloplazminsztézis-zavarban, Wilson-kórban, Menkes-szindrómában és táplálkozási rézhiányban. Ez utóbbi vasrefrakter hypochrom microcytás anaemia kapcsán vetődhet fel.

Haptoglobin (Hp)

A májban termelődik. A Hp1 és Hp2 allélokat kódoló gének három strukturálisan különböző fenotípust hoznak létre: Hp1-1, Hp2-1 és Hp2-2. Szérumkoncentrációja minden egyén esetén ezek típusától függ, ezért referenciatartománya is viszonylag széles (0,3–2,0 g/l). Akut fázis fehérje, mely a széteső vörösvértestekből felszabaduló hemoglobint köti meg. Szintje csökken hemolitikus anaemiákban, akut és krónikus májbetegségekben, valamint malabsorptiós szindrómában. Veleszületett haptoglobinhány ritka.

α_2 -makroglobulin

A szérumban található legnagyobb fehérje, molekulatömege 820 kDa. Vesebetegségben sem jut át a glomerulusokon. Endopeptidázokat, így tripszint és kimotripsint köt meg, ezáltal inaktíválva őket. Szintje emelkedik nephrosis-szindrómában, májcirrrosisban és bizonyos kollagénbetegségekben.

A β -FRAKCIÓBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉK

C-reaktív protein (CRP)

1930-ban írták le, nevét onnan kapta, hogy kötődve a pneumococcus C poliszacharidhoz a kórokozót agglutinálja. Klasszikus akut fázis fehérje, amely a májban termelődik proinflammatorikus citokinek, így IL-6, IL-1 és TNF hatására. Akut gyulladásos folyamatokban szintje a plazmában 6–12 óra után kezd el emelkedni, csúcskoncentrációját 48 óra után éri el és 1-2 hét alatt normalizálódik. A CRP az endogén és

exogén ligandok széles skálájához (mikroorganizmusok, apoptotikus sejtek, DNS) képes kapcsolódni és opsonizálni azokat, ezáltal elősegítve a fagocitózist.

A laboratóriumokban meghatározott CRP-koncentráció mértékét a klinikumban széles körben használják fel, ezek a következők:

- Fertőzés diagnosztikájának megerősítése és monitorozása pl. posztoperatív állapotokban, intenzív terápiás betegek, újszülöttek, traumás betegek kezelésekor, szülészeten korai burokrepéskor.
- Antibiotikumterápia hatásosságának megítélése.
- Vírusok és baktériumok okozta lázas állapotok differenciáldiagnózisára (pl. meningitis, pneumonia).
- Bizonyos autoimmun gyulladások aktivitásának megítélése (rheumatoid arthritis, vasculitis).
- Akut és krónikus gyulladásos betegségek diagnosztikájának megerősítése (malignus betegségeket kísérő krónikus gyulladásban is emelkedik a szintje).
- Atherosclerosisos betegek hs-CRP- (high sensitivity CRP) szintjének mérésével cardiovascularis rizikóbecslésre.

Transzferrin

A plazmában a vasat szállítja a felszívódás és a lebomlás helyéről a felhasználás helyére. A legjelentősebb „vasfelhasználó szerv”, a csontvelő, ahol a vas a képződő vörösvértestek hemoglobinjába épül be. Egy transzferrinmolekula két vasiont képes megkötni és szállítani. Egészséges egyének transzferrinmolekulái csak 30%-ban telítettek. Szintje csökken fehérjevesztéses állapotokban, elsősorban vesebetegségekben, valamint fertőzésekben és gyulladásokban (negatív akut fázis fehérje). Vashiányos anaemiában szintje megemelkedik.

β_2 -mikroglobulin

Kis molekulatömegű fehérje (12 kDa), amely minden magvas sejt sejtmembránjában megtalálható, az MHC I molekula β -lánc. Ennek ellenére elsősorban a myeloid és lymphoid sejtekből kerül a plazmába. Egészséges egyéneknél fiziológiás sejtregeneráció esetén szintézise állandó. A veseglomerulusokban szabadon filtrálódik, a tubulussejteknél pedig visszaszívódik. Szérumban mérhető koncentrációja a

szintézis és a kiválasztás mértékétől függ, egészségesekben egyensúlyban van. A klinikumban elsősorban lymphomák, myeloma multiplex és vesebetegségek monitorozására használják.

A γ -FRAKCIÓBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉK – AZ IMMUNGLOBULINOK

Immunglobulinok

A B-sejtekben termelődnek és a szervezetben a humorális immunválaszban vesznek részt. Minden egyes immunglobulin-molekula négy polipeptidláncból épül fel, amelyek egymáshoz kovalens diszulfidkötéssel keresztül kapcsolódnak: egy pár nehézláncból és egy pár könnyűláncból áll. A nehézláncoknak öt (γ , α , μ , δ , ϵ), a könnyűláncoknak pedig két típusa ismert (κ , λ). Mindkét lánc típus tartalmaz egy variábilis (V) régiót (antigénfelismerő hely), a Fab fragmentumon belül és egy konstans (C) régiót, nehézlánc esetében az Fc, könnyűlánc esetében az Fab fragmentumon belül. Az immunglobulin-osztályok legfontosabb tulajdonságait a 11-2. táblázat mutatja be.

Az immunglobulin-molekulák nagyfokú változékonyságát a genetikai szinten bekövetkező nehéz- és könnyűlánc-génátrendeződés biztosítja. Sorrendben ez előbb a nehézlánc szintjén történik meg, majd a könnyűláncoknak előbb a két κ génje rendeződik át, és csak azután a λ láncé. Ezzel magyarázható a B-sejtek szintjén a 2:1 kimutatható κ : λ arány.

Újszülöttek szérumban IgA és IgM csak rendkívül kis mennyiségben vagy egyáltalán nem mutatható ki.

Viszont az IgG, amely elsősorban anyai eredetű (placéntán keresztül jut át), nagy koncentrációban mérhető, szintje születés után azonban csökkenni kezd. Az immunglobulinok koncentrációja fokozatosan emelkedve éri el az egészséges felnőttre jellemző értéket.

Az immunglobulinok szintézisének két fontos eltérése van:

- Hypogammaglobulinaemiával járó csökkent szintézis.
- Hypergammaglobulinaemiát eredményező túltermelés.

Az immunglobulin-termelés csökkenésének oka lehet veleszületett vagy szerzett. Veleszületett hiányos állapotban egy vagy több immunglobulin-osztály vagy -alosztály termelődése zavart szenvedhet. Ennek eredményeként ezek a gyerekek sokkal fogékonyabbá válnak a különböző fertőzésekre. A felnőttkorban jelentkező immunglobulinszintézis-zavarok általában más betegséghez társulva jelentkeznek; így pl. lymphomák, myeloma multiplex, gyógyszerek, toxinok hatására, fehérjevesztéses állapotokban fordulnak elő.

Az immunglobulinok túltermelődése lehet diffúz és diszkrét.

Diffúz hypergammaglobulinaemiában egy betegség (pl. fertőző betegség, májbetegség, autoimmun betegség) váltja ki a nagyszámú B-sejt-klón által termelődő immunglobulin-szaporulatot, a prezentálódó antigének sokaságát. Ilyen esetben tehát nagyszámú különböző tulajdonsággal, primer szerkezettel és fi-

11-2. táblázat. Az immunglobulin-osztályok fő tulajdonságai

Tulajdonság	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
nehézlánc	γ	A	μ	δ	ϵ
nehézlánc-alosztályok	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_1, α_2	μ_1, μ_2	nincs	nincs
molsúly (kDa)	~ 150	~ 150–400	~ 900	~ 175	~ 190
J lánc	nincs	Van	van	nincs	nincs
szérumkoncentráció (g/l)	8,0–18	1,1–5,0	0,6–2,2	< 0,03	< 0,02
félélettípus a szérumban (nap)	21	6	10	3	2
komplementaktiváció	igen	ritkán	igen	nem	nem
opszonizáció	igen	gyenge	nem	nem	nem
anaphylaxia	nem	nem	nem	nem	igen

zikai kémiai tulajdonsággal rendelkező specifikus antitestmolekula keletkezik, amelyek különböző vagy ugyanabba az immunglobulin-osztályba sorolhatók. A szérumfehérje-elektroforetogramon ez elmosódott széles sáv képében jelentkezik a γ -frakció területén, és *poliklonális gammopathiának* nevezzük. Poliklonális gammopathiával járnak együtt az akut és krónikus fertőzések és gyulladásos megbetegedések, májbetegségek, autoimmun folyamatok és a szisztémás malignus megbetegedések.

Diszkrét hypergammaglobulinaemiában az anti-gén-„felismerés”, szempontjából, szerkezetileg és funkcionálisan egyforma immunglobulin-molekula és/vagy töredéke termelődik nagy mennyiségben. Ezt *monoklonális proteinnek* (M-protein, régi elnevezése paraprotein) nevezzük, ami myeloma multiplexben, Waldenström-macroglobulinaemiában és más lymphoproliferatív betegségben fordul elő. Monoklonális szintézisük eredményeként minden egyes M-protein csak egyetlen immunglobulin-osztályba, -alosztályba, allo-típus osztályba és lánc típusba tartozik. Az M-proteinek szerkezete általában a normális immunglobulinéhoz hasonló. A szérum- és vizeletfehérje-elektroforetogramon az M-protein-molekulák egyformasága egy éles, keskeny alapú, diszkrét csík formájában jelentkezik. Denzitometriás értékelés után az *extrafrakció* neve *M-protein*, *M-gradiens*, ill. *M-csúcs*. Mobilitás szempontjából az α -frakciótól a γ -frakció végéig lehetnek jelen. Legtöbb esetben rajta kívül normál poliklonális immunglobulin is kimutatható. Azokat a betegségeket, amelyek monoklonális immunglobulin termeléssel, így M-gradiens jelenlétével járnak együtt, *monoklonális gammopathiáknak* vagy *plazmasejt-dyscrasiáknak* nevezzük. Hátterükben egy immunkompetens B-sejt ellenőrizetlen, néha tumoros szaporodása áll.

Immunfixációs elektroforézissel való tipizálás után az M-protein a következőképpen jelenhet meg:

- Egy osztályba és egy típusba tartozó monoklonális immunglobulin, pl. IgG κ , IgA λ stb.
- Egy típusú monoklonális szabad könnyűlánc, pl. κ vagy λ (szérumban meghatározva szabad könnyűlánc, vizeletben Bence–Jones-fehérje az elnevezése).
- Szabad nehéz- (H-) lánc vagy F_c -rész, pl. α , γ és μ lánc vagy F_c fragmens.
- Különböző monoklonális immunglobulinok: bi-, tri- és multiklonális gammopathia.

Malignus monoklonális gammopathiát okozó B-sejt-dyscrasiák:

- Plazmasejt eredetű (myeloma multiplex, soliter csontplasmocytoma, extramedullaris myeloma).
- IgM-et termelő lymphoplasmocytás sejtek (Waldenström-macroglobulinaemia).
- B-sejt eredetű (krónikus lymphocytás leukaemia, hajás sejtes leukaemia).
- Könnyűláncot termelő B-sejtek, amelyek amyloid formájában kicsapódhatnak.

A benignus vagy premalignus monoklonális gammopathiákat *MGUS* (monoclonal gammopathies with undetermined significance, *monoklonális gammopathiák nem meghatározott jelentőséggel*) néven ismerjük. Ezekben az esetekben is jelen van az M-protein, de myelomára vagy B-sejt-malignitásra utaló tünetek nincsenek. Fontos tudni, hogy milyen tünetek megjelenésekor ajánlatos a beteget monoklonális gammopathia irányába kivizsgáltatni. A teljesség igénye nélkül ezek a következők: megmagyarázhatatlan hátfájdalom, osteolyticus góccok, osteopenia röntgenfelvételen, gyengeség, fáradékonyság, anaemia, hypercalcaemia, veseelégtelenség, Bence–Jones-fehérje ürítése, gyakori bakteriális fertőzések, megmagyarázhatatlan érző-motoros perifériás neuropathia, paraesthesia, nagyfokú súlyvesztés, elsősorban ha a beteg 50 évesnél idősebb.

Az immunglobulinok vizsgálati lehetőségei

Kvantitatív meghatározás:

- Nefelometria.
- Turbidimetria.

Immunglobulin-osztályok és -alosztályok mérése: IgA (IgA₁, IgA₂), IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), IgM.

Teljes könnyűlánc-mérés: κ , λ (κ/λ arány)

Szabad könnyűlánc (FLC) mérés: κ , λ (κ/λ arány).

Kvalitatív meghatározás:

- Szérumfehérje elektroforézis (SPE).
- Immunelektroforézis (IE).
- Immunfixáció (IFE).
- Vizeletfehérje elektroforézis (UPE).
- Vizeletfehérje immunfixáció (UPI).

Az immunglobulin-mérési eredmények kiadásánál és interpretálásánál mindig figyelembe kell vennünk,

hogy megnövekedett szintézis esetén mono-, oligo- vagy poliklonális termelődésről van-e szó. Az IgG, az IgA és az IgM mennyisége a legtöbb fertőző betegségben nem emelkedik 150–200%-nál többet a referencia középértékéhez viszonyítva, kivételt képez néhány autoimmun betegség és vírusinfekció, ahol 200–400%-kal is nagyobb lehet.

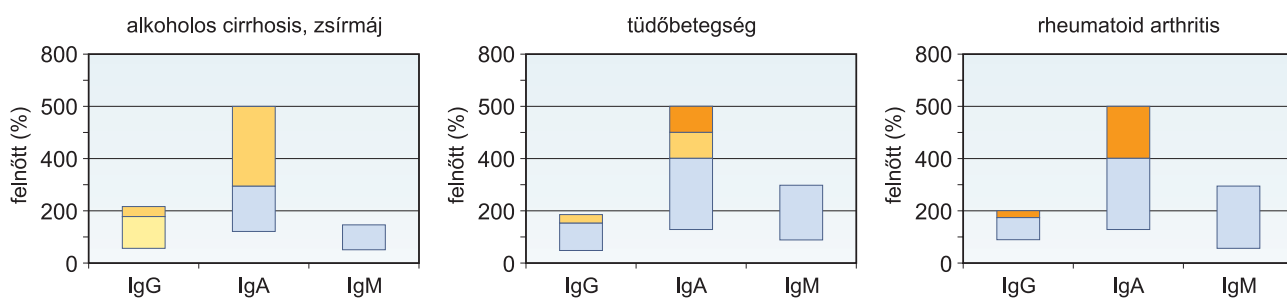
Szelektív IgA-szint-emelkedés fordulhat elő a következő betegségekben:

- légúti infekciók,
- pneumonia és más tüdőmegbetegedés,
- ízületek megbetegedései (rheumatoid arthritis),
- a béltraktus gyulladásos megbetegedései,
- alkohol indukálta májbetegség, pl. zsírmáj, cirrhosis (11-3. ábra).

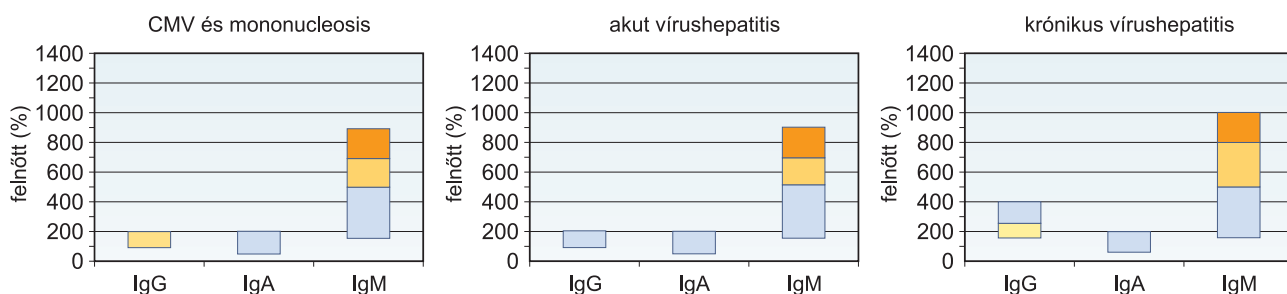
Szelektív IgM-szin-emelkedés fordulhat elő a következő betegségekben:

- vírusinfekciók pl. hepatitis, mononucleosis, citomegalovírus-fertőzés (CMV),
- malária,
- trypanosomiasis,
- biliaris eredetű májbetegség – primer biliaris cirrhosis (PBC) (11-4. ábra, 11-5. ábra).

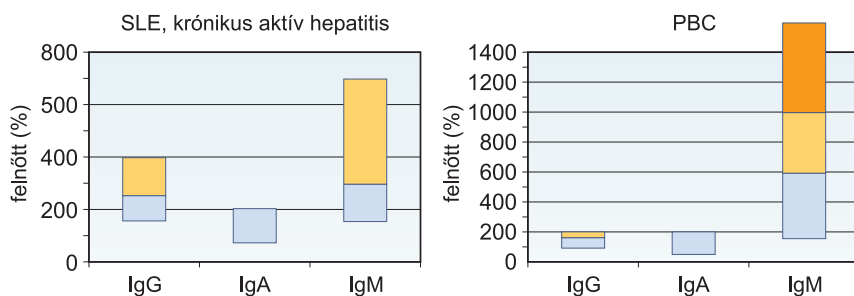
Monoklonális gammopathia gyanújakor a laboratóriumi kivizsgálás során mindig célszerű egy diagnosztikai algoritmust követni. Ezt az algoritmust a 11-6. ábra mutatja be. A monoklonális gammopathiák besorolása, ill. diagnosztikai kritériumai is változtak az utóbbi időben.



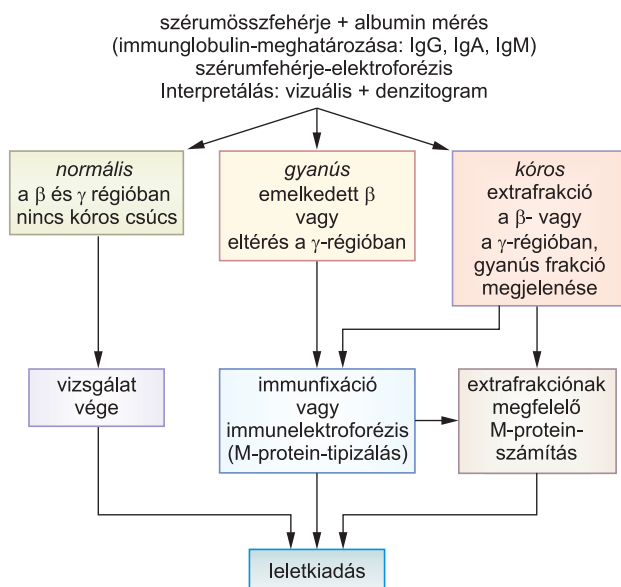
11-3. ábra. Szelektív IgA-szintézissel járó megbetegedések (100% – IgG: 10 g/L, IgA: 2,0 g/L, IgM: 1,0 g/L)



11-4. ábra. Szelektív IgM-szintézissel járó megbetegedések I. (100% – IgG: 10 g/L, IgA: 2,0 g/L, IgM: 1,0 g/L)



11-5. ábra. Szelektív IgM-szintézissel járó megbetegedések II. (100% – IgG: 10 g/L, IgA: 2,0 g/L, IgM: 1,0 g/L)



11-6. ábra. Monoklonális gammopathia kivizsgálásának laboratóriumi algoritmusai

Amennyiben a lelet negatív, de a tünetek alapján továbbra is fennáll a gyanú, ajánlott koncentrált reggeli első vizeletből vizeletfehérje-elektroforézist, ill. immunfixációt végezni az esetleges Bence–Jones-fehérje kimutatására, a szérumból pedig szabad könnyűlánc mérés végezhető

A monoklonális gammopathiák új besorolása a következő:

1. Monoklonális gammopathia nem meghatározott jelentőséggel (MGUS).
2. Aszimptomás myeloma multiplex.
3. Szimptomás myeloma multiplex.
4. Nem szekretoros myeloma multiplex.
5. Csont solitaer plasmocytoma.
6. Extramedullaris plasmocytoma.
7. Többszörös solitaer plasmocytoma.
8. Plazmasejtes leukaemia.

Az International Myeloma Working Group 2005-ös ajánlásai

Myeloma multiplex diagnosztikai kritériumai a következők:

1. M-protein jelenléte a szérumban és/vagy a vizeletben.
2. A csontvelőben klonális plazmasejtek vagy plasmocytoma jelenléte.
3. Társuló szöveti és szervi károsodás (célszervkárosodás, beleértve a csontlaesiókat).

Nem szekretoros myeloma diagnosztikai kritériumai:

1. M-protein nem mutatható ki immunfixációval a szérumban és/vagy a vizeletben.
2. Csontvelő klonális plazmasejt-szaporulat > 10% vagy plasmocytoma jelenléte.
3. Társuló szöveti és szervi károsodás (célszervkárosodás, beleértve a csontlaesiókat).

Aszimptomás myeloma diagnosztikai kritériumai:

1. M-protein > 30g/l a szérumban és/vagy a vizeletben.
2. Csontvelő klonális plazmasejtszám > 10%.
3. Nincs társuló szöveti és szervi károsodás (célszerv, beleértve a csontlaesiókat) és tünetei.

MGUS (monoclonal gammopathies with undetermined significance) diagnosztikai kritériumai:

1. M-protein a szérumban < 30 g/l.
2. Csontvelő klonális plazmasejtszám < 10% és alacsony plazmasejt-infiltráció csontvelő-biopsziával (ha készült).
3. Nem igazolható más B-sejtes lymphoma.
4. Nincs myeloma asszociált szervkárosodás (célszerv, beleértve a csontlaesiókat is).

A célszervkárosodás kritériumai myeloma multiplexben (CRAB: calcium, renal, anaemia, bone):

1. A kalciumszint emelkedése 0,25 mmol/l-rel nagyobb, mint a referenciatartomány felső határa vagy > 2,75 mmol/l.
2. Veseelégtelenség: szérumkreatinin-szint > 173 μmol/l.
3. Anaemia: hemoglobin 20 g/l-rel kisebb, mint a referenciatartomány alsó határa vagy < 100 g/l.
4. Csontlaesiók: litikus laesio vagy osteoporosis kompressziós töréssel (MR- vagy CT-vizsgálattal).
5. Más: hiperviszkozitás, amyloidosis, rekuráló bakteriális infekció (> 2/év).

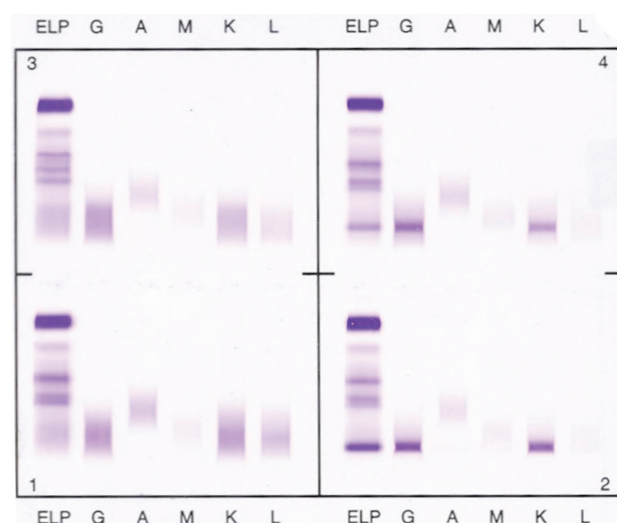
A felsorolt diagnosztikai kritériumok mellett egy laboratóriumi ajánlást is létrehozta. Ennek alapján monoklonális gammopathia gyanúja esetén először a szérumszfehérje-elektroforézis (SPE) elvégzése javasolt. Ennek kimutatási érzékenysége 1,0–2,0 g/l között van. Azonosítani lehet vele minden intakt immunglobulin termelő myelomát. Azonban nem képes azonosítani a könnyűlánc myelomások 30%-át, az amyloidosisos betegek 50%-át valamint a nem szekretoros myelomások

kat. Következő lépésben a szérumfehérje elektroforézis mellett elvégezzük az immunfixációs elektroforézist (IFE) is. A módszer kimutatási szenzitivitása 0,15–0,5 g/l között van, azonban még így sem lehet beazonosítani minden könnyűlánc myelomást, az amyloidosis 30%-át, valamint a nem szekretoros myelomásokat. Harmadik lépcsőben elvégezhetjük a vizelet fehérje elektroforézist és immunfixációt Bence–Jones-fehérje kimutatásra (UPE) A teszt Bence–Jones-fehérje iránti kimutatási érzékenysége 0,01–0,05 g/l. Ennek következtében képes 30 %-kal több könnyűlánc-myeloma és az amyloidosis nagy részének kimutatására. Negyedik lépcsőben ajánlott a szérum és vizelet szabad könnyűlánc mérés (FLC). Segítségével kiszűrhetünk minden könnyűlánc myelomás beteget. Kimutatási érzékenysége ellenére önmagában nem alkalmazható, mivel teljes immunglobulint nem mutat ki; MGUS és intakt immunglobulint termelő myelomában sincs mindig könnyűlánc termelés. A különböző laboratóriumi tesztek kimutatási érzékenységét a 11-3. táblázat mutatja be.

Immunfixációs elektroforézis (IFE)

Az IFE segítségével lehetővé válik az M-proteinok osztályozása és tipizálása. A fehérjéket általában agarózgélben választják el töltésüknek és nagyságuknak megfelelően (0,8% agaróz és trisz-barbitál puffer pH 9,1). Ezután következik az elválasztott fehérjék immunprecipitációja (fixációja) monovalens antihumán emlős immunglobulinok segítségével. A nem precipitálódott fehérjéket mosással és leitatással eltávolítjuk. Végül a kicsapódott immunkomplexeket festéssel (pl. savanyú viola) tesszük láthatóvá. A 11-7.

ábrán egy immunfixációs lemezt mutatunk be. Egy lemezre négy beteg mintáját tudjuk felvinni. A fehérjéket minden beteg esetében 6 sávban választjuk el. Az első szérumfehérje-elektroforetogram marad, mivel erre nem rétegezzük immunglobulint, elválasztás után ebben a sávban fixáljuk a fehérjéket. A következő sávok esetében a szérumfehérje-elválasztás után sorrendben IgG, IgA, IgM, κ és λ könnyűlánc konstans régiója ellen termelt antitestet rétegezzük. Az immunfixációs lemez értékelésekor először az elektroforetogramsávban keresünk esetleges eltérést, ami általában éles, jól körülhatárolt csík (extrafrakció/extrafrakciók) formájában jelentkezik. M-protein jelenlétében ezzel azonos magasságban a nehéz- és könnyűláncok sávjának valamelyikében az éles, jól körülhatárolt csík szintén megjelenik; pl. a 11-7. ábrán a 2-es és a 4-es számú beteg esetében IgG κ tí-



11-7. ábra. Immunfixációs elektroforetogramok

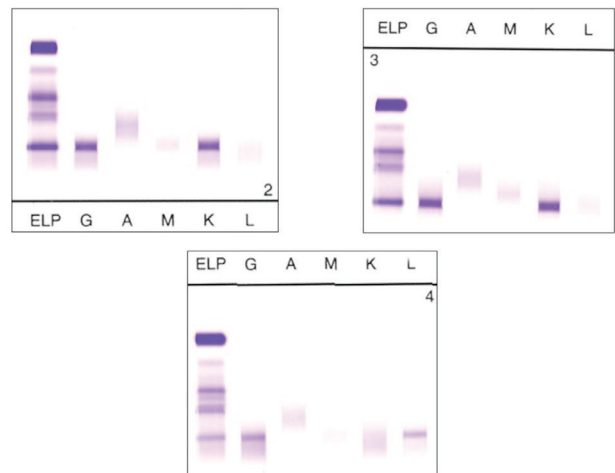
11-3. táblázat. Különböző laboratóriumi tesztek diagnosztikus érzékenysége myeloma multiplexben

Teszt	Myeloma	AL amyloidosis	MGUS
	%		
SPE	90	50	45
SPE + se-IFE	95	70	80
SPE + UPE	95	75	70
SPE + UPE + se- és vizelet-IFE	97	90	80
FLC	96	95	65
SPE + FLC	99	98	85
SPE + FLC + IFE	99	99	100

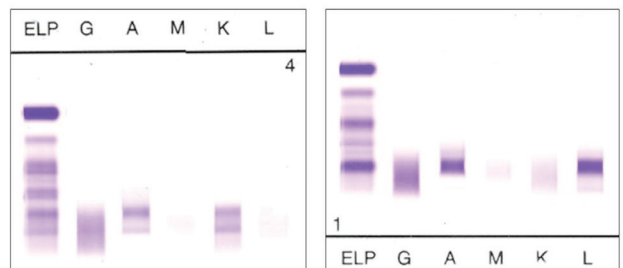
pusú monoklonális M-protein látható. Az M-protein γ -frakción belüli pontosabb elhelyezkedésének megadása érdekében a γ -frakciót három részre osztottuk fel. A β -frakcióhoz közel eső részt gyors γ -régiónak, a γ -frakció középső részét középső γ -régiónak, a katódhoz közel elhelyezkedő γ -frakció részt pedig lassú γ -régiónak neveztük el. Így az immunfixációs eredmény kiadásakor nem csak az M-protein típusát, hanem annak γ -frakción belüli pontos elhelyezkedését is megadjuk. A 11-7. ábra 2-es és 4-es számú betegének esetében tehát IgG κ típusú M-protein mutatható ki a lassú γ -régióban a szérumfehérje-elektroforetogramon megjelenő extrafrakciónak megfelelően. Az M-protein pontos helyének megadása elsősorban csontvelő-transzplantáción átesett betegek kezelésében fontos, az esetleges recidíva minél hamarabbi kiszűrése érdekében. Poliklonális gammopathiában a különböző sávokban a precipitációs zóna diffúz, elmosódott emelkedése látható (11-8. ábra). Normál immunfixációs kép szintén elmosódott a precipitációs régióban, mennyiségi elváltozás nélkül (11-7. ábra 1-es és 3-as számú beteg).

A következőkben néhány tipikus példával illusztráljuk az immunfixációval osztályozott monoklonális gammopathiákat. A 11-9. ábrán IgG κ (2-es és 3-as számú beteg), valamint IgG λ (4-es számú beteg) típusú monoklonális M-protein látható. A 11-10. ábra egy IgA κ (4-es számú beteg), valamint egy IgA λ (1-es

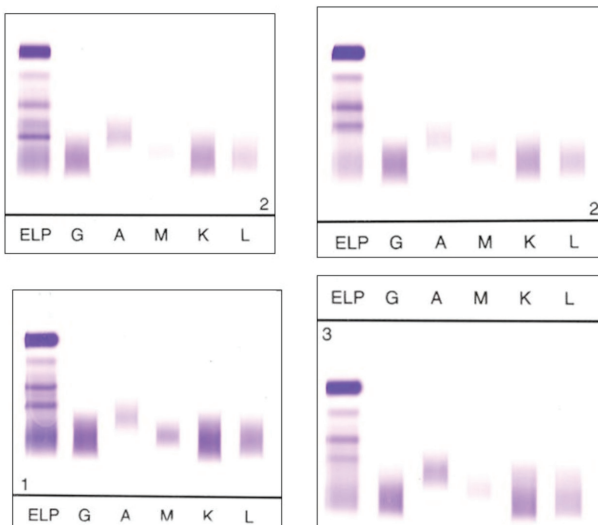
számú beteg) típusú monoklonális M-proteint mutat be. IgM κ típusú monoklonális M-proteineket szemlélte a 11-11. ábra. Előfordul, hogy a kóros plazma-sejtklón a komplett nehézláncból álló M-proteinen kívül szabad könnyűláncot is termel. Ilyen esetben a szabad könnyűlánc a könnyűláncok variábilis régiója ellen termelt monovalens antitestek segítségével mutatható ki. Ezek normál körülmények között, amikor a könnyűlánc a nehézláncsal összeszerelve található, az antitest számára nem hozzáférhetők. A 11-12. ábra



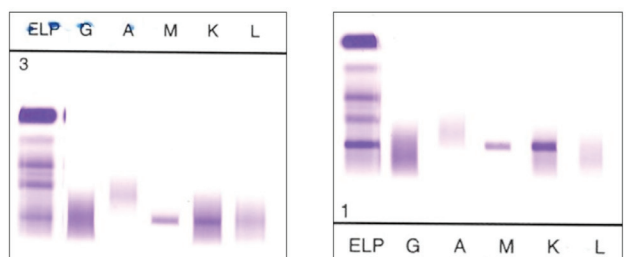
11-9. ábra. Monoklonális gammopathia – IgG κ és λ típusú M-proteinek



11-10. ábra. Monoklonális gammopathia – IgA κ és λ típusú M-proteinek



11-8. ábra. Poliklonális gammopathia immunfixációs elektroforetogramja

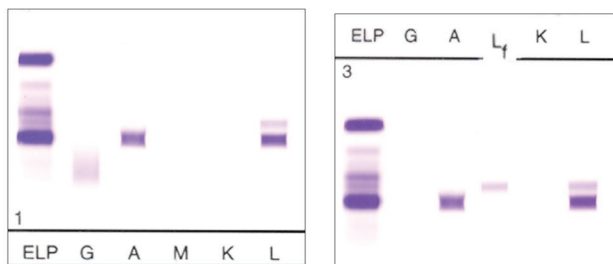


11-11. ábra. Monoklonális gammopathia – IgM κ típusú M-proteinek

egy ilyen beteg immunfixációs lemezét mutatja be. Az első lemezen a β -frakcióban található extrafrakciónak megfelelően IgA λ típusú M-proteint láthatunk. Ugyanakkor az α_2 - és a β -frakció között lévő extrafrakcióval egy magasságban csak a λ -sávban találunk csíkot, a nehézláncok sávjában nem. Felmerül a szabad λ -könnyűlánc jelenlétének a lehetősége, amit a következő lemezen az L_f sávjában alkalmazott szabad λ -könnyűlánc-ellenes antitest használatával igazoltunk.

Az immunfixációs elektroforézis eredményeinek klinikai értékelésénél mindig figyelembe kell vennünk a beteg tüneteit, egyéb laboratóriumi eredményeit és a képalkotó diagnosztika leleteit, mivel számos egyéb nem myeloma multiplexes megbetegedés is járhat együtt monoklonális gammopathiával a következők szerint:

- Bőrbetegségek:
 - scleroderma,
 - pyoderma gangrenosum,
 - necrobioticus xanthogranuloma,
 - discoid lupus erythematosus,
 - psoriasis,
 - cutan lymphoma.
- Immunszuppresszió:
 - AIDS- és HIV-infekció,
 - vesetranszplantáció,
 - csontvelő-transzplantáció.
- Májbetegségek:
 - krónikus hepatitis,
 - cirrhosis,
 - primer biliaris cirrhosis.
- Különböző autoimmun és más megbetegedések:
 - reumatoid arthritis,
 - gyulladásszerű negatív polyarthritis,
 - polymyositis (IgG κ),
 - rheumás polymyalgia,



11-12. ábra. Monoklonális gammopathia – IgA lambda típusú M-protein és szabad lambda könnyűlánc

- myasthenia gravis,
- angioneuroticus oedema.

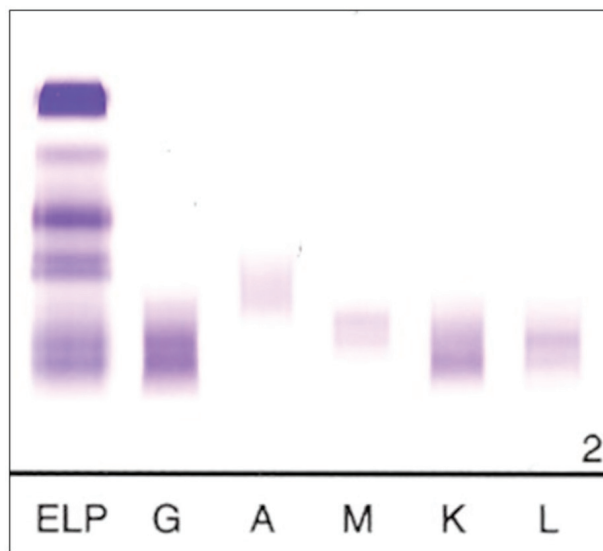
A 11-13. ábrán egy csontvelő-transzplantáción átesett beteg oligoklonális M-proteinek tartalmazó immunfixációs elektroforetogramját mutatjuk be (ún. „zebracsíkos,” mintázat). Mivel a myeloma multiplex laboratóriumi diagnosztikához szervesen hozzátartozik a vizeletfehérjék elektroforézise és immunfixációja is a Bence–Jones-fehérjék kimutatására, röviden vázoljuk ez utóbbi eljárást.

Vizeletfehérje immunfixációs elektroforézise

Az eljárás alkalmas a proteinuria kimutatására és típusának azonosítására, valamint Bence–Jones-fehérjék és teljes immunoglobulin-molekula ürítésének kimutatására. A Bence–Jones-fehérje kimutatási érzékenysége ezzel a módszerrel 0,01–0,05 g/l. A vizeletfehérje-elválasztás lúgosra puffertolt agaró gélen megy végbe. A kilenc (ebből egy vizeletfehérje-elektroforézis) sávban szétválasztott fehérjéket megfelelő antiszérummal fixáljuk. Az oldatban maradt fehérjéket leitatással, mosással eltávolítjuk. A kicsapódott fehérjéket savanyú violával festjük.

A használt antiszérumok az elektroforetikus sávoknak megfelelően:

1. ELP: vizeletelektroforetogram, antiszérum nélkül.
2. Tubularis fehérjék: β_2 -mikroglobulin, retinolkötő fehérje (RBP), α_1 -mikroglobulin.

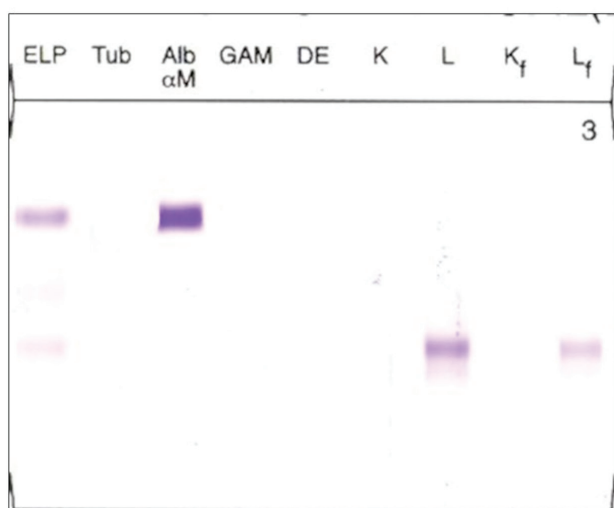


11-13. ábra. Csontvelő-transzplantáción átesett beteg oligoklonális M-proteinjei

3. Glomerularis fehérjék: albumin, α_2 -makroglobulin.
4. GAM nehézlánc: trivalens szérum.
5. DE nehézlánc: bivalens szérum.
6. Szabad és kötött κ -könnyűlánc.
7. Szabad és kötött λ -könnyűlánc.
8. Szabad κ -könnyűlánc.
9. Szabad λ -könnyűlánc.

A proteinuria értékelése itt nem kerül részletezésre, mivel az egy másik fejezetben található. *Bence-Jones*

nes-proteinuriáról akkor beszélünk, ha monoklonális csík jelenik meg a kötött és szabad könnyűláncok sávjának egyikében, míg a trivalens GAM és a bivalens DE sávban nem jelenik meg monoklonális csík. Amennyiben mégis, a beteg a komplett immunglobulin mellett szabad könnyűláncot is ürít. Ha a κ - és/ vagy λ -sávban diffúz zónát látunk, ez poliklonális szabad könnyűláncnak felel meg, nem *Bence-Jones*-protein. A 11-14. ábra egy szabad λ -könnyűláncot ürítő beteg vizelet *immunfixációs elektroforetogramját* mutatja.



11-14. ábra. Vizelet-immunfixációs elektroforetogram – *Bence-Jones*-proteinuria, szabad λ -könnyűlánc-ürítéssel

IRODALOM

- LE CARRER, D.: Serum electrophoresis immunofixation, illustrated interpretations. Editions FM-BIO, Vanves, 2005.
- THOMAS, L. (ed.): Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1998.
- THOMAS, L. (ed.): Protein sin Clinical and Laboratory Medicine. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 2008.
- SMITH, A., WISLOFF, F., SAMSON, D: on behalf of the UK Myeloma forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Hematology: Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma. British Journal of Haematology 132:410–451, 2005.

Kis molekulatömegű fehérjék, peptidek, peptidhormonok kimutatása

KŐSZEGI TAMÁS

A kis molekulatömegű fehérjék jellemzői

A kis molekulatömegű fehérje fogalma

Általánosságban véve az albuminnál kisebb (67 kDa) tömegű fehérjéket, peptideket soroljuk ebbe a csoportba. A beosztás talán önkényes, szerepet játszik ebben az a tény is, hogy a vese filtrációs küszöbe ebbe a tartományba esik. A másik ok az lehet, hogy az albumin monoklonális homogén terméknek tekinthető – legalábbis a translációkor született fehérje esetében – a későbbi poszttranszlációs módosulások nélkül. Az albumin nagy mennyiségben kering a vérplazmában és szintje nagyon állandó. Ugyanez nem mondható el az albuminnál kisebb fehérjéről, peptidekről, hiszen sok biológiailag aktív molekula tartozik ebbe a csoportba és ezek vérszintje a szervezet mindenkori általános állapotától, válaszreakcióitól függ. Ez a molekulacsoport mind szerkezetét, mind funkcióját tekintve igen heterogén, és ugyanez igaz plazmakoncentrációjukra is: a néhány g/l-es koncentrációtól kezdve a ng/l értékekig terjedő tartományban találhatók a keringésben. Érthető módon minél nagyobb biológiai aktivitással rendelkezik egy molekula, annál kisebb a vérszintje és rövidebb a biológiai félféletideje. Szintézisük és a sejtéből történő kikerülésük sebessége változó, azonban általánosság-

ban itt is elmondható, hogy a gyors válaszkészséget mutató molekulák biológiai aktivitása fokozott.

A kis molekulatömegű fehérjék jelentősége

A molekulacsalád komponensei szerteágazó biológiai funkciót töltenek be: endokrin hormonok, sejtosztódást serkentő vagy gátló faktorok, az immunválaszt befolyásoló pro- és antiinflammatorikus citokinek, klasszikus akut fázis fehérjék és még sok egyéb biológiai funkcióval rendelkező molekula. Biológiai aktivitásuk nem mindig kedvező a szervezet számára, pl. súlyos bakteriális szepszisben a túlzott erősségű citokinválasz visszafordíthatatlan szervi károsodásokat és septicus shockot idézhet elő, vagy a fokozott katabolizmus következtében a sejtekből kiszabaduló fehérjék (pl. aktin monomerek) tüdőkárosodást okozhatnak, fokozva ezzel a betegség súlyosságát. A molekulacsoport fehérjei hatásukat intracellulárisan, lokálisan és távoli célsejteken keresztül fejtik ki (autokrin, parakrin, endokrin módon). Jó néhány komponens funkcióját kevésbé vagy egyáltalán nem ismerjük. Az utóbbi évtizedben mind több elméleti kutatás és klinikai tanulmány foglalkozik a vérszérumból izolálható kis molekulatömegű peptidekkel és fehérjékkel, mert bizonyos betegségekben a betegekben nyert fehérjék spektruma az egészségesekéhez képest jellegzetes eltéréseket mutat, így vizsgálatuk ígéretes lehet pl. a daganatos folyamatok minél korábbi detektálásában.

A kis molekulatömegű fehérjék csoportosítása

Sokféle csoportosítás lehetséges, pl. molekulaszerkezet, méret, funkció szerint. Legkézenfekvőbbnek a

11-4. táblázat. Kis molekulatömegű fehérjék biológiai szerepük szerinti csoportosítása

Biológiai hatás	A csoport néhány jellegzetes molekulája
proinflammatorikus mediátor	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ
antiinflammatorikus mediátor	IL-4, IL-10, IL-13
sepsismediátor?	prokalcitonin
hidrofób molekulák transzportja, immunválasz	lipokalin molekulacsalád (α_1 savanyú glikoprotein, retinolkötő fehérje stb.)
akut fázis fehérje	α_1 -antitripszin, α_1 savanyú glikoprotein
növekedési faktor	PDGF, EGF, FGF, VGF stb.
endokrin funkció	peptidhormonok

betöltött biológiai szerep szerinti csoportosítás tűnik, de tudnunk kell, hogy a hasonló funkcióval rendelkező molekulák kémiai szerkezetükben lényeges eltéréseket mutathatnak. A legfontosabb csoportokat a 11-4. táblázatban tüntettük fel.

Célszerűnek látszik egy másik szempont szerinti csoportosítás is, ez a beosztás a molekulacsoport klinikai értékelését, jelző (marker) szerepét veszi figyelembe. A markermolekulák sokszor hasznos információt szolgáltatnak egy kóros állapot felismeréséről, lefolyásáról, a kezelés hatékonyságáról vagy egy szerv vagy szervrendszer funkciójáról még akkor is, ha azok biológiai szerepe kevésbé ismert. A 11-5. táblázatban a biológiai marker sajátság szerinti csoportosítást tüntettük fel.

A kis molekulatömegű fehérjék „születése”

Alapvetően kétféle mechanizmust kell megkülönböztetni:

- Szintézis és aktiváció a sejtben és/vagy a sejtén kívül.
- A már kész fehérje degradációja, eliminációja során létrejött fragmentumok keletkezése.

A szintézis – a génátírás és a transzláció – sejtben belül megy végbe, a létrejött polipeptidláncok aminosav-sorrendje megfelel a kódoló génben tárolt információknak. Azonban az így megtermelt peptid, fehérje a legkritikább esetben tölt be azonnal biológiai funkciót, előbb aktiválódnia kell. Az aktiválódásra a sejtben belül vagy az extracelluláris térben kerül sor. Nagyon gyakran a késztermékhez képest az átírt fehérje nagyobb molekulatömegű, az aktiválódás útja ún. limitált proteolízis, kisebb fragmentumok enzimatis lehasítása. Az aktiváció sokszor több lépésben zajlik,

többszörös hasítással, pl. preproinzulin → proinzulin → inzulin, vagy preproBNP → proBNP → NT-proBNP → BNP. A BNP a natriuretikus peptidek családjába tartozik, az agyban és a szívben termelődik (a B az agyra – brain – utal), de vérszintje elsődlegesen a szív bal kamra funkciójától függ. Az aktív hormon a BNP (32 aminosav), amely a pro-BNP-ből hasad le (inaktív molekula az NT-proBNP, 76 aminosav), a kiindulási preprohormon 134 aminosavat tartalmaz. Más aktivációs mechanizmusok is léteznek: foszforiláció, glikoziláció, di- vagy trimerizáció stb.

A fehérjék inaktiválását és eliminációját is általában részleges proteolízis előzi meg, amely után a szérumban a degradációs termékek vagy szabadon keringenek és a vizelettel ürülnek, vagy nem specifikus (pl. albumin), ill. specifikus fehérjekötéssel (pl. szabad aktin-gelzolin) a májban vagy a RES-ben bomlaniuk le építőköveikre.

A kis molekulatömegű fehérjék kimutatási lehetőségei

MÓDSZERTANI MEGKÖZELÍTÉS

A kimutatás irányulhat egy adott molekulatömegű csoportra vagy egy adott konkrét molekulára. Az előbbi esetben általában valamilyen elválasztásos módszert használunk, az utóbbiban a specifikusságot rendszerint a kérdéses fehérje, peptid ellen termeltetett antitest biztosítja. Az antitest alkalmazását össze lehet kötni előzetes szeparálással, pl. elektroforetikus elválasztással, és a detektálni kívánt antigént ezután jelzett antitestkompleksszel tesszük láthatóvá (Western blot, lásd 4. fejezet). Ezen kívül az antitesteket

11-5. táblázat. Kis molekulatömegű fehérjék marker jelleg szerinti csoportosítása

A marker információs értéke	A csoport néhány jellegzetes molekulája
vesefunkció, filtráció	cisztatin C, β_2 -mikroglobulin
sepsis korai diagnózisa, követése	prokalcitonin
tumormarker	fehérje- és peptidhormonok
lehetséges tumormarker	5–30 kDa tömegű peptidek
uraemiás állapot	kis molekulatömegű fehérjék, parathormon
csont-turnover	kollagéndegradációs termékek

felhasználhatjuk immunanalitikai (elterjedt kifejezéssel immunoassay) módszerekben, ahol a specifikus detektálás egyben nagy érzékenységgű mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz. Az antitesteken kívül más, specifikus kötést, molekulaszerkezet-felismerést alkalmazó technika is ismert. Ezekben általában egy szilárd hordozón a detektálni kívánt fehérje valamilyen ligandja vagy a fehérjével kapcsolatba lépő egyéb molekula helyezkedik el, és a rendszeren átáramoltatjuk a mintát, ahol az megkötődik és kimutathatóvá válik (affinitásos elv). Jó példa erre a fehérje-chip technika, ahol egy chipen többféle affinitásos elvet is alkalmazhatunk, és több különböző fehérjét is detektálhatunk egyszerre, egy adott rendszerben. A másik érdekes új módszer a felszíni plazmonhullám rezonancia (surface plasmon resonance, SPR), ahol a szilárd fázis felületén létrejövő kötődés kinetikáját is monitorozhatjuk. A továbbiakban ismertetünk néhány példát mind az előzetes elválasztáson és/vagy előtisztításon, mind az antigén-antitest reakción alapuló kimutatási technikákra.

ELŐZETES FRAKCIONÁLÁST, DÚSÍTÁST ALKALMAZÓ MÓDSZEREK

ULTRASZŰRÉS

Kíméletes, nem denaturáló eljárás, ahol a mintából a nagy molekulatömegű komponenseket molekuláris szűrővel választjuk el a detektálni kívánt, általában kis koncentrációban lévő molekuláktól. Többféle eljárás használatos, de mindegyik lényege, hogy garantált pórusméretű membránon préselik át a mintát nyomáscellában, nitrogéngáz alkalmazásával vagy centrifugában a centripetális erő segítségével. Leggyakrabban 50 kDa pórusméretű membránt alkalmaznak, mert ennek segítségével a szérumban óriási mennyiségben jelen lévő albumin 95 – 98%-a eltávolítható. Léteznek 30, 20, 10, 5, 1 kDa pórusméretű membránok is, a tisztítást akár több lépcsőben is elvégezhetjük fokozatosan kisebb molekulaméretű szűrőt alkalmazva, így jól meghatározott molekulatömegű mintákat kaphatunk és analizálhatunk. A módszer előnye, hogy egyszerű, relatíve gyors, és a kinyert komponensek általában megőrzik biológiai aktivitásukat. A szűrők többször is felhasználhatók. Hátránya az eljárásnak az esetleges gyártási hibából adódóan

vagy a felhasználás során létrejövő sérülés a membránon, amely a szeparálás biztonságát veszélyezteti. Ezen kívül a többszöri használat során – még az előírt tisztítási procedúrák betartásakor is – a fehérjék egy része adszorbeálódhat a membrán felületén és megváltozhat a szűrő áteresztőképessége.

MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIA (GÉLSZŰRÉS)

Szintén nem denaturáló eljárásként alkalmazható egyszerű módszer. A gél pórusméretének megválasztásával végezhetünk ún. sótlanítást vagy puffercserét, ill. kinyerhetjük az analizálni kívánt molekulaméret-tartományt. Az elúció monitorozását 280 nm-en való UV fotometriás detektálással végezhetjük, így a megfelelő molekulaméretű tartomány célzottan összegyűjthető a további analízisekhez.

ACETONITRILES (ACN) KICSAPÁS

Széles körben elterjedt egyszerű módszer a kis molekulatömegű fehérjék, peptidek dúsítására és a nagy mennyiségben jelen lévő nagyobb molekulatömegű szérumfehérjék eltávolítására. A szérumot 1:1 arányban elegyítik ACN-nel, majd centrifugálás után a felülúszót kinyerik és az oldószert elpárologtatják. A beszárított mintát trifluoroecetsavban veszik fel és HPLC oszlopon sótlanítják. Az így nyert eluátum közvetlenül alkalmas a peptidek tömegspektrometriás vizsgálatára.

PERKLÓRSAVAS (PCA) MÓDSZER

PERKLÓRSAVAS (PCA) KICSAPÁS

A rutin kromatográfiás módszereknél általában fehérjementesítésre használt kicsapásos eljárást Intézetünkben dolgoztuk ki a szérum savoldékony fehérjefrakciójának kinyerésére. Rendkívül egyszerű és jól reprodukálható technika, amely alkalmas a savas közegben oldódó molekulacsoport mennyiségi meghatározására és elválasztás, valamint specifikus detektálás után egyedi fehérjék azonosítására. A perklórsav a szérumalbumint majdnem 100%-ban eltávolítja, és a savas közegben az esetlegesen albuminhoz kötődő peptideket is oldatba viszi. Hátránya, hogy erősen denaturáló módszer és csak a pH<2,0 közegben is ol-

datban maradó fehérjefrakció vizsgálatára alkalmas (ez lehet előny is, hiszen valójában szelektív dúsítást jelent).

A módszer kivitelezése:

Reagensek:

- 10 v/v %-os perklórsav vízben.
- 9,13%-os kálium-hidroxid (frissen készítendő).
- *Kicsapás, minta nyerése:*
- Eppendorf-centrifugacsövekben végzik, a minta pl. vérszérum.
- 500 µl szérum + 500 µl 10%-os PCA, vortexelés és inkubálás szobahőmérsékleten 10 percig.
- Centrifugálás 13 000 fordulattal, 3 percig, majd 300 µl felülúszó leszívása új csőbe.
- 300 µl felülúszó + 200 µl 9,13%-os KOH, vortexelés, majd 10 perc állás szobahőmérsékleten, nyitott centrifugacsővel (a képződő gázok eltávolítására).
- Centrifugálás 13 000 fordulattal, 3 percig, 300 µl felülúszó leszívása új csőbe – ez képezi a mintát.

Az eljárással a perklórsav nagy része csapadék formájában eltávolítható és a neutralizált savoldékony frakció alkalmas mennyiségi meghatározásra és fehérje-elektroforetikus vizsgálatokra egyaránt.

MENNYISÉGI MÉRÉSEK

UV abszorbancia. A neutralizált mintát desztillált vízzel 10-szeresére hígítjuk, a fehérjekoncentrációra a peptidkötésre jellemző, 220 nm-en mért abszorbancia alapján következtethetünk. Standardként tisztított bovin albumint használhatunk, amelyet a mintához hasonló módon kezelt, de fehérjét nem tartalmazó közegben oldunk fel. Kvarcküveták és kétsugaras fotométer használata kívánatos, ahol a csatornák közti különbséget levegőre korrigáljuk, a mintát levegővel szemben fotometráljuk. A javasolt albumin standard koncentráció: 20–100 mg/l-es tartomány.

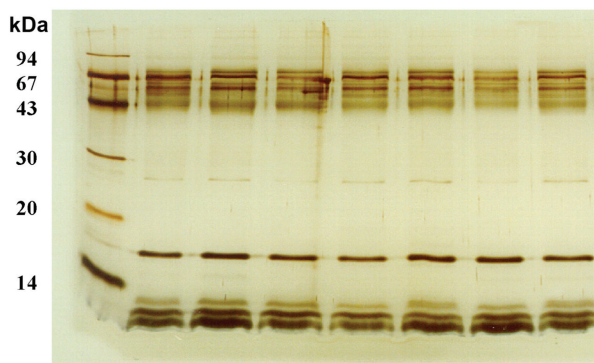
Az UV-fotometriás mérés kivitelezése egyszerű, de a mintában lehetnek 220 nm-en elnyelődést mutató egyéb molekulák is, pl. gyógyszerek, ezért érdemes a fehérjemeghatározást a következő módon is elvégezni:

Festékkötési (Bradford-) reakció. A módszer lényege a Coomassie Brilliant Blue G 250 festék fehérjekötésén alapszik, az abszorbanciát 595 nm-en mérjük (lásd 2. fejezet). A javasolt standard fehérjekoncentráció-tartomány szintén 20–100 mg/l.

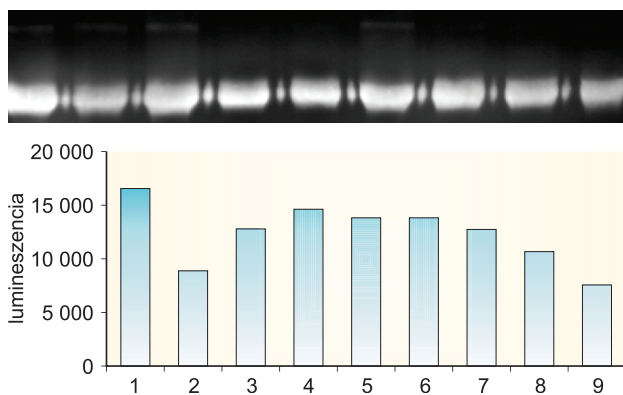
PERKLÓRSAVAS (PCA) KICSAPÁS KOMBINÁLÁSA WESTERN BLOT MÓDSZERREL

A neutralizált minták alkalmasak SDS-PAGE-análízisre is. A LAEMMLI szerinti poliakrilamid-elválasztáshoz a savoldékony frakciókat 5-szörös töménységű mintapufferben vesszük fel a lehető legkisebb hígulás érdekében, az elválasztáshoz 15%-os gélkonzentrációt alkalmazva. A neutralizáláshoz használt kálium-hidroxid miatt a minták még elegendő káliumionot tartalmaznak ahhoz, hogy az szobahőmérsékleten az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) egy részével oldhatatlan csapadékot képezzen. A problémát úgy oldhatjuk meg, hogy futtatás előtt újabb forralást végzünk, és a gélekre a kb. 50 °C-os vízfürdőn tartott mintákat melegen visszük fel. A futtatás után kombinált ezüsfestést alkalmazunk, a parallel gél fehérjeit nitrocellulózmembránra transzferáljuk.

Az itt következő példában saját vizsgálatunkat mutatjuk be. Tejes blokkolást követően α_1 savanyú glikoprotein (AGP-) ellenes nyúl primer antitestet és peroxidázzal jelölt antinyúl IgG-t használtunk, erősített kemilumineszcenciás (ECL) detektálást alkalmazva. A fényreakciót Kodak Image Station 2000R készülékkel fényképeztük le, amely alkalmas a kemilumineszcenciás jel mennyiségi értékelésére. A módszer részleteit lásd a 4. fejezetben. Egy reprezentatív kísérlet eredményét 11-15. és a 11-16. ábrán mutatjuk be. Az első gélen egészséges orvostanhallgatók savoldékony fehérjeinek elektroforetikus mintázata látható. A molekulatömeg-markerek alapján a 67 kDa magasságban alig láthatunk festődést, ami arra utal, hogy albumin a kicsapás során csak nyomokban maradt a



11-15. ábra. Egészséges orvostanhallgatók savoldékony szérumfehérjeinek SDS-PAGE vizsgálata (ezüsfestés; baloldalt a molekulatömeg-markerek láthatók)



11-16. ábra. AGP kimutatása septicus betegek savoldékony fehérje frakciójából (ECL-detektálás; az oszlopdiagram az egyes sávok lumineszcenciaintenzitását mutatja relatív egységben; az ábra felső részén Western blot lumineszcenciaintenzitások 1–9-ig)

mintában. Jellemzően, minden pásztán megtalálható csíkokat látunk a 40–60 kDa és a 20 kDa alatti tartományban. Az AGP-ellenes antitesttel sikerült a 43 kDa-os markerrel azonos magasságban kemilumineszcenciás jelet detektálni. A Western blot analízist septicus betegek mintáiból is elvégeztük.

A kemilumineszcenciás kvantitatív eljárás lehetőséget ad arra, hogy az egyes sávokban detektált fehérje antigén mennyiségeket egymással összevessük. Alkalmazhatunk belső referenciamintát is, pl. kevert sérumból nyert savoldékony frakciót, amelyet minden futtatáskor felviszünk, és a betegek kapott ECL-intenzitásokat a referenciára kapott lumineszcenciára vonatkoztatjuk (*ECL-hányados*). Kísérletünkben a septicus betegek savoldékony frakciójának mennyisége az egészséges kontrollokra mért értékekhez képest 3–5-szörös volt. Ugyanúgy a Western blotra kapott kemilumineszcenciás jelek alapján a betegekben az α_1 savanyú glikoprotein (AGP) mennyisége jelentősen megemelkedett, a mintákban az egyik legmarkánsabb sávot mutatva. A vizsgálatokkal megpróbáltunk a szervezet gyulladásos válaszreakciójára és az általános katabolizmusra jellemző mérhető, reprodukálható markert találni.

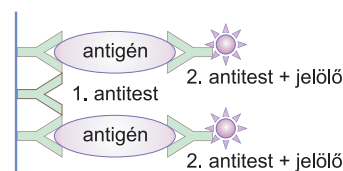
EGYEDI FEHÉRJÉK KIMUTATÁSA IMMUNANALITIKAI MÓDSZERREL (IMMUNOASSAY)

Az immunoassay-kről, az automatizált módszerekről részletesen a 7. fejezetben olvashatnak. Itt egy proinflammatorikus citokin, a TNF- α meghatározásán ke-

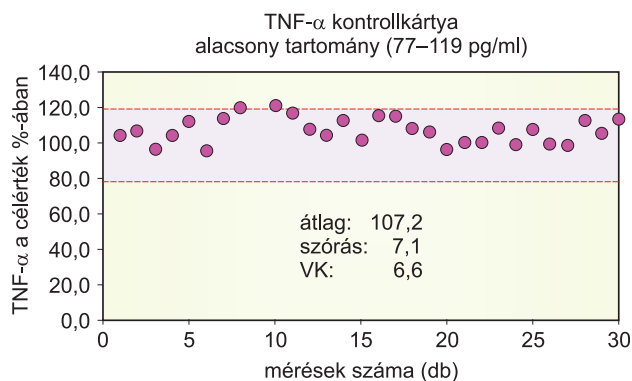
resztül mutatjuk be a kis molekulatömegű peptidok, fehérjék mennyiségi meghatározásának elvét és gyakorlatát.

A polipeptidok rendszerint több antigéndeterminánssal rendelkeznek, ezért az ellenük termelt antitestek különböző epitópokhoz képesek kötődni. Két, egymástól eltérő helyen lévő epitópra specifikus monoklonális antitesttel a vizsgálni kívánt antigén detektálható és mennyisége is mérhető. Az eljáráshoz rendszerint szilárd fázist használnak, amelyhez az első antitestet hozzákötik. A mintával való inkubáció után mosási fázis következik, ezt egy újabb inkubáció követi, valamilyen érzékeny detektálást lehetővé tévő jelölt hordozó (radioaktív izotóp, lumineszcens vegyület stb.) második antitesttel. Ismételt mosás után a szilárd fázis felületén kialakult „szendvicskomplex” jele mérhető, a jel nagysága arányos az antigén mennyiségével (telítési assay). Standardok alkalmazásával az antigén koncentrációja meghatározható. A módszer elvét a 11-17. ábra mutatja.

Jelölőként a nem izotópos módszerek terjedtek el (fluoreszcencia, kemilumineszcencia), amelyek érzékenysége hasonló az izotópot alkalmazó módszerekéhez. Mint minden laboratóriumi vizsgálatnál, az immunoassay-kinél is szükséges a minőség-ellenőrzés, ismert koncentrációjú kontrollok rendszeres mérésével. Az ábrán bemutatjuk a TNF- α automatizált



11-17. ábra. Szilárd fázisú telítési immunoassay elve



11-18. ábra. TNF- α kontrollkártyája, az adatok a célérték százalékában vannak feltüntetve. Immuno kemilumineszcenciás automatizált módszer

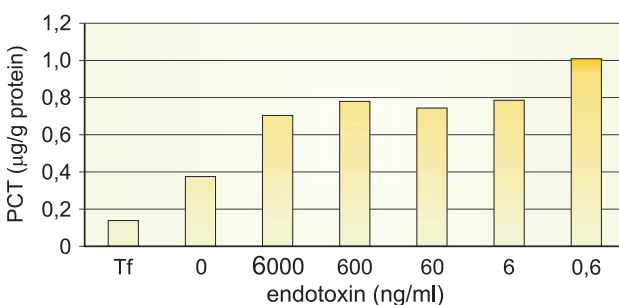
meghatározásának kontrollkártyáját. Az adatok azt mutatják, hogy a TNF- α a pg/ml-es tartományban megbízhatóan mérhető: a sorozatok közti pontatlanság variációs koefficiense 6,6%, az átlagos eltérés a célértéktől +7,2% (11-18. ábra).

INTRACELLULÁRIS POLIPEPTID KIMUTATÁSA SZÖVETTENYÉSZETI SEJTEKBŐL

Procalcitonin (PCT)

A procalcitonin mint a kalcitonin prohormonja egészségesek vérésszérumában a kimutathatósági határ körül mozog. Körülbelül 10–15 éve fedezték fel, hogy szisztémás bakteriális és gombás fertőzéseknél (szepszis) a PCT szintje a vérben sokszorosára emelkedik. Az egyik leghatékonyabb stimulusnak az endotoxint találták, endotoxinexpozíció után már 4 óra múlva szignifikáns PCT-emelkedést regisztráltak. Ma a PCT szérumszintjének mérése a szepszis felismerésében az egyik legkorábbi és legmegbízhatóbb laboratóriumi marker. A nagyszámú irodalmi adat ellenére nem teljesen ismert a PCT fokozott kiáramlásának szöveti lokalizációja. A kérdés lehetséges megválaszolására mutatjuk be az Intézetünkben Hep G-2 májsejtkultúrán végzett kísérletünket.

A vizsgálathoz monolayer sejtkultúrákat különböző koncentrációjú, a tenyésztő médiumban oldott endotoxin révén expozíciónak tettük ki. A 24 órás inkubáció után a sejteket mostuk és lizáltuk 0,1% Triton-X 100-at tartalmazó PBS-sel. A lizátumok fehérjetartalmát meghatároztuk (BRADFORD szerint), majd a mintákból lumineszcenciás szendvics immunoassayvel mértük a procalcitonin mennyiségét. A PCT-t a sejtek fehérjetartalmára vonatkoztattuk ($\mu\text{g/g}$). Eredményeink a 11-19. ábrán láthatók.



11-19. ábra. Hep G-2 sejtek PCT-válasza endotoxinexpozícióra (Tf: tápfolyadék, az endotoxin a tenyésztő médiumban lett feloldva)

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a máj a PCT-válasz egyik lehetséges szöveti lokalizációja lehet. A paradoxnak tűnő fordított arányosság (endotoxin:PCT) okát egyelőre nem ismerjük.

*

A kis molekulatömegű szérumfehérjék óriási palettája áll rendelkezésre a laboratóriumi diagnosztikában és a kutatásban. Ez a terület az analitikai módszerek finomodásával egyre több lehetőséget ad a patofiziológias folyamatok jobb megértésére és a betegségek minél korábbi diagnosztikájára.

IRODALOM

- BUIJS, J., FRANKLIN, G. C.: SPR-MS in functional proteomics. http://www.google.hu/search?source=ig&hl=hu&rlz=1G1GGLQ_HUHU408&=&q=Jos+Buijs+and+Gary+C.+Franklin&btnG=Google+keres%C3%A9s&aq=&oq
- FLOWER, D. R.: The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318:1–14, 1996.
- KÖSZEGI T., KÉRI Gy., MOLNÁR Zs. és mtsai: Szisztémás fertőzés monitorozása a szérum procalcitonin szint és a keringő kismolekulású fehérjék analízisével. *Focus Medicinæ* 2:38–43, 2000.
- KÖSZEGI, T.: Immunoluminometric detection of human procalcitonin. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53(1–3):157–164, 2002.
- LEE, P.-S., PATEL, S. R., CHRISTIANI, D. C. et al.: Plasma Gelsolin Depletion and Circulating Actin in Sepsis – Pilot Study. *PLoS ONE* 3(11):e3712.
- LIU, C., WANG, H., PAN, C. et al.: Serum protein fingerprint of patients with gastric cancer by SELDI technology. *African Journal of Biotechnology* 9(15):2298–2304, 2010.
- MERRELL, K., SOUTHWICK, K., GRAVES, S.W. et al.: Analysis of Low-Abundance, Low-Molecular-Weight Serum Proteins Using Mass Spectrometry. *J. Biomol. Tech.* 15(4):238–248, 2004.
- MOORE, D. F., ROSENFELD, M. R., GRIBBON, P. M. et al.: Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* 21(1):69–82, 1997.
- TIRUMALAI, R. S., CHAN, K. C., PRIETO, D. A. et al.: Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Mol. Cell Proteomics* 2:1096–1103, 2003.
- Purification of Serum Peptides for Biomarker Research with Amicon Ultra Centrifugal Filters (<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/6djfqfn>)

Sejtes elemek differenciálása: flow citometria – Bevezetés a flow citometriába

MAGYARLAKI TAMÁS

Definíciók és célkitűzések

A *flow citometria* (FCM) vagy *áramlási citometria* igen hatékony mérés technika, amellyel heterogén összetételű sejtpopulációkban lévő egyedi sejtek multiplex paramétereit mérhetjük. A flow citométerek (az áramlási citométerek) sokféle szerepkörben alkalmazhatók: immunfenotipizálásban; sejtszámlálásban (volumetriás vagy mikrogöngyös módszerrel); DNS-ploiditás és funkcionális marker vizsgálatokban (pl. daganatos sejtek in vitro multidrog-rezisztencia vizsgálatában, növekedési faktor, ill. citokinreceptor-expresszió kimutatásban stb.). Az expresszió mérésére az ún. átlag fluoreszcencia (mean fluorescent intensity, MFI) értéket alkalmazzuk, amely a sejtek „egészséges” vagy „kóros” állapotát hivatott kimutatni. Az áramlási citometria során olyan mérést végzünk, melynek során másodpercenként több ezer sejt egymást követve keresztezi a lézervény útját, és a keletkezett szórt fényt minden egyes sejtről egyenként tudjuk begyűjteni analízis céljára. Ennyi adatot természetesen csak számítógép segítségével lehet begyűjteni és FCM analízis szoftver segítségével statisztikailag elemezni. Az adatokból nyert eredmények információt adnak a következőkről:

- A vizsgálati minta egyes sejtjeinek és összességüknek mérete (*size*).
- A sejtek belső összetettsége (*complexity*).
- Sejfelszíni fehérjék (*phenotype*).
- Esetenként a sejt- vagy sejtfelszíni fehérjék működéséről, ill. állapotáról (*functional expression*).

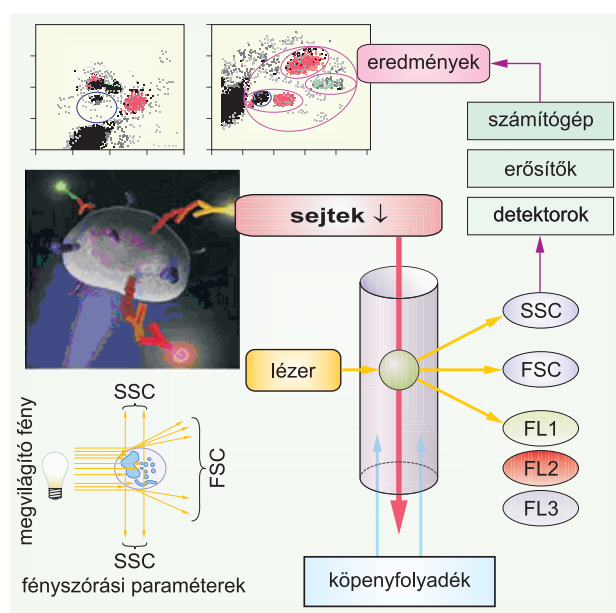
E rövid ismertetőben áttekintjük, hogyan is működnek az áramlási citométerek? Hogy detektáljuk a sejtekről érkező különböző szórt fénytípusokat (*forward scatter*: FSC; *side scatter*: SSC; *fluorescent scatter*: FL) a készülék különböző optikai csatornáin. Miként lehet kezelni a keletkezett rengeteg adatot? Hogyan is vizsgálhatók *specifikus fehérjék egyedi sejtekhez kötöt-*

ten az FCM segítségével a kutató és klinikai laboratóriumi munkákban?

Műszeres áttekintés

A 11-20. ábrán sematikusan mutatjuk be a flow citométer elsődleges rendszerét, az egyes alkotórészeket. az alábbiak:

- *Folyadékrendszer* (centrális csőszerű alkatrész a függőlegesen beinjektált sejtekkel és a *köpeny folyadékkal*). Ez a rendszer hivatott biztosítani a minta sejtjeinek átfolyását („hidrodinamikai fókuszálás”) úgy, hogy e sejtek külön-külön is mérhetők legyenek (innen származik az áramlási citométer név is!).
- *Lézerek*, a látható- és fluoreszcens fény forrásaaként.
- *Optika*, amely összegyűjti és elvezeti a látható a fluoreszcens fényt.
- *Detektorok*, amelyek fogadják az egyes fénynyalábokat.
- Elektronikai és perifériás *számítógéprendszer* (a komputer alakítja át a detektorokról jövő szignálokat digitalizált adatokká, és ez végzi a szükséges elemzést is).



11-20. ábra. Az áramlási citometria (FCM) működésének elve

(IP: centrális zöld pont, sejtek, köpeny folyadék; FSC: forward scatter, előreszórás; SSC: side scatter, oldalszórás; FL1, FL2, FL3: fluoreszcens csatornák)

A „találkozási pont” (*interrogation point*, IP) alkotja a rendszer „szívét”. Ez az a pont, ahol a minta sejtjei találkoznak a lézersugárral (a lézer a sejteket tartalmazó folyadékáramot 90°-ban merőlegesen éri!). Az ütközésből keletkező látható és fluoreszcens fényszórást az optika gyűjti be.

A legtöbb flow citométerben a beinjektált sejtes mintákat az áramló sheath-folyadékkal vagy fiziológiás sóoldattal fókuszálják kb. egy sejtsorátmérőnyi széles sejtáramra, ezzel megelőzve a „sejttorlódást” és a gyakori kapillárisdugulást.

Nézzük, hogy milyen *mérettartományban* tudunk az FCM-mel mérni? Az FCM-ek általában 3 nagyságrendnyi részecskeméretben képesek mérésekre: a legtöbb FCM hematológiai és immunológiai applikációban az 1–15 µm-es vérsejttartományban működik (PLT: 2–4 µm, RBC: 6–7 µm, lymphocyt (Ly): 8 µm, granulocyt (Gran): 12 µm, monocyt (Mo): 14 µm). Azonban speciális igények esetén kisebb tartományban (baktériumok: 0,5 µm, mikropartikulumok vagy mikrovezikulumok: 0,1–1 µm) vagy nagyobb mérettartományban (tumorsejtvonalak: 20–50 µm, blastocysta: 100 µm) is mérhetünk.

Az egyes sejtek lézeres vizsgálata

Az FCM módszer alkalmas az egyes sejtek folyadékáramban lézerral való vizsgálatára: *amint egy-egy sejt áthalad a lézer előtt, a fény fel-felvillanva töredezik/ szóródik a tér összes lehetséges irányában:*

Forward scatter (FSC)

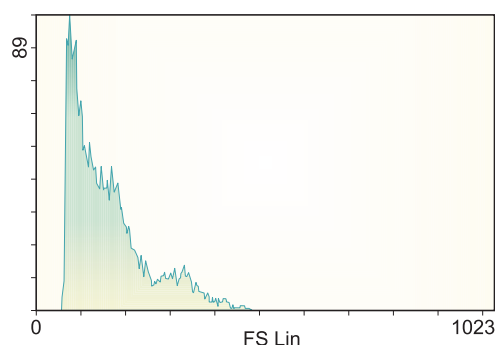
Előre történő (pontosabban 0° körüli) szórás az a fénypászta, amelyet az előről (a „lézerral szemben”) detektálunk. Az FSC nagysága arányos a sejt nagyságával, így a FSC paramétert a sejtnagyság mérésére tudjuk alkalmazni. De hogyan lehetséges a „lézerral szemben” sejt eredetű fényszórást mérni? Az FSC fényt az *FSC-detektor* felfogja, majd a fényintenzitást elektromos feszültségimpulzussá alakítja. A legtöbb FCM-ben a detektort a lézerfény direkt hatásától az ún. *obscuration bar* (OB) védi, amelyet közvetlenül az FS-detektor elé helyeznek. Az OB részlegesen befedi az FS-detektor elülső központi részét, megvédve azt a közvetlen lézersugárzástól. Amint az FS lézerfény eléri az F-detektort, a fény az OB körül (alacsony fokban, 2–3°) szóródik, így kizárólag a sejtekről származó

szórt fény kerül mérésre. Mivel a kis sejtek kisméretű, a nagy sejtek nagyméretű FSC feszültségimpulzust keltenek, ezért a regisztrált feszültségimpulzusok arányosak az átfolyó sejtek méretével. Ha ezt egy hisztogramon ábrázoljuk, a kis sejtek balra, a nagy sejtek jobbra esnek a diagramon (11-21. ábra).

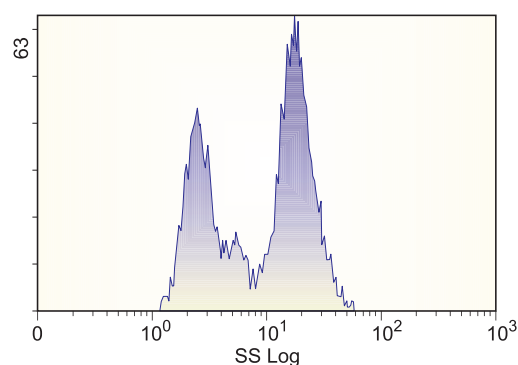
Az FSC hisztogram tipikus egydimenziós méreteloszlási populációs diagramnak felel meg.

Side scatter (SSC)

Amint ezt láthattuk, a sejteket érő fényszórás nem csak előről, de más irányokban is megfigyelhetjük. Azt a fényszórás, amely nagyobb szögből (általában 90°) detektálható, megegyezés szerint *oldalszórásnak* (side scatter, SSC) nevezzük. Az SSC a sejtek szemcszettségével (citoplazmagranulomok) és a sejt belüli struktúrák összetettségével (nagy részt a sejt-mag alakjával) áll összefüggésben. Az SSC nagysága arányos a sejtek strukturális komplexitásával. Az SSC fényt optikai lencsék és tükrök „szállítják” a lézernyalábra rendszerint merőlegesen (90°-ban) elhelyezett detektorokhoz. A jeleket az SSC detektor hisztogramokká alakítja (11-22. ábra).



11-21. ábra. Flow citométeres vizsgálat hisztogramja



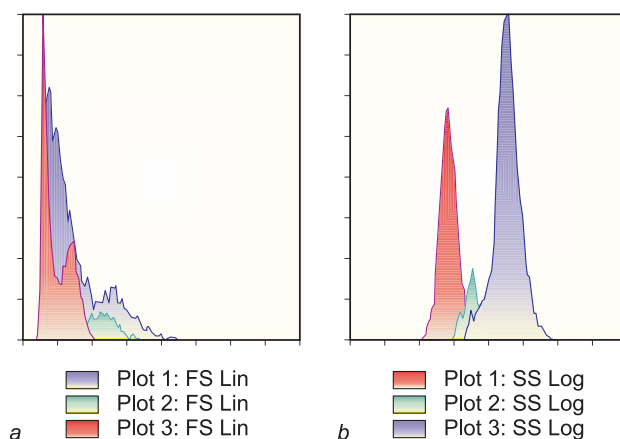
11-22. ábra. SSC hisztogram–

Multiparaméteres (többparaméteres) analízis perifériás vérsejteken (PBC)

Színjelöléssel való kapuzás (colour gating)

Az eljárás lényege, hogy „színjelöléssel való kapuzás” (colour gating) segítségével kombináljuk az 1D hisztogramokat: az 1D hisztogramok (FSC, SSC) – a korábban bemutatott „szürke” formátumban – nem feltétlenül képesek ábrázolni a sejtpopulációk összetettségét (összegzett, szummált képet adnak). Például az olyan sejtsoportokból, amelyek a „szürke” diagramokon az egyik dimenzióban homogénnek tűnhetnek (lásd 11-21. ábra: FSC) [egy színes hisztogram alkalmazásával, amely „áttükrözi” egy másik dimenzióból (11-23b ábráról: SSC) az ott sokkal inkább elkülönülő, eltérő színekkel ábrázolt populációkat], az egységesnek tűnő „szürke” hisztogramon belül színekkel láthatóvá tehetők az „egyébként átfedő” sejtpopulációk (11-23a ábrára: FSC). A 11-23. a ábrán jól láthatók a piros–zöld–kék színnel elkülönített („colour-gated”) lymphocytá–monocyta–granulocyta (Ly–Mo–Gran) sejtsoportok.

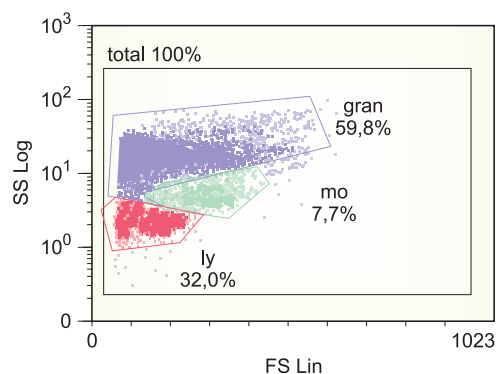
A 11-23. b ábrán az SSC színes hisztogram dimenziójában ugyanazok a sejtek (Ly–Mo–Gran) természetesen azonos színekben jelennek meg, ami lehetővé teszi azonos populációk eltérő tulajdonságainak szimultán vizsgálatát.



11-23. ábra. Multiparaméteres analízis

a) Színjelöléssel láthatóvá tett lymphocytá–monocyta–granulocyta sejtsoportok; FSC hisztogram

b) Colour gating segítségével készült színes SSC hisztogram



11-24. ábra. Felhődiagram (az FSC és SSC diagram egyesítése)

Színes dot plot (felhődiagram)

Elegánsabb grafikai megoldás, ha a két (FSC és SSC) hisztogramot egyesítjük egy 2D pont diagramban, amelyet színes dot plot-nak („felhődiagram”) is nevezünk (11-24. ábra): látszik, hogy az egyesítéshez az SSC hisztogramot egyenes állásban (X-tengelyhez), az SSC hisztogramot 90°-ban balra elforgatva (Y-tengelyhez) kell illeszteniünk, hogy a megfelelő színű Ly (vörös), Mo (zöld), Gran (kék) sejtpopulációk pontthalmazai („felhőkép”) azonos kapuba kerüljenek.

Íme két emberi vérminta felhődiagram fehérvérsejt-alcsoportjai az FCM-en:

- Lymphocyták (Ly) kis sejtek (FSC) minimális belső komplexitással (SSC).
- A monocyták (Mo) kissé nagyobbak (FSC) mérsékelt belső komplexitással (SSC).
- Granulocyták (Gran), nagyobb a sejt méretük (FSC) és kifejezett a komplexitásuk (polimorf nukleáris mag + citoplazmagranuláció). Több csoportjuk van:
 - Neutrophilek. Általában a granulocyták leg-tömegesebb képviselői (a 11-25a ábrán: Neutrophilek).
 - Eosinophilek (Eo).
 - Basophilek (Ba).

E két utóbbi kisebb granulocytacsoport FCM-en csak ritkán látható elkülönülten (11-25. ábra a).

SSC-CD45-kapuzás

A felhődiagramokon nem mindig különülnek el egyértelműen az egyes sejtsoportok (mint már láttuk, az Eo és a Ba populációk normál mintákon sem mindig

azonosíthatók, patológiás mintákon pedig gyakori az „átfedés” pl. myeloproliferatív vagy myelodysplasiás kórképekben, valamint gyakori a normálistól eltérő új populációk, vagyis blastok, lymphomás kóros sejtek megjelenése). Ezen segít a SSC-CD45-kapuzási technika (SSC-CD45-kapuzás): ebben az esetben a szokásos SSC paraméter (x tengely) mellett egy *kiegészítő fluoreszcens* (FL: y tengely) *monoklonális antitest jelölést*, a CD45, pán-leukocytá-antigén jelölést alkalmazzuk (a fluoreszcens jelölési technika részleteit később a Fluoreszcencia fejezetben tárgyaljuk). Ha előzőleg a felhődiagramon (11-25. ábra a) helyesen kapuztuk az egyes populációkat (Ly: vörös, Mo: zöld, Neu: narancs), akkor a koherens csoportok (Ly–Mo–Neu) azonos, „tisztá” színekben jelennek meg a SSC-CD45-kapuzásban is (11-25. ábra b).

Blast ablak (BL)

Az SSC-CD45-kapuzás igen hasznos „mellékterméke”, hogy a CD45-negatív, alacsony SSC-vel bíró *sejttörmeléket* (kevés pont középen és lent az x tengelyen a 10^0 – 10^1 log közötti régióban) leválasztja a mérni kívánt sejtektől (az utóbbiak füzéralakban középen). Talán még lényegesebb előny, hogy a leírt részecskeeloszlás kapcsán alakuló pontdiagramon egy központi (normálisan) jelmentes terület válik azonosíthatóvá, az ún. *blast ablak* (BL: blast window), amely patodiagnosztikai szempontból lehet igen fontos. A normális sejtek helyét (a bemutatott vérmintában minimális sejtaránnyal szemben, lásd 11-25. ábra b, ahol a BL: 0,4%) kóros állapotokban (leukæmiák, lymphomák) éretlen, *blastos sejtek* foglalhatják

el, amelyek jelenléte támogathatja a diagnózist, ill. e sejtek további fenotípusvizsgálatra kikapuzhatók.

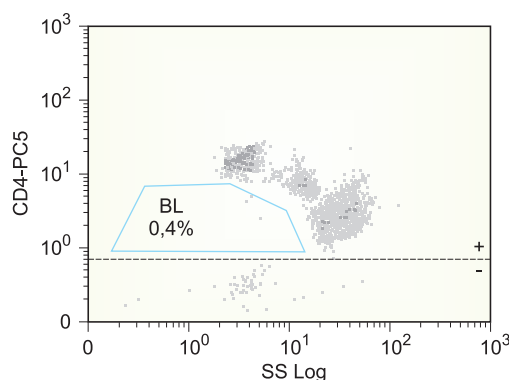
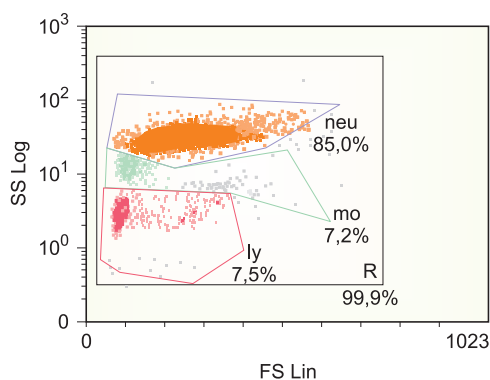
A flow citometriában a *multiparaméter-analízis* tekinthető a legfőbb diagnosztikai vívmánynak. Így tudjuk a kóros sejtek egyedi tulajdonságait szimultán mérni (sejtes koexpressziók) és diagnosztikai értékű hematológiai, ill. immunológiai információkat gyűjteni.

Fluoreszcencia

Nézzük, hogy ha a látható fény sejtes szórási paramétere mellett a fluoreszcens fény vizsgálatát is bevetjük, milyen további strukturális és funkcionális adatokat nyerhetünk sejteinkről?

Az áramlási citometriában a sejtek fluoreszcens jelölése révén azok differenciálódási fehérjéit (CD: cluster of differentiation) vizsgáljuk. A vizsgálatokhoz az e fehérjékhez kapcsolódó fluoreszcens molekulával *konjugált monoklonális antitesteket* (moat) alkalmazunk. A *fluorofór* (fluoreszcenciát hordozó molekula) lézerrel gerjesztett *emissziós fluoreszcenciáját mérjük*. A monoklonális antitestek CD osztályozása lehetővé teszi, hogy a sejtes differenciálódás fehérje antigénjei között egységes logikai rendszer szerint tudjunk dolgozni. Itt csak utalunk arra az információtömegre, amely a CD moat reagensek tulajdonságaival és diagnosztikai alkalmazhatóságával kapcsolatban az interneten elérhető (lásd irodalom).

A vérminta egyedi sejteinek FCM (áramlási citometriai) morfológiai paramétereit (FSC és SSC) első



11-25. ábra. SSC-CD45-ös kapuzási technika

a) Emberi vérből készült felhődiagram fehérvérsejt-alcsoportjai [lymphocytá (Ly): vörös; monocytá (Mo): zöld; neutrophil (Neu): narancs]

b) SSC-CD45-ös kapuzással készült diagram (BL: blast ablak)

menetben „festetlen” formában vizsgáltuk (1. tesztcső: autofluoreszcencia) 2D felhődiagramokon.

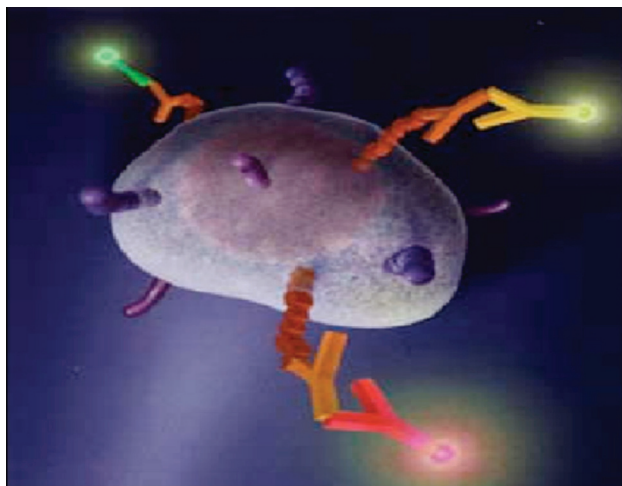
A további csövekben (2-től n-ig tetszőleges számú „festett mintában”: *fenotípuspanelben*) monoklonális antitest festéseket is alkalmazunk. Az egyes tesztcsövekben akár 2-3 vagy több eltérő színű fluorofór jelölt monoklonális antitestet együtt is alkalmazhatunk: ez a *kombinált színjelölés* (11-26. ábra).

Példa egy tipikus *hármas színjelölési kombinációra*: a FITC: fluoreszcens izotiocianát (zöld), a fikoeritrin (PE, vörös) és a peridinin-klorofill-protein komplex (PerCP, kék) fluorofór konjugátumokat alkalmazhatjuk a monoklonális antitesteken.

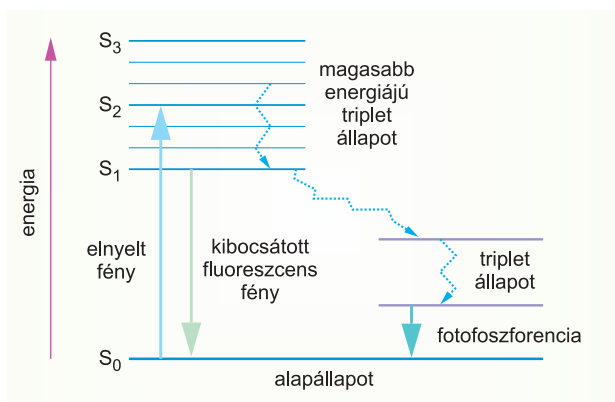
A fluoreszcencia elméleti alapjai

De miként lehet ezeket az eltérő fluoreszcens szín-emissziókat (általában FL1: zöld, FL2: piros, FL3: kék) létrehozni (gerjeszteni) és sejtszinten elkülönítve mérni? A flow citometria ideális eszköz erre a célra is. Hogy jobban megértsük az FCM fluoreszcens technikáját, a fluoreszcencia elméleti alapjaihoz kell visszatérnünk.

Energiaállapot. A (lézer)fény általi gerjesztés (*excitatio*) során a fluorofórmolekula magasabb energiaszintre emelkedik, majd egy gyors (10^{-15} s) és egy viszonylag lassabb (10^{-9} s) visszatérést követve ismét eléri az alapállapotot. Ezenközben az első fázisban hőtermelés, a másodikban fénykibocsátás (*emissio*) kapcsán távozik a befektetett gerjesztő energia. Az emisszióknak (a hővesztés miatt) természetesen kisebb az energiája, nagyobb a hullámhossza (Sto-



11-26. ábra. Fluoreszcens jelölés alkalmazása vérminta egyedi sejteinek vizsgálatában. A sejtek FCM morfológiai paramétereinek vizsgálata (magyarázat a szövegben)



11-27. ábra. FCM morfológiai paraméterek vizsgálata hármas fluoreszcens színjelöléssel

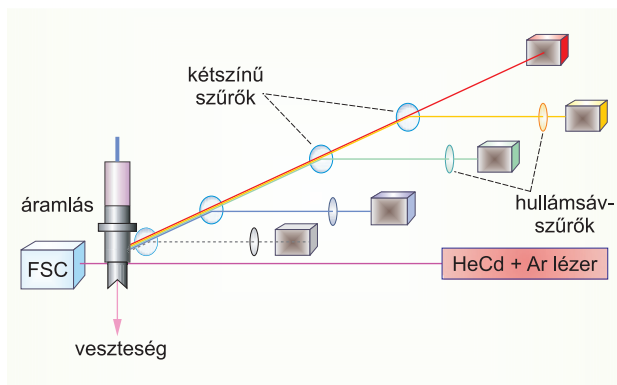
kes-shift), és természetesen az *emissziós fény színe eltér az excitációs fény színétől*. Ez a fizikai tény ad alapot a gerjesztő fényforrás (FCM esetén lézer) és a sejtjelölő fluorofór (a konjugált monoklonális antitest) emissziós spektrumának elkülönítésére. Azaz a jelölt sejt eltérő színben fluoreszkál, mint a gerjesztő lézer. Az egyes fluorofórok emissziós színe is eltér egymástól (11-27. ábra).

Fluoreszcens mérés az FCM-ben

A PBC sejtmintánkban mérendő – fluorofór konjugált monoklonális antitestekkel festett – sejtek először is a hidrodinamikusan fókuszált áramlatban ütköznek a lézernyalábbal, és minden irányban fény-szórást okoznak. A fluorofórok, amelyek az egyes sejteken utaznak („jelölés”), a lézer fluoreszcens fénye által azonos hullámhosszon (általában 488 nm) gerjesztődnek, és szinte azonnal eltérő (fluorofórspecifikus) hullámhosszokon emittálják a fényt. A *fluoreszcens fényszóródási jel* (amely magában foglalja az egyes fluorofórok által emittált, egymástól eltérő színeket és ennek megfelelő hullámhosszakokat) azután továbbutazik a műszerben (90°-os szögben elvezetve optikai filterek és tükrök révén), hasonlóképpen mint ahogy ezt az SSC szignál esetében már leírtuk (11-28. ábra).

A megfelelő optikai filterek és tükrök a heterogén hullámhosszú szórt fluoreszcens fényjeleket azután a megfelelő hullámhosszakot kimutató detektorokhoz (FL1, FL2, FL3) osztják le.

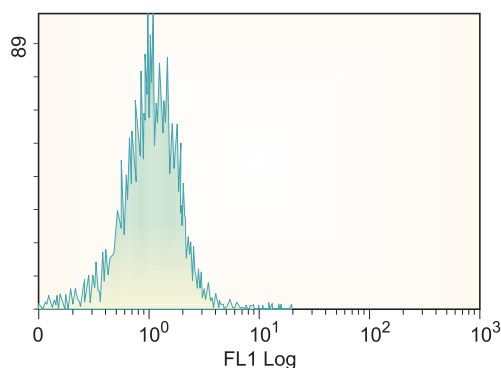
A fluoreszcens fényjelekből *elektronikus impulzusok* (voltage pulse) és a továbbiakban digitalizált komputeradatok (data), valamint diagramok (hisztogram, dot plot) keletkeznek, csakúgy, mint ahogy



11-28. ábra. Fluoreszcens mérés az FCM-ben

ezt az FSC- és SSC-detektálás kapcsán ezt korábban leírtuk. A fluoreszcensen jelölt sejtcsoportokban az intenzívebben festődő sejtek („bright”) több sejtfelszíni jelölődést (ennek megfelelően több sejtfelszíni fehérjemolekulát), a kevésbé festődők („dim”) kevesebb sejtfelszíni molekulát hordoznak. Az előbbi jobbra, az utóbbi balra halmozódik mint elektromos impulzusjel („voltage pulse” signal) az FL-hisztogramon (11-29. ábra a).

Az egyes elektromos impulzusjeleket a komputer elektronikus programja lesimítja a hisztogramokon. Ennek megfelelően a legtöbb regisztrált fluoreszcens hisztogram szabályos, közel Gauss-szerű eloszlást mutat, amelyre jellemző egy többnyire középponti helyzetű maximális eseményszám (Mean Fluorescent Intensity, MFI), amelyet alulról és fölülől szimmetrikusan vesznek körül az alacsonyabb, ill. magasabb MFI-vel (festődési intenzitással) jellemezhető csökkenő számú „széli mérési események” (11-29. ábra b; itt kb. $10^3:1$ felel meg az MFI-nek az FL1 Log skálán).



11-29. ábra. Fluoreszcens jelölésű sejtekről készült hisztogram

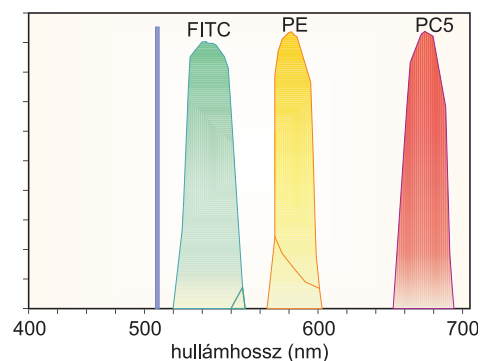
a) A fluoreszcencián jelölt sejtek által előidézett elektromos impulzusjelek szétválása a hisztogramon a sejtek festődésének mértéke szerint

b) Az impulzusjelek számítógépes átalakítása révén létrejött hisztogram alak

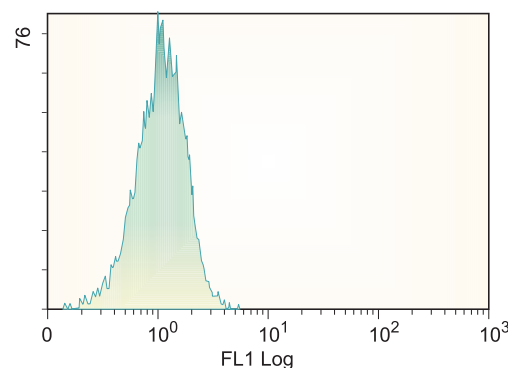
Kombinált színjelölés („multicolour labeling”)

A megfelelő színkombinációhoz először is ismerünk kell az alkalmazandó fluorofórok excitációját és emissziós spektrumát (11-30. ábra).

Az FITC és a PE gyakran szerepel kettős festési kombinációkban, ill. gyakori a hármass kombinációként ezekkel együtt alkalmazott PC5. E fluorofóroknak közös az excitációs hullámhossza (488 nm hullámhosszúságú kék argonlézer). Amint az excitációt biztosító lézer mindhárom fluorofórt az FCM-ben egyidejűleg stimulálja, akkor az emittált fény háromféle hullámhossznak megfelelően jelenik meg (FITC: 520 nm: zöld, PE: 580 nm: sárga, PC5 (fluorokróm R fikoeritrin-cianin 5.1): 670 nm: bordó), így a specifikus emissziók külön-külön gyűjthetők. Ha ezek a spektrális maximumok közel esnek egymáshoz, előfordul, hogy hullámhosszátfedések zavarhatják a fluorofórok specifikus emisszióinak szelektív begyűjtését („spectral overlap”). Ilyen átfedő hullámhosszterületek előfordulnak az FITC és PE emissziók ese-



11-30. ábra. Kombinált színjelölés (multicolour labeling) alkalmazása a fluoreszcenciás mérés során



tében is (a 11-30. ábrán sötét vonalak alatti területek a FITC, ill. PE görbén), ezek azonban, ha nem érintik a maximális emissziós hullámhosszakát, akkor *kompensációs technikával* elektronikusan eltávolíthatók (a részleteket később tárgyaljuk).

Az egymástól távol eső emissziós maximumú diszkrét emissziós spektrumok esetén, mint pl. PC5 az FITC-vel vagy PE-vel kombinálva nincs hasonló gond. A hármas és négyes színekombinációk mindennaposá váltak az FCM-es rutin laboratóriumokban, ahol általában 1 vagy 2 lézerrel működő flow citométerek működnek. Újabban a tudományos kutatólaboratóriumokban akár 10 feletti színekombináció is elérhető (több szimultán lézerrel rendelkező flow citométereket alkalmazva). A közeli jövőben ezek is minden bizonnyal bevezetésre kerülhetnek a rutin laboratóriumokban.

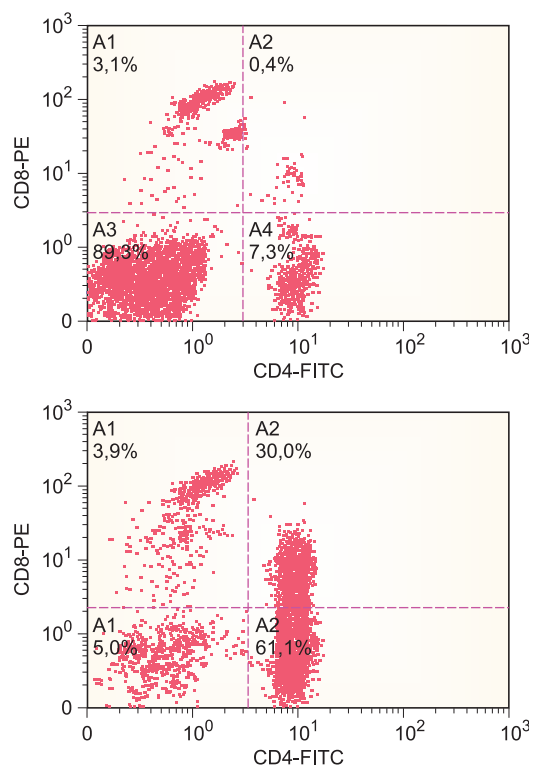
Kétszínű dot plot analízis

Ha két szín kombinációs kísérletet végzünk, ennek értékeléséhez *kvadránsdiagramokat* használhatunk, amelyeken négyféle populáció látható (11-31. ábra a).

- Csak vörös (bright) fluoreszcens sejtek (A1 kvadráns: CD8-PE) a bal felső sarokban (UL: upper left).
- Csak sárga(bright) fluoreszcens sejtek (A4 kvadráns: CD4-FITC) a bal alsó sarokban (LR): lower left).
- Kettős pozitív sárga + zöld sejtek (A2 kvadráns: CD8-PE+CD4-FITC) a jobb felső (UR: upper right).
- Kettős negatív sejtek(A3 kvadráns: alacsony intenzitású „dim” CD8-PE és CD4-FITC), melyek a bal alsó kvadránsban (LL: lower left).

Normál vér vizsgálatokor (lásd 11-31. ábra a) ez az eloszlás jellemző az egymás markerexpresszióit kizáró, ún. exkluzív CD4 és CD8 humán perifériás lymphocytapopulációkra (PBC), azaz gyakorlatilag nincs CD4 + CD8 kettős pozitív populáció (az A2-kvadráns mindössze 0,4%).

Ezzel szemben *patológias* esetekben (11-31. ábra b) – például egy LGL-lymphoproliferatív szindrómában, ahol a kóros sejtek LGL (large granular lymphocyte) morfológiát mutatnak – már szignifikáns mennyiségű CD4 + CD8 kettős pozitív (A2 kvadránsban 30%) lymphocytá található, és ennek az eredménynek akár diagnosztikai jelentősége lehet.



11-31. ábra. Kétszínű dot plot analízis

a) Kétszínű dot plot analízis kvadránsdiagramja egészséges személy lymphocytáit vizsgálva

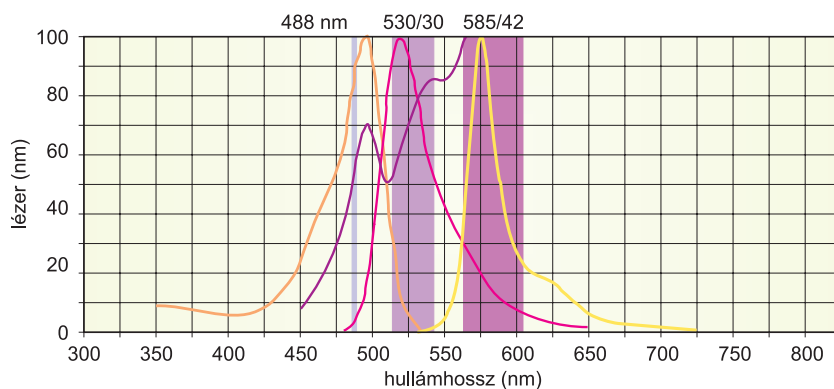
b) Kétszínű dot plot analízis kvadránsdiagramja LGL lymphoproliferatív szindrómában szenvedő beteg lymphocytáiról

Optikai filterek (fényszűrők)

Excitációs (gerjesztési) és/vagy emissziós filtereket kombinációban alkalmazunk a fluorofórok specifikus gerjesztésére és emissziós hullámhosszainak begyűjtésére. Ezt a célt az *excitációs filterek* a gerjesztő fényforrás (lézer) legerkisebb hullámhosszának szelektív átengedésével, az *emissziós filterek* pedig a fluorofór specifikus emissziójából a legintenzívebb hullámhosszú fény kigyűjtésével érik el (11-32. ábra).

A *band pass filterek* olyan optikai filterek (fényszűrők), melyek önmagukban képesek a fluorofór-molekulák fényemissziós csúcs hullámhosszait (*peak emissions*) kiszűrni (*band pass emissziós filterek*). Emellett egyes band pass filterekkel megoldhatjuk, hogy ha a gerjesztő fény túlzottan széles, nem specifikus spektrummal rendelkezik (pl. halogén fényforrás esetén) kizárólag a fluorofórokat specifikusan gerjesztő monokromatikus hullámtartomány jusson át a készülékbe (*band pass excitációs filterek*). Minden erőfeszítésünk ellenére a legtöbb fluorofór excitációs

11-32. ábra. Optikai filter alkalmazásával készült diagramok



és emissziós spektruma sajnos nem jól körülhatárolható csúcsokból, hanem gyakran meglehetősen széles hullámhossztartományban terpeszkedő, szabálytalan alakú görbékéből áll. A spektrális *fluorofór emissziós csúcsok centrális pontjai* általában jól körülhatárolhatóak (pl. 520 nm az FITC-re és 580 nm a PE-re). Azonban pl. az *emissziós band pass filterek* kiszűrt hullámhossztartományának *szélessége* (width) is van (pl. 530 ± 30 és 585 ± 42 nm az FITC-, ill. PE-filterekre vonatkozóan). Ha ez tartalmazza a centrális pontot (PE band pass filterre ez 564–606 nm, amely alkalmas a PE fluorofór 580 nm-es csúcs kiszűrésére) és nem szűr ki túl széles tartományt (PE: 585 ± 21 nm), akkor a filter alkalmas a méréshez.

Másfajta filterek is vannak, amelyek párokban használatosak, ezek a *long és short pass filterek*. A *short pass filterek* bizonyos hullámhossz alatt (cut-off pont pl. 550 nm), a *long pass filterek* bizonyos hullámhossz felett (cut-off pont 610 nm) szűrik a fényt. A short pass és long pass filterek kombinációjával ugyanúgy elérhető egy hullámhossztartomány kiszűrése, mint egy band pass filter alkalmazásával (pl. jelen esetben az 550–610 nm tartományban az 585 nm-es PE jel mérhető, az 520 nm-es FITC jel kívül marad). Multiplex optikai filter és lézer kombinációkkal az FCM gyártó cégek igyekeznek a felhasználói igényeknek megfelelő egyedi rendszereket kialakítani.

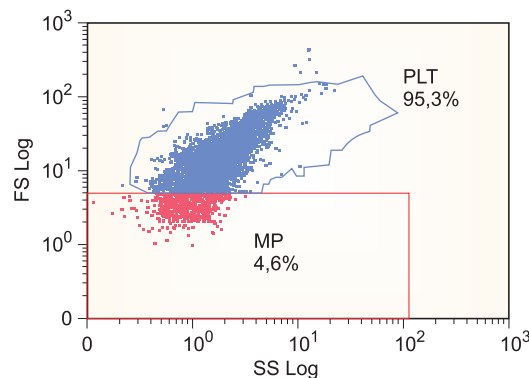
Kompenzáció

Bár láttuk, hogy az optikai filterek a spektrális fluoreszcens fény szelektív detektálása terén sok kérdést megoldanak, azonban nem az összeset. Előfordul, hogy az egymáshoz közel eső emissziós spektrumok egy kisebb része a legjobb filterkombinációk ellenére is kismértékben átfed (*spectral overlap*). Ezt tapasztaljuk pl. az FITC és a PE (lásd 11-30. és 11-32. ábra)

esetében is. Ezt a mérési precizitást zavaró hatást fizikailag nem, csak az elektronikus adatok matematikai korrekciójával küszöbölhetjük ki. Amennyiben nem a fluorofórok csúcsemiszióiról, hanem csak a spektrum „szélső”, kevésbé intenzív emissziójú területeiről van szó, akkor az FCM-ben a kompenzáció elnevezésű elektronikus komputeres eljárással a kis százalékban jelen lévő átfedő hullámhosszterület emisszióját egyszerűen kivonjuk a szomszédos fluorofór teljes emissziójából és vice versa (FL1 – FL2% és FL2 – FL1%). Így vélhetőleg mindkét fluorofór vonatkozásában korrekt (átfedésmentes) eredményeket kapunk. Egyes készülékek programjai ezt automatikusan is el tudják végezni.

Forward scatter threshold

Végül még egy pont, amely érzékenyen érintheti a flow citométeres adatgyűjtés pontosságát, a *threshold* (lefordíthatatlan szó, kb. *kimutatási szintet* jelent, itt azt a *minimális kimutatott részecskeméretet, amely alatt nem érdemes adatot gyűjteni*). Ha minden egyes



11-33. ábra. Számítógépes kompenzáció az elektronikus adatok matematikai korrekciójával; ezáltal a mérésre nem érdemes kismértékű részecskék zavaró hatása kiküszöbölhető (PLT: platelet, vérlemezke; MP: mikropartikulum)

apró részecskét ($< 2 \mu\text{m}$) „beengednénk” az FCM-be, akkor olyan sok jelet kapnánk, hogy a bennünket érdeklő nagyobb méretű részecskék mennyiségi aránya vizsgálhatatlanul kicsinnyé válna. Ezért kell egy *alsó mérethatárt* meghatároznunk a rutin PBC-méréseknél. A sejttermelékek, mikropartikulumok (MP) és mikrovezikulumok például a FSC/SSC diagramon a vérlemezkék (PLT) mérethatára alatt vannak (11-33. ábra).

Ha a mérés célja a vörsejtek (PBC) mérettartományának mérése (Ly–Mo–Gran, $8\text{--}14 \mu\text{m}$), akkor az FSC szokásos cut-off értéke a *forward scatter threshold* (általában 50 arbitrary FCM egység, kb. $2 \mu\text{m}$), ami egyértelműen kizárja a zavaró kis részecskéket a mérésből.

Kis részecskék mérése

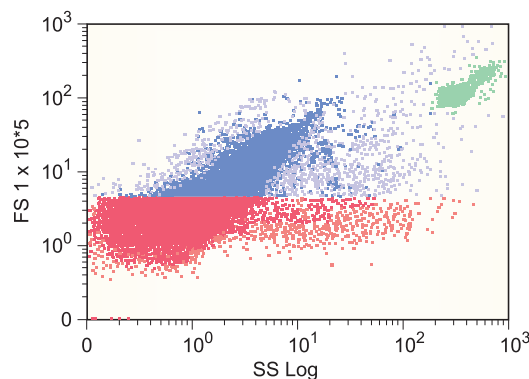
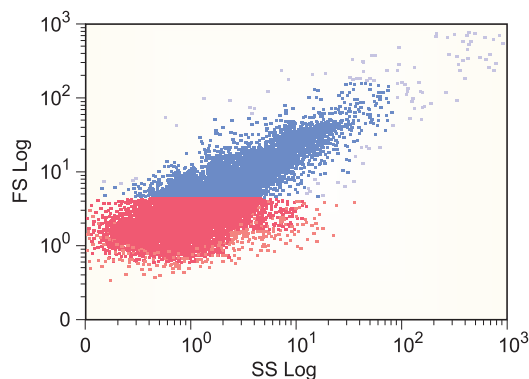
Speciális igények jelentkezésekor, ahol viszonylag kis részecskéket mérünk az FSC threshold határán (pl. kis vérlemezkéket, PLT), akkor egy másik, *fluoreszcens threshold* is alkalmazhatunk. A vérlemezkéket specifikus CD61 monoklonális antitest festődésük alapján választjuk ki a méréshez (ebben benne lesznek a méretre „határeset” microthrombocyták is), így azonban minden más FCM részecskét – méretétől függetlenül mindent, ami nem vérlemezke – kizárunk a mérésből. Ha az FCM mérésünk során kifejezetten a kisméretű részecskékre (pl. mikropartikulumokra) összpontosítunk, akkor a leírtakkal ellentétben semmiféle méret-tresholdot nem alkalmazhatunk, hacsak nincs valamilyen mikropartikulumokra spe-

cifikus fluoreszcens markerünk (pl. FL-treshold Annexin-V-FITC-re). A következő ábrán (11-34. ábra a) a threshold kikapcsolásával láthatóvá válik, hogy az mikropartikulumok nagyobb része (piros pontok) csak így jelenik meg. Amíg korábban a threshold alatt voltak a mikropartikulumok, nagyrészt kimutatlanul (összevethető a 11-33. ábrával: ahol kevés mikropartikulum van a PLT régió alatti részében, piros populáció 4,6%;, kék populáció). Az is látható, hogy a threshold feloldásával a mikropartikulumokra (piros) annyira dominálnak, hogy a PLT (kék) populáció mennyisége egészen háttérbe szorul.

A kis részecskék szelektív elemzésében egy másik speciális lehetőség, hogy a mintához kevert standard kisméretű *fluoreszcens jelölésű műanyag mikrogönggyökkel* (microbead, MB: zöld) pontosan meghatározhatjuk pl. a mérendő mikropartikulumok mérettartományát (felső határ: $0,9 \mu\text{m}$ MB és alsó határ: $0,5 \mu\text{m}$ MB), és *szelektíven kapuzva* csak innen mérünk.

Sejtszámmeghatározás mikrogönggyökkel – one platform FCM-analízist

Mikrogönggyökkel *abszolút sejtszámmeghatározást* is végezhetünk az FCM-en. A 11-34. b ábrán egy nagyobb méretű MB ($3 \mu\text{m}$) alkalmazását látjuk mikropartikulummérés során. Ennek a mikrogönggynek a részecskekoncentrációja standard (6×10^6 részecske/ml). Ha az ismeretlen koncentrációjú MP mintánkhöz sztöchiometrikus arányban keverjük az MB-t, a százalékos arányok megoszlása alapján, aránypár segítségével könnyen kiszámíthatjuk



11-34. ábra. Igen kis méretű részecskék vizsgálata

a) Vizsgálat a threshold kikapcsolásával

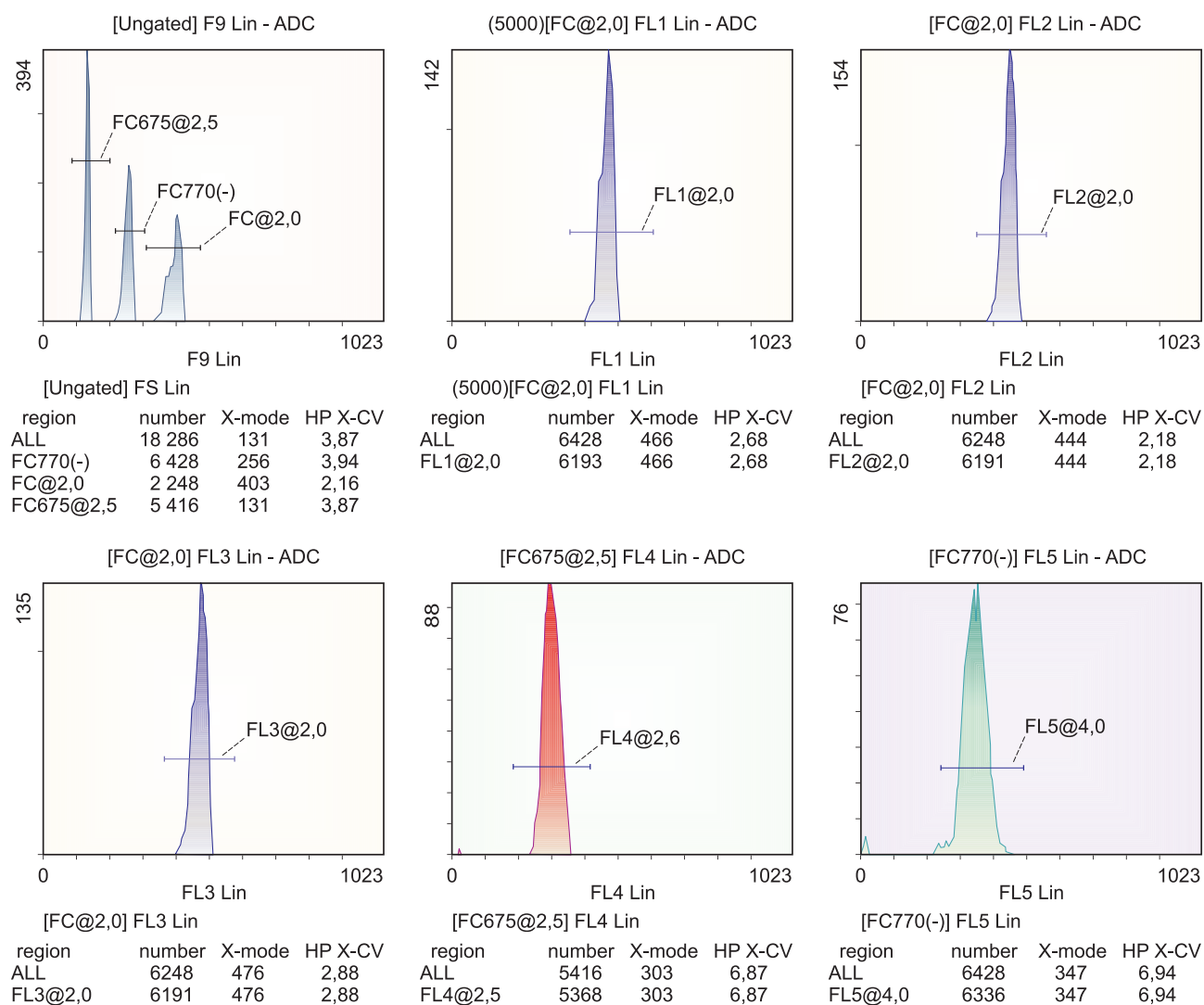
b) Fluoreszcensen jelöl mikrogyönggyökkel (MB, microbead) végzett abszolút sejtszámmeghatározás

az ismeretlen minta koncentrációját. Ezt az ún. *one platform FCM analízist* (ismert koncentrációjú mikrogyöngyöt keverünk ismeretlen koncentrációjú részecskékkel) a klinikai laboratóriumi gyakorlatban is alkalmazzuk: a *csontvelői őssejt transzplantáció* során. A *multicolour* (azaz kombinált színjelöléses CD34 + CD45 + CD133 monoklonális antitestest festésekkel azonosított) őssejtek a perifériás vérből vagy csontvelőből csak rendkívül kis arányban nyerhetők („low incidence stem cell population”). Az egyéb sejtek keverékével együtt a recipiensbe beadott őssejtek abszolút számának meghatározása elengedhetetlen a terápia várható hatékonyságának megítélésére, ez technikailag azonban nagy kihívás

az FCM számára. A pontatlan volumetriás összejmérési technikák helyett ez esetben is az ismert koncentrációjú mikrogyöngyökkel végzett one platform FCM analízis ajánlott.

FCM minőségi kontrollja mikrogyöngyökkel

Végül a mikrogyöngyök az áramlási citometria minőségi kontrolljában (quality control, QC) is nélkülözhetetlenek. FCM műszeres QC célokra a gyártók a gépek rendszeres ellenőrzése és beállítása céljára 3 mérettartományban és 5 fluorofór jelöléssel biztosítanak beállításra való (setting) mikrogyöngyöket, hogy az FCM korrekt működésében mindig biztosak lehessünk már mérés előtt (11-35. ábra).



11-35. ábra. FCM minőségi kontrolljára gyártott mikrogyöngyökkel végzett vizsgálat

IRODALOM

- www.invitrogen.com/resources/education/tutorials
- CD moat reagensek tulajdonságai: http://en.wikipedia.org/wiki/Talk:Cluster_of_differentiation, [http://www.clinicalflow.com/Cases/Introduction_to_Flow_Cytometric_Analysis/Cluster_of_Differentiation_\(CD_Markers\)](http://www.clinicalflow.com/Cases/Introduction_to_Flow_Cytometric_Analysis/Cluster_of_Differentiation_(CD_Markers)) http://www.lumrix.net/medical/immunology/cluster_of_differentiation.html
- kombinált színelölés: www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.38320.File.dat/flow_worksheet.pdf
- BAUMGARTH, NICOL, ROEDERER, M.: A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods* 243 77–97, 2000. www.elsevier.nl/locate/jim
- BERKI TÍMEA: Áramlási cytometriai vizsgálatok autoimmun betegségekben (vizsgálati tájékoztató). Immunbiológiai és Immuntechnológiai Intézet (IBI). <http://www.pote.hu/ibi>
- BD Bioscience: Introduction to Flow Cytometry: a Learning Guide. Manual Part Number 11-11032-01. 2000. <http://www.bdbiosciences.com/home.jsp>
- BD Flow cytometry on-line training. <http://www.bdbiosciences.com/support/training>
- Beckman Coulter FC500 CXP Training manual 130105 2004. https://www.beckmancoulter.com/eCatalog/Catalog/Flow_Cytometry
- Beckman Coulter on-line training. Animated flow cytometry theory. <http://www.coulterflow.com/bciflow/theory.php>
- JABŁOŃSKI, A. <http://en.wikipedia.org/wiki/Jablonski>
- JÁKSÓ P.: A Flow Cytometria (FCM) alkalmazása a patológiában” (PhD kurzus, évente); Pécsi Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet http://www.pote.hu/index.php?page=egyseg&egy_id=230&menu=dinam&dmid=117&nyelv=hun
- KAPPELMAYER J.: Flow cytometria (áramlási cytometria) a diagnosztikában. Debreceni Egyetem KBMPI oktatási anyaga <http://kbmpi.deoec.hu/info.aspx?sp=1>
- KRIVÁN G., KARÁSZI ÉVA, GOPCSA L. és munkatársai: Az áramlási citometria klinikai alkalmazása. *Clinical use of of flow cytometry. Focus Medicinae* 4:2–7., 2009. <http://www.pharmaline.hu/index.php?page=medkat&kod=-FOM&mode=show&order=kiado>
- MAGYARLAKI T., TÖKÉS-FÜZESI MARGIT: Tájékoztató az áramlási cytometria klinikai laboratóriumi hematológiai alkalmazásáról. Pécsi Tudományegyetem Orvoskar Laboratóriumi Medicina Intézet, 2001 (revised 2008). http://aok.pte.hu/index.php?page=egyseg&nyelv=hun&egy_id=140&egy=140
- MATOLCSY A., UDVARDY M., KOPPER L.: Hematológiai betegségek atlasza. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006. <http://www.medicina-kiado.hu/>
- PÁLINGER ÉVA: Áramlási cytometriai vizsgálatok (Felhasználói tájékoztató). Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt és Immunológiai Intézet. <http://www.dgci.sote.hu/>
- ROBINSON, J. P. (ed.): Handbook of Flow Cytometry Methods. Wiley-Blackwell, 1993. <http://eu.wiley.com/WileyCDA/>

Autoimmun kórképek diagnosztikai lehetőségei

BERKI TÍMEA

Az autoimmun betegségek jellemzői

Autoimmun betegségek azok az ismeretlen etiológiájú, progrediáló, gyulladásos-degeneratív betegségek, amelyekben az immunrendszer valamely szabályozási zavar miatt a saját struktúrák ellen indít el reakciót. Ennek bizonyítékai a betegségre jellemző, sokszor már előtte megjelenő autoantitestek, amelyek patogenetikai jellege sokszor nem bizonyítható, de jól jelzik a betegség típusát, némelykor annak aktivitását is.

Autoantitestek. Az emberi szervezetben kétféle autoantitestet (AAT) különböztetünk meg, az egyik a természetes autoantitestek, a másik a patológiás autoantitestek csoportja:

- A természetes autoantitestek hálózata az immunrendszer részeként, a saját, ősi, konzervatív molekulák leképezései, azok védelmét szolgáló antitestek, amelyek az ún. „immunológiai homunculus”-t alkotják. Ezek az antitestek az egyénre jellemzőek. Már csecsemőkorban kimutathatók, és jellemző, hogy alacsony affinitású, polireaktív, általában IgM izotípusú antitestek, a szérumban pg/ml koncentrációban vannak jelen. Autoantitestek nagyobb koncentrációban megjelenhetnek átmenetileg bizonyos betegségekben, mint fertőzések, sérülések, regeneratív folyamatok, de az immunrendszer szabályozó mechanizmusai normális esetben a

betegség lezajlása után visszaállítják az egyensúlyt, és az autoantitestek eltűnnek.

- A patológiás autoantitestek valamely autoimmun betegség részeként jelennek meg, általában IgG vagy IgA, ritkábban IgM izotípusúak és nagyobb a szérumban koncentrációjuk (ng/ml, mg/ml) (11-6. táblázat).

A szérumban mért autoantitestek önmagukban tehát nem jelentik valamely betegség diagnózisát. Viszont segítik a klinikust a színes tünettanú autoimmun betegségcsoportban elhelyezni a betegséget, segítenek a differenciáldiagnosztikában („marker antitest”), a betegség progressziójának követésében, a prognózis felállításában. Némelyik autoantitest alkalmas a betegség aktivitásának, a terápia eredményességének nyomon követésére is (11-7. táblázat).

Autoimmun betegségek tényezői. Az autoimmun betegségek kialakulásában számos tényező játszik szerepet.

- Így a *genetikai hajlam* jellemző bizonyítéka az egyes kórképek HLA- vagy egyéb génekkel való szoros asszociációja.
- A jellemző női dominancia felhívja a figyelmet a *hormonális tényezők* befolyásoló szerepére. Jellemzően fiatal nőkben kialakuló betegségek ezek, amelyek progresszióját a hormonális státus változása pl. terhesség, laktáció idején jelentősen befolyásolhatja.
- Különbféle *külső, provokáló tényezők* szerepének bizonyított volta így bizonyos vírusok, bakteriális *infekciók*, *vegyszerek*, *munkahelyi ártalmak* provokálhatják egy-egy betegség kialakulását, manifesztációját, ill. a nyugvó betegség fellobbanásához vezethetnek.

11-6. táblázat. Természetes és patológiás autoantitestek összehasonlítása

Jellemző	Természetes AAT	Patológiás AAT
izotípus	legtöbbször IgM	IgG, IgA vagy IgM
koncentráció	pg/ml	ng/ml, mg/ml
affinitás	alacsony	nagyobb
reaktivitás	polireaktív	monoreaktív
termelő sejt	B1-sejt	konvencionális B-sejt
T-sejt-függés	T-independens	T-dependens

11-7. táblázat. Autoantitestek laboratóriumi kimutatásának jelentősége

<i>Antitest alkalmazása</i>	<i>A célra felhasználható antitest</i>
diagnózis felállítása	dsDNS, CCP, kardiolipin stb.
stádium (aktív–inaktív) megítélése	dsDNS, ANCA
alcsoport, rizikócsoporthatározása a kórképen belül	Scl-70, Cenp-B
prognózis megállapítása	Cenp-B, Scl-70
terápia eredményességének leérése	foszfolipid, dsDNS, ANCA
több kórkép egyidejű fennállásának (overlap) megállapítása	ENA-G

AZ AUTOIMMUN BETEGSÉGEK TÍPUSAI

Attól függően, hogy az immunrendszer a szervezet mely struktúrája ellen irányul, megkülönböztetünk szisztémás és szervspecifikus autoimmun betegségeket.

A *szisztémás kötőszöveti betegségek* prototípusa a szisztémás lupus erythematosus (SLE), amelyre jellemző a szervezet minden sejtjében előforduló antigének elleni immunreakció, legjellemzőbben az antinukleáris autoantitestek megjelenése. Ebben a betegségben jellemző még antigén-ellenanyag immun-

komplexek megjelenése a keringésben, azok lerakódása különböző szervek hurokkapillárisaiban (vese, ízületek, szív, tüdő, agy stb.), ahol a komplementrendszert aktiválva gyulladásos reakciót hoznak létre.

A *szervspecifikus autoimmun betegségekben* az autoimmun reakció viszont általában egyetlen antigén (pontosabban egyetlen szerv, egyetlen sejt típus néhány antigénje) ellen irányul, és ennek a szervnek a betegségét, esetenként pusztulását okozza. A szervspecifikus autoimmun betegség közismert példája a Hashimoto-tyreoiditis, amelyben az autoimmun re-

11-8. táblázat. Betegségcsoportokra jellemző autoantitestek

<i>Betegség</i>	<i>Autoantitest</i>
<i>Szisztémás betegség</i>	
SLE	dsDNS, nukleoszóma, ENA: Sm, RNP
Sjögren-szindróma	SSA, SSB
SSC	Scl-70, centromer (Cenp-B)
vasculitis	ANCA: MPO, PR3
myositis	Jo-1, Rib-P, SRP, Ku, Mi-2, PL-7, PL-12, PMScl-100
foszfolipid-szindróma	kardiolipin, β_2 -GP1, foszfatidilszerin, protrombin
RA, JRA	CCP, reumatoid faktor
<i>Szervspecifikus betegség</i>	
thyroiditis	tireoglobulin (TG), thyroidea-peroxidáz (TPO)
coeliakia	szöveti transzglutamináz (tTG), gliadin
1-es típusú diabetes mellitus	glutaminsav-dekarboxiláz (GAD), tirozin-foszfátáz (IA2)
primer biliaris cirrhosis	M2-mitokondriális (PDH)
colitis – Crohn-betegség	ASCA–PR3
Goodpasture-szindróma	GBM

ENA: extrahálható nukleáris antigén

akció a pajzsmirigy lassú pusztításával hypothyreosis-hoz vezet (11-8. táblázat).

A legismertebb szisztémás autoimmun betegségek:

- Szisztémás lupus erythematosus (SLE) és rokon betegségek (discoid lupus, szubakut cutan lupus erythematosus).
- Rheumatoid arthritis (RA) és az ezzel rokon betegségek, mint pl. a juvenilis krónikus arthritis (JCA) stb.
- Antifoszfolipid-szindróma (APS).
- Sjögren-szindróma (SS).
- Progresszív szisztémás sclerosis (PSS) és az ezzel rokon betegségek.
- Kevert kötőszöveti betegség (MCTD).
- Polymyositis/dermatomyositis (az „idiopathiás gyulladásos myopathia” csoport betegségei).
- Szisztémás vasculitisek.
- Nem differenciált kötőszöveti betegség (UCTD), más néven: nem differenciált collagenosis (NDC) vagy nem differenciált autoimmun betegség (NDAS) valójában nem önálló betegség, hanem bizonyos szisztémás kórképek (pl. SLE, PSS stb.) kezdeti vagy átmeneti („overlap”) formája. A kezdetben ilyen diagnózissal kezeltek egy részének betegsége később, újabb tünetek, manifesztációk megjelenése után definitív SLE, PSS stb. betegséggé alakul.

Egy-egy példa a szervspecifikus autoimmun betegségekre szervek szerint:

- Bőr: pemphigus vulgaris.
- Endokrin rendszer: Hashimoto-thyreoiditis.
- Gyomor-bél rendszer: autoimmun gastritis, anaemia perniciosaival vagy a nélkül.
- Idegrendszer: sclerosis multiplex.
- Máj: primer biliaris cirrhosis.

- Szív: autoimmun myocarditis.
- Tüdő: idiopathiás tüdőfibrosis.
- Vese: Goodpasture-szindróma.
- Vér: autoimmun haemolyticus anaemia.

AZ AUTOIMMUN BETEGSÉGEK

DIAGNÓZISÁNAK KÉRDÉSEI

Az autoimmun betegségek nagy részének felismerését diagnosztikai vagy klasszifikációs kritériumok segítik. A klinikusnak számos tüneti, anamnesztikus és diagnosztikus paraméter együttes fennállását figyelembe véve, egy pontrendszer alapján szabad csak kimondania a diagnózist. A szisztémás kötőszöveti betegségek közül az SLE, az RA, a JCA, az MCTD, az SS, a PSS, a polymyositis/dermatomyositis, az APS és a szisztémás vasculitisek kritériumrendszere széles körben használatos. Ennek csak egy része a klinikai immunológiai laboratóriumból származó autoantitest és egyéb immunológiai és gyulladásos paraméterek (vérkép, vérsejtsüllyedés, CRP, komplement stb.) eredménye (11-9. táblázat).

Ezért nagyon fontos, hogy ezt a klasszifikációs score-rendszert (pontrendszert) jól ismerő szakorvos állapítsa meg a diagnózist, kérje a konkrét autoimmun betegség gyanúját alátámasztó célzott laboratóriumi autoantitest-vizsgálatokat. A hozzá nem értő klinikust önmagában az autoantitest jelenléte téves diagnózishoz és a betegség fel nem ismeréséhez, hibás terápiához vezetheti. Az autoimmun betegségek sokfélesége miatt a legtöbb esetben az immunológiai laboratóriumi diagnosztikai eljárások szűrővizsgálatra nem alkalmasak – nincs „autoimmun laboratóriumi diagnosztikai panel”. Tehát célszerű a betegek anamnézise, tünetei és a rendelkezésre álló egyéb leletek alapján valamiféle iránydiagnózist készíteni, és ennek megfelelően kérni a speciális vizsgálatokat. Fontos azt

11-9. táblázat. Általános laboratóriumi eltérések

- Gyorsult süllyedés
- Hypocomplementaemia
- Vizeleteltérések (haematuria, proteinuria, cylindruria stb.)
- Leukopenia, thrombocytopenia
- Anaemia (normocytás, normochrom, Coombs-pozitivitás)
- Autoantitestek jelenléte (nukleoszóma, dsDNS, anti-Sm, antifoszfolipid AAT stb.)

is tudni, hogy önmagában egy-egy autoantitest kimutatása egyáltalán nem jelzi az autoimmun betegség jelenlétét. Tehát ha a kérdéses beteg – pl. antinukleáris antitest (ANA-) vagy rheumafaktor- (RF-) pozitív, ettől még akár egészséges is lehet. Az immunológiai laboratóriumi tesztek döntő többsége nem kellően specifikus, és nem is elég érzékeny, pl. a rheumafaktor. Vannak specifikusabb és elég szenzitív markerek, amelyek a betegség aktivitását jól jelzik, pl.: dsDNS, ANCA, foszfolipidantitestek, CCP.

Az autoantitest-meghatározás módszertana

A különböző autoantitest-meghatározási módszerek az antinukleáris autoantitest mérési lehetőségein keresztül kerülnek bemutatásra. Az egyes módszerek előnyei, hátrányai szintén itt kerülnek tárgyalásra. A többi autoantitestnél a mérési módszert csak megemlítjük.

ANTINUKLEÁRIS AUTOANTITESTEK A SZISZTÉMÁS KÖTŐSZÖVETI BETEGSÉGEK ELKÜLÖNÍTÉSÉBEN

Az antinukleáris antitest (ANA) vagy antinukleáris faktor (AF) kifejezés *a sejtmag különböző komponen-*

sei ellen irányuló autoantitestek összefoglaló neve. Ma már jól definiált, a sejtmagból tisztított vagy rekombináns technikával előállított antigének állnak rendelkezésre e nagy autoantitest-csoport egyes típusainak elkülönítésére. Ezen ellenanyagok pontos kimutatása a szisztémás autoimmun betegségek laboratóriumi diagnosztikájának legfontosabb része. Segítik a differenciáldiagnózist, egy adott betegségen belüli alcsoportba sorolást, számos esetben a betegség aktivitásának és prognózisának megítélését. Néhány autoantitest az egyes kórképek diagnosztikai kritériumai között is szerepel (*11-10. táblázat*).

INDIREKT IMMUNFLUORESZCENCIA

Az immundiagnosztikai laboratóriumok számos módszert alkalmaznak az ANA kimutatására, amelyek között a legrégebbi az *indirekt immunfluoreszcens (IIF) technika*. Mintaként kezdetben rágcslókból származó szervmetszeteket, majd a nyolcvanas évektől egy humán eredetű sejtvonalat, a HEP-2 sejteket [Human Epithelioma Type 2 Cells (CCL-23) – American Type Culture Collection] használták, ill. használnak ma is. A HEP-2 sejtek alkalmazásának nagy előnye, hogy a kitapadó sejtek nagy sejtmagja, jól látható citoplazmája miatt az ANA több külön-

11-10. táblázat. A leggyakoribb antinukleáris autoantitestek prevalenciája és relevanciája

AAT	Asszociált betegség	AAT-frekvencia (%)	IIF-mintázat
SSA (Ro)	SLE Sjögren-szindróma (SS) neonatalis lupus	25–35 40–70 100	finoman pöttyözött sejtmag
SSB (La)	Sjögren-szindróma SLE	30 10	finoman pöttyözött sejtmag
Sm	SLE (specifikus)	15–30	durván pöttyözött sejtmag
RNP	MCTD (kevert kötőszöveti betegség: Raynaud-szindróma, sclerodactylia, oesophagusdysmotilitas)	95 SS 20 SLE 30–50	nagy, durván pöttyözött sejtmag
Scl-70	scleroderma	20–35	granuláris, nukleoláris/homogén mag
Jo-1	polymyositis	20–40	pöttyözött, citoplazmatikus
Cenp-B	scleroderma CREST variáns	limitált SS 80 SS 20	diszkréten pöttyözött, a metafázisban lévő sejtekben
hiszton	drog indukálta SLE	90	homogén mag
dsDNS	SLE (specifikus)	40–60	homogén mag

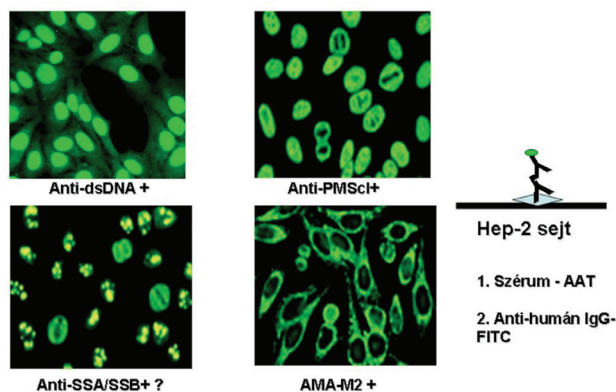
bőző típusa különíthető el rajta (eltérő fluoreszcens festődési mintázatot adva), valamint az osztódó sejteken a sejtciklusfüggő autoantitestek is jól látszanak (11-36. ábra). Mindezek miatt a HEp-2 sejteken végzett IIF-vizsgálatot az ANA-kimutatás „gold standard”-jának (referenciamódszerének) tekintjük.

Az ANA kimutatása ezzel a módszerrel szűrővizsgálat, mert a mikroszkópban látott kép csak egyes esetekben teszi lehetővé az antitest pontos azonosítását. Az esetek többségében az ANA specificitásának kimutatását további, antigénspecifikus indirekt ELISA vagy immunoblot-vizsgálatokkal végezzük.

Az indirekt immunfluoreszcens technikával végzett ANA-kimutatás diagnosztikus kitek (tesztek) használatával is időigényes, sok manuális munkát és nagy gyakorlatot kíván. Értékelése tapasztalatot és gyakorlatot igényel, ugyanakkor bizonyos mértékig szubjektív. Emiatt csak immunológiai centrumokban javasolt végezni, ahol mind a kellő mintaszám, mind a kellő gyakorlat rendelkezésre áll.

Az indirekt immunfluoreszcencia előnyei:

- A vizsgálathoz használt antigén természetes környezetében látható.
- A mintahígítás változtatásával (csökkentésével) a metodika érzékenysége fokozható.
- Az inkubációs idő növelésével a vizsgálat érzékenysége növelhető.
- A beteg különféle autoantitestjei sokszor nem tankönyvi vagy jól ismert formában jelennek meg – ilyenkor lehetőség van sejt/szövet/szerv metszetek kombinált használatára (biochip).



11-36. ábra. ANAscreen indirekt immunfluoreszcencia (IIF). Több különböző autoantitest összefoglaló elnevezése. Szűrőteszt, a leggyakrabban kért vizsgálat HEp-2 sejt. 1.: szérum-AAT; 2. antihumán IgG-FITC

- Az antihumán IgG, IgA vagy IgM-PO (peroxidáz) konjugátum változtatásával az autoantitest izotípusa is meghatározható.
- Szűrésre alkalmas.
- Kis mintaszám esetén is olcsó, részben automatizálható.

Az indirekt immunfluoreszcencia hátrányai:

- Kiértékelése gyakorlatot igényel.
- A kiértékelésben sok a szubjektív elem.
- Fluoreszcens mikroszkóp szükséges.
- Heterofil antitestek zavaró hatása.
- A háttér-fluoreszcencia zavaró hatása.
- Aspecifikus lelet nem ritka.
- Konfirmáló metodikára van szükség (dsDNS, ENA-6 stb.).
- Nagy mintaszériára megszorításokkal alkalmas.

ANA ELISA-SZŰRŐTESZT (SCREEN)

Az utóbbi években azonban számos cég ANA kimutatására alkalmas ELISA teszteket ún. ANAscreen ELISA-t hozott forgalomba. Az ELISA technika számos előnnyel rendelkezik az indirekt immunfluoreszcencia technikához képest: kivitelezése egyszerű, automatizálható, értékelése objektív, nagyszámú minta egyidejű vizsgálatára alkalmas. Magyarországon is sokféle ANA-ELISA teszt kapható, de hiányoznak azok az összehasonlító vizsgálatok, amelyek a tesztek eredményeit összevetik egymással és a standard indirekt immunfluoreszcencia technika eredményeivel (11-11. táblázat).

Az elméleti megfontolások legfontosabb tárgya az alkalmazott antigén. Mivel szűrővizsgálatról van szó, célszerű olyan tesztet választani, amely valamennyi nukleáris antigént tartalmazza.

A 11-37. ábrán látható tesztben az ELISA-lemezt a következő, HEp-2 sejtek magjából kivont *antigének keverékével* érzékenyítik:

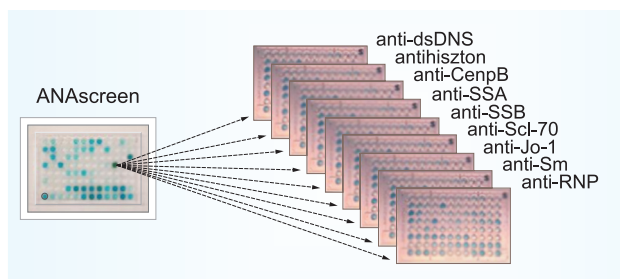
- dsDNS
- hiszton
- centromer
- SSA/Ro, SSB/La
- Sm, Sm/RNP
- Scl-70, Jo-1

Pozitivitás esetén egy-egy antigénnel fedett külön ELISA-lemezeken „kifejtő” vizsgálatok következnek.

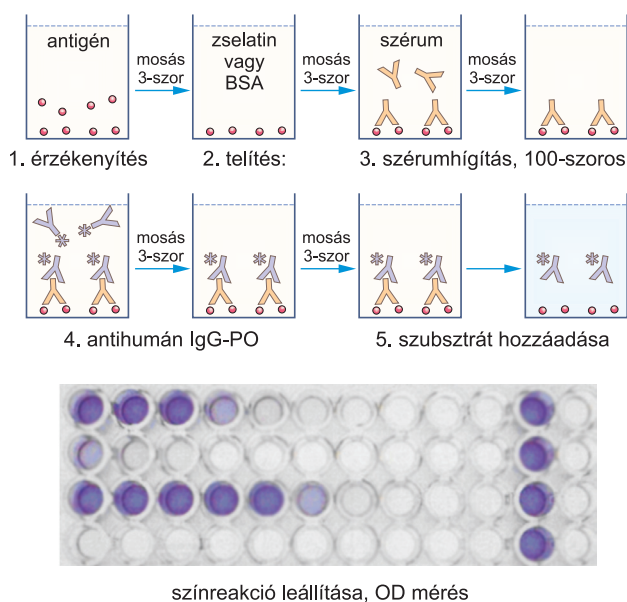
11-11. táblázat. ANA-mintázat, ANA/ENA antigén és egyes betegségek összefüggése

ANA HEp-2 mintázat	Antigén	Betegség
homogén	ds-DNA-hisztón komplex	SLE
foltos, szemcsés	Sm RNP SS-A SS-B centromer	SLE MCTD Sjögren-szindróma, SLE, RA scleroderma, CREST, PBC
nukleoláris	nukleoláris RNS Scl-70 PM-Scl	scleroderma scleroderma myositis scleroderma overlap
citoplazma	Jo-1 riboszóma	polymyositis/dermatomyositis

A gyakran előforduló, jól definiált autoantitesteken kívül vagy azok mellett ugyanis számos egyéb, ritkábban előforduló vagy nem pontosan azonosított ellenanyag is jelen lehet, amelyeknek ugyanúgy diagnosztikai, differenciáldiagnosztikai, prognosztikai jelentősége van (pl. magmembrán elleni antitest antifoszfolipid-szindrómában, PCNA elleni antitest SLE-ben stb.). Amikor egy ANA-ELISA tesztben csak néhány antigént kötnek a szilárd fázishoz, akkor csak az ezek ellen irányuló antitesteket lehet kimutatni, minden egyéb sejtmagkomponens elleni antitest láthatatlan marad. Ezért célszerű olyan ANAscreen ELISA tesztet választani, amely a HEp-2 sejtek lizátumát is tartalmazza. Ugyanakkor ebben az esetben sokszor előfordul olyan pozitív szűrőteszteredmény, amelynek specificitását az antigénspecifikus ELISA-tesztekkel nem tudjuk azonosítani (11-38. ábra). Probléma lehet az ANAscreen ELISA érzékenysége is, ami azt eredményezi, hogy fontos ellenanyagok (pl. anti-dsDNS) alacsonyabb koncentrációját nem jelzi (11-12. táblázat).



11-37. ábra. ANAscreen microplate ELISA befejező mozzanata



11-38. ábra. Antigénspecifikus autoantitest ELISA

ANA-IMMUNOBLOT

Az antinukleáris autoantitestek szemikvantitatív meghatározásának egyik lehetősége az immunoblot módszer. A tesztben nitrocellulózcsík felszínére immobilizált autoantigének szolgálnak reakciófelszínnek (11-39. ábra).

Előnyei:

- Egyszerre egy mintából több antigénre specifikus autoantitest kimutatására alkalmas, vagyis multiplex módszer.
- Gyors.
- Egyetlen beteg mintája is vizsgálható vele.

11-12. táblázat. Az antinukleáris autoantitest ELISA-szűrővizsgálat elemzése

Az ANA-ELISA előnyei

- Nagy szenzitivitás
- Kis és nagy aviditású antitestek kimutatására egyaránt alkalmas
- Kvantitatív meghatározás
- Izotípus-meghatározás lehetséges
- Automatizálható
- Nagyszámú minta gyors és olcsó vizsgálata

Az ANA-ELISA hátrányai

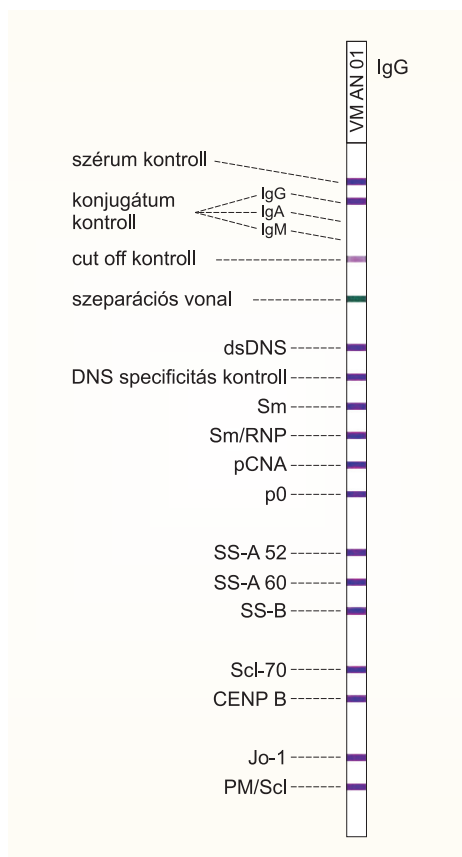
- Sokszor bizonytalan antigén(forrás)
- Bizonytalan antigéntisztaság
- Egyedi standardok és kontrollok
- A nemzetközi standardizálás hiánya
- Aspecifikus reakciók okozta álpozitivitás (CIC, RF, immunglobulinok)

Hátrányai:

- Az antigének többnyire rekombináns fehérjék vagy tisztított nukleoproteinek, melyek a nitrocellulóz felszínére immobilizálva más konformációt vesznek fel, mint pl. az ELISA-lemez felszínén abszorpcióval kikötött antigének. Ennek az a következménye, hogy bizonyos anti-

géndeterminánsok (epitópok) eltűnnek, vagy új epitópok kerülnek a felszínre a harmadlagos szerkezet változása miatt. Így előfordulhat, hogy bizonyos, az indirekt immunfluoreszcenciában vagy ELISA-ban mért autoantitestek nem, mások pedig nonspecifikusan oda tudnak kötődni az immunoblot felszínéhez.

- Előfordulnak álpozitív és álnegatív reakciók.
- Nem vizsgálható egyszerre sok antigén.



11-39. ábra. ANA-profil immunoblot

Gyorsasága, egyszerű kivitelezhetősége miatt olyan laboratóriumokban alkalmazzák, ahol kicsi a mintaszám. Nem igényel speciális felszereltséget, leolvasását szemmel (vizuálisan) vagy egy szkennelhez (optikai kiértékelőhöz) kapcsolt automatikus analízáló szoftver segítségével végzik. Ugyanakkor kevésbé tartják specifikusnak, mint az előző két módszert, főleg az antinukleáris antitestek megbízható meghatározására. Ugyancsak hátránya, hogy nem minden autoantigén immobilizálható (pl. kardiolipin, foszfolipidek stb.) a nitrocellulóz- vagy egyéb felszínhez.

MULTIPLEX AUTOANTITEST-MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK

A legújabb technológiai fejlesztések olyan irányba haladnak, hogy a minta egyszeri felhasználásával, egy méréssel 5–100 különböző autoantitest koncentrációját tudjuk detektálni. Ezek a multiplex mérési módszerek két nagy kategóriába sorolhatók az alkalmazott szilárd hordozó alapján. Az egyik esetben a mikrochip technológiára adaptálták az immunoas-

say-t, a másikban méret vagy fluoreszcencia alapján jól elkülöníthető mikropartikulumokra.

Mindkét esetben a kritikus lépés az antigén felvittele a szilárd hordozó felszínére az antigenitás megtartásával. A cél olyan mérés technika optimalizálása, amelyben a standard antigénspecifikus ELISA-val egyenként mért autoantitest eredmények egy mérésben reprodukálhatók.

MicroSpot Assay

A mikrochip hordozó felszínén kis, elkülönített területekre viszik fel a különböző antigéneket az ún. „micro-dot” technológiával. Így akár 200 különböző antigénspecifikus reakcióhelyet tudnak létrehozni („nyomtatni”) egy 3–6 mm nagyságú nitrocellulóz felszínre (Ekins, 1998). Minden egyes reakcióhely (antigén) egy 80 µm átmérőjű terület, amelyre kevesebb mint 1 nL mennyiségű antigént „nyomtatnak” egy automatával (11-40. ábra). Ebben az eljárásban a microspot felszínén befogott autoantitest mennyisége olyan kicsi, hogy ez nem befolyásolja annak koncentrációját a mintában, még akkor sem, ha a kötés nagy affinitású. Ilyen körülmények között a mintából kifogott autoantitest mennyisége közvetlenül tükrö-

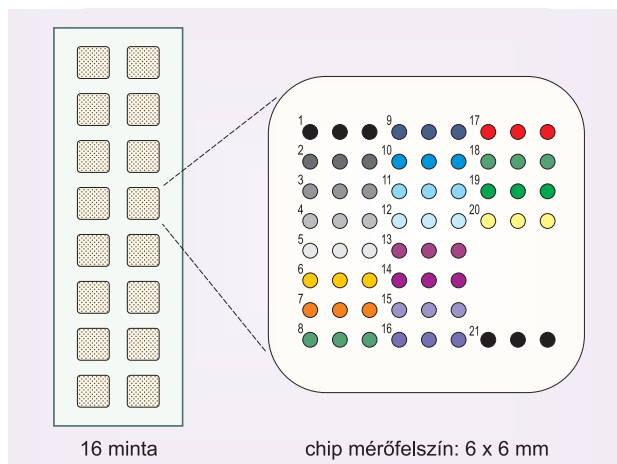
zi annak koncentrációját. Érdekes, hogy a koncentráció mérés ilyen környezeti („ambiens”) analit körülmények között független a minta volumenétől, és a kis mintafelhasználás ellenére nagyon szenzitív. Ennek két oka van: egyrészt a kötés a legmagasabb célmolekula-koncentráción zajlik, másrészt a befogó molekula-analit komplex egy nagyon kis területen található, nagy jelet okozva ott.

A mérési formátum egy kétlépéses fluoreszcens immunoassay, ahol a fluoreszcens jelet egy lézerdetektor méri.

Áramlási citometriás immunoassay – multiplex microbead assay

A Luminex cég (Austin, TX, USA) kifejlesztett egy áramlási citometriás mérési elven alapuló, multiparametrikus fluoreszcens immunoassay-t. Ebben a rendszerben két különböző fluorofór különböző koncentrációival feltöltött latexgyöngyök (bead) szolgálnak szolid fázisként. Ezek a részecskék az áramlási citométeren mind külön csoportként jelennek meg. A több mint 60 különböző tulajdonságú partikulum mindegyike külön célmolekula (autoantitest) mérésére szolgál, egy mintából. Egy adott gyöngycsoportból kb. 1000 darab képezi a reakciófelszínt, amelyhez az adott antigént kovalens kötással kapcsolják. Az autoantitest kötődését a mikrogöngyökhöz egy második színű fluoreszcens molekulával jelölt anti-humán IgG antitesttel tesszük láthatóvá. A készülék egyetlen méréssel minden gyöngycsoportból 1000-1000 partikulomot lemérve elkülöníti azokat fluoreszcens jelzésük, valamint intenzitásuk alapján, és külön jelként detektálja az adott gyöngycsoportnak a jelölő fluoreszcencia intenzitását is. Ez a jel egyenesen arányos a befogott autoantitest mennyiségével.

A multiplex assay-k ígéretesek az autoantitest-diagnosztikában, ugyanakkor a szilárd fázishoz kötött molekulák antigenitásának megtartása még nem tökéletes. Cél az indirekt immunfluoreszcencia technikával és ELISA-val verifikált standard, kvantitatív mérések reprodukálhatósága a multiplex mérésekben is. Néhány esetben a szenzitivitást és a specificitást is vizsgálni kell. Ugyanakkor a miniaturizálás mint végső cél fontos az immundiagnosztikában is, mert költséghatékonyabb, gyorsabb, klinikailag hasznos, és nem utolsósorban kevésbé terheli a beteget.



11-40. ábra. Autoimmun MicroSpot Protein Array

Az ábrán 14 szisztémás autoimmun betegséget jelző autoantitestet mérnek egyszerre, egy mintából. 1–5: kalibrátor; 6: Cenp-B; 7: Ui-70k; 8: Sm; 9: SSA/Ro52; 10: SSA/Ro60; 11: SSB/La; 12: Mi-2; 13: PM/Scl-75; 14: PM/Scl-100; 15: Jo-1; 16: Scl-70; 17: PR3; 18: MPO; 19: dsDNS; 20: puffer; 21: pozitív kontroll

A laboratóriumi gyakorlatban mért autoantitestek

AZ AUTOIMMUN BETEGSÉGEKBEN ELSŐSORBAN MEGHATÁROZOTT AUTOANTITESTEK

Anti-dsDNS – kettős szálú DNS elleni autoantitest

Az antitest elsősorban SLE aktív szakaszaiban pozitív, de más szisztémás autoimmun betegségben is előfordulhat. SLE-ben szenvedő betegben a dsDNS pozitív-vá válása megelőzheti a klinikai tünetek megjelenését. Az autoantitest-pozitivitást a betegség *aktivitási markerének* tartják, amely általában komplementfaktor- (C3, C4, CH50) csökkenéssel együtt jelenik meg. A dsDNS antitest mérésével jól követhető a terápia sikeressége.

Anti-dsDNS-pozitivitás jellemző: SLE aktív fázisában, SLE veseérintettsége esetében,

más szisztémás autoimmun betegségekből: RA, Sjögren-szindróma, MCTD, scleroderma, egyéb autoimmun kórképekben: krónikus aktív hepatitis (CAH), primer biliaris cirrhosis (PBC).

Mérőmódszer:

- A klasszikus HEp-2 indirekt immunfluoreszcenciánál megbízhatóbb a *Crithidia luciliae* (gerinctelenek béltraktusában élősködő protozoon) szubsztráton végzett IIF-vizsgálat. Ez utóbbi előnye, hogy ebben az egysejtűben óriás mitokondriumok vannak nagyfokban kondenzált kettős szálú DNS-sel, hisztonok nélkül. Így a diagnosztikus értéke jobb, mint a HEp-2 homogén rajzolatú képnek.
- Antigénspecifikus ELISA: fontos, hogy a gyártó valóban tiszta, általában humán rekombináns kettős szálú DNS-preparátumot használjon antigénnek.

Antinukleoszóma-autoantitest

A nukleoszóma a kromatin alapszerkezeti eleme, 147 bázispár hosszúságú szuperhelikális DNS szakasz, amelyet hiszton fehérjék (H2a, H2b, H3, H4) vesznek körül. Az e struktúra ellen megjelenő autoantitestek jellemző korai diagnosztikus markerei az SLE-nek és a gyógyszerindukálta SLE-nek. Az antitest sokszor megelőzi az anti-dsDNA autoantitest megjelenését, aktív SLE 100%-os markere.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

ENA – extrahálható nukleáris antigének elleni autoantitestek

Az ENA a sejtmagból kémiai eljárással kivonható antigének összefoglaló neve. Minden ANA-pozitív mintát ENA-ra tovább kell vizsgálni. A *mérőmódszer* általában az antigénspecifikus ELISA. Az ENA-pozitivitás szisztémás autoimmun betegségekre jellemző (lásd 11-10. és 11-11. táblázat).

Az ENA csoportba tartoznak a következő antitestek:

- RNP-antitest (U1-RNP – small nuclear uridine-rich ribonucleoproteins).
- Sm-antitest (small nuclear ribonucleoprotein particles, más néven Smith-antigén).
- SS-A antitest (soluble substance A nuclear antigen, más néven SS-Ro – Robert-antigén vagy Sjögren A).
- SS-B antitest (soluble substance B nuclear antigen, más néven SS-La – Lane-antigén, vagy Sjögren B).
- Scl-70 antitest (scleroderma antigén, lényegében 70 kDa anti-topoizomeráz).
- Jo-1 antitest (hisztidil-tRNS-szintetáz-ellenes antitest, a Jo-1 jelölés egy beteg nevéből ered).

Anti-RNP

Kevert kötőszöveti betegség (MCTD) esetén 100%-ban fordul elő egyetlen antitestként, SLE-ben 32%-ban, de mellette megtalálható az anti-dsDNS, anti-Sm és antihisztin antitestek jelenléte is. Szisztémás sclerosisban 10% az előfordulási gyakorisága.

Anti-Sm

Az SLE diagnózisának ACR-kritériumában egyik paraméter. 99%-ban specifikus a jelenléte SLE-re, előre jelezve annak súlyos szervi manifesztációit (KIR, vese).

Anti-SS-A

Collagenosisok, különösen a Sjögren-szindróma diagnosztikus markere, de SLE-ben is előfordul.

Anti-SS-B

Diagnosztikus érzékenysége primer Sjögren-szindrómában 70%, szekunder Sjögren-szindrómában 50%, SLE-ben 25%, neonatalis lupusban 70%, szubakut cutan lupusban 80%.

Anti-Scl-70

A progresszív szisztémás sclerosis (PSS) súlyosabb lefolyású formájára jellemző autoantitest. Raynaud-jelenség meglétekor az antitopoizomeráz-I autoantitest pozitivitása előre jelzi a PSS kialakulását korai bőr- és belső szervi (szív, tüdő, vese) manifesztációkkal.

Anti-Jo-1

Az idiopathiás myositis ismert, 100%-ban specifikus markere. Szenzitivitása 30%-os idiopathiás myositisben, 46% polymyositisben. A Jo-1-pozitív esetek súlyosabb lefolyásúak, 65%-os a valószínűsége a tüdő érintettségének (alveolitis, tüdőfibrosis).

A GYAKORLATBAN VIZSGÁLT EGYÉB AUTOANTITESTEK

Cenp-B – centromer elleni autoantitest

A centromer B-protein DNS-kötő fehérje, amely más fehérjékkel együtt fontos szerepet játszik a centromer kialakulásában. Az ellene megjelenő autoantitesteknek fontos diagnosztikus és prognosztikus jelentősége van a progresszív szisztémás sclerosis (PSS) enyhébb formájának kialakulásában és Raynaud-jelenségben. Az anti-Cenp-B autoantitest prognosztikai marker, és évekkel megelőzheti a progresszív szisztémás sclerosis egy lokális, enyhébb formájának, a CREST-szindrómának a kialakulását.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

Anti-C1q komplementfaktor autoantitest

A C1q komplementfaktor ellen megjelenő IgG autoantitest fontos segítség az SLE lefolyásának, főképp a vesérintettségnek és a terápia eredményességének nyomon követéséhez. Ugyancsak diagnosztikus markere a hypocomplementaemiás-urticariás vasculitis szindrómának (HUVS), ebben 100%-ban pozitív, membranoproliferatív glomerulonephritisben (MPGN) 88%-ban mutatható ki az anti-C1q autoantitest. Mivel az antitest megjelenése akár hónapokkal is megelőzheti az SLE vesemanifesztációját, folyamatos monitorozása indokolt.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

Anti-CCP – ciklikus citrullinált peptid elleni autoantitest

A CCP (filaggrin) kötőszöveti antigén, amely ellen antitest termelődik rheumatoid arthritises betegek-

ben. A CCP (ciklikus citrullinált peptid) elleni antitest korai biomarker, évekkel a rheumatoid arthritis klinikai megjelenése előtt megjelenik a vérben. A CCP-t jobb diagnosztikai markernek tartjuk rheumatoid arthritisesben, mint a rheumatoid faktort. Az anti-CCP a rheumatoid arthritises betegek 85–95%-ában kimutatható.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

RF (rheumatoid faktor) izotípusok – anti-IgG IgG/IgA/IgM

Az RF az IgG Fc-régiója ellen termelődő antitest. Három izotípusa fordul elő: RF-IgG, RF-IgM, RF-IgA. Alacsony a specifitása, rheumatoid arthritis és juvenilis krónikus arthritis mellett autoimmun kórképekben, fertőzésekben, gyulladásos folyamatokban is pozitív lehet.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

Kardiolipin IgG/IgA/IgM antitest

Az antitest-pozitivitás az antifoszfolipid-szindróma diagnózisának egyik laboratóriumi kritériuma. A kardiolipin a mitokondrium belső membránjának integráns (20%) foszfolipidje, nélkülözhetetlen számos energiatermelő metabolikus folyamatban fontos enzim működéséhez. A kardiolipin fehérje elleni antitest számos kórképben megjelenik. Az antitest gátolja az alvadási kaskád foszfolipid fehérjéinek aktivitását, ennek következtében alvadási zavar, érelzáródás jöhet létre. Kardiolipinantitest jelenlétében nem tud az embrió beágyazódni és a placenta kialakulni. Kardiolipin-pozitivitás a terhesség későbbi szakaszában magzati retardációt, placentaér-thrombosit, koraszülést okozhat.

Különbféle bakteriális infekciókban keresztreakció miatt előfordulhat álpozitivitás (pl. tbc, *Treponema pallidum*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Borrelia*, HIV fertőzés).

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

 β_2 -glikoprotein I elleni IgG/IgA/IgM antitest (β_2 -GPI antitest)

A β_2 -GPI fehérje a kardiolipin és más foszfolipid fehérjék kofaktora. Gátolja a véralvadás intrinszc útját. Az antitest-pozitivitás az antifoszfolipid-szindróma diagnózisának egyik laboratóriumi kritériuma.

Kardiolipin- és β_2 -GPI-antitest vizsgálat javasolt a következő esetekben:

- Thrombophilia kivizsgálásakor.
- 45 év alatti betegben nem tisztázott mélyvénás thrombosis, ill. artériás elzáródás esetén.
- Szisztémás autoimmun betegségekben a thrombosis- és abortuszrizikó megítélésére.
- Habitális abortuszban.
- In vitro fertilizáció sikertelenségekor.
- SLE, SLE-szerű kórképek vagy más szisztémás autoimmun betegségben.
- Ismeretlen eredetű recidiváló thrombocytope-niában.
- Neurológiai kórképekben, ha a megszokott okok és rizikótényezők nem igazolhatók (migrén, chorea, multiinfarctus okozta dementiában, myelitis transversában, <45 évnyi élettörténetekben).

Kardiolipin és/vagy β_2 -GPI antitest-pozitivitás előfordulása:

- Vénás és artériás thrombosisban.
- Szisztémás autoimmun betegségekben, elsősorban SLE-ben.
- Habitális abortuszban.
- Placentathrombosisban.
- Infertilitásban.
- Syphilisben.

Fontos: pozitív (elsősorban gyengén pozitív) kardiolipinvizsgálatot, az aspecifikus pozitivitás kizárása végett 12 héttel később meg kell ismételni.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

ANCA (antineutrofil citoplazma elleni antitest)

Az ANCA a neutrophil granulocyták citoplazmájában lévő különféle enzimek elleni antitestek gyűjtőneve.

Mérőmódszerek:

1. Indirekt immunfluoreszcenciával vizsgálva háromféle mintázat ismerhető fel:

- c-ANCA (citoplazmamintázat).
- p-ANCA (perinukleáris mintázat).
- Atípusos ANCA (nem besorolható, általában p-mintázat).

c-ANCA mintázatot mutató autoantitestek:

- proteináz-3 (PR3) enzim;
- bactericidal/permeability increasing protein (BPI).

p-ANCA mintázatot mutató antitestek:

- myeloperoxidáz (MPO);

- minor antigének: laktoferrin, Katepszin-G, elasztáz, lizozim.

2. Antigénspecifikus indirekt ELISA-val vizsgáljuk az anti-MPO és anti-PR3, esetleg a minor antigének elleni autoantitestek megjelenését.

- MPO-, ill. p-ANCA-pozitivitás: a mikroszkópos polyangitis specifikus markere, amely jelzi a betegség aktivitását is, így alkalmas annak monitorozására. Pozitív lehet még Churg–Strauss-szindrómában, panarteriitis nodosában és idiopathiás glomerulonephritisben.
- A PR3, ill. a c-ANCA fontos diagnosztikus marker a Wegener-granulomatosisban.

Az ANCA-vizsgálat indikációi:

- Akut glomerulonephritis.
- Vasculitisek diagnosztikája.
- Tüdővérzés, különösen tüdő-vese szindróma esetén.
- Asthma eosinophiliával és tüdőgranulomákkal.
- Mononeuritis multiplex.
- Makacs sinusitis vagy otitis.
- Subglotticus trachealis stenosis.
- Retroorbitalis szövetszaporulat.

Autoimmun myositis autoantitestprofil-immunoblot: Jo-1, PM/Scl, Ku, SRP, Mi-2, PL-7, PL-12

Az autoimmun dermatomyositis/polymyositis szisztémás autoimmun betegség, amelyben az izomzat gyulladása mellett bőr-, tüdő- és ízületi elváltozások is vannak. A betegség tarka autoantitestképpel jár, ami segít a myositisszel járó kórképek differenciálásában, az overlap-szindrómáknál és a betegség prognózisának megítélésében és a terápia követésében.

Jellemző autoantitestek:

- Szívizom-érintettség: SRP-pozitivitás.
- Tüdőérintettség: antisztetáz-pozitivitás (Jo-1, PL-7, PL-12).
- Bőrelváltozás: anti-Mi-2-pozitivitás.

Autoimmun myositisben előforduló autoantitestek:

- Hisztidil-tRNS szintetáz (Jo-1) – 20–30%.
- Treonil-tRNS-szintetáz (PL-7) – 3–6%.
- Alanil-tRNS-szintetáz (PL-12) – kb. 3%.
- Hiszton-deacetiláz és nukleosóma remodelling komplex (Mi-2) 10–30%.
- SRP (signal recognition particle) – 5%.

Myositis overlap-szindrómában előforduló autoantitestek

- Ku (70–86 kDa) – 15%.
- SS-A/Ro – 5–10%.
- U1-RNP – 5–10%
- U2-RNP – 4–17%

Autoimmun polymyositis gyanújában ajánlott laboratóriumi vizsgálatok (11-13. táblázat):

- ANA (Hep-2).
- ANA ELISA.
- ANA-pozitivitás esetén ENA.
- autoimmun myositis autoantitest profil.

Szükséges kiemelni, hogy a betegség CK-, GOT- és LDH-szint emelkedéssel jár!

SZERVSPECIFIKUS AUTOANTITESTEK

Pajzsmirigyellenes autoantitestek (anti-Tg, anti-TPO, TRAK)

Anti-Tg (antithyroglobulin)

A tiroglobulin 660 kD molekulatömegű, vízdékony thyreoprotein. A pajzsmirigyben termelődik, a fehérjék 75%-át adja. Belőle képződik a T_3 és T_4 hormon úgy, hogy a molekula 2 tirozincsoportja jód-atomot vesz fel, összekapcsolódik, és proteolitikusan lehasad a fehérjéről. A thyreoglobulin elleni antitest (anti-Tg) jelenlétében csökken a pajzsmirigyhormon termelése, ami hosszú távon hypothyreosist okozhat.

A pajzsmirigy-peroxidáz enzim (TPO) a mirigysejt membránjához kötött fehérje, amelynek funkciója a pajzsmirigyhormon szintézise. A TPO ellen termelődő antitestek tönkreteszhetik a pajzsmirigy hormonszintézisét, ennek következtében hosszú távon hypothyreosis jöhet létre.

Az *anti-Tg-pozitivitás* jellemző Hashimoto-thyroiditisben 60–70%-ban, primer myxoedemában szintén 60–70%-ban, Basedow–Graves-kórban kb. 20%-ban, más autoimmun betegségeken, mint idiopathiás diabetes mellitus (IDDM), anaemia perniciosa, coeliakia és egyéb krónikus gyulladások.

Anti-TPO

Az *anti-TPO-pozitivitás* előfordulása Hashimoto-thyroiditisben és primer myxoedemában kb. 90%, Basedow–Graves-kórban kb. 80%. Nem immunológiai eredetű pajzsmirigybetegségeken (struma, autonom adenoma) és széles skálájú autoimmun beteg-

ségekben (Addison-kór, IDDM, anaemia perniciosa, autoimmun polyendocrinopathia, coeliakia, CAH), vitiligóban szintén leírtak anti-TPO-pozitivitást.

11-13. táblázat. ANA-pozitivitás előfordulása különféle betegségeken

Betegség	Előfordulás %-a
SLE	95–100
DIL	95–100
discoid SLE	21–50
SCLE	20–65
MCTD	100
scleroderma	31–90
CREST-szindróma	95
Sjögren-szindróma (SS)	50–95
egyéb reumás betegség	20–50
panarteritis nodosa	15
polymyositis/dermatomyositis	40
psoriasis vulgaris	30
uveitis	60
autoimmun CAH	45–100
PBC	40
vírushepatitis	30
alkoholos cirrhosis	30
cryptogen cirrhosis	30
myasthenia gravis	35–50
tüdőfibrosis, alveolitis	20–60
ITP	50–70
autoimmun haemolyticus anaemia	40–50
autoimmun thyroiditis	20–40
anaemia perniciosa/atrophias gastritis	20–30
leukaemia	70
terhesség	50
mononucleosis	30–70
LE-beteg egészséges rokonai	25
egészséges személy 60 éves kor alatt	0–5
egészséges személy 60 éves kor fölött	5–30

Ilyenkor a TSH-szintet ellenőrizni szükséges.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

TRAK

TSH-receptor elleni antitest. Mára bebizonyították róla, hogy diagnosztikus értéke kizárólag a neonatális thyreotoxicosis predikciójában van, de a bonyolult metodika miatt kevés helyen alkalmazzák.

Szöveti transzglutamináz (tTG), endomysium (EMA) és gliadin elleni antitestek

A coeliakia minden életkorban előforduló betegség, amelynek oka a glutén okozta intolerancia. Glutént tartalmaz a búza-, az árpa- és a rozsliszt. Genetikailag predisponált egyénekben a glutén által okozott immunológiai elváltozások miatt a bélbolyhokban atrophia alakul ki. A betegek tüneteinek egy része a felszívódási zavarral függ össze, amely érintheti a fehérje-, zsír- és ásványi anyagcserét is. A betegség társulhat más autoimmun betegségekkel is. Gluténmentes diéta hatására a panaszok megszűnnek, és az autoantitestek kb. 6 hónap alatt eltűnnek.

A klasszikus gasztroenterológiai tünetek (hasmenés, haspuffadás) mellett a betegségre gondolni érdemes vashiányos anaemiában, autoimmun pajzsmirigybetegekben, korai osteoporosisban, 1-es típusú diabetes mellitusban, recidiváló herpeszfertőzéseknel és stomatitis aphthosában, alopecia areatában, férfi és női meddőségben, habituális abortuszban, laktózintoleranciában, ismeretlen eredetű polyneuropathiában. Az EMA- és a tTG-mérések diagnosztikai hatékonysága igen nagy (90–95%).

Mérőmódszerek:

- Indirekt immunfluoreszcencia: majomesophagus-metszeten endomizium IgA (EMA IgA). IgA-hiányos betegeknel az IgG típusú ellenanyagot kell mérni.
- Antigénspecifikus ELISA: szöveti transzglutamináz IgA és IgG antitest, anti-gliadin IgA.

ASCA (*Saccharomyces cerevisiae* elleni antitest) IgG és IgA

Az ASCA a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) elleni autoantitest. Az élesztőgomba falában lévő mannóztartalmú foszfopeptid ellen termelődik. A gyulladással járó betegségek közül Crohn-betegségben kb. 70%-os pozitívitas fordul elő, colitis ulcerosában viszont csak 6 %-os. Az autoantitest már a betegség

korai fázisában kimutatható. A két betegség differenciálásán túl az autoantitest-kimutatás a betegség aktivitási markere is.

A gyulladással járó betegségek között jól differenciál az ASCA- és ANCA-vizsgálat együttes végzése is. Colitis ulcerosában ANCA- (PR3), Crohn-betegségben ASCA-pozitívitas gyakoribb.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

Gyomor parietalis sejt (GPC, vagy PCA) és az intrinsic faktor (IF) elleni IgG antitest

A gyomor parietalis sejt antitest a H^+/K^+ -ATP-áz protonpumpa elleni antitest, amely biztosítja a gyomor normális pH-ját. Az intrinsic faktor a B_{12} -vitamin felszívódásához nélkülözhetetlen faktor. A gyomor parietalis sejtjei ellen termelődő antitest atrophias gastritist okoz. A teszt specificitása alacsony, mert más szervspecifikus autoimmun betegségben, ill. egyéb kórképekben és tünetmentes egyéknél is kimutatható. Az autoantitest-pozitívitas anaemia perniciosában 86–90%-ban jellemző.

Mérőmódszer: antigénspecifikus ELISA.

Autoimmun májbetegség autoantitest-immunoblot profil (AMA-M2, LKM1, LC, SLA, dezmin, miozin, F-aktin)

Az autoimmun májbetegségek csoportjába tartozik az autoimmun hepatitis (AIH), a primer biliaris cirrhosis (PBC) és a primer sclerotizáló cholangitis (PSC).

Gyakran előfordul, hogy overlap-szindróma képeben jelentkezik a betegség, egyszerre vannak jelen gyulladásra (GOT, GPT) és cholestasisra (AP, γ -GT) jellemző laboratóriumi eredmények.

Az *autoimmun hepatitis* diagnosztikai kritériuma: normális α_1 -antitripszin, réz- és cöruoplazminsint, negatív HBV-, HCV-, CMV- és EBV-szerológia, csekély alkoholfogyasztás (< 25 g/nap), ANA és/vagy SMA, LKM, SLA antitest-pozitívitas.

A tesztben szereplő antigének:

- SMA: simaizom elleni antitestek (smooth muscle antibodies, anti-F-aktin, antidezmin és anti-miozin).
- LKM: máj-vese mikroszóma (liver-kidney microsomal) antitest.
- LC-1: májcitoszol (liver-cytosol antigen type I) antitest.
- SLA/LP: szolubilis máj (soluble liver) antigén.

- AMA-M2: a mitokondriális belső membránhoz asszociált piruvát-dehidrogenáz komplex elleni antitest a primer biliaris cirrhosis marker autoantitestje, a kórkép kb. 95%-ában pozitív.

Az autoimmun hepatitisek egyes típusait és a rájuk jellemző autoantitestek előfordulási gyakoriságát a 11-14. táblázat mutatja.

Onconeuralis/paraneoplasias antitest immuno-blot [Hu, Ri, Yo amphiphysin, CV2 (CRMP5), PNMA2, Ma-2/Ta]

A tumorok által exprimált különféle antigének (11-15. táblázat) ellen az immunrendszer antitesteket termel. Ezek az antitestek reakcióba lépnek az idegszövet hasonló antigénszerkezetű elemeivel, aminek következtében neurológiai zavarok alakulnak ki. Az

11-14. táblázat. Autoimmun májbetegségekben előforduló autoantitestek

Autoantitest	ANA	SMA	SLA	LKM LC	pANCA	AMA
	%					
AIH I. típus	80–100	60–90	–	–	–	–
AIH II. típus	–	–	–	100	–	–
AIH III. típus	–	–	100	–	–	–
PBC	10	10	–	–	10	95
PSC	5	<10	–	–	80	–
AIH II. típus HCV+	5	5	–	100	–	–

PBC: primer biliaris cirrhosis; PSC: primer sclerotizáló cholangitis; AIH: autoimmun hepatitis

11-15. táblázat. Paraneoplasticus antigének és a hozzájuk asszociált tumorok

Autoantitest	Antigén-előfordulás helye a szervezetben	Neurológiai tünet	Asszociált tumor
anti-Hu (ANNA-1)	neuron sejtmag (központi/perifériás idegrendszer)	szenzoros neuropathia limbicus encephalitis kisagyi degeneráció gastrointestinalis pseudoobstructio	kissejtes bronchus cc.
anti-Yo (PCA, Purkinje-sejt elleni antitest)	Purkinje-sejt citoplazma (kisagy)	kisagyi degeneráció	mamma cc. ovarium cc.
anti-Ri (ANNA-2) (központi idegrendszer)	neuron sejtmag	agytörzsi encephalitis	mamma cc. bronchus cc.
anti-PNMA2 (Ma2/Ta)	neuron és here	limbicus encephalitis kiasagyi degeneráció agytörzsi encephalitis	tüdő cc. seminoma
anti-CV2 (CRMP5)	oligodendrocyta citoplazma	chorea szenzoros neuropathia kisagyi degeneráció limbicus encephalitis	kissejtes bronchus cc. thymoma
anti-amphiphysin	szinapsis vesiculamembrán	stiff-man szindróma	mamma cc. kissejtes bronchus cc.

így létrejövő központi idegrendszeri elváltozást paraneoplasias neurológiai kórképnek nevezik.

Jelenleg vizsgálható paraneoplasias antitestek:

- Anti-Hu (ANNA-1, anti-neuronális nukleáris antigén 1).
- Anti-Yo (Purkinje-sejt elleni antitest).
- Anti-Ri (ANNA-2, anti-neuronális nukleáris antigén 2).
- Anti-Ma2/Ta (anti-pnma2 – paraneoplasticus neuronális antigén).
- Anti-CV2 (CRMP5 Collapsin Response Mediator Protein).
- Anti-amphiphysin (szinaptikus vezikulák citoplazmatikus proteinje).

IRODALOM

- TA, E., COHEN, A., FRIES, J. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271–1277, 1982.
- HOCHBERG, M. C.: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40:1725, 1999.
- MUNA, N. M., VERNER, J. L., HARMOND, D. F. et al.: Fluorescent antibody technique as a routine procedure in the diagnosis of lupus erythematosus using stored tissue culture cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:117, 1966.
- HUMBEL, R. L.: Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij, W. J., Maini, R. N. (eds.): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, the Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 1–16, 1993.
- BRADWELL, A. R., STOKES, R. P., JOHNSON, G. D.: *Atlas of HEp-2 patterns*. The Binding Site 1995.
- ENGVAL, E., PERLMANN, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. *G. Immunochemistry* 8:871–874, 1971.
- TOWBIN, H., STAHLIN, T., GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350, 1979.
- EMLEN, W., O'NEILL, L.: Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum.* 40:1612–1618, 1997.
- SMOLEN, J. S., BUTCHER, B., FRITZLER, M. J. et al.: Reference sera for antinuclear antibodies II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum.* 40:413–418, 1997.
- KOIZUMI, H., ONOZUKA, Y., SHIBATA, M. et al.: Detection of anti-nuclear antibodies in liver diseases by indirect immunofluorescence method and enzymelinked immunosorbent assay. *Rinsho Byon* 8:744–748, 1999.
- CZIRJÁK L.: *Klinikai Immunológia*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006.

A celluláris immunitás klinikai laboratóriumi vizsgálata

BERKI TÍMEA

Morfológiai módszerek

Az immunrendszer sejtjeit vizsgálhatjuk funkcionális és morfológiai megközelítéssel. A sejtek morfológiai sajátosságait vizsgálhatjuk festés után hagyományos képalkotó eljárásokkal, de ellenanyagokkal való specifikus jelölés segítségével pontosabb molekuláris információkra tehetünk szert. A sejtek intracelluláris és sejtfelszíni fehérjemolekulái ellen fejlesztett specifikus poli- vagy monoklonális ellenanyagokkal, enzim vagy fluoreszcens jelzés felhasználásával *immunhisztokémiai* eljárással mikroszkópos megfigyeléseket tehetünk a sejtek fehérje alkotóelemeiről. Morfológiailag a fehérjék lokalizációján kívül azok mennyiségéről és megoszlásáról is információt kapunk. Ezek a módszerek ugyanakkor nagyon időigényesek, értékelésükben szubjektív elemek vannak, megbízható kvantitatív analízisre nehezen alkalmazhatók. Ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki az áramlási citometriát.

Áramlási citometria

Az áramlási citometria gyors, többparaméteres meghatározásra alkalmas módszer, nagyszámú sejt többféle tulajdonságának statisztikai feldolgozását teszi lehetővé. A sejtek morfológiai (méret, granularitás) és fenotípus analízise mellett funkcionális (enzimaktivitás, életképesség, fehérjeexpresszió, DNS-tartalom, sejtciklus, intracelluláris pH és kalciumion-szignál stb.) vizsgálatokat is lehetővé tesz különböző fluoreszcens festékek alkalmazásával. Az áramlási citometria elvét és módszereit a 11.4. fejezet taglalja.

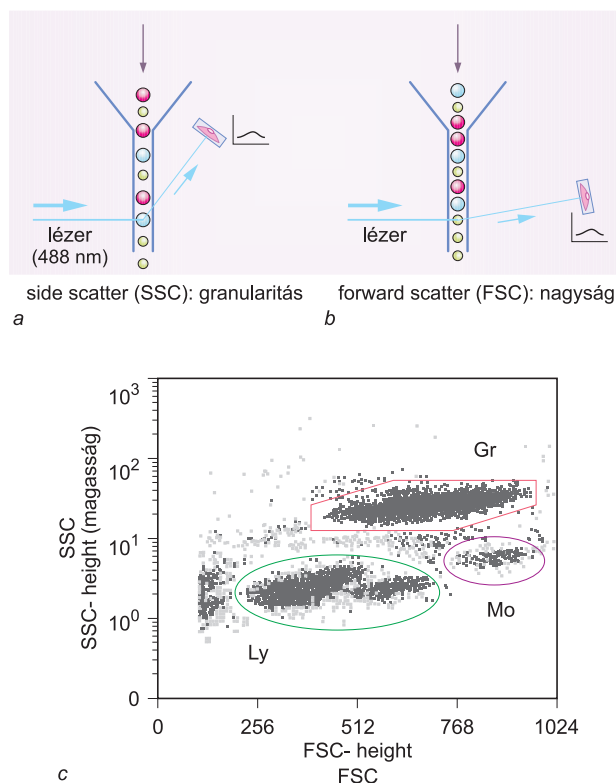
Az áramlási citometriával mérhető legfontosabb paraméterek (11-41. ábra, 11-42. ábra):

- Sejtméret (SSC).
- Granuláltság (FSC).
- Fluoreszcenciaintenzitás: FL-1 (zöld), FL-2 (narancs), FL-3 (piros), FL-4 (távolsi vörös).
- Idő (pl. kalciumszignál-mérésnél, az ábrán nem szerepel).

Immensejtek fenotípus meghatározása

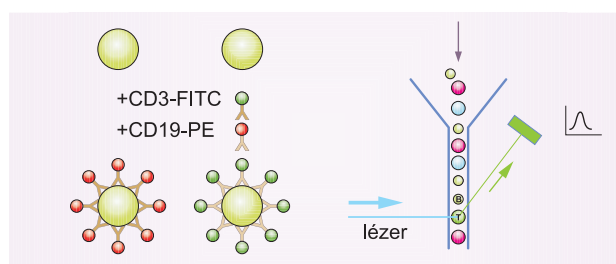
CD markerek

Elsősorban a sejtfelszíni molekulák, az ún. *CD markerek* (cluster of differentiation) alapján tudunk a *fehérvérsejtek alcsoportjai* közt különbséget tenni (11-43. ábra). A CD markerekre specifikus ellenanyagokkal nem csak az immensejtek fenotípusát, hanem az ún. aktivitási markereket, differenciálódási stádium-



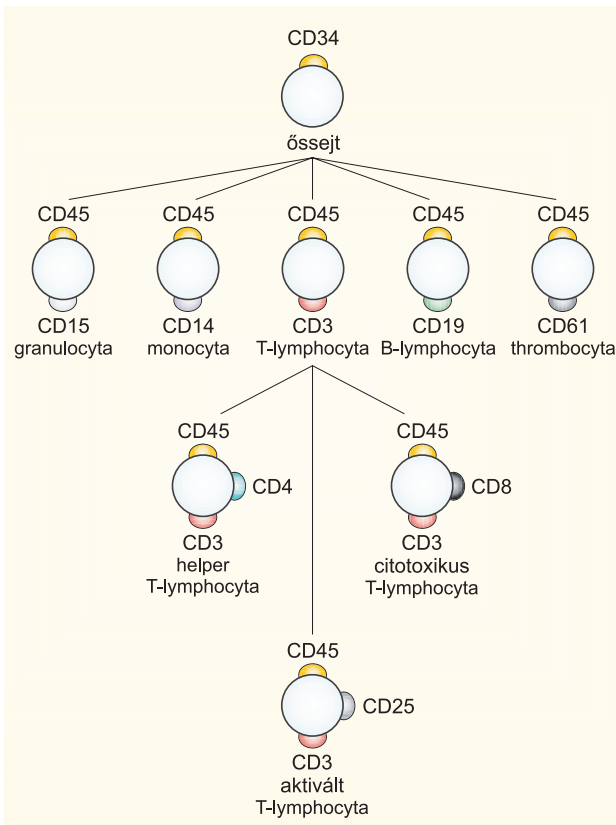
11-41. ábra. Áramlási citometria elve és fizikai paraméterei (Gr: granulocytá; Ly: lymphocytá; Mo: monocytá)

- a) SSC, side scatter: granularitás
b) FSC, forward scatter: nagyság
c) Áramlási citometriai diagram



11-42. ábra. Sejt felszíni molekulák fluoreszcens jelölése áramlási citometriához

CD3-FITC: zöld → FL1; CD19-PE: narancs → FL2; CD56-CyChr: piros → FL3; CD45-APC: vörös → FL4

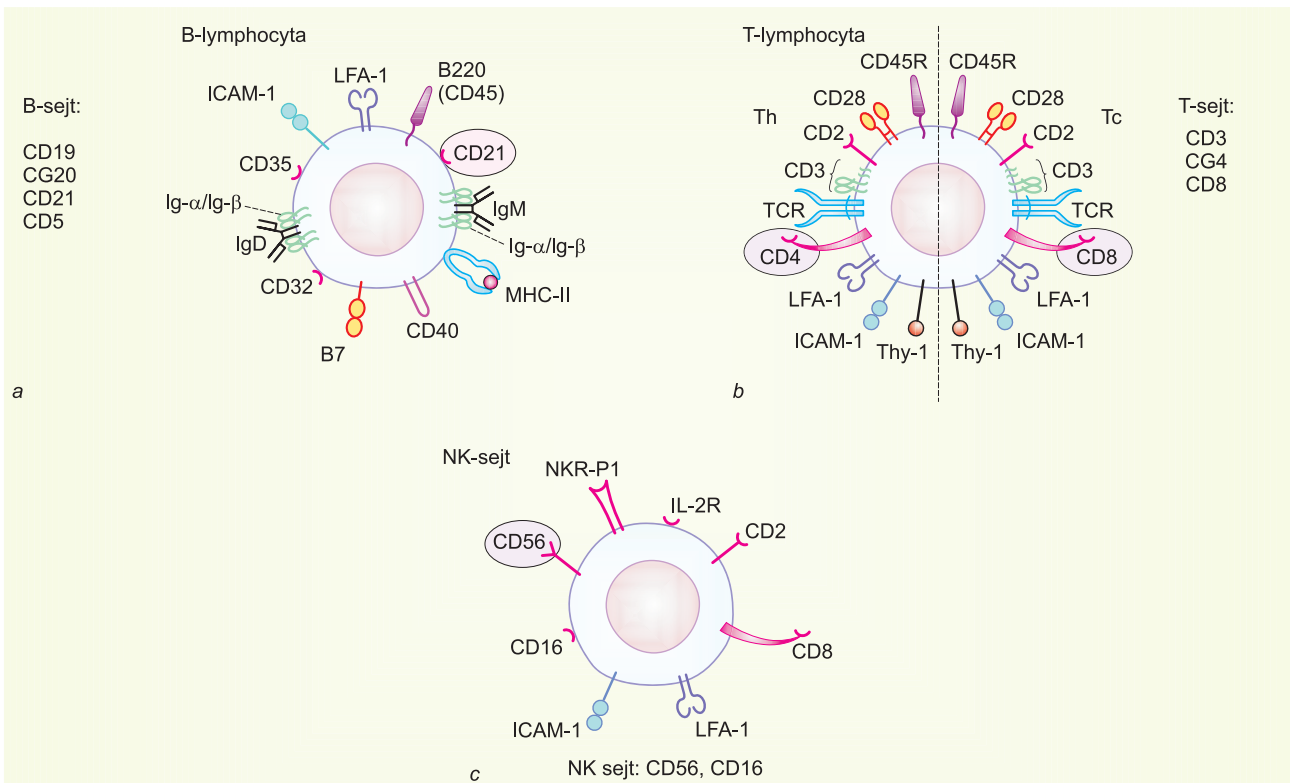


11-43. ábra. CD markerek

mokat is mérhetjük. A sejtfelszíni CD markerek tulajdonképpen különböző funkciójú sejtfelszíni receptorok, azok ligandjai, adhézións molekulák vagy más, a sejt működése szempontjából fontos molekulák. A legtöbb receptor jelátviteli funkcióval is rendelkezik, amellyel a sejt működésének megváltozását okozza. 2009-ig több mint 350 humán CD markert írtak le, jellemeztek, és jelölhetjük őket monoklonális ellenanyagokkal.

A *CD-nómenklatúrát* 1982-ben Párizsban az I. Nemzetközi Humán Leukocytá Differenciálódási Antigén (HLDA) Workshopon hozták létre és kezdeményezték. A rendszert a leukocytá antigénekkal reagáló monoklonális ellenanyagok klasszifikációjára alkották, és a világ különböző laboratóriumában fejlesztették ki. Azóta a rendszer elterjedt, és ma számos sejtcsoportra több mint 350 CD antigént különböztünk meg. Ezt jelzi a munkacsoport névváltoztatása is 2004-ben Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) Workshopra, jelezve a szélesebb kiterjedésű céljait.

Egy molekula CD számozása nem csak a specifikus monoklonális ellenanyaggal való reaktivitását jelenti,



11-44. ábra. Lymphocytacsoportokat azonosító CD markerek

hanem szükséges az antigén jellemzése is. Ha a molekula nincs karakterizálva, akkor a w indikátor jelzést kapja (pl. CDw186) [9].

A CD markerekre specifikus ellenanyagokat használnak a perifériás vérből vagy csontvelőből nyert sejtek fenotípusmeghatározására áramlási citometrias mérőmódszerrel, de alkalmazzák szövettani körülmények között is, pl. malignus hematológiai folyamatok diagnózisára, monitorozására is. A módszer nélkülözhetetlen a különböző hematológiai megbetegedésekben a sejtek differenciálódási stádiumának besorolásához, autoimmun megbetegedésekben, infekciókban az aktivált sejtek arányának detektálásához, az egyes lymphocytá-csoportok százalékos arányának és abszolút számának meghatározásához.

A CD rendszerrel jellemezhetünk fehérvérsejtcsoportokat azok differenciálódási állapota és funkciója szerint. Rendszerint több marker kombinációjával tudunk pontos definíciót kapni (11-44. ábra). Ezt a CD-specifikus antitestek különböző fluorofórral való jelölése teszi lehetővé, amely egy mintában több különböző hullámhosszon aktiválható és emittáló fluoreszcens molekula egyidejű detektálásában segít (11-16. táblázat, 11-17. táblázat).

A CD molekulákat felhasználjuk a sejtek különböző módszerekkel való szeparálására, beleértve az áramlási citometriát is. Egy-egy sejtcsoportot a CD marker után tett plusz (+) vagy mínusz (–) jellel jelölhetünk aszerint, hogy expresszálja vagy sem az adott molekulát. A haemopoeticus őssejtre jellemző pl. a

11-16. táblázat. Fontosabb fluorofórmolekulák

Festék	Abszorpciós hullámhossz	Emissziós hullámhossz	Szín
Hydroxycoumarin	325	386	blue
Methoxycoumarin	360	410	blue
Alexa fluor	345	442	blue
Aminocoumarin	350	445	blue
Cy2	490	510	green (dark)
FAM	495	516	green (dark)
Alexa fluor 488	494	517	green (light)
Fluorescein FITC	495	518	green (light)
Alexa fluor 430	430	545	green (light)
Alexa fluor 532	530	555	green (light)
HEX	535	556	green (light)
Cy3	550	570	yellow
TRITC	547	572	yellow
Alexa fluor 546	556	573	yellow
Alexa fluor 555	556	573	yellow
R-phycoerythrin (PE)	480; 565	578	yellow
Rhodamine Red-X	560	580	orange
Tamara	565	580	red
Cy3.5 581	581	596	red
Rox	575	602	red
Alexa fluor 568	578	603	red
Red 613	480; 565	613	red

11-17. táblázat. Fluoreszcens DNS-festékek

<i>Festék</i>	<i>Abszorpció hullámhossz</i>	<i>Emisszió hullámhossz</i>	<i>Szín</i>
DAPI	345	455	blue
Hoechts 33258	345	478	blue
SYTOX blue	431	480	blue
Hoechts 33342	343	483	blue
YOYO-1	509	509	green
SYTOX green	504	533	green
TOTO 1, TO-PRO-1	509	533	green
SYTOX orange	547	570	yellow
Chromomycin A3	445	575	yellow
Mithramycin	445	575	yellow
Propidium iodide	536	617	red
Ethidium bromide	493	620	red

CD34+, CD31– megjelölés (11-18. táblázat; lásd 11-43. ábra) [8].

A CD markerekre specifikus monoklonális ellenanyagok általában élő, nem fixált sejtek jelölésére alkalmasak. Fixálás vagy bármilyen eljárás, amely a CD antigének konformációjának megváltozását idézi elő, a jelölést zavarhatja vagy megakadályozza. Ezért a mononukleáris sejtek (lymphocyták és monocyták) sejt felszíni antigénjeinek jelölését alvadást gátló vér-

mintán végzik, majd a jelölés után fixálják a sejteket az áramlási citometriás analízisig. Ugyancsak fixált sejteket használunk intracelluláris fehérjemolekulák (pl. citokinek, jelátvivő molekulák, transzkripciósfaktorok) jelölésére, mert a jelölő antitest sejtbe juttatásához a sejtek membránját először átjárhatóvá kell tenni. A permeabilizált sejtéből fixálás nélkül kiáramlanak az intracelluláris molekulák, ezért szükséges permeabilizálás előtt a sejteket fixálni.

11-18. táblázat. A legjellemzőbb CD-markerek (lásd 11-43. ábra is)

<i>Sejttípus</i>	<i>CD-marker</i>
őssejt	CD34+, CD31–
minden leukocytá	CD45+
granulocytá	CD45+, CD15+
monocytá	CD45+, CD14+
T-lymphocytá	CD45+, CD3+
T helper sejt	CD45+, CD3+, CD4+
T citotoxikus sejt	CD45+, CD3+, CD8+
B-lymphocytá	CD45+, CD19+ vagy CD45+, CD20+
thrombocytá	CD45+, CD61+
NK-sejt	CD16+, CD56+, CD3–

Vizsgálati irányok, lehetőségek

Immunfenotipizálás

- Malignus hematológiai kórképek diagnosztikája és differenciál diagnosztikája.
- Autoimmun betegségek aktivitásának nyomon követése.
- Pre- és poszttranszplantációs állapotok nyomon követése.
- HLA-haplotípus vizsgálata.
- Tumorsejtek vizsgálata: proliferációs antigének vizsgálata, adhézións molekula expresszió kimutatás.
- Fertőző betegségek diagnosztikája és nyomon követése.
- Sejtfelszíni fehérje- vagy egyéb struktúrák távolságának meghatározása (energiatranszfer)

Kvantitatív mérési lehetőségek

- A vizsgált markert expresszáló sejtek mennyiségének meghatározása.
- Sejtfelszínen expresszálódó antigének kvantitatív meghatározása.

DNS- és RNS-tartalom mérése

- Sejtciklus-analízis.
- Apoptózismérés.
- Reticulocytaszám meghatározása.

Funkcionális vizsgálatok

- Fagocitálóképesség vizsgálata: fagoburst-teszt.
- Intracelluláris kalciumion-koncentráció meghatározás, sejtaktiváció-mérés.
- Intracelluláris pH-meghatározás.
- Enzimmennyiség, -aktivitás, ill. -lokalizáció mérése.
- Reaktív oxigénintermedierek (ROI) termelődésének detektálása (pl. H_2O_2).
- Kemotaxis vizsgálat.
- Proliferációs index meghatározása.

Sejtszeparálás

Vizsgálati panelek fenotípus meghatározásra

Immunhiányos állapotok, transzplantáció monitorozása:

- Immunstátus-monitorozás: T-, B-, Mo-, Th-, Tc-szubpopuláció meghatározása perifériás vérből.
- CD3, CD4, CD8 sejtek abszolút számának meg-

határozása CD3/CD45, CD4/CD45, CD8/CD45 jelöléssel.

- Naiv/memória sejtarány meghatározás: CD3/CD45RO/CD45RA.
- Adhézións molekulák expressziójának vizsgálata (keringő leukocyták, ill. stimulált leukocyták felszínén). LAD diagnosztika (CD11/CD18 expresszió zavara).

Fertőzések állapotok nyomon követése:

- Aktivitási markerek vizsgálata: CD3/CD69, CD3/HLA-DR/CD25, CD8/HLA-DR.
- Immunstátus-monitorozás: T-, B-, Mo-, Th-, Tc-alcsoport meghatározása perifériás vérből.

Autoimmun folyamat monitorozása (11-19. táblázat):

- Immunstátus-monitorozás: T-, B-, Mo-, Th-, Tc-alcsoportok meghatározása perifériás vérből.
- Autoantitest-termelő B-sejtek vizsgálata: CD5+ B-sejt-arány meghatározása.
- Aktivitási markerek vizsgálata: CD3/CD69, CD3/HLA-DR/CD25, CD8/HLA-DR.
- Naiv/memória T-sejt arány meghatározása: CD3/CD45RA/CD45RO.
- Intracelluláris citokin mintázat, fagocitózis vizsgálat.

A legutóbbi Cluster of Differentiation lista és leírás az interneten érhető el [8, 10].

Mikroszkópos módszerek

Hagyományos hisztokémiai módszerek

A hagyományos hisztokémiai módszerekkel a szöveti környezetben lévő sejteket vagy izolált sejteket is vizsgálhatunk az egyes sejtalkotókhoz szelektíven kötődő festékek segítségével vagy a sejtekben előforduló enzimek szubsztrátjainak hozzáadásával, e folyamatok színes terméket eredményeznek. Ily módon egyes sejtípusok és funkcionális sajátosságok vizsgálhatók, de a sejtalkotók molekuláris szintű vizsgálatát nem teszi lehetővé.

Enzimhisztokémiai technika

Az enzimhisztokémiai technika felfedezése és kifejlesztése elsősorban a magyar GÖMÖRI GYÖRGY nevéhez fűződik, vele egy időben, de tőle függetlenül a japán TAKAMATSU 1939-ben közölte az alkalikus

11-19. táblázat. A hematológiai malignitások azonosítására használt CD-markerek*

Antitest (CD)	Reaktivitás
CD1a	thymocyták és éretlen T-sejt
CD2	T-sejt, large granular lymphocyte (LGL), NK-sejt, némelyik APL, tumoros hízósejt
CD3	T-sejt, primer lymphoma
CD4	T-sejt (helper/inducer), monocyták, myeloblast, NK-sejtes lymphoma
CD5	T-sejt, B-CLL/SLL, MCL
CD7	T-sejt, némelyik myeloblast
CD8	T-sejt (szuppresszor/citotoxikus), large granular lymphocyte (LGL), némely NK-sejt
CD10	folliculus-centrumsejt, FL, némelyik DLBCL, pre-B-ALL, pre-T-ALL, thymocyták, BL
CD11b	granulocyták, monocyták
CD11c	monocyták, HCL, LGL, aktivált T-sejt, MZL
CD13	myeloid sejt, ritka pre-B-ALL
CD14	monocyták
CD15	granulocyták, Hodgkin-lymphoma
CD16	granulocyták, NK-sejt, LGL
CD19	B-sejt, pre-B-ALL, AML alcsoportok (AML1/ETO t(8;21)-al)
CD20	B-sejt, ritka plazmasejtes myeloma
CD22	B-sejt
CD23	B-CLL/SLL, plazmasejt, follicularis dendritikus sejt
CD25	HCL, B- és T-sejtes lymphoma-alcsoportok
CD30	Hodgkin-lymphoma, anaplasticus nagysejtes lymphoma, DLBCL alcsoport, B-sejtes lymphoma alcsoportok
CD33	myeloid sejt, ritka pre-B-ALL, ritka blastos NK-lymphoma
CD34	myeloblast, lymphoblast, endothelsejt
CD38	plazmasejt, aktivált T- és B-sejt, B-CLL/SLL alcsoportok, epithelsejt
CD41	megakaryocyták
CD43	myeloid sejt, T-sejtes lymphoma, pre-B-ALL, pre-T-ALL, B-sejtes lymphoma(subset), plazmasejt
CD56	NK-sejt, LGL
CD57	NK-sejt, LGL
CD61	megakaryocyták
CD79a	B-sejt, plazmasejt, megakaryocyták
CD103	HCL, ritka T-sejtes lymphomák
CD117	AML, hízósejt, stromasejtes tumorok (GIST), plazmasejt
bcl-2	érett B-sejt (kivéve benignus GCC), T-sejt és FL
nehézlánc (IgG, IgA, IgM, IgD)	B-sejt, plazmasejt, DLBCL ALK expresszióval
HLA DR	AML (kivéve APL), B-sejt, monocyták
könnyűlánc (κ vagy λ)	B-sejt (sejtfelszín), plazmasejt (citoplazma)
TdT	pre-B-ALL, pre-T-ALL, némelyik AML

*A kurzivált rövidítések a betegségeknek az interneten a wikipediában megtalálható leírására utalnak.

foszfatázok hisztokémiai azonosítására szolgáló eljárást.

Az enzimmikrokémia alapja az, hogy az adott enzimreakció termékei oldhatatlan és lehetőleg fény-, ill. elektronmikroszkópban látható csapadékot adjanak. Fontos az enzimreakcióhoz megfelelő olyan fixálószer alkalmazása, amely az enzimet rögzíti, de aktivitását nem változtatja meg. Erre legelterjedtebben az aldehidek használatosak (formaldehid, glutáraldehid), mégpedig semleges pH-ra pufferelt oldatok formájában. Az enzimmikrokémiai eljárások jellegüket tekintve indirekt technikák, azaz nem magukat az enzimfehérjéket mutatjuk ki, hanem azok aktivitásából következtetünk előfordulásukra. Az enzimmikrokémiai reakciókat a sejt egy bizonyos specifikus struktúrájára (pl. egyes organelumra, plazmamembránra stb.) vonatkoztatjuk, így mondjuk, hogy specifikus citotopobiokémiai reakciókat végzünk.

Immunhisztokémiai technika

Az immunhisztokémiai reakció az elsődleges antigén-ellenanyag kapcsolódáson alapuló jelzéses technikák közé sorolható. Célja szöveti körülmények között vagy sejteken ellenanyag segítségével bizonyos antigének (tumor marker, enzimek, citokinek stb.) kimutatása. Diagnosztikus célra a fagyasztott metszeteken kívül elsősorban 4% formalinban fixált metszeten végeznek immunhisztokémiai reakciót. Az eljárás előnye, hogy a fixálás konzerválja a fehérjék antigenitását és megőrzi a szöveti struktúrát. Ugyancsak előnye a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintáknak, hogy patológiai célra évek múlva is lehet retrospektív immunhisztokémiai reakciót elvégezni a szöveten. A formalinfixálás hátránya, hogy keresztkötéseket hoz létre a fehérjékben és ezért álnegatív reakciót eredményezhet. Ennek elkerülésére számos megoldást dolgoztak ki. Ezek közül az egyik, hogy a szövet minél rövidebb ideig (2 nap) legyen a fixálószerben. A másik eljárás az antigénfeltárás, amelyre számos módszer áll rendelkezésre, pl.:

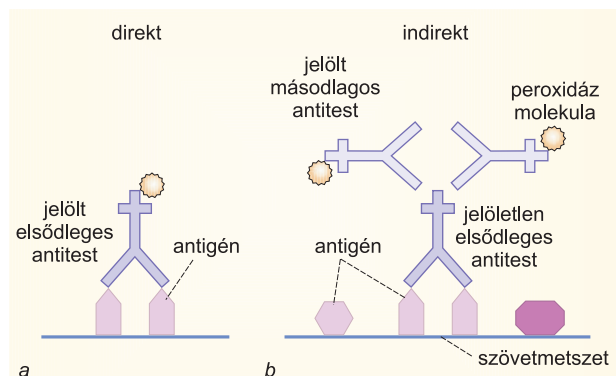
- Detergens kezelés (Tween 20, Saponin, Nonidet p40) a harmadlagos kötéseket felbontó anyagok, (urea, tiourea, guanidin-klorid, litium-perklorát stb.).
- Enzimatisz emésztés (tripszin, proteináz-K, pronáz-E).

- Hőfeltárás főzéssel, mikrohullámú kezeléssel, amely az immunreakció felerősödését eredményezi.

Szintén fontos az endogén enzimaktivitás gátlása is (peroxidáz, alkalikus foszfatáz) a nem specifikus háttér csökkentésére.

Ha az antigénre specifikus ellenanyagot festékekkel vagy enzimmel közvetlenül jelöljük, *direkt módszer*ről beszélünk. A direkt citokémia előnye, hogy gyors és kevésbé munkaigényes, ugyanakkor magas a háttér és relatíve gyenge a jel. Ha az antigénspecifikus elsődleges ellenanyag jelöletlen és kimutatásához általában egy poliklonális, jelölt másodlagos ellenanyagot használunk, *indirekt jelölésnek* nevezzük (11-45. ábra). Az indirekt módszer előnye, hogy alacsonyabb a jelölt másodlagos ellenanyag nemspecifikus kötődése okozta háttérreakció, ugyanakkor a jel erősítését teszi lehetővé.

A jelölő molekula lehet valamely fluoreszcens festék (lásd 11-16., 11-17. táblázat), amelynek láthatóvá tételéhez speciális aktiváló fényforrással és szűrővel ellátott fluoreszcens mikroszkópot használunk. A fluoreszcens jelölést zavarhatja a szövetek autofluoreszcenciája, ami elsősorban a flavin típusú vegyületeknek köszönhető. Magas autofluoreszcencia esetén célszerű olyan jelölő fluoreszcens festéket alkalmazni, amelynek abszorpciója vagy emissziója nem esik egybe az autofluoreszcenciát adó anyagéval. Ugyancsak alacsonyabb a fagyasztott metszetek autofluoreszcenciája.



11-45. ábra. Immunhisztokémia

a) Direkt

b) Indirekt

A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálathoz leggyakrabban peroxidáz és/vagy foszfatáz enzimet használunk jelölő molekulának. Az enzimreakció oldhatatlan, színes terméke a szövetekhez kötődve jelzi az antigén-antitest kapcsolódás helyét. A peroxidáz enzim katalizálja pl. a diaminobenzidin oxidációs reakcióját, kromogénként barna színű termék keletkezik, miközben az alkalikus foszfatáz enzim szubszt-rátja általában kék színreakciót ad.

Nagyon kis mennyiségű antigén kimutatásához a jelet tovább erősíthetjük ún. többlépcsős technikák alkalmazásával, amelyek közül az avidin-biotin-peroxidáz (ABC) eljárás (11-46. ábra) és a peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) komplex használata terjedt el (11-47. ábra).

A PAP módszernél az első két antitest hasonló az indirekt módszerben használttal, azzal a különbséggel, hogy a második antitest jelöletlen. A harmadik antitest egy peroxidáz enzimre specifikus, az első antitesttel azonos fajban termelt monoklonális antitest. Így a második antitest egyik karja az első antitesthez kötődik, másik karja pedig a peroxidáz enzimre specifikus antitestet fogja, vagyis hidat képez a két antitest között (lásd 11-47. ábra). A módszer 100–1000-szer érzékenyebb az indirekt módszernél, ugyanakkor megtartja a specificitását.

Az avidin-biotin komplex (ABC) módszer az toxásfehérjéből izolált avidin biotinhoz (H vitamin-hoz) való rendkívül magas affinitásán alapul. Ebben a módszerben a második antitestet biotináljuk, míg

a harmadik réteg az avidin-peroxidáz enzim komplexet tartalmazza (lásd 11-46. ábra).

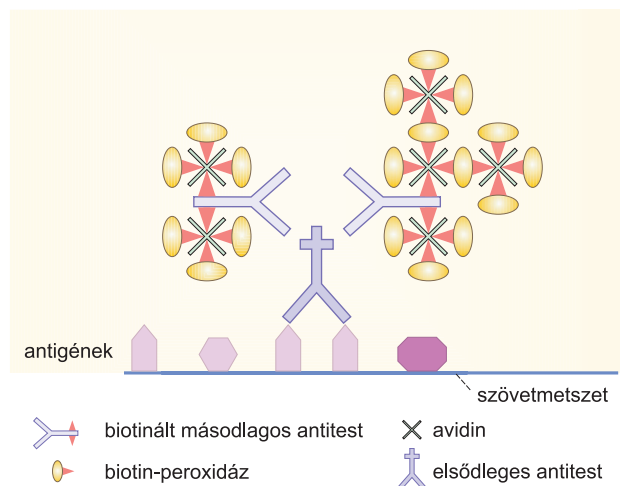
Citokinek kimutatása

Általános jellemzők

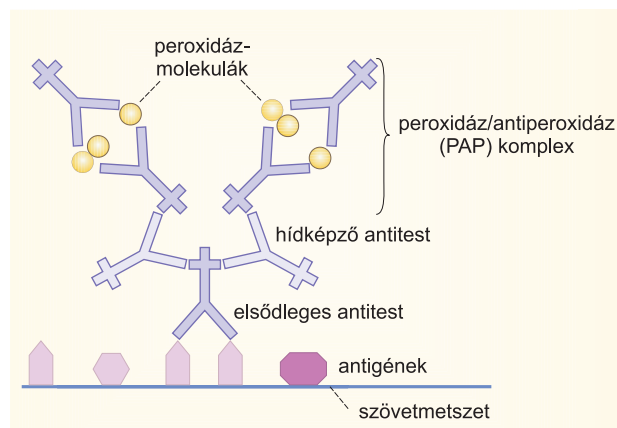
Az immunválasz sejtjeinek párbeszéde, az információtovábbítás két mechanizmussal zajlik. Egyrészt közvetlen sejt-sejt kapcsolatok útján, adhéziós molekulák segítségével, másrészt szekretált fehérjék, ún. citokinek és receptoraik útján. A citokin görög eredetű szó: a cito-, azaz „sejt” és kinosz, azaz „mozgás” szóösszetételből származik, de összességében azokat a szabályozó polipeptideket soroljuk ide, amelyek az immunrendszer működését összehangolják. Ugyanakkor ismert, hogy szerepük van az embriogenezis bizonyos folyamataiban is.

A citokinek általános jellemzői:

- Kis molekulatömegű (10–40 kDa) glikoproteinek, peptidek.
- Izolált sejtek termelik átmeneti génaktiváció hatására.
- Pikomoláris koncentrációban termelődnek, igen bomlékonyak, rövid a féléletidejük, ezért nehezen mérhetők.
- Receptorokon keresztül hatnak, nagy affinitású kötődéssel.
- Sejtek közötti kapcsolatokat közvetítik: információtovábbítás, immunválasz szabályozása.



11-46. ábra. Avidin-biotin-peroxidáz komplex módszer. A biotinált másodlagos antitest nagy affinitású kapcsolatot létesít az avidin-biotin-peroxidáz komplexszel



11-47. ábra. Peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) módszer. A háromrétegű módszer során egy hídképző antitest köti össze az elsődleges antitestet a PAP-komplexszel

A citokinműködés formája a következő lehet:

- *Autokrin*, a citokint termelő sejtre visszaható.
- *Parakrin*, a termelő sejt közvetlen közelében lévő sejtre ható.
- *Endokrin*, a szervezet egy távoli pontjára ható.

A legtöbb citokinnek többféle szerepe is van, ezért több helyre is besorolható a hatásaik szerinti csoportok közt.

A citokinek csoportosítása:

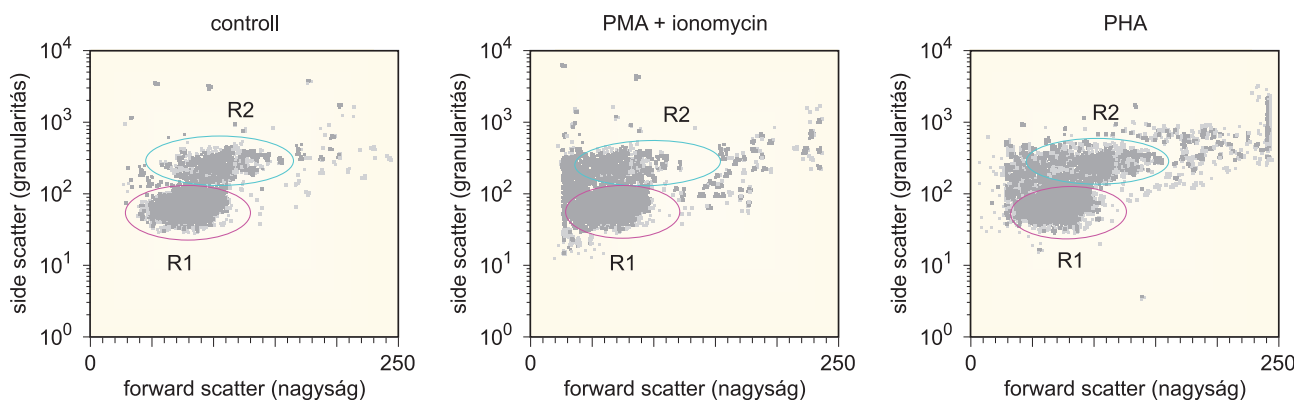
- A haemopoiesisben ható növekedési faktorok:
 - SCF (stem cell factor),
 - GM-CSF,
 - G-CSF,
 - erythropoetin,
 - IL-3, IL-7, IL-11 stb.
- A lymphocyták aktiválódására, differenciálódására ható citokinek:
 - Th1-citokinek: IL-2, IFN- γ , IL-3, TNF, LT
 - Th2-citokinek: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 stb.
 - Th17: IL-17,
 - Treg: IL-10, TGF- β .
- A természetes immunitásban ható, vagy a gyulladásos folyamatokra ható citokinek. Ezek a nem fajlagos immunrendszer sejtjeiből azonnal termelődnek vagy felszabadulnak, amikor egy kórokozó a szervezetbe kerül. Ilyenek az antivirális hatású interferonok (IFN α , - β és - γ), a tumor-nekrózis-faktorok (TNF α és β), az IL-1 α és β , az IL-6, az IL-10, az IL-12, a migrációt gátló faktor (MIF) és a kemokinek.

Mivel a citokinek zöme lokálisan hat, a szérumban megbízhatóan mérhető koncentrációt csak kivételes esetben érnek el. Közülük az ún. „gyulladásos citokinek” (IL-6, TNF-alfa) sepsisben érnek el olyan szérumszintet, hogy közvetlenül is meghatározhatóak.

Immunsejtek stimulálása

Diagnosztikai vagy kutatási célokra a vérből, egyéb testfolyadékokból vagy szövetekből izolált immunsejtek stimulálása révén tudunk mérhető citokinmennyiséget nyerni. Attól függően, hogy milyen sejttípus citokintermelésére vagyunk kíváncsiak, különböző stimulálószerrel kezeljük a sejteket. A lymphocytákat 4–12 órán át PMA/ionomycin stimulációnak vetjük alá. A PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát) protein-kináz C (PKC) aktivátor, míg az ionomycin a *Streptomyces globatus* baktérium által termelt ionofór, amely növeli az intracelluláris Ca^{2+} -jelet. A PMA-stimuláció hátránya, hogy megváltoztatja a sejtek morfológiáját (11-48. ábra), és számos sejtfelszíni CD marker, pl. a CD4, CD33, CD14 expressziójának drasztikus csökkenését idézi elő (11-49. ábra). Ezért bizonyos laboratóriumok a PHA (fitohemagglutinin lektin) stimulációt használják (11-50. ábra). A monocytákat általában LPS (lipopoliszacharid) stimulációnak tesszük ki.

Abban az esetben, ha a sejtekben intracellulárisan kívánjuk a citokinek meghatározni, pl. áramlási citometria vagy mikroszkópos immuncitokémiai reakció segítségével, akkor a stimulálószer tartalmazó reakcióelegybe brefeldint vagy monenzint (Sander et al 1993) is teszünk, amely gátolja a fehérjék Gol-



11-48. ábra. A PMA/ionomycin stimulálás megváltoztatja a sejtek FSC/SSC flow citometriás megjelenését

gi-készülékből való transzportját és szekrécióját. Így a termelt citokin viszonylag magas koncentrációban a termelő sejtben a Golgi-ciszternákban marad, ott egy fluorokrómmal jelzett antitest felhasználásával detektálható lesz.

Citokin mérése áramlási citometriával – intracelluláris jelölés

Ma az áramlási citometriás mérés terjedt el leginkább a citokinek egysejt szintű kimutatására. A multiparaméteres meghatározási mód lehetőséget ad a sejtfelszíni fenotípus (CD marker) jelölés után intracellulárisan is a citokinek egyidejű kimutatására egy mintában.

A metodika hátránya a stimulálás és az intracelluláris jelölés miatt annak hosszadalmas volta.

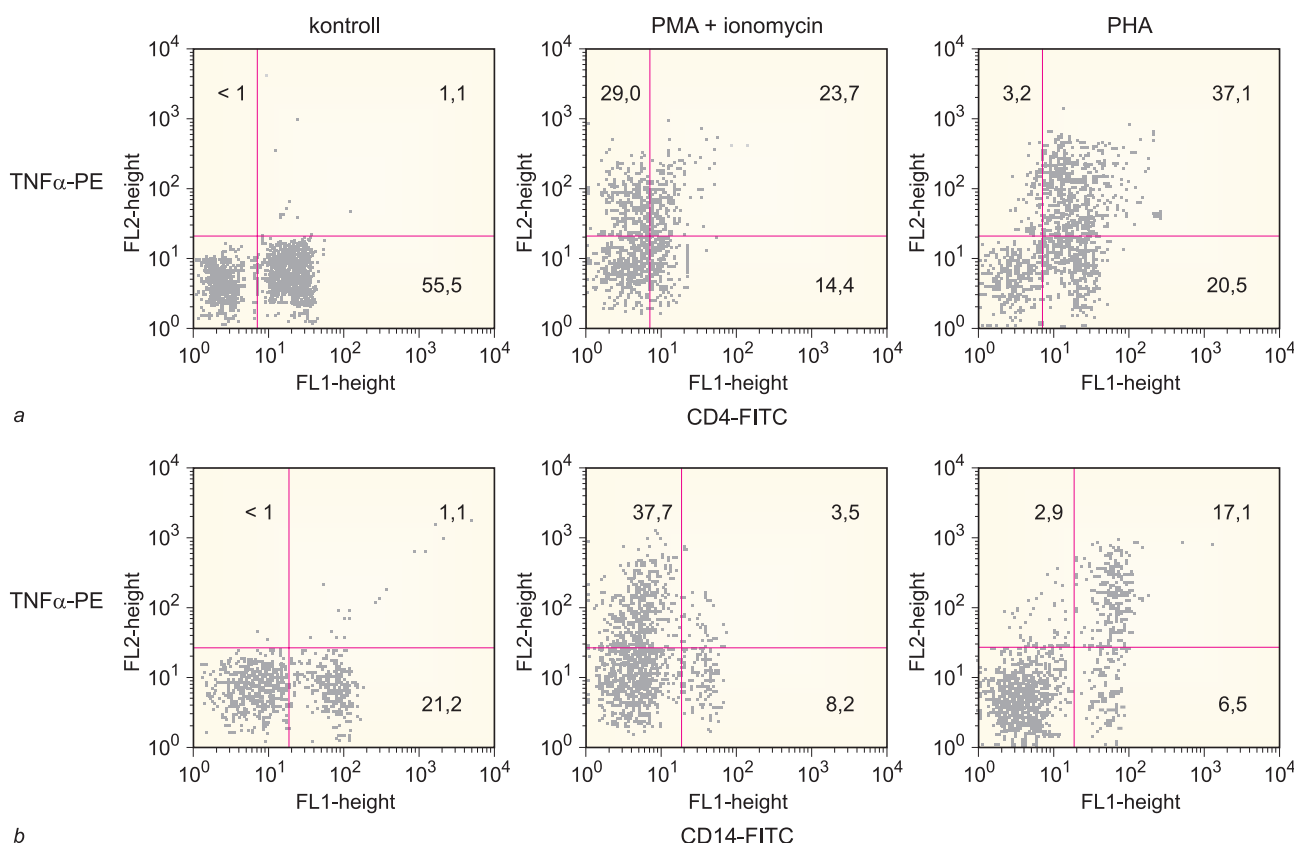
Megoldható viszont, hogy a sejtek stimulálása után folyékony nitrogénben fagyasztva tároljuk a mintát, és később végezzük el a sejtfelszíni és intracelluláris jelöléseket. A sejtfelszíni jelölésre még intakt sejten kerül sor, azt követően 1–4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáljuk a sejteket, majd következik a permea-

bilizálásuk, általában 0,1% saponin detergenst tartalmazó pufferben. Ennek előnye, hogy reverzibilisen tárja fel a sejtmembránt. A saponint kimosva a pufferből az intracelluláris jelölőmolekula a sejt belsőjében marad, mert a sejtmembrán folyamatossága visszaáll.

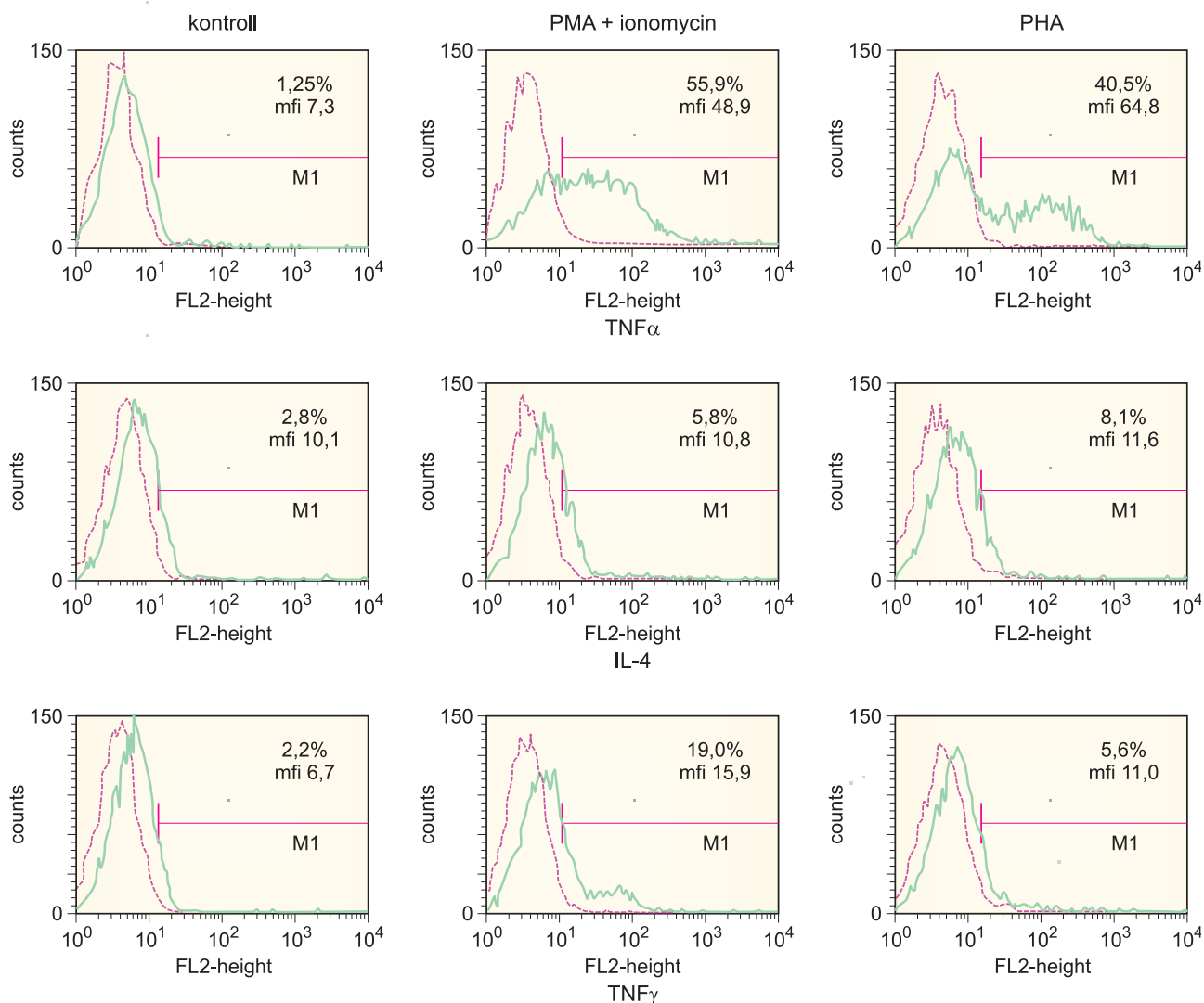
Egy lehetséges mérőmódszer leírása

Anyagok:

- heparin a vérvételhez, RPMI-1640, PMA törzsoldat (1 mg/ml), ionomycin to. (1 mg/ml), monensin (0,5 mM = 500 μ M to.).
- anti-CD4-PE (sejtfelszíni jelöléshez).
- anti-IL-4-FITC, anti-IL-2-FITC, anti-IFN γ -FITC (50 μ g/ml-es törzsoldatok) PBS/BSA/ NaN_3 pufferben. Izotípus-FITC (vagy patkány IgG-FITC).
- pufferek: PBS/ NaN_3 , PBS/ NaN_3 /BSA (mosó puffer), PBS/saponin/BSA/ NaN_3 permeabilizáló puffer), 4% PFA/PBS (fixáló puffer), lízispuffer (Becton Dickinson), FACSFix.



11-49. ábra. A PMA/ionomycin stimulálás megváltoztatja a CD4-expressziót



11-50. ábra. A PMA/ionomycin hatékonyabb citokinstimuláló szer

Sejtek stimulálása:

1. Stimuláló oldat készítése: RPMI-be 40 ng/ml PMA-t, 2 μ g/ml ionomycint és 4 μ M monensin összemérése. A stimulálatlan mintákra RPMI + 4 μ M monensin jön.
2. 200 μ l heparinos vérhez adjunk 200 μ l stimuláló oldatot, inkubáljuk CO₂-inkubátorban 4–6 órát. A stimulálatlan vérhez a monensines RPMI jön 1:1 arányban. (annyiszor 50 μ l vér + 50 μ l stimuláló puffert kell kiszámítani, ahány mintát szeretnénk jelölni).

Jelölés:

1. 100 μ l stimulált vérmintát (a hígítottból) jelöljük 5 μ l a-CD4-PE ellenanyaggal 30 percig jégén.

2. Majd adjunk hozzá 1 ml szobahőmérsékletű lízis-puffert, inkubáljuk 10 percig.
3. Mosás 1-szer mosó puffereben, 1-szer PBS/NaN₃-ban.
4. Fixálás 200 μ l 4%-os PFA/PBS-ben 20 percig, jégén.
5. Mosás 1-szer PBS/NaN₃, 1-szer saponin pufferben.
6. Ezután felvenni a sejteket 80 μ l saponin pufferben, hozzátenni 20 μ l a-IL-2, vagy a-IL-4, vagy a-IFN-FITC, vagy 10 μ l izotípus-FITC antitestet. Inkubálás 30 percig jégén.
7. Mosás 2-szer saponin pufferben, 1-szer mosó pufferben.
8. Felvenni a sejteket 500 μ l FACSfix oldatban.
9. 24 órán belül mérés, analízis áramlási citométeren.

AZ ELISPOT-MÓDSZER

Az enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) eljárás elterjedt funkcionális módszer az immunválasz monitorozására. Elsőként 1983-ban CECIL CZERKINSKY alkalmazta antigénspecifikus ellenanyag termelő B-sejt-szám meghatározásra. Mára számos más szekretált molekula mérésére is adaptálták, legáltalánosabban az aktivált lymphocyták citokintermelésének meghatározására egysejt szinten. Minden spot (folt) megfelel egy citokintermelő sejtnak, a spot (folt) nagysága pedig arányos a termelt molekulamennyiséggel. Így az ELISPOT-assay minőségi és mennyiségi analízisre is szolgál.

Az ELISPOT rendkívüli érzékenységének az oka az, hogy a sejt által termelt fehérjemolekulát a membránra immobilizált befogó antitest azonnal megkötí annak enzimatis bomlása előtt. A módszer alkalmas igen ritka sejtpopulációk (antigénspecifikus sejtek, citokintermelő sejtek stb.) frekvenciájának meghatározására. Ezzel a konvencionális citokin szendvics-ELISA-nál nagyságrendekkel érzékenyebb módszer áll rendelkezésünkre. Érzékenységére jellemző, hogy méréshatára 1/100 000 sejt, ami azt jelenti, hogy ez a jelenleg rendelkezésre álló legérzékenyebb celluláris módszer. Az RT-PCR-analízis érzékenységéhez hasonló, azzal a különbséggel, hogy fehérjét és nem mRNS-t mér.

Ez citokinek esetében nagyon előnyös, hiszen számos citokin transzlációs szabályozás alatt áll, ezért az RNS-szintű meghatározás nem tükrözi a valóban termelt citokin mennyiségét.

Az ELISPOT assay kivitelezése (11-51. ábra):

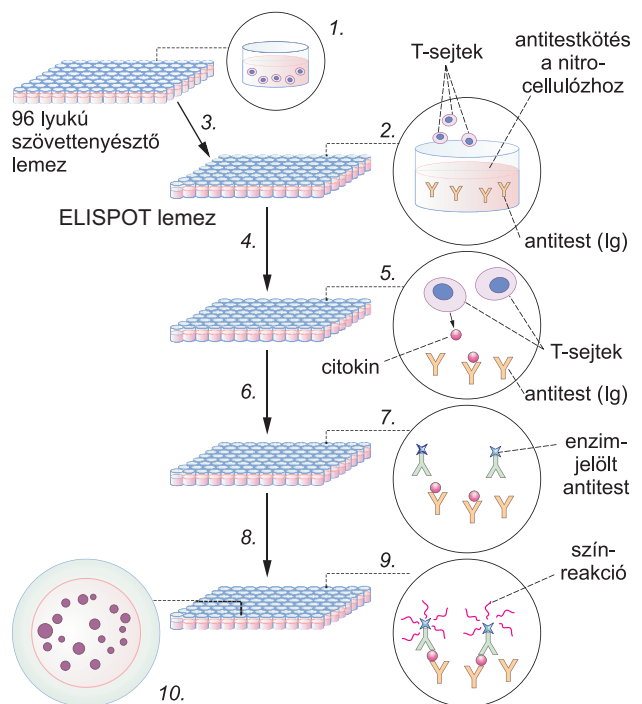
Első lépésként a citokinspecifikus befogó antitestet immobilizáljuk a szilárd fázishoz, amelyre a legjobb a polivinil-difluorid membránnal bélelt 96 lyukú mikrotitráló lemez.

A második lépésben a vizsgálandó sejtet adjuk a lemezhez stimulálószer jelenlétében vagy anélkül, és megfelelő ideig (O/N) inkubáljuk, hogy citokin termelődjék. A termelődött citokint a befogó antitest megkötí a termelő sejt környezetében.

Ezután mosással eltávolítjuk a sejteket, és a citokinspecifikus detektáló antitestet adjuk a rendszerhez. Ez a második antitest lehet direkt enzimkonju-

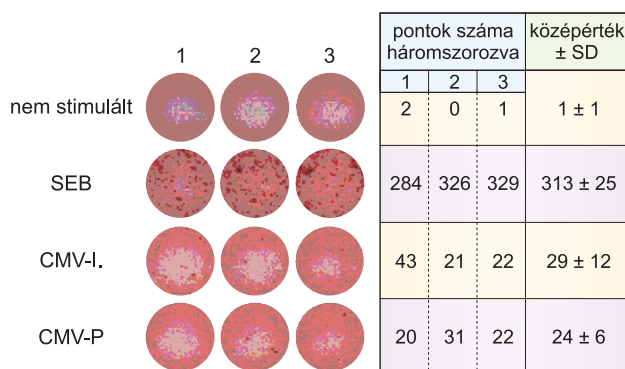
gált vagy biotinált, amikor egy harmadik lépésben enzimkonjugált streptavidint adunk a reakciócellába.

Végül az enzim szubsztrátja következik, amely oldhatatlan csapadékot képez a termelt citokin helyén. Így a látható spot (folt) megfelel egy citokint termelő sejt helyének. A spotokat (foltokat) vagy mikroszkóposan, vagy egy automata ELISPOT-olvasó (reader) segítségével detektáljuk (11-52., 11-53. ábra) [11].

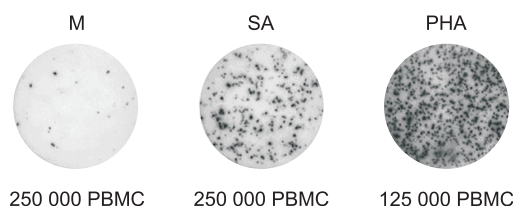


11-51. ábra. ELISPOT. Az eljárás lépései:

1. A T-sejtek (ismert mennyiségének) stimulálása specifikus antigénnel a sejt kultúra lemezen
2. Az ELISPOT-lemez üregeit előzetesen anti-citokin antitestekkel érzékenyítik
3. A T-sejtek átvitele az ELISPOT-lemezre
4. A sejtek inkubációja; citokinszekréció
5. Citokinkötés az antitesthez
6. A sejtek mosása; a lemezekre jelölő antitestek adagolása
7. Enzimmel jelölt másodlagos antitestek kötődése a citokinhez
8. A lemez mosása; szubsztrát hozzáadása
9. Oldhatatlan színes termék keletkezik
10. A pozitív pontok (spotok) megszámlálása mikroszkóppal



11-52. ábra. ELISPOT dot analízis

11-53. ábra. Humán IL-17A citokin mérése ELISPOT-tal [M: közepes; SA: hővel előlt, formalinban fixált *Staphylococcus aureus* sejtek (valamennyi baktériumrészecskét tartalmazza); PHA: fitohemagglutinin]

IRODALOM

- [1] ZOLA, H., SWART, B., BANHAM, A. et al: CD molecules 2006 – Human cell differentiation molecules. *Journal of Immunological Methods* 319(1-2):1–5, 2007.
- [2] SANDER, B., ANDERSSON, J., ANDERSSON, U.: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol. Rev.* 119:65–93, 1991.
- [3] JUNG, T., SCHAUER, U., HEUSSER, C. et al.: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 159(1-2):197–207, 1993.
- [4] BARAN, J., KOWALCZYK, D., OZÓG, M. et al.: Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(2):303–313, 2001.
- [5] CZERKINSKY, C., NILSSON, L., NYGREN, H. et al.: A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* 65(1-2):109–121, 1983.
- [6] CHAMBERS, I. R., CONE, T. R., OSWALD-RICHTER, K. et al.: Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT): Quantification of Th-1 cellular immune responses against microbial antigens. *J. Vis. Exp.* (45):2221. 10. 3791/2221, 2010.
- [7] KARLSSON, A. C., MARTIN, J. N., YOUNGER, S. R. et al.: Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* 283(1-2):141–153, 2003.
- [8] http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_human_clusters_of_differentiation
- [9] <http://www.sciencegateway.org/resources/prow/index.html>
- [10] <http://www.hcdm.org/MoleculeInformation/tabid/54/Default.aspx>
- [11] <http://www.mabtech.com/main/Page.asp?PageId=16&PageName=About+ELISpot>

A hemosztázis vizsgálatának újabb fehérjemódszertana

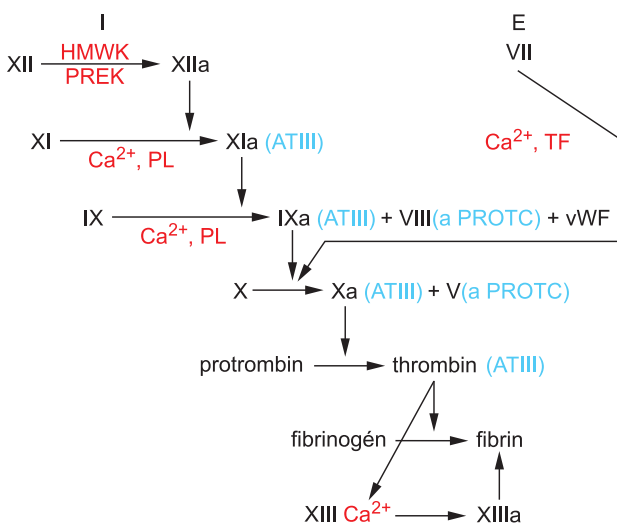
TÖKÉS-FÜZESI MARGIT

A véralkadási rendszer fontos szerepet tölt be a szervezet homeosztázisának fenntartásában. Ezt a szerepét a vascularis endothel, a thrombocyták, a pro- és antikoaguláns fehérjék, valamint a fibrinolitikus rendszer segítségével valósítja meg. A véralkadási rendszer fehérjéi nem csak az érsérülés helyén létrejövő alvadási folyamatban és repairben vesznek részt, hanem a gyulladásos folyamatok kialakulásában és lezajlásában is fontos szerepet játszanak. Az alvadási faktorok szerepet játszanak az embrionális növekedésben és fejlődésben is.

A véralkadás folyamata

A véralkadás folyamatának leírására régebben a kaszkád (11-54. ábra) modellt használták, amelyben a zimogén formában jelen lévő enzimek szigorú sorrendet követve fehérjefragmentumok lehasításával egymást követően aktiválják egymást. A folyamatok nagy része foszfolipidfelszín és kalciumiont igényel, néhány esetben szükséges az enzim és szubsztrátjának kofaktorhoz való kötődése is.

Ez a modell a véralkadás folyamatában egy extrinsic és egy intrinsic utat különböztet meg. Az extrinsic



11-54. ábra. A véralkadás kaszkádmodellje

út beindításához szöveti faktorra (TF), valamint aktív VII-es faktorra (FVIIa) van szükség. Az intrinsic út esetében a XII-es faktor kontakt aktiválása negatívan töltött felszínen megy végbe. A két út a X-es faktor szintjén találkozik, és innen a közös útba torkollik, amelynek végén a trombin hatására megtörténik a fibrinogén-fibrin átalakulás.

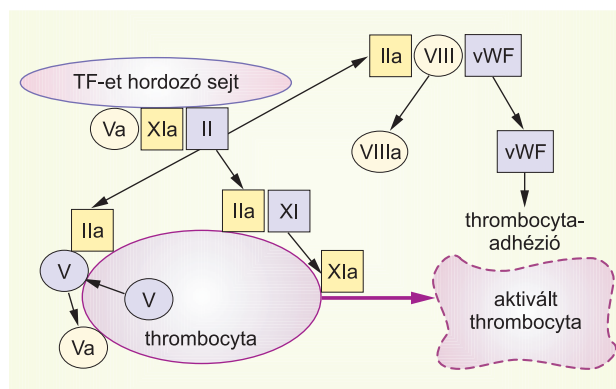
A véralkadás kaszkádmodellje hasznos volt az alvadás folyamatának megértésében, valamint a véralkadási laboratóriumi tesztek klinikai értékelésében. A véralkadással kapcsolatos tudásunk bővülésével ez a modell már nem tudott választ adni az in vivo végbemenő folyamatokra. A kaszkádmodell szerint az intrinsic és az extrinsic út egymástól függetlenül működik és indítja be az alvadás folyamatát.

Ennek ellentmondanak olyan klinikai megfigyelések, mint pl. az intrinsic út beindításában részt vevő faktorok – XII-es faktor, prekallikrein, nagy molekulatömegű kininogén – hiánya, ami megnyúlt APTI-vel (aktivált parciális tromboplastinidő) jár, azonban nem okozza a beteg vérzékenységét. A XI-es faktor hiánya (haemophilia C) is csak változó mértékben okoz vérzékenységet, ezzel szemben a VIII-as és IX-es faktor hiánya (haemophilia A és B) súlyos vérzékenységgel jár annak ellenére, hogy az extrinsic véralkadási út intakt. Hasonlóképpen a VII-es faktor hiánya is vérzékenységhez vezethet jól működő intrinsic út mellett.

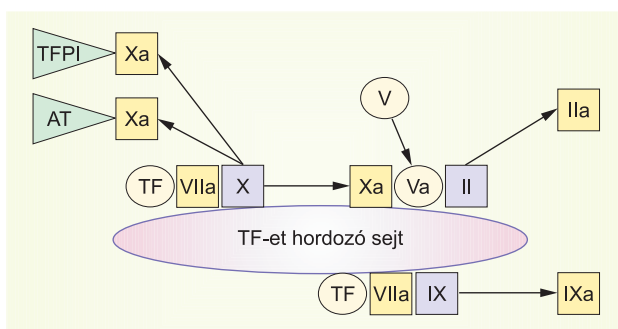
Ezek alapján úgy tűnik, hogy a két út nem egymástól függetlenül működve jut el a X-es faktor aktiválásáig. Ezek után vezették be a véralkadás ma is elfogadott sejtes modelljét. Ennek alapján az alvadás in vivo sejtfelszínen (szöveti faktort hordozó sejt, thrombocyta) indul el, és három különböző, egymáshoz kapcsolt fázisban zajlik le:

- **Iniciáció.** Ennek során az érsérülés helyén a szöveti faktort hordozó sejtek szabaddá válnak, és a vérben keringő VIIa faktor gyorsan kötődik a TF-hez. A VII-es faktor az egyetlen, amelynek egy kis része, kb. 1%-a, aktivált formában kering a vérben. Ennek eredményeként kis mennyiségű IXa és Xa faktor, valamint trombin képződik (11-55. ábra).
- **Amplifikáció.** Ebben a fázisban az előző lépésben kis mennyiségben keletkezett trombin aktiválja a thrombocytákat, von Willebrand-faktort (vWF) szabadít fel, és az V-ös, a VIII-as és a XI-es faktorok aktiválásához vezet (11-56. ábra).

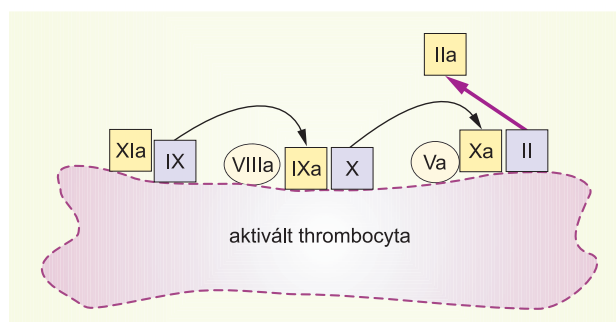
- **Propagáció.** A propagáció fázisában az előző lépésekben keletkezett enzimek az aktivált thrombocyták prokoaguláns membránfelszínén összeszerelődnek és létrehozzák a tenáz komplexet. Ez a thrombocyták felszínén Xa faktort hoz létre, mely a protrombináz komplex részévé válik. Ennek eredménye lesz a trombin képződés „robbanás”, a thrombocyták felszínén, mely beindítja a fibrinogén–fibrin átalakulást (11-57. ábra, 11-20. táblázat).



11-56. ábra. A vérárvadás sejtes modellje – II. lépés – amplifikáció



11-55. ábra. A vérárvadás sejtes modellje – I. lépés – iniciáció



11-57. ábra. A vérárvadás sejtes modellje – III. lépés – propagáció

11-20. táblázat. Prokoaguláns alvadási faktorok

Jelenlegi nevezéktan szerint (név)	Funkció	Féléletidő (óra)
faktor I (fibrinogén)	fibrin prekursora	90
faktor II (protrombin)	szerin-proteáz a protrombináz-komplexben	65
faktor III (kalcium)	kofaktor	–
faktor IV (szöveti faktor)	a vérárvadási kaszkád elindítója	–
faktor V (proakcelerin)	kofaktor a protrombináz-komplexben	15
faktor VII (prokonvertin)	a vérárvadási kaszkád elindítója	5
faktor VIII (antihemofiliás faktor)	kofaktor a tenáz-komplexben	12
faktor IX (Christmas-faktor)	szerin-proteáz a tenáz-komplexben	24
faktor X (Stuart–Prower-faktor)	szerin-proteáz a protrombináz-komplexben	40
faktor XI (plazmatromboplasztin)	a vérárvadás amplifikációja	45
faktor XII (Hageman-faktor)	kontakt faktor	50
faktor XIII (fibrinstabilizáló faktor)	fibrin keresztkötése	200
prekallikrein (Fletcher-faktor)	kontakt faktor	35
nagy molekulatömegű kininogén (Fitzgerald-faktor)	kontakt faktor	150

Az alvadás folyamatában *természetes inhibitorok* is részt vesznek, amelyek a trombinképződést ellenőrzik (11-21. táblázat).

A *fibrinolitikus rendszer* véralvadásban betöltött szerepe egyrészt az, hogy biztosítsa a véralvadék kialakulását az érsérülés helyén, másrészt hogy eltávolítsa a sebgyógyulás lezajlása után az alvadékokat. A véralvadék kialakulása során pro- és antifibrinolitikus fehérjék épülnek be a fibrinhálóba a fibrinhez való kötődés által (11-22. táblázat). A szöveti plazminogénaktivátor (tPA), a plazminogén és a plazmin a fibrin lizin helyeihez kötődik, miközben az α_2 -antiplazmint a XIIIa faktor keresztköti a fibrinhez.

A plazmin/plazminogén két formában található meg:

- Glu-plasmin/plasminogén, amelyben a fehérje 1. pozíciójában egy glutamát található, és ez a vegyület kevésbé aktív.
- Lys-plasmin/plasminogén, amelyben az első 76 aminosav katalitikus lebontása után az első aminosav lizin.

A *plazminogén-plazmin átalakulást* egyrészt a tPA (szöveti plazminogén aktivátor), amely az endothel-sejtekből szabadul fel, másrészt az uPA (urokináz) (ez elsősorban a vizeletben található meg) aktiválja. A tPA féléletideje a plazmában rövid, mivel az I-es típusú plazminogénaktivátor inhibitor (PAI-1) gyorsan inaktíválja és a máj lebontja. A fibrinhez kötött tPA azonban védve van a gátló faktortól, ezért aktivitása is nagyobb mértékű. A plazmin nem specifikus enzim, a fibrinogént, a fibrint és a keresztkötött fibrint is lebontja (arginin és lizin kötéseket hidrolizál). Az ennek eredményeként keletkező termékek a fibrin/fibrinogén degradációs termékek (FDP). D-di-

11-22. táblázat. A fibrinolízis fehérjéi

Antifibrinolitikus fehérjék

- α_2 -antiplazmin
- PAI-1
- PAI-2
- TAFI

Profibrinolitikus fehérjék

- plazminogén
- plazmin
- tPA
- uPA

mer azonban csak a keresztkötött fibrin bontása után keletkezik, és ez specifikus a keletkezett alvadékhoz kötött fibrinre, vagyis kialakulását mindig thrombusképződés előzi meg.

A *fibrinolízis* legfontosabb *gátló* fehérjéje a PAI-1 és a PAI-2 (1-es és 2-es típusú plazminogénaktivátor inhibitor), az α_2 -antiplazmin és a trombin által aktiválható fibrinolízisinhibitor (TAFI). A PAI-1 és PAI-2 megtalálható a trombocytákban és az endothelsejteken. A PAI-2 nagy mennyiségben termelődik terhességben a placenta által, de megtalálható a monocytákban is. Az α_2 -antiplazmin és a TAFI a májban termelődik. A keringésben jelen lévő plazmint az α_2 -antiplazmin gyorsan inaktíválja. A fibrinhez kötött forma viszonylagosan védett a gátlás alól, viszont a plazmin fibrinhez való kötődését az FXIIIa által az alvadékhoz keresztkötött α_2 -antiplazmin gátolja. A TAFI-t a trombin-trombomodulin komplex aktiválja, és az alvadékban jelen lévő fibrinről lizin maradványokat távolít el, ezáltal megakadályozva, hogy a plazmin ki tudja fejteni hatását.

11-21. táblázat. Természetes alvadási inhibitorok

Fehérje	Funkció
antitrombin	gátolja a trombint, a Xa, IXa, XIa faktort
protein C	gátolja a VIIIa és Va faktort
protein S	a protein C kofaktora
TFPI	gátolja a TF-VIIa komplex C-t és a TAFI-t a trombinnal komplexben
heparinkofaktor 2	gátolja a trombint
α_2 -makroglobulin	gátolja a trombint és a Xa faktort
α_1 -antitripszin	gátolja a XIa faktort és más szerin-proteázokat

Véralvadási tesztek

Egy rutin diagnosztikai feladatokat ellátó laboratórium szintjén a véralvadás folyamatának ellenőrzésére az ún. *véralvadási szűrőtesztek* állnak rendelkezésre. Ezek lehetnek globális tesztek, amelyek arról adnak felvilágosítást, hogy a fibrinképződéshez vezető reakciók normálisan folynak-e le, vagy defektus áll fenn (pl. vérzési idő). A globális tesztek viszonylag érzéketlenek, segítségükkel csak súlyos alvadási zavar ismerhető fel. A fázisvizsgálatok segítségével meghatározható, hogy az alvadási zavar a véralvadás melyik fázisára lokalizálódik (pl. PI, APTI, TI). A faktoranalízis-vizsgálatoknál úgy választjuk meg a feltételeket, hogy az egyes faktorok aktivitását vagy koncentrációját mennyiségileg tudjuk meghatározni (pl. fibrinogén). Az alap véralvadási szűrőtesztek tehát: PI (protrombinidő), APTI (aktivált parciális trombo-plasztinidő), TI (trombinidő) és a fibrinogénmeghatározás. Minden esetben fontos a thrombocytaszám meghatározásához egy gépi vérképvizsgálat elvégzése is. A hemosztázis vizsgálatainak eredményeit jelentősen befolyásolhatják a preanalitikai tényezők. Ezeket soroljuk fel a 11-23. táblázatban anélkül, hogy kitérnénk a részletekre.

A véralvadási mérésekhez *koagulométereket* használunk. A koagulométerek a mintához adott reagens

vagy startreagens és a fibrinháló megjelenése között eltelt időt másodpercben mérik (funkcionális tesztek). Ezek működhetnek mechanikus és optikai elven. Az optikai elven működő koagulométerek általában 405 és 660 nm hullámhosszon mérnek. A mérést zavarhatja a lipaemia, ill. az emelkedett bilirubinszint. Ennek kiküszöbölésére mérhetünk egy másik hullámhosszon is, és a keletkezett jelet erre korrigáljuk, vagy az alvadási végpont meghatározásához a görbét deriválhatjuk (ez általában az első derivált). Mechanikus mérés során az ívelt fenekű küvetta alján található golyó mágneses térben mozog, a fibrinpolimer kialakulásával egy időben a közeg viszkozitása nő, ami a golyó mozgásának lassulásához és megállásához vezet. Ebből lehet megfelelő algoritmus segítségével az alvadási időt kiszámolni, ezt az értéket a készülékek másodpercben kijelzik.

Az alap alvadási paraméterek mérési eredményei, amennyiben szűrésre használjuk őket, egyrészt felvethetik a lehetséges diagnózist, másrészt ezek alapján további speciális tesztek végezhetők el a véralvadási defektus pontos meghatározásához (11-24. táblázat).

Protrombinidő- (PI-) meghatározás

A citráttal alvadásgátolt thrombocytaszegény plazmához feleslegben adunk trombo-plasztint és kalciumiont, és a reagens hozzáadása és a fibrinképződés

11-23. táblázat. Preanalitikai tényezők

Mintavétel és feldolgozás

- Mintavétel során kerüljük a hosszan tartó vénás leszorítást (<1 perc)
- Felnőttek esetén használjunk 19–22 G-s tűméretet
- Kerüljük a katéterek használatát
- Mintavétel után azonnal forgassuk át 4-5-ször a vérmintát a mintavételi csőben, amely pufferezett 0,105–0,109 M (3,2%) Na₃-citrátot tartalmaz
- Méréshez ne használjunk fel olyan mintát, ahol a mintavétel során nehézségeink adódtak
- Ne használjunk hemolizált vagy alvadékos tartalmú mintát a méréshez. Az „alultöltött csövekből” (<80–90%) származó mérések bizonyos szűrőtesztek megnyúlását eredményezhetik (pl. PI, APTI mérések a nem megfelelő vér–citrát arány miatt)
- Ha a minta hematokritértéke 55%-nál nagyobb, állítsuk be a megfelelő antikoaguláns–vér arányt (zárt vérvételi rendszerben erre nincs lehetőség)
- A minták szállítása és centrifugálása szobahőmérsékleten történjen; 2000xg-vel legalább 15 percig centrifugáljunk
- A mintákat centrifugálás után mérésig szobahőmérsékleten tároljuk
- A méréseket a mintavételtől számított 4 órán belül végezzük el (heparin monitorozás esetén 2 órán belül)
- A mintákat, ha szükséges, hosszabb ideig –80 °C-on tároljuk
- A lefagyasztott plazmát 37 °C-os vízfürdőben olvasszuk fel

11-24. táblázat. Véralvadási szűrőteszt eredmények eltéréseinek értelmezése

Teszt				Lehetséges véralvadási defektus
PI	APTI	TI	Fibrinogén	
megnyúlt	normál	normál	normál	VII-es faktor hiány
normál	megnyúlt	normál	normál	VIII, IX, XI, XII-es vagy kontakt faktor hiány, lupus-antikoaguláns
megnyúlt	megnyúlt	normál	normál	II, V, X-es faktor hiány oralis antikoaguláns terápia K-vitamin-hiány kevert V + VIII-as faktor hiány kevert II, VII, IX, X-es faktor hiány májbetegség
megnyúlt	megnyúlt	megnyúlt	normál vagy alacsony	hypo- vagy dysfibrinogenaemia májbetegség masszív transzfúzió DIC (disszeminált intravascularis koaguláció)

között eltelt időt másodpercben mérjük. A tromboplasztin szöveti faktort (TF-t) és foszfolipideket tartalmaz, amely lehet állati eredetű (nyúlgyóból, patkányplacentából kivonva) vagy rekombináns készítmény. A szöveti faktor a VIIa faktorról reagálva a véralvadás „extrinsic”, útját indítja el. Az eredményt megadhatjuk másodpercben, a normál százalékában, il. PR (protrombinráta) formájában. Az így kapott eredmények azonban nagymértékben függenek az alkalmazott tromboplasztin reagenstől, mivel különböző érzékenységet mutatnak a II-es, V-ös, X-es és VII-es faktor irányában. Az orális antikoaguláns terápián lévő betegek vizsgálatakor a PIVKA (Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonism) zavarja a PI-meghatározásban részt vevő normál koagulációs faktorok aktiválását. Ezek a fehérjék a II-es, VII-es, IX-es és X-es faktor nem- γ -karboxilált prekursorait foglalják magukba, amelyek a K-vitamin-antagonista terápia hatására jönnek létre. Ezért a protrombinidő nemzetközi szabványosítása érdekében bevezették az INR (International Normalised Ratio) használatát:

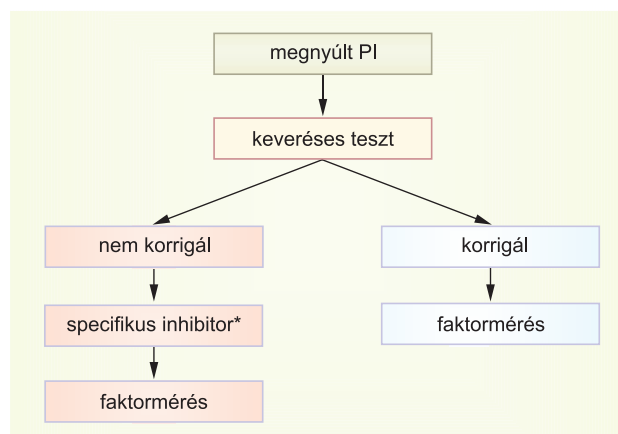
$$\text{INR} = \text{PR}^{\text{ISI}},$$

ahol a PR a beteg plazmájában mért PI/normál plazmából mért PI (MNPT, Mean Normal PT).

A gyártók által forgalomba hozott különböző érzékenységű reagenseket egy WHO által bevezetett

referencia tromboplasztinkészítményhez hasonlítják. Ennek ISI- (International Sensitivity Index) értéke 1,0.

A PI érzékeny és ily módon megnyúlt a VII-es, X-es, V-ös és II-es faktor és fibrinogénszint-csökkenés esetén. Az orális antikoaguláns terápia monitorozására használt módszer. Megfelelően antikoagulált beteg esetében INR = 2-3 közötti célértéket kell elérnünk, kivéve a műbillentyű-beültetett betegeknél, ahol ez az érték nagyobb is lehet. A 11-58. ábra mutatja be a megnyúlt PI esetén elvégzendő szükséges vizsgálatokat.



11-58. ábra. Megnyúlt PI kivizsgálása

*Ritka esetben a lupus-antikoaguláns is megnyújthatja a PI-t, azonban ilyen esetben az APTI is mindig megnyúlik

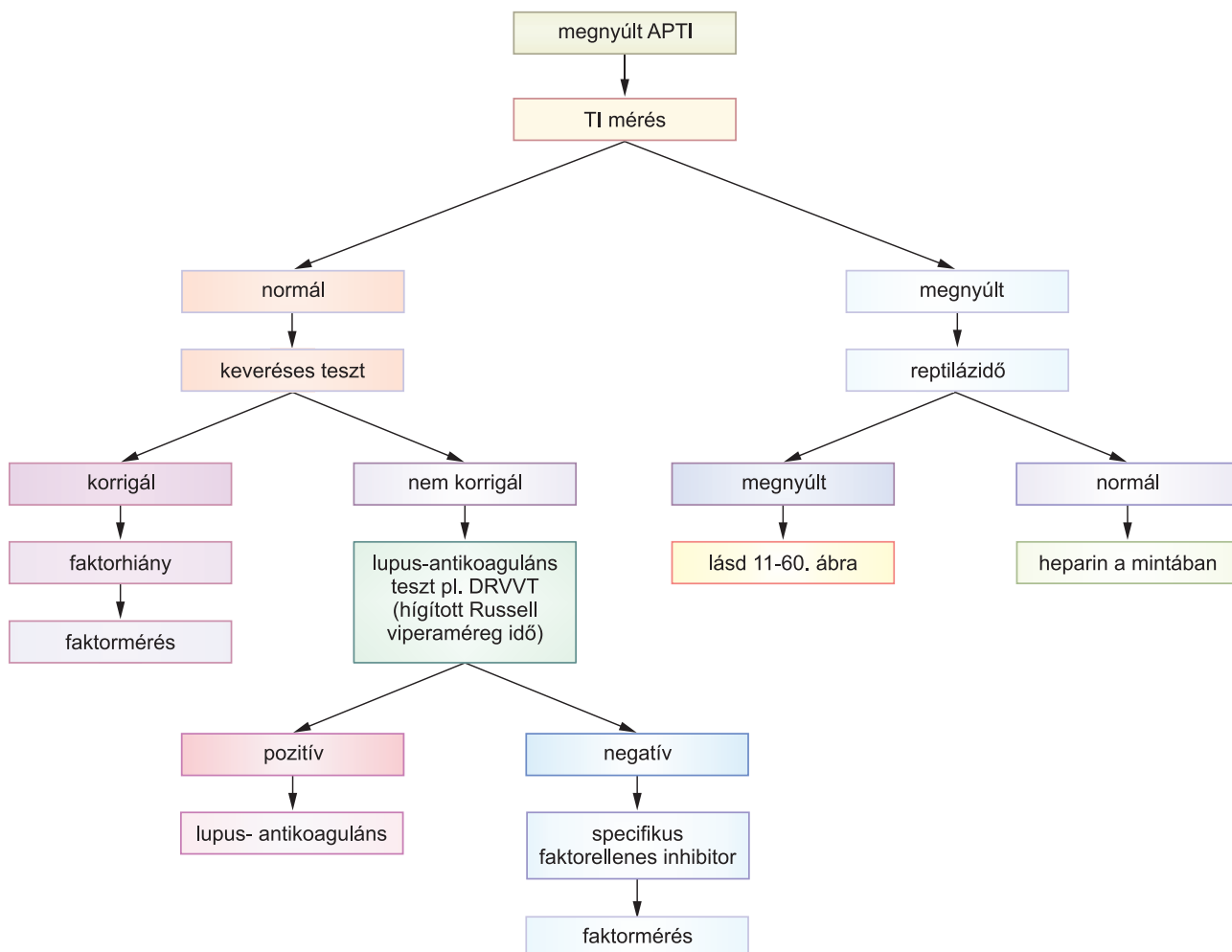
Aktivált parciális tromboplastinidő (APTI-) meghatározás

A minta ebben az esetben is thrombocytaszegény plazma. A reagens parciális tromboplastin, amely nem tartalmazza a szöveti faktort, csak a foszfolipid-részt. A reakció azonban így nagyon lassan zajlana le, ezért a reagenshez kontakt aktivátort (kaolin, szilika, elagsav) is hozzáadnak. A minta és a reagens előinkubálása (aktiválása) után hozzáadott kalcium-klorid startreagens és a fibrinalvadék megjelenése között eltelt időt mérjük másodpercben. A módszer a véralvadás „intrinsic”, és „közös” útját modellezi, az ezekben részt vevő faktorok csökkenése esetén megnyúlik.

Az eredményt normál kontrollhoz viszonyítva (kórosnak tekinthető a ± 8 s eltérés) vagy APTI-ráta (betegnél mért APTI/normál kontroll APTI) formájában adjuk meg. Az APTI megnyúlását okozhatja a XII-es, XI-es, X-es, IX-es, VI-as, V-ös és II-es faktor és a fibrinogén szintjének csökkenése.

Használjuk nem frakcionált heparin (UFH) terápia monitorozására. Ilyen esetben az APTI 1,5–2,5-szörös megnyúlását kell elérni. Megnyúlt APTI-t eredményezhet lupus-antikoaguláns (LA) jelenléte is. A 11-59. ábra mutatja be a kóros APTI esetén végzendő további vizsgálatokat. Az APTI jelentős megnyúlása tapasztalható néha vérzés megjelenése nélkül is. Ez XII-es faktor, HMWK (high molecular weight kinnogén), PK (prekallikrein) hiányban, lupus-antikoaguláns jelenlétében és nem megfelelő vér : citrát arány esetén észlelhető.

A keverékes teszt során a beteg plazmájához 1:1 arányban normál plazmát keverünk. Ezáltal az alvadási faktorok minimum 50%-a rendelkezésre áll. Ennek következtében, ha a keverékes teszt eredményeként normál APTI-t mérünk, az APTI-megnyúlás hátterében faktorhiány áll. Nem korrigálható keverékes teszt inhibitor jelenlétét (heparin, specifikus faktorelles inhibitor vagy lupus-antikoaguláns) valószínűsíti.



11-59. ábra. Megnyúlt APTI kivizsgálása

Trombinidő- (TI-) meghatározás

A thrombocytaszegény plazmához meghatározott mennyiségű trombin reagenst adunk és másodpercben mérjük a fibrinalvadék megjelenéséig eltelt időt. A fibrinogén polimerizált fibrinné való átalakulásának arányát követjük nyomon. Az eredményt normál kontrollhoz viszonyítva (kórosnak tekinthető a ± 8 s eltérés) vagy TI ráta (betegnél mért TI/normál kontroll TI) formájában adjuk meg. A TI megnyúlását okozhatja hypo- vagy dysfibrinogenaemia, heparin terápia (heparinszennezettség esetén is), FDP (fibrin/fibrinogén degradációs termékek) és a fibrin polimerizációját zavaró faktorok (pl. paraprotein) jelenléte a mintában. A 11-60. ábra mutatja be a kóros TI esetén végzendő további véralvadási vizsgálatokat.

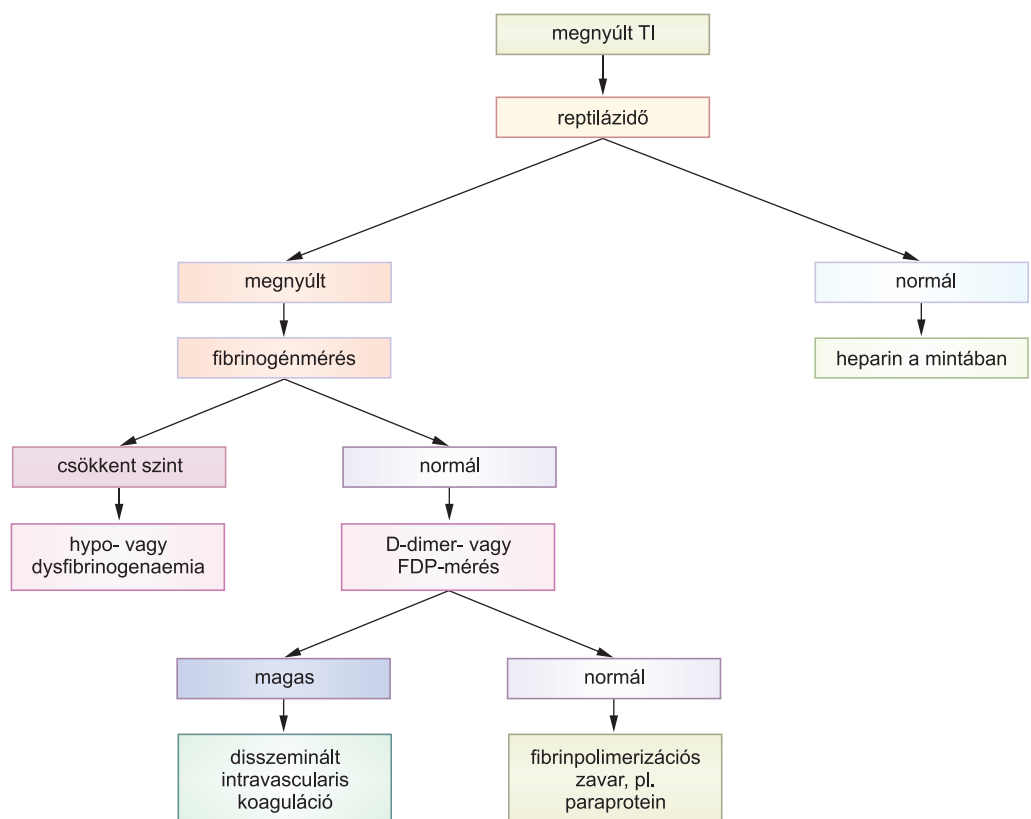
Fibrinogénmeghatározás

A fibrinogénkoncentráció meghatározására több módszer is rendelkezésünkre áll, így direkt meghatározás kinetikus turbidimetriával, immunkémiai módszerek és az ún. PI-származtatott vagy derivált fibrinogén módszer. Ez utóbbi esetében a fibrinogén

koncentrációt a PI mérése során a fényszórás mértékének változásából vagy optikai denzitásából számítjuk ki. Előnye, hogy gyors és olcsó. Hátránya, hogy bizonyos betegcsoportok esetén nem ad pontos eredményt (pl. DIC, májbetegség, vesebetegség, dysfibrinogenaemia, trombolitikus terápia, ill. erősen megnyúlt protrombinidő).

Ezért a fibrinogén meghatározására ajánlott módszer a CLAUSS szerinti. Ez biológiai hatás alapján mér – egy módosított trombinidő-meghatározás –, az 1:9 arányban hígított plazmához trombint adunk feleslegben, és másodpercben mérjük a fibrinalvadék megjelenéséig eltelt időt. Ennek eredményeként a fiziológiásan jelen lévő inhibitorok hatása elhanyagolhatóvá válik, és a mért idő csak a mintában jelen lévő fibrinogén koncentrációjától függ. Ismert fibrinogénkoncentrációjú plazma hígításaival kalibrációs görbét készítünk, amelyről a beteg plazmájának fibrinogénkoncentrációja leolvasható. Az eredményt g/l mértékegységben adjuk meg (referenciatartomány: 2–4 g/l).

A fibrinogént a máj termeli és az akut fázis fehérjék csoportjába tartozik. Szintje csökken csökkent szintézis (pl. májbetegség), megnövekedett felhasználás



11-60. ábra.
Megnyúlt TI
kivizsgálása

nálás (pl. DIC, hyperfibrinolysis) miatt. Emelkedett fibrinogénkoncentrációt mérhetünk megemelkedett szintézis, pl. akut fázis reakció (gyulladás, tumor, trauma, égés), krónikus gyulladásos reakció (rheumatoid arthritis, bizonyos autoimmun megbetegedések) következményeként, fehérjevesztéses állapotokban az albuminvesztesség kompenzálására vagy veleszületetten (az atherosclerosis rizikófaktora).

IRODALOM

- DEBRECZENI L., KOVÁCS L. G. (szerk.): Gyakorlati laboratóriumi medicina. 2. kiadás, Literatura Medica Kiadó, Budapest, 2008.
- KITCHEN, S., OLSON, J. D., PRESTON, F. E. (eds): Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Wiley- Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2009.
- O'SHAUGHNESSY, D., MAKRI, M., LILICAR, D. (eds): Practical Hemostasis and Thrombosis. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- SMITH, STEPHANIE A.: The cell-based model of coagulation. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19(1):3–1, 2009.

A thromboemboliás kórképek fehérjediagnosztikája

TÖKÉS-FÜZESI MARGIT

A thromboemboliás kórképek az artériás vagy vénás keringésben kórosan létrejövő thrombus következményei. Eredményeként létrejöhet részleges vagy teljes érelzáródás, ill. a keletkezett vérrögökből embolusok szakadhatnak le, tovább súlyosbítva a kórlefolyást. A vénás thromboemboliák (VTE) a mélyvénás thrombosit (MVT) és a pulmonalis emboliát (PE) foglalják magukba. Az artériás thrombosis elsősorban akut ischaemiás állapot formájában jelentkezik, ami érintheti a szívartériákat (akut coronaria-szindróma: instabil angina, szívinfarktus), az agyi artériákat (átmeneti agyi ischaemiás attack, agyvérzés), valamint a végtagok perifériás és a mesenterium artériáit. A thromboemboliás kórképek diagnosztizálása elsősorban nem laboratóriumi teszteken alapul. Ilyen esetekben a laboratórium a mérhető rizikótényezők felderítésében, a praethromboticus állapot előrejelzésében, ill. a nehezen diagnosztizálható thrombosis és pulmonalis embolia kizárásában segítheti a klinikus munkáját. *Praethromboticus állapotban mérhető alvadási paraméterek:*

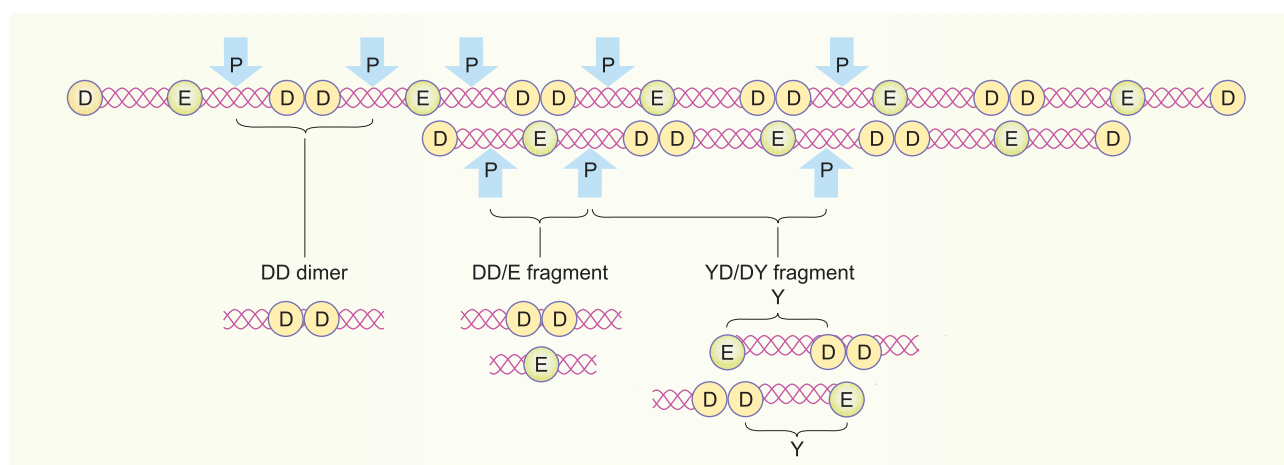
- Fibrinopeptid A (FPA), amely a fibrinogénből trombin hatására lehasadó molekula.
- Fibrin monomer.
- Trombin-antitrombin komplex (TAT) kimutató.

Ezek szintje hamar emelkedik a plazmában, mérések viszont költséges és időigényes. Rutin laboratóriumok szintjén is elvégezhető vizsgálat ilyen esetekben a D-dimer-mérés.

D-dimer-meghatározás

A fibrinolízis során, mivel a plazmin nem specifikus enzim (lebontja a fibrinogént, a fibrint és a stabil fibrinhálót is), különböző *fibrindegradációs termékek* (FDP) keletkeznek, pl. D-dimer, DXD fragmentum, DD/E fragmentum (11-61. ábra). A D-dimer a többi FDP-vel szemben csak a XIII-as faktor által kereszt-kötött fibrinháló plazmin általi hasításakor keletkezik, ami azt jelenti, hogy létrejöttét mindig thrombusképződés előzi meg. Kimutatására kvalitatív/szemikvantitatív gyorsesztek, ELISA, immunturbidimetria és fluoreszcens immunoassay-k is rendelkezésre állnak. Ezek közül a legelterjedtebb a turbidimetriás mérés. Monoklonális antitesttel bevont latexpartikulumokat tartalmazó reagenshez adjuk a mintát. D-dimer jelenlétében a partikulumok agglutinálódnak, a fényabszorbanancia csökken. Az abszorbanciaváltozás pedig arányos a mintában jelen lévő D-dimer mennyiségével, amelynek értékét ismert koncentrációjú D-dimer hígításaiból készített kalibrációs görbéről olvasunk le.

Az eredményt a különböző módszerek különböző mértékegységben adják meg; a hazánkban forgalomban lévő tesztek mg/l ($\mu\text{g/ml}$) vagy mgFEU/l ($\mu\text{gFEU/ml}$) egységben. A FEU (fibrinogen equivalent unit) azt a fibrinogénmennyiséget fejezi ki, amelyből az adott koncentrációjú fibrindegradációs termék keletkezett.



11-61. ábra. A fibrinolízis (P: plazmin; D, E: a fibrinogén D, E régiója; ezek N- és C-terminális fehérjék)

Két $\mu\text{gFEU/ml}$ D-dimer immunreaktivitása annyi, mint 1 $\mu\text{g/ml}$ tisztított D-dimeré. Ez azt jelenti, hogy a FEU-ban kifejezett D-dimer-értékek kétszer olyan magasak lehetnek, mint a D-dimer egységekben kifejezett értékek. A kvantitatív D-dimer-tesztek eredményei nem könnyen hasonlíthatók össze egymással, mivel a különböző tesztekben alkalmazott antitestek specificitása és affinitása különböző, valamint a kalibrátor készítmények előállítása is. Ebből adódnak a különböző referenciatartományok és cut-off értékek, a legtöbb teszt esetén azonban ez $<500 \mu\text{gFEU/ml}$.

A D-dimer-teszt elsősorban a vénás thromboemboliák – mélyvénás thrombosis, tüdőembolia – kizárására alkalmas, általában klinikai „score”-rendszerbe illesztve vagy „stand alone”, kizárási tesztként. A legtöbb teszt szenzitivitása VTE vonatkozásában 98–100% között van. Specificitása azonban ennél lényegesen alacsonyabb, nem éri el az 50%-ot. Ez azt jelenti, hogy a vizsgálat negatív prediktív értéke MVT és PE kizárására közel 100%, tehát cut-off érték alatti D-dimer-eredmény esetén jelenlétük kizárható. Nem használható azonban artériás thromboticus folyamat kizárására (infarctus, stroke). Pozitív teszteredmény azt mutatja számunkra, hogy a szervezetben valahol thrombuslebontás folyik, arról nem ad felvilágosítást, hogy ez intra- vagy extravasalisán történik-e. Haematoma jelenlétekor, trauma után, posztoperatív állapotokban is lehet emelkedett

a D-dimer-szint. Ugyanez történik gyulladásos folyamat és tumor környezetében, amikor a kis erekben microthrombusok képződnek. A D-dimer-teszt másik fontos alkalmazási területe a DIC (disszeminált intravasculáris koaguláció) kimutatásában van score-rendszerbe illesztve.

Thrombophiliák laboratóriumi diagnosztikája

A thrombophilia fokozott hajlamot jelent a thromboemboliás kórképek kialakulására, hátterében lehetnek örökletes vagy szerzett faktorok, esetleg ezek kombinációja (11-25. táblázat). Veszélyesített thrombophilia gyanújának kell felmerülnie abban az esetben, amikor fiatal (55 év alatt) betegnél alakul ki mélyvénás thrombosis szokatlan helyen (nem alsó végtagon), recurrens módon, és családi halmozódást mutat. A thrombophilia irányában való kivizsgálást speciális hemosztázis laboratóriumokban végzik. A jelenlegi ajánlások értelmében ki kell vizsgáltatni az artériás/vénás thrombosison átesetteket, igazolt thrombophiliások tünetmentes gyermekeit serdülőkorban, valamint fiatal korban thrombosison átesettek testvéreit. A thrombophilia kivizsgálása szempontjából fontos az időpont, amikor elvégezzük a laboratóriumi teszteket. Molekuláris genetikai tesztek esetében ez bár-

11-25. táblázat. A thrombophiliák fő okai

Veleszületett	Szerzett
AT-defektus	antifoszfolipid-antitest (APLA), lupus-antikoaguláns (LAC), antikardiolipin antitest (ACA)
protein C defektus	tumoros megbetegedések
protein S defektus	myeloproliferatív szindróma
FV Leiden mutáció (APC rezisztencia)	PNH (paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria)
protrombin 20210A polimorfizmus	nephrosis-szindróma
dysfibrinogenaemia	hyperhomocysteinaemia
emelkedett FVIII	
emelkedett FIX	
emelkedett FXI	
közepes hyperhomocysteinaemia	

11-26. táblázat. Ajánlott első vonalbeli kivizsgálások thrombophiliában

<i>Teszt neve</i>	<i>Teszt típusa</i>	<i>Módszer</i>
véralvadás-szűrőteszt	funkcionális	APTI, PI, TI
antitrombin	funkcionális	heparin kofaktor aktivitás mérés szarvasmarha trombinnal vagy Xa szubsztráttal
protein C	funkcionális	kromogén aktivitás
protein S	immunológiai	szabad PS antigén
APC-rezisztencia	funkcionális	minta előhígítása V. faktor hiányos plazmával
vagy		
faktor V Leiden-mutáció	DNS alapú	
protrombin G20210A	DNS alapú	
lupus-antikoaguláns	funkcionális	alvadás alapú teszt (clotting-based)
antikardiolipin	immunológiai	

11-27. táblázat. Thrombophilia kivizsgálásában lehetőség szerint elvégezhető tesztek

<i>Teszt neve</i>	<i>Módszer</i>
aktivált PC rezisztencia	eredeti, nem módosított teszt
AT antigén	immunológiai módszer
protein C antigén	immunológiai módszer
protein C aktivitás	alvadás alapú funkcionális teszt
össz-protein S antigén	immunológiai módszer
protein S aktivitás	alvadás alapú funkcionális teszt
fibrinogén	alvadás alapú funkcionális teszt
fibrinogén	immunológiai módszer
VIII, IX, XI. faktor szint	alvadás alapú funkcionális teszt
homocisztein	funkcionális vagy immunológiai teszt

mikor alkalmas, és az élet során elegendő egy vizsgálat elvégzése (FV Leiden, Protrombin 20210A mutációk). Más alapelven működő tesztek esetében a thrombosis lezajlása után 3–6 hónappal érdemes elvégezni a kivizsgálást. Oralis antikoaguláns kezelésen lévő betegek kivizsgálása nem ajánlott, mivel a protein C, a protein S és a lupus-antikoaguláns eredmények nem interpretálhatók. Tartós heparinkezelés csökkenheti az antitrombin- (AT-) szintet. Amennyiben az antikoaguláns kezelés nem függeszthető fel, akkor a vizsgálat

idejére ajánlott a beteg kis molekulatömegű heparinkezelésre való átállítása. Thrombophilia diagnózisát nem molekuláris teszt végzésekor csak akkor mondhatjuk ki, ha az két ismételt mintavétel után is pozitív eredményt adott.

A thrombophilia szűrésére ajánlott tesztek a 11-26. táblázaton mutatjuk be; részletes leírásuk a megfelelő helyen a szövegben szerepel. A lehetőség szerint elvégezhető további tesztek a 11-27. táblázat foglalja össze.

ANTITROMBIN- (AT-) DEFEKTUSOK

Az előzőleg antitrombin III néven ismert *antitrombin* a májban termelődő 58 kDa nagyságú fehérje. A trombin legfontosabb inhibitora, ugyanakkor más szerin-proteázokat is gátol, így a Xa, IXa, XIa, XIIa, valamint a szöveti faktorhoz kötött VIIa faktort is. Funkcionális szempontból két fontos régiója van: egy trombinkötő domén a molekula karboxi-terminális részén (Arg393-Ser394) és egy heparinkötő hely az N-terminális részén. Heparin nélkül az AT lassan inaktíválja a trombit, ezt nevezzük az *antitrombin progresszív aktivitásának*. Heparin bekötődésekor viszont az AT konformációváltozáson esik át, ennek eredményeként az AT és a szerin-proteázok közötti komplexképződés a 4000-szeresére emelkedik. A heparin jelenlétében végbemenő gyors trombin- és Xa faktor inaktíválást nevezzük az antitrombin *heparinkofaktor-aktivitásának*. Az AT-hiány a thromboembolia kialakulásának kockázatát 8–10-szeresére emeli.

A veleszületett antitrombinhiánynak két formája ismert.

- I-es típusú AT hiány. Ilyenkor a minőségileg jól működő antitrombin mennyisége csökken, vagyis mind az AT antigén, mind az aktivitás csökken.
- II-es típusú AT hiány. Mennyiségileg megfelelő, de funkcionálisan rosszul működő fehérje termelődik. Ebben az esetben az AT antigénszint normál vagy közel normál, de az aktivitás jelentősen csökkent. A II. típuson belül is három alcsoportot különböztetünk meg attól függően, hogy az AT melyik részét érinti a molekuláris defektus.

Az AT-aktivitás kimutatására alkalmazott tesztek közül az *AT-deficienciák szűrésére a heparinkofaktor-aktivitás mérése* ajánlott, mivel ezzel a klinikailag fontos eltérések kimutathatók.

A mérés két lépésben megy végbe:

- Az első lépésben a beteg plazmáját ismert mennyiségű szarvasmarha Xa faktorral inkubáljuk fölös mennyiségű heparin jelenlétében.
- Majd az el nem reagált Xa faktor aktivitását kromogén szubsztrát segítségével mérjük. A szubsztrátról lehasadó kromogén p-nitro-anilint 405 nm-en kinetikusan mérjük. A mért

színintenzitás fordítottan arányos a beteg plazmájában jelen lévő AT-nal.

Vannak gyártók, akik a Xa faktor helyett IIa faktort alkalmaznak a tesztben. Az eredményt az aktivitás százalékában adjuk meg.

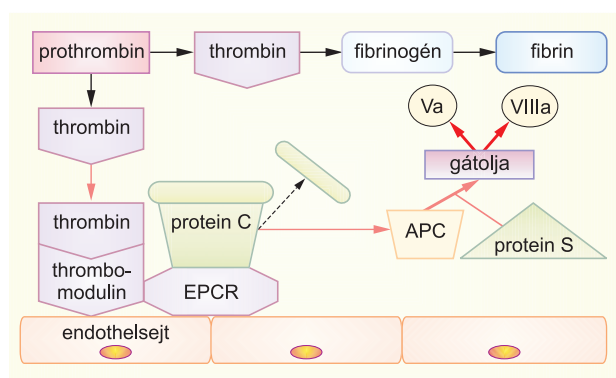
PROTEIN C (PC-) DEFEKTUSOK

A protein C a májban zimogén formájában termelődő 62 kDa nagyságú K-vitamin-függő fehérje. K-vitamin hatására poszttranszlációs módosuláson esik át, vagyis a fehérjében lévő glutaminsavhelyek γ -karboxilációja megy végbe. Az aktív protein C kialakulásához a plazmában kalciumion, trombin és foszfolipid jelenlétére van szükség. A protein C trombin általi aktiválásához az endothelsejtekhez kötött trombomodulinra és endotelhialis protein C-receptorra van szükség. Az aktivált protein C kofaktora, a protein S jelenlétében inaktíválja a VIIa és Va faktort, ezáltal gátolva a trombinképződést (11-62. ábra). A PC-hiány hétszeresére emeli thrombosis kialakulásának a kockázatát.

Az öröklött protein C-deficienciának is két formája ismert:

- I-es típus. A deficienciák 75%-át teszi ki. Ilyenkor a PC-nek mind mennyiségileg, mind funkcionálisan csökken a szintje.
- II-es típus. E deficienciában a funkcionális fehérje szintje csökken az antigénszinthez viszonyítva.

A PC-aktivitás mérésére ajánlott teszthez kromogén szubsztrátot alkalmaznak; a teszt két lépésben megy végbe. Az első lépésben a beteg plazmáját inkubáljuk PC-aktivátorral (*Agkistrodom contortrix contortrix* kígyó mérge).



11-62. ábra. A protein C és a protein S rendszer működése

A második lépésben az aktivált PC a kromogén szubsztrátot hasítja, a felszabaduló p-nitro-anilint pedig 405 nm-en kinetikusan mérjük. A színintenzitás egyenesen arányos a mintában jelen lévő PC mennyiségével.

PROTEIN S (PS-) DEFEKTUSOK

A protein S 84 kDa molekulatömegű, májban termelődő, K-vitamin-függő fehérje. A plazmában lévő PS (protein S) kb. 65%-a a komplement C4b-kötőfehérjéhez (C4b-BP) kapcsolódik. Ez nem tud kofaktoraktivitást kifejteni. A maradék szabad PS képes az aktivált protein C-hez (APC) kötődni, kifejteni kofaktorhatását és ezáltal részt venni a VIIa és Va faktor inaktiválásában. A protein S-hiány thrombosis kialakulásának a kockázatát nyolcszorosára növeli.

Az örökletes PS hiánynak három formája ismert.

- I-es típus. Kvantitatív hiány, amelynek eredményeként csökkent mennyiségű, de strukturálisan normál fehérje termelődik. Ennek következtében mind a kötött, mind a szabad PS szintje csökken, ennek eredménye a funkcionális PS szint csökkenése.
- II-es típusú deficiencia. Kvalitatív elváltozás, vagyis csökken a PS-aktivitás, amely normál vagy közel normál össz- és szabad PS-szinttel párosul.
- III-as típusú deficiencia. A szabad PS antigén és a funkcionális PS mennyisége csökken, az össz-PS-mennyiség normál.

A PS-hiány a thrombosis kockázatát nyolcszorosára növeli.

A PS mérésére használt immunológiai módszerek mind az aktív, mind az inaktív szabad PS-formát mérik, ezért a funkcionális szabad PS-mennyiséget főlélik. Az össz-PS mérésekor az inkubációs időt úgy kell megválasztanunk, hogy a PS-nek kellő ideje legyen kilépni a C4b-BP komplexből és reagálni az antitestekkel. ELISA-tesztek végzésekor magas hígításra és a primer antitesttel hosszú inkubációs időre van szükség. Kezdetben poliklonális antitestet használtak, amely nem tudott különbséget tenni a kötött és szabad forma között. Ezért a C4b-BP forma eltávolítására polietilén-glikolos (PEG) kicsapást alkalmaztak. A későbbiekben olyan antitestet fejlesztettek ki, amely a PS C4b-BP-hez való kötőhelyét ismeri fel.

Ezek a szabad PS kicsapás nélküli, direkt mérését tették lehetővé.

Az utóbbi időben széles körben elterjedt mérési módszer a latexhez kötött immunológiai mérés. Az antigén ilyen esetben a szabad PS. Az első lépésben a tisztított latexhez kötött C4b-BP kalciumion jelenlétében megköti a beteg plazmájában lévő szabad PS-t. Második lépésben a szintén latexhez kötött PS ellen termelt antitest reagál a C4b-BP-hez kötött szabad PS-sel. Ennek eredményeként agglutináció jön létre, és a turbiditásváltozás egyenesen arányos a plazmában lévő szabad PS-sel.

A funkcionális tesztek a PS kofaktoraktivitását alapulnak. A plazmában lévő PS kofaktoraktivitásától függően az aktivált PC antikoaguláns aktivitás fokozódik, ami az alvadási idő (APTI) megnyúlásával jár együtt. Amennyiben a plazmához Va faktort is adunk (amely az aktivált PC szubsztrátja), kiküszöbölhetővé válik az APC-rezisztens betegben mért téves eredmény.

AKTIVÁLT PROTEIN C (APC-) REZISZTENCIA

Az APC-rezisztenciát nem megfelelő antikoagulánsválaszként határozhatjuk meg egy APTI alapú alvadási tesztben, ha a plazmához in vitro aktivált protein C-t adunk. Az APC kofaktorával, a PS-sel együtt a VIIa és Va faktort inaktiválja. Az Va faktort az Arg 506 aminosavpozícióban hasítja.

A fokozott alvadékonyságot okozó APC-rezisztencia hátterében 95%-ban az V-ös faktor génjének pontmutációja áll, amely az 506-os hasítási helyet érinti, és Leiden-mutációként vált ismertté. A gén 1691-es pozíciójában a guanin adeninre cserélődik (G1691A), aminek eredménye az 506-os pozícióban létrejövő aminosavcsere, az arginin glutaminra cserélődik. Ennek következménye, hogy az APC lassabban inaktiválja az Va faktort. Magyarországon az APC-rezisztencia prevalenciája 10% körüli. A Leiden-mutációra heterozigóta egyéneknél a thrombosis kockázata hétszeres, a homozigótáknál (gyakoriság 1:1000) ez 50–80-szoros is lehet.

Az APC-rezisztencia mérésére használt tesztek APTI alapúak. Az első generációs tesztekben párhuzamosan két APTI-t mérünk, egyiket a beteg plazmájához adott exogén APC, a másikat anélkül, kalciumion jelenlétében. Az eredményt APC-ráta formájában adjuk meg, amelyet a két alvadási időből

képezünk. Képezhetünk normalizált rátát is, amelynek során a beteg APC-rátáját osztjuk a poolozott (gyűjtött) normál plazmából mért APC-rátával. Ilyen esetekben azonban a normál plazmákat ajánlott előzetesen APC-rezisztenciára leszűrni, mivel egyetlen Leiden-mutációt hordozó beteg mintája is jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. A teszt nem tekinthető diagnosztikusnak Leiden mutáció szempontjából, mivel az eredményeket jelentősen befolyásolja a plazmában lévő VIII-as faktor, protein S-szint, valamint az antifosfolipid-antitestek jelenléte. A teszt specificitása növelhető, ha a tesztplazmát V-ös faktor hiányos plazmával hígítjuk (1:4). Az újabb generációs tesztekben az APTI alvadási teszt nem kontakt aktivációval, hanem specifikus kigyóméreggel vagy IXa faktorról, amelyek a X-es faktort közvetlenül aktiválják.

PROTROMBIN 20210A POLIMORFIZMUS

A protrombin gén 3' untranslated (át nem íródó) régiójában a 20210-es pozícióban a guanin adeninre (G20210A) cserélődik ki, aminek eredményeként a plazmában megnő a protrombinszint, növelve ezáltal thrombosis kialakulásának a kockázatát. Heterozigótákban a kockázat 2–4-szeres, homozigótákban akár tízszeres kockázatot is jelenthet.

Kimutatására molekuláris genetikai módszert használnak.

ANTIFOSZFOLIPID-ANTITESTEK, LUPUS-ANTIKOAGULÁNS KIMUTATÁSA

Az *antifosfolipid-szindróma* (APS) a thrombosisok és a terhesség során bekövetkező komplikációk egyik fontos oka. Szerzett thrombophilia, autoimmun betegség, amelyben a tüneteket a plazmában megjelenő foszfolipid- (PL-) ellenes antitestek okozzák. Ezek az antitestek átmenetileg, klinikai tünetek nélkül is megjelenhetnek gyógyszerhatás vagy vírusinfekció (elsősorban gyermekkorban), bakteriális infekció, ill. parazitás megbetegedés következményeként. Ebben az esetben nem tekinthető betegségnek.

Az *antifosfolipid-antitesteket* először szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegekben írták le, akik álopozitív syphilis-teszt-eredményt mutattak. Kiderült, hogy ennek hátterében a plazmájuk-

ban keringő autoantitestek állnak, amelyek képesek a negatívan töltött foszfolipidekhez – így a kardiolipinhez – kötődni. Innen ered az *antikardiolipin-antitest* (ACA) megnevezés. Ezzel közel egy időben írták le, hogy a SLE-s betegek in vitro megnyúlt alvadási idővel rendelkeznek, ami azonban nem jár együtt vérzékenységgel. A megnyúlt foszfolipid dependens alvadási teszt eredményt (pl. APTI) normál plazma hozzáadásával sem lehetett korrigálni, ami inhibitor jelenlétére mutatott. Ezt az inhibítort nevezték el *lupus-antikoagulánsnak* (LA). Paradox módon a *lupus-antikoaguláns* jelenléte a SLE-betegekben nem vérzékenységgel, hanem megnövekedett thrombosis-kockázattal jár együtt. A későbbiek során az antifosfolipid-antitestekkel kapcsolatban kiderült, hogy az antigén tulajdonságot nem maga a foszfolipid hordozza, hanem a hozzákötött fehérjék. Ezek közül a legismertebb a β_2 -glikoprotein I, a protrombin, a XI-es faktor, a protein C, a protein S és az annexin-V. Ezek akkor exponálódnak, ha anionos PL-hez vagy negatívan töltött felülethez kötődnek.

Az APS nemzetközileg elfogadott diagnosztikai kritériumait a 11-28. táblázat mutatja be. A diagnózis kimondásához legalább egy klinikai és egy laboratóriumi kritériumnak teljesülnie kell. A laboratóriumi eredmény akkor tekinthető diagnosztikusnak, ha legalább két alkalommal 12 hetes különbséggel elvégezve pozitív. Az LA-t az ISTH SSC LA/PL-függő antitestek albizottsága iránymutatása szerint kell kimutatni, az ACA-t pedig standardizált β_2 -glikoprotein I-dependens ELISA-val.

Az LA kimutatásának laboratóriumi kritériumai:

- Foszfolipidfüggő alvadási teszt megnyúlása LA jelenlétében.
- A megnyúlást okozó inhibitor kimutatása (keveréssel teszt).
- Az inhibitor PL-függőségének kimutatása:
 - relatív korrekció emelt mennyiségű PL-lel;
 - a hatás fokozódása a PL hígításával.
- Ha a diagnózis bizonytalan, egyéb coagulopathiák kizárása (faktorhiány, faktorelles gátlótest).

A kimutatás lehetőségei:

- A mérésekhez használt plazma (a beteg plazmája és kontroll normális plazma) centrifugálása kétszer 20 perc 2000xg-vel.

11-28. táblázat. Antifoszfolipid-szindróma diagnosztikai kritériumai

Klinikai kritériumok	Laboratóriumi kritériumok
<p><i>thrombosis:</i> artériás, vénás vagy kis erek thrombosisa bármilyen szövetben vagy szervben</p>	<p>IgG és/vagy IgM antikardiolipin-antitest közepes vagy magas koncentrációban és/vagy IgG és/vagy IgM anti β_2-glikoprotein I közepes vagy magas koncentrációban és/vagy lupus-antikoaguláns</p>
<p><i>terhességi komplikációk:</i> a morfológiai szempontból normális magzat megmagyarázhatatlan halála a 10. héten vagy azt követően; három vagy több megmagyarázhatatlan 10. hét előtti abortusz egymás után; 34. hét előtti koraszülés súlyos praeclampsia vagy placenta-elégtelenség következtében</p>	

- LA-érzékeny alvadási idők: APTI, LA-érzékeny APTI, hígított Russell viperaméreg-idő (RVMI). A LA-pozitív betegminta LA-érzékeny alvadási ideje szignifikánsan megnyúlt a kontrollhoz képest. A PI ritkán nyúlik meg LA jelenlétében, ennek oka a nagy mennyiségű LA jelenléte lehet.
- A megnyúlást okozó inhibitor kimutatása keveréssel. APTI és LA-szenzitív APTI esetében 1:1 vagy 1:4 arányú hígításban végezzük a mérést. LA jelenlétében a keveréssel nem korrigál. A nem korrigálhatóság megítélésére számíthatjuk ki a következőket:
 1. APTI keverék – APTI kontroll: > 5 s.
 2. APTI keverék – APTI kontroll/APTI beteg \times 100: > 15% (*Rosner-index*).

Hígított Russell viperaméreg-idő teszt esetében a számítás a következő:

betegplazma kontrollplazma keverék RMVI/kontrollplazma RMVI: > 1,2.

- A megerősítő tesztek két elven működhetnek:
 - A PL csökkenésével a foszfolipidfüggő teszt alvadási ideje megnyúlik ilyen pl. a RVMI hígított PL-lel vagy az APTI hígított PL-lel.

- A PL koncentrációjának növelésével az alvadási idő rövidül; ilyen a thrombocythaneutralizációs teszt (PNP), a neutralizáció hexagonális PL-lel és RVMI megerősítő tesztje.
- A PL-ellenes antitestek direkt kimutatására ELISA technikát használnak.
 - Antikardiolipin-antitest (ACA) esetében az IgG-, IgM-, IgA-nak közepes vagy magas titerben kell jelen lennie;
 - β_2 -glikoprotein I-gyel reagáló antitest kimutatás esetén az IgG és az IgM.

IRODALOM

- DEBRECZENI L., KOVÁCS L. G. (szerk.): Gyakorlati laboratóriumi medicina. 2. kiadás, Literatura Medica Kiadó, Budapest, 2008.
- KITCHEN, S., OLSON, J. D., PRESTON, F. E. (eds): Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Wiley- Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2009.
- O'SHAUGHNESSY, D., MAKRI, M., LILLICARP, D. (eds): Practical Hemostasis and Thrombosis. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- SMITH, STEPHANIE A.: The cell-based model of coagulation. J. Vet. Emerg. Crit. Care 19(1):3–1, 2009.

A testnedvek fehérje-összetételének diagnosztikus kémlelése

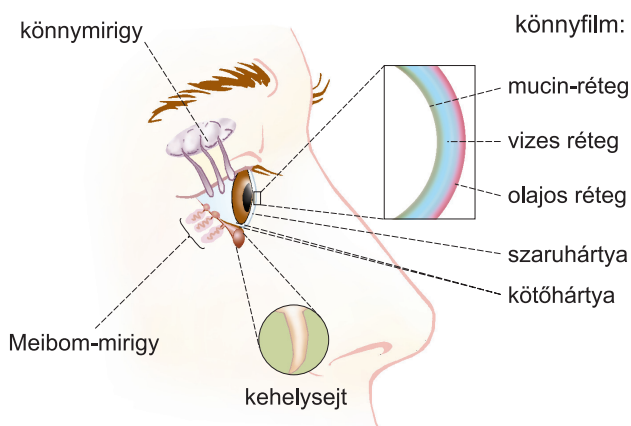
A könny vizsgálata

LUDÁNY ANDREA

A könny mint vizsgálati objektum viszonylag ismeretlen a laboratóriumi diagnosztikában annak ellenére, hogy nem invazív módon nyerhető. Egyre több megfigyelés és vizsgálati eredmény utal arra, hogy összetételének analízise nem kizárólag a szemészeti betegségek diagnosztikájában játszhat fontos szerepet. Információt nyújthat az egész szervezet állapotról. Ezért a könnyfehérjék ismeretének mind fiziológiai, mind patofiziológiai szempontból jelentősége van.

A KÖNNY FIZIOLÓGIAI SZEREPE ÉS ÖSSZETÉTELE

A könny a szem külső felszínén filmszerű réteget képez, ezáltal védelmet biztosít a cornea és a conjunctiva epithelsejtjei számára mind a külső fizikai kémiai, mind a kórokozók hatásaival szemben. Összetett viszkózus folyadékrendszer, amely három rétegből áll: lipidekből, fehérjékből és elektrolitokból, valamint mucinszerű anyagokból tevődik össze.



11-63. ábra. A szem és a könnytermelő szövetek sematikus ábrázolása. A könnyfilm három rétege

A lipidek a külső fázist, a fehérjék és az elektrolitok a vízdékony középső fázist, a „ragadós” szialomucin komplexek a könnyfilm belső rétegét képezik. A könny jelentős mucintartalmát, amely glikoproteinek és glükóz-aminoglikánokból áll, az emlősökben a cornea és a conjunctiva kehelysejtjei termelik. Mind a cornea és conjunctiva epithelsejtjei által termelt transzmembrán forma, mind a glandula lacrimalis által szekretált szekretoros mucin jelenléte szükséges a könnyfilm stabilitásához. Az anorganikus sókat és glikoproteineket tartalmazó vizes fázist főleg a könnymirigy (glandula lacrimalis) és a conjunctiva felső áthajlásában elhelyezkedő járulékos könnymirigyek állítják elő. A Meibom-mirigy és a szemhéjszéli faggyúmirigyek (Zeiss- és Moll-mirigyek) a lipideket szekretálják (11-63. ábra).

A könny fiziológiai szerepe

A könnyfilm nedvesen tartja az avascularis corneát, így biztosítva a gázcserét a levegő és az epithelsejt között. Ha a szem felszínére idegentest vagy valamilyen vegyi szennyeződés kerül, a reflexesen beinduló könnyezés kimossa, felhígítja a károsító idegen anyagokat. A fertőzésektől antibakteriális és antivirális hatású anyagai (lizozim, laktoferrin, β -lizin, immunglobulinok: szekretoros IgA) védik meg. Fontos feladata az epithelsejték tápanyag- és vitaminellátása, valamint az anyagcseretermékek eltávolítása. A könny ezen kívül nélkülözhetetlen metabolitokat is tartalmaz, mint pl. retinolt, amely szerepet játszik a cornea transzparenciájának a megőrzésében. Minden szemhéjzárásnál („pislogásnál”) újraképződik.

Vizsgálataink szempontjából kiemelendő a könny fehérjetartalma; előállítását nagyrészt a könnymirigy epithelsejtjei és a sejt közötti térbe vándorolt plazmasajték biztosítják. Irodalmi adatok szerint a könnyfehérje összetételében az emlősfajoknál nagyfokú konzervativizmus figyelhető meg.

A KÖNNY FEHÉRJÉI

GACHON és munkatársai 1979-ben elektroforetikus analízissel kb. 60 fehérjét detektáltak és azonosítottak a könnyben, ezek közül kb. 20 fehérje származik a könnymirigyből. Némi egyszerűsítést alkalmazva a könnyproteineket 3 csoportba osztották:

- Fehérjék, amelyek jelen vannak a szérumban és a könnyben is.

- Fehérjék, amelyek csak a könnyben vannak jelen, a szérumban nem detektálhatók.
- Proteinek, amelyek a könnyben is és az epithelsejtben is megtalálhatók.

A 2. csoport legjelentősebb képviselője a laktoferrin, a lizozim és a könnyspecifikus prealbumin (TSPA, tearspecific prealbumin). Azok a fehérjék, amelyek a szérumban is és a könnyben is jelen vannak, a conjunctiva kapillárisainak „szívárgása” során juthatnak a könnybe. Megfigyelték, hogy a conjunctiva hyperaemiában szenvedők könnyében nagyobb az albumin koncentráció, ami jelentős csökkenést mutat kalcium-dobezilát adásakor. (Ez a gyógyszer csökkenti a vasopermeabilitást). Azt a következtetést vonták le, hogy a szérumproteinek a kötőhártya-kapillárisok „szívárgása” során keverednek a könnyhöz.

Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és tömegspektrometriás (MS) vizsgálatokat alkalmazva a kutatók 2006-ban már 491 proteint azonosítottak a könnyben. A 491 fehérje közül 200 intracelluláris, ezek az epithelsejtek pusztulása során kerülnek a könnybe, 68 extracelluláris, 24 membránfehérje és 199 nem osztályozható ilyen módon.

A könnymirigy által termelt fehérjék: lizozim, laktoferrin, EGF, lipokalin és IgA

A lizozimet FLEMING azonosította először a könnyben, 1922-ben. Ez a lizoszómákban termelődő glikolitikus enzim a könnyben fordul elő legnagyobb arányban. Antibakteriális hatású, normális szintje 0,6–2,6 mg/ml.

A laktoferrin szintén antibakteriális hatású, a könnymirigy acinussejtei termelik. Elsőként 1966-ban detektálták a könnyben. ELISA-val vizsgálták a könny laktoferrintartalmát: a total protein 25%-át teszi ki, átlagos koncentrációja 2 mg/ml. Reverzibilisen képes kötni két vasatomot, ez magyarázza antibakteriális hatását. Bakteriosztatikus hatása mellett a klaszszikus komplementrendszer erős inhibitora. Szintje jelentősen csökkenhet egyes betegségekben, főleg olyanokban, amelyekhez száraz szem szindróma is társul. Ilyen betegség például a hepatitis C fertőzés. ABE és munkatársai 42 hepatitis C-ben szenvedő beteget vizsgáltak, és azt találták, hogy mind a könny volumene, mind a laktoferrin szintje csökken a szisztémás betegségben [1]. A gyulladással járó szembetegségek (pl. conjunctivitisek) szintén csökkent lak-

toferrinszinttel járnak. A humán könny lizozim- és laktoferrin koncentrációja jól tükrözi a könnymirigy funkcióját.

A könnyben jelentős mennyiségben található még EGF (epidermal növekedési faktor) fehérjét is, amely a cornea épségére vigyáz, az apró sérüléseket állítja helyre. Sjögren-szindrómában az EGF szintje jelentős csökkenést mutat. Szintjének pontos mérésére ELISA módszert dolgoztak ki, koncentrációját 1,6 ng/ml-nek találták.

A lipokalin olyan savas protein, amely bőséges mennyiségben van jelen a könnyben. 1956-ban detektálták és azonosították először. Segíti a magas viszkozitás fenntartását, a könnyfilm felületi feszültségének csökkentését, ezáltal hozzájárul a könnyfilm stabilitásának megőrzéséhez. A lipokalin a fő lipidkötő fehérje a könnyben. Emellett rendelkezik antibakteriális és antivirális hatással is, hiszen endonukleáz aktivitása és cisztein proteáz gátló hatása van.

A szekretoros IgA a legjelentősebb mennyiségben jelen lévő immunglobulin a könnyben, első védelmi vonalként szerepel.

Szérumproteinek: albumin, transzferrin, IgG és IgM

Az albumin azonos a szérumban lévő albuminnal. A humán könny minor komponense, de bármilyen conjunctiva stimulációra nő a mennyisége a már említett fokozott érateresztés miatt.

A transzferrin hatása hasonló a laktoferrinéhez, csak kisebb koncentrációban van jelen. A könnybe a többi szérumproteinhez hasonlóan passzív transzport útján kerül. Gyulladás esetén nagyobb mennyiségben található IgE, IgG és IgM.

Egyéb proteinek: akvaporin-5 és gyulladásos fehérjék

Az akvaporin-5 olyan membránprotein, amely nagyobb mennyiségben expresszálódik a könny- és a nyálmirigyekben. Normális esetben az acinaris és a ductalis sejtek apicalis membránjában mutatható ki. Sjögren-szindrómában az akvaporin-5 megoszlása változik meg: a citoplazmában marad, és nem jut ki az apicalis membránba.

Száraz szem szindrómában a gyulladásos markerek emelkedést mutatnak a könnyben: nagyobb koncentrációban van jelen az IL-1 α és IL-1 β , az IL-6, az IL-8, a TGF- β_1 és a TNF- α . A csökkent könnytermelés miatt kialakuló apró sérülések a conjunctiván gyul-

ladásos környezetet teremtenek, megnő a különböző citokinek mennyisége, a védő EGF fehérje mennyisége viszont csökken.

További fehérjéket is identifikáltak kis koncentrációkban a könnyben. Ilyen többek között: az amiláz, a peroxidáz, a plazminogénaktivátor, az alvadási faktor XIII, a prolaktin, a TGF- β , az endotelin-1, a retinol. Természetesen ez a felsorolás korántsem teljes így sem. A humán könnyben még jó néhány fehérje vár azonosításra, amelyek funkciója egyelőre ismeretlen. Kiemelendő, hogy a könny nagy total protein tartalma mellett egyre nagyobb lehetőség nyílik érzékeny analitikai eljárásokkal újabb fehérjék kimutatására és a proteomika jövőbeni alkalmazására.

A KÖNNYFEHÉRJÉK VIZSGÁLATA – KLINIKAI DIAGNOSZTIKAI LEHETŐSÉGEK

SZEMÉSZETI VONATKOZÁSOK – A SZÁRAZ SZEM SZINDRÓMA

A szemgolyót borító folyadék a szemhéjak sima mozgását „kenőanyagként” is segíti. Így a könnytermelés csökkenése, a könny összetételének megváltozása révén a könnyfilm instabillá válhat, felszakadhat, bizonyos esetekben teljesen hiányozhat. Ilyenkor a cornea és a conjunctiva kiszáradhat, kiszáradás okozta szaruhártya- és kötőhártya-gyulladás, keratoconjunctivitis sicca alakulhat ki. A keratoconjunctivitis sicca enyhébb és súlyosabb formái igen gyakoriak. Az etiológiája igen összetett.

Az 1996-ban született új felosztás (Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes) a különböző száraz szem formákat két fő csoportba sorolja:

- A csökkent könnytermelésen, a szem kisebb könnytartalmán alapuló száraz szem (tear-deficient dry eye, TDDE).
- A fokozott könnyvesztésen, a könnyfilm instabillá válásán vagy kifejezett párolgáson alapuló száraz szem (evaporative dry eye, EDE).

Csökkent könnytermelésen alapuló száraz szem (TDDE)

Erre a csökkent könnytermelés és az alacsonyabb könnytartam jellemző, és az ebből adódó tünetek:

égő, viszkető, szúró érzés. A könnydeficiens száraz szem csoportját további két alcsoportra lehet osztani:

- Nem Sjögren-szindrómás, de csökkent könnytermelésen alapuló száraz szem (Non-Sjögren Tear Deficient Dry Eye, NSTD).
- Sjögren-szindrómához társuló, csökkent könnytermelésen alapuló száraz szem (Sjögren Syndrome Tear Deficient Dry Eye, SSTD).

A *keratoconjunctivitis sicca* gyakran szisztémás betegség, azaz a Sjögren-szindróma részjelensége lehet. A szemszáradás xerostomiával, ízületi panaszok nélkül (primer) vagy valamilyen szisztémás autoimmun betegség (SLE, rheumatoid arthritis, dermatomyositis stb.) talaján alakul ki (szekunder). A primer Sjögren-szindrómát az egyéb kötőszöveti betegségektől a könny fehérjetartalmának változásával lehet megkülönböztetni. Az albumin:laktóferin 2:1-nél nagyobb aránya sokkal gyakoribb primer Sjögren-szindrómásoknál.

Az életkor előrehaladtával kismértékben csökken a könnymirigy által termelt fehérjék koncentrációja. Ezen kívül a nem is befolyásolja a könnymirigy funkcióját. A humán könny-peroxidáz aktivitása ugyanis különbözik férfiakban és nőkben. A menopauza során – az ösztrogénszint változásával – nőkben szignifikánsan csökken a peroxidázaktivitás, így ez magyarázhatja a változókorban lévő nőknél a száraz szem szindróma gyakori előfordulását.

Fokozott könnyvesztésen, a könnyfilm instabillá válásán vagy kifejezett párolgáson alapuló száraz szem (EDE)

Normális könnytermelés mellett is száradhat a szem felszíne. Megváltozhat a könny összetétele, a könny nem nedvesíti a felszínt, „lepereg”.

Diabeteses betegeknél megfigyelték, hogy szignifikánsan gyakoribb a száraz szem szindróma előfordulása. A szemhéjak és a pislogás rendellenességei, amikor nem képződik időről időre újra a könnyfilm, nem záródik a szemrés, fokozott párolgás van jelen. A cornea felszínének makroszkópos vagy mikroszkópos elváltozásai, felületi egyenetlenségei és szintkülönbségek miatt instabillá válik a könnyfilm, vagy ki sem alakul.

Kontaktlencse jelenléte miatt is kialakulnak a szemszáradás tünetei, ugyanis kontaktlencsét viselő

szemen a könnyfilm elvékonyodik, könnyebben felszakad, közvetlen epithelkárosodás is létrejöhet. Az is kiderült, hogy a lágy, hidrofíli kontaktlencsét viselőknél a lencsén talált fehérjedepozitumok lizozimdimerek, ill. polimerek, melyek a normális könnyben ilyen formában nincsenek jelen.

A KÖNNYFEHÉRJÉK VIZSGÁLATA SZISZTÉMÁS BETEGSÉGEK BEN

Egyre több közlemény utal arra, hogy a könnyfehérjék vizsgálatát nem csak „lokális”, szemészeti, hanem az egész szervezetet érő szisztémás betegségekben is hasznosítani lehet. A mintavétel nem invazív, fájdalommentes, és így könnyedén szerezhetünk információkat a szervezet állapotáról.

Diabetes mellitus

Leginkább kiemelt célcsoportja az ezzel kapcsolatos kutatásoknak a diabetes mellitus. Úgy tűnik, a diabeteses betegek könnyfehérje-összetételében más jellegű megoszlási mintázatok vannak, mint azoknál a cukorbetegknél, akiket száraz szem tünetekkel kezeltek. Ez az új fehérjemintázat-beli változás (amely specifikusan a 30–50 kDa molekulatömegű tartományban detektálható, és egészségeseknél nem észlelhető) további vizsgálatok tárgyát képezheti. A cukorbetegség időtartama és ezen fehérjemintázat-beli változások között szoros összefüggést mutattak ki, vagyis minél hosszabb ideje tart a betegség, annál több fehérjeexpressziós változás figyelhető meg a könnyben. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy ezek az eltérések összefüggnek-e a diabeteses retinopathia kialakulásával.

Az 1-es típusú diabetesben szenvedő betegek többsége határozottan mutatja a kötőhártya-betegségre utaló jeleket annak ellenére, hogy náluk a könnyelválasztás funkcionális próbái, mint pl. a basális könnyáramlás (basal tear flow) és a szemészeti diagnosztikában használt könnyfilm-stabilitási próba (tear brake-up time) a normális tartományba esnek.

Dohányzás

A dohányzás – mint számos betegség ismert rizikófaktor – is okozhat száraz szem szindrómát. A könny elektroforetikus fehérjemintázata dohányzókánál megváltozik, és ezek a proteineltérések a száraz szem tüneteinek súlyosságával párhuzamosan nőnek.

Krónikus hepatitis C

E betegekben is kimutatták, hogy mind a könny mennyisége, mind a könnymirigy által termelt fehérjék (laktoferrin) koncentrációja csökken. Ez a glandula lacrimalis díszfunkciójára utal e betegségcsoportban, ami száraz szem tünetként jelenik meg.

Daganatos betegségek

A könnyfehérjék vizsgálata új fordulatot hozhat néhány daganatos betegség vonatkozásában is. Mai irodalmi adatok szerint daganatos megbetegedésekben nem csak a szérum, hanem a könnyfehérjék összetétele is megváltozik. A humán könny térképezése során felfedezett lakriglobin nagy szekvenciaazonosságot mutat a mellrákban „túlexpresszáldó” mammaglobinnal. Lakriglobin jelenlétét detektálták mell-, prostata-, tüdő-, ovarium- és vastagbél-daganatos betegek nagy százalékban. További vizsgálatok szükségesek a lakriglobin könnybeli szekréciója és a daganatos megbetegedések megjelenése közötti összefüggések kiderítéséhez.

A könny fehérjéinek változása 2-es típusú diabetes mellitusban

Világszerte több mint 100 millió ember szenved diabetes mellitusban és ennek a szisztémás anyagcsere-betegségnek a szövődményeiben. Számos szemészeti komplikáció felmerülhet, amelyek akár vak-sághoz is vezethetnek. A cataracta kialakulásának kockázata 2–4-szer nagyobb az átlagpopulációhoz képest, a száraz szem szindróma súlyossága pedig korrelációt mutat a diabeteses retinopathia fennállásával (11–29. táblázat).

Minél hosszabb ideje tart a diabetes, annál jelentősebbek a könnyben lévő változások. Elektroforézissel vizsgálva a diabetes mellitusban szenvedők könnyfehérje-mintázatát, jelentős különbségek vannak az egészségesekéhez képest. A fő proteinek: a lizozim, a laktoferrin, a lipokalin és az albumin változatlan képet mutatnak, de a *proteincsúcsok számában emelkedés* figyelhető meg. A legjelentősebb változások a 30–50 kDa közötti tartományban vannak. A feltételezések szerint ezek az „új” proteinek valójában az *eredeti fehérjék glikozilált változatai*, és felelősek a szemészeti komplikációk kialakulásáért a diabeteses betegek körében.

Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a diabetesben szenvedők Schirmer-tesztel nyert eredményei „rosz-

11-29. táblázat. A cukorbetegség szemészeti szövődményei

Szemgolyón kívül jelentkező szövődmények

- szemhéjszéli gyulladás (blepharitis), xanthelasma
- száraz szem szindróma
- kötőhártyai értágulatok
- orbitalis mucormycosis
- a külső szemmozgató izmok paresise [n. abducens (VI.), n. oculomotorius (III.)]
- látóideg-neuropathia

A szem belsejében jelentkező szövődmények

- a corneában Descemet-membrán-redők
- az elülső szemcsarnok melaninpigmentációja
- glaucoma
- rubeosis iridis
- az akkomodáció (közelre tekintési alkalmazkodóképesség) romlása
- fénytörésváltozások (átmeneti rövidlátás, túllátás)
- időskori szürkehályog korai jelentkezése, diabeteses hópehely-cataracta
- retinopathia diabetica

szababb”, mint az egészséges önkéntesekéi, azaz a cukorbeteg körében sokkal gyakoribb a száraz szem kialakulása, ami paradox módon néha könnyezéssel jár (ennek a könnynek azonban teljesen más az összetétele, mint a normálisénak) A reflexkönny mennyisége is szignifikánsan kevesebb a diabeteses csoportban, ami magyarázza a cornea és a conjunctiva nagyobb érzékenységét, fogékonyságát a különböző betegségekre.

AJÁNLOTT MÓDSZERTANI MEGKÖZELÍTÉSEK A KÖNNY VIZSGÁLATAKOR

Mintavétel, mintakezelés

Könnyminta vételére kétféle módszer alkalmazható:

- Reflexkönnyet stimulálva (pl. szagingerrel) nagyobb mennyiségű, „hígabb” minta nyerésére van lehetőség. A mintavételhez megfelelően kialakított, hajlékony, kereskedelmi forgalomban kapható kapillárisvégű Eppendorf-pipetták alkalmasak. A könnyet a conjunctiva alsó forniából, annak érintése nélkül vesszük. Mérhető mintavolumen esetén (a kapilláris „hitelesítésé-

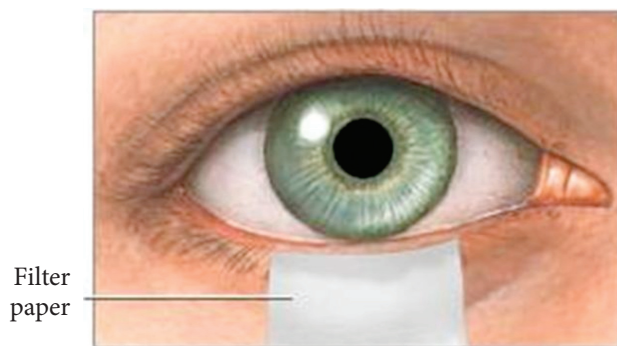
vel”) a fehérjekoncentráció az eredeti könny-mintában mg/ml (g/l) értékben is kifejezhető.

- Másik módszerként a szemészeti gyakorlatban ismert és diagnosztikai célra is alkalmazott Schirmer-teszt szolgálhat. A teszt a megnedvesedő szűrőpapír kockák számából enged a könny mennyiségre következtetni. Hátránya, hogy ez a mintavétel pontos volumenadatok meghatározására nem alkalmas. Előnye gyorsasága és egyszerűsége, hiszen a tesztcsíkot a beteg magának is felhelyezheti. Mindössze néhány percet vesz igénybe a mintavétel. További előnye, hogy az alapszekréciót képes mutatni stimuláció nélkül. Bizonyos esetekben standardizált gyűjtési időre is szükség lehet (11-64. ábra).

A könnymintákat pufferoldatban hígítottuk, a felhasználásig pedig -70°C -on tároltuk. (Pufferoldat: 150 mM TRIS-HCl, pH 6,8; 1 mM EDTA; 4 mM EGTA; 0,2 mM PMSE.)

Mennyiségi mérések – ajánlott fehérjemeghatározások

A könny nagy fehérjetartalmú szekréta: reflex mintákban 2,9–8,6 mg/ml, a basalis szekréciónál pedig még nagyobb a fehérjekoncentráció. A fehérjemeghatározáshoz az eredeti könny nagy fehérje koncentrációja miatt a *Benedikt-módszer* (fehérjemeghatározás mikrobiurettel) és a hígított mintákhoz a *Bradford-módszer* (festékkötésen alapuló eljárás) a megfelelő. A Bradford-módszer a Schirmer-teszt eljárásnál ajánlott, nagyságrenddel nagyobb érzékenysége miatt. Itt ugyanis a könny hígításával kell számolni a tesztpapírból való mintaextrakció miatt. A Schirmer-tesztben a könnymintákat a mintavétel során olyan „feltárási” oldattal kezeljük, amely a további analízisig ideális médiumként szolgál: azaz puf-



11-64. ábra. Schirmer-teszt

ferolt, proteolízist gátló rendszer, megelőzi a fehérjék esetleges autolízisét, és a hígulással a könny minta nagy mucintartalmából eredő kezelési nehézségeket is áthidalja.

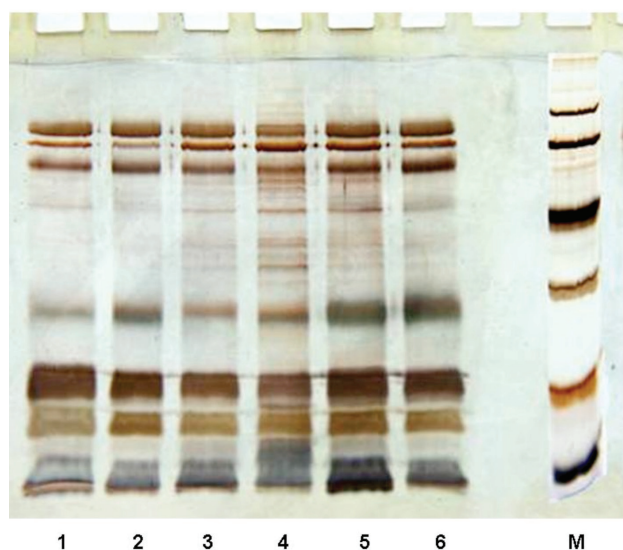
A mért értékek vonatkoztatásai, értékelései.

Automatizált sorozatméréseknél (pl. célzott specifikus fehérjevizsgálatok) a kapott vizsgálati eredményeket minden esetben az összfehérje-koncentrációra vonatkoztatjuk, tehát a mért specifikus fehérje pg/ml értéket az összfehérje mg/ml koncentráció egységére számoljuk. Így kerülhetjük el az abból adódó problémát, hogy nem ismerjük a Schirmer-teszttel vett könnyminták eredeti fehérjekoncentráció-adatait.

A minták fehérje-összetétele – elválasztási és detektálási technikák

SDS elektroforézis lapgélben – kombinált ezüstözéssel

A donor (egészséges) könnyminták fehérje-összetételét egydimenziós SDS poliakrilamid-lapgél elektroforézissel standard körülmények között (12,5%-os gélkoncentráció) vizsgálva azt találtuk, hogy a humán könny összetétele kombinált ezüstözési technikával jól detektálható. A fehérjék között különböző molekulatömegű fehérjék szerepelnek, ami az elektroforetogramokon jellegzetes mintázatot mutat (11-65. ábra), (lásd 4. fejezet).



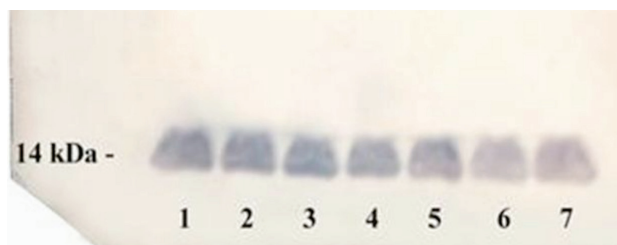
11-65. ábra. Könnyminták 12,5% SDS lapgél összehasonlító elektroforetogramja kombinált ezüstözéssel (1-6-ig egyedi könnyminták, pásztánként 1,3 µg proteinnel, Wiloughby-féle ezüstözéssel)

Western blot eljárás – Gallyas-féle és ECL-előhívással

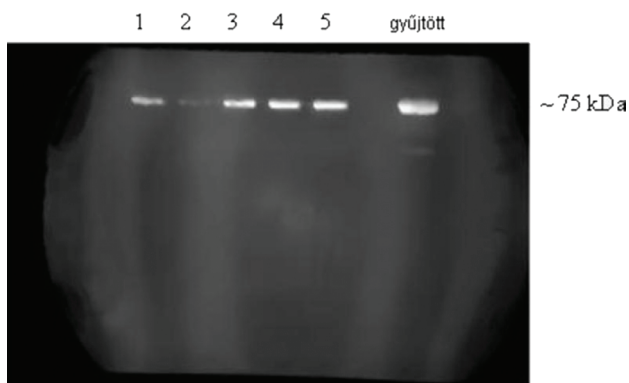
Az irodalomban közölt könnyfehérjék (lizozim, laktoferrin, IgA, szérumalbumin, lipokalin, lipofilin) közül immunoblotting eljárással alkalmunk volt magunknak is a lizozimet (14 kDa) és a laktoferrint (75 kDa) azonosítani. Western blottal mind a peroxidáz alapú immundetektálást a Gallyas-féle ezüstözéssel, mind az ECL-előhívással sikerült a könnymintákra adaptálnunk (ECL: Enhanced Chemiluminescence: erősített kemilumineszcenciás detektálás). Míg a Gallyas-féle ezüstözés mennyiségi megítélésre ismeretlen kevésbé alkalmas, addig az ECL-detektálás KODAK Image Station 2000R készülékünk segítségével mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz (lásd 4. fejezet).

Kétdimenziós nagy feloldású elektroforézis (O'Farrell) – fehérje térkép

Az O'Farrell-féle fehérjeszeparálás előzetes dúsítást igényel az analízisekhez. A fehérjék detektálása



11-66. ábra. Immunoblotting. Humán könny lizozim [Ni-DAB + ezüst (Gallyas-féle) előhívással; 1-7: egyedi könnyminták; 3-3 µg protein/pásztá]



*ECL=Enhanced chemiluminescence

11-67. ábra. Immunoblotting. Humán könny laktoferrin; ECL-detektálás (ECL: enhanced chemiluminescence) (egyedi könnyminták: 3-3 µg protein/pásztá, gyűjtött minta: 8 µg)

MARSHALL szerint módosított ultraszenzitív ezüstözési eljárással végezhető. Ily módon 75 µg könnyfehérjéből sikerül elegendő intenzitású detektálást elérnünk (11-68. ábra). (lásd 4. fejezet).

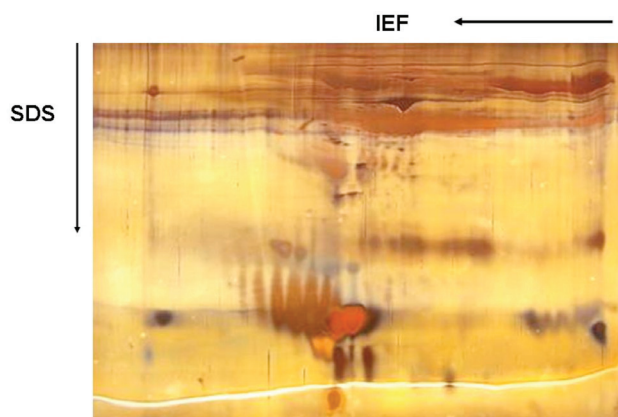
Könnyfehérjék azonosítása kiegészítő MALDI TOF MS technikával

Értékes további információk szerezhetők az említett szeparálási és detektálási eljárások tömegspektrometriás kombinációival: különösen azért, mert ez már a proteomika megvalósítását eredményezheti olyan nem szokványos vizsgálati anyagoknál, mint a könny (11-69. ábra).

Tömegspektrometriával laktoferrint, szérumalbumint, β-aktint, lipokaint (más néven orozomukoidot), lizozimet és immunglobulin-fragmentumokat sikerült magunknak is egészséges donorok mintáiból azonosítani. További frakciók azonosítása, valamint az analízisek kiterjesztése a betegmintákra vizsgálatunk jövőbeni irányát jelenti.

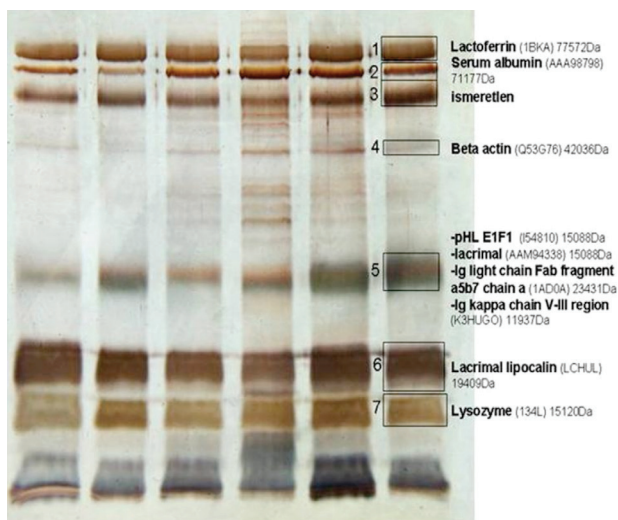
IRODALOM

- [1] ABE, T., NAKAJIMA, A., MATSUNAGA, M. et al.: Decreased tear lactoferrin concentration in patients with chronic hepatitis C. Br. J. Ophthalmol. 83:684–687, 1999.
- [2] ARGUESO, P., GIPSON, I. K.: Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. Exp. Eye Res. 73:281–289, 2001.
- [3] BALLOW, M., DONSHIK, P. C., RAPACZ, P. et al.: Tear Lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular diseases. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28:543–545, 1987.



11-68. ábra. Humán könny kétdimenziós fehérjetérképe nagy feloldású O'Farrell-technikával (12,5%-os gélkonzentráció; pH 3–10; Marshall szerinti ezüstözés; a proteinmennyiség 75 µg)

- [4] BJERRUM, K. B.: The ratio of albumin to lactoferrin in tear fluid as diagnostic tool in primary Sjögren's syndrome. Acta Ophthalmol. Scand. 75:507–511, 1997.
- [5] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254, 1976.
- [6] DÉKÁNY HELGA: Fehérje elválasztási és detektálási módszerek alkalmazása szemészeti vizsgálati anyagokon – különös tekintettel a könnyre. Diplomamunka PTE/ÁOK 2009.
- [7] EVANS, V., VOCKLER, C., FRIEDLANDER, M et al.: Lactoglobulin in human tears, a potential marker for cancer. Clin. Experiment. Ophthalmol. 29:161–163, 2001.
- [8] GRUS, F. H., SABUNCUO, P., AUGUSTIN, A. et al.: Effect of smoking in tear proteins. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 240:889–892, 2002.
- [9] GRUS, F. H., SABUNCUO, P., DICK, H. B. et al.: Changes in the tear proteins of diabetic patients. BMC Ophthalmol. 2:4, 2002.
- [10] GRUS, F. H., JOACHIM, STEPHANIE C., PFEIFFER, N.: Proteomics in ocular fluids. Proteomics Clin. Appl. 1:876–888, 2007.



11-69. ábra. Könnyfehérjék elektroforetikus fehérjefrakcióinak azonosítása MS-technikával

1. Laktoferrin (1BKA) 77 572 Da
2. Szérumalbumin (AAA98798) 71 177 Da
3. Ismeretlen
4. β-aktin (Q53G76) 42 036 Da
5. pHL E1F1 (154810) 15 088 Da
könny (AAM94338) 15 088 Da
Ig könnyűlánc Fab fragmentum a5b7 lánc a (1AD0A) 23431 Da
Ig κ lánc V-III régió (K3HUGO) 11937 Da
6. Könny-lipokalin (LCHUL) 19 409 Da
7. Lizozim (134L) 15 120 Da

- [11] HARTMANN ÁGNES: Módszerek a könnyfehérjék összehasonlító mikroanalízisére. Diplomamunka PTE/ÁOK 2007.
- [12] KLAEGER, A.J., CEVALLOS, V., SHERMAN, M. D. et al.: Clinical application of homogenous colorimetric assay for tear lysozyme. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 7:7–15, 1999.
- [13] MARCOZZI, G., LIBERATI, V., MADIA, F. et al.: Age- and gender-related differences in human lacrimal fluid peroxidase activity. *Ophthalmologica* 217:294–297, 2003.
- [14] MARSHALL, T.: Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal Biochem.* 1984; 136: 340–346.
- [15] NÉMETH J.: A cukorbetegség szemészeti szövődményei. *Családorvosi fórum* 7: 14–17, 2005.
- [16] REDL, B.: Human tear lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:241–248, 2000.
- [17] SCOTT, G., MOWREY-McKEE, M.: Dimerization of tear lysozyme on hydrophilic contact lens polymers. *Curr. Eye Res.* 15:461–466, 1996.
- [18] DE SOUZA, G., GODOY, A., LYRIS, M. F. et al.: Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology* 7:R72, 2006.
- [19] XU SHENGYUAN, VENGE PER: Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482:298–307, 2000.

A nyál fehérjéinek vizsgálata

KÖSZEGI TAMÁS

A NYÁL BIOLÓGIAI FUNKCIÓI

Régóta ismert, hogy a nyálmirigyek szekréciójából és a szájüregben lévő sejtes elemekből kialakuló nyál fontos és sokrétű szerepet tölt be a szájüreg és az emésztőrendszer épségének fenntartásában. A legismertebbek ezek közül az antimikrobiális, sebgyógyulást segítő vagy a fogszuvasodást, fogkőképződést gátló hatások. A nyál emésztőenzim-tartalmánál fogva részt vesz a szénhidrátok és a zsírok lebontásában is. Ezen kívül mucinban gazdag fehérjéi segítségével védőbevonatot képez a fogakon és a nyálkahártyákon, „kenőanyagként” működve. A nyál pH-ja enyhén lúgos, ami a savtermelő bakteriális tevékenységet ellensúlyozza, ezzel is védve a fogzománc épségét. A nyál képes a fogzománc mikrosérüléseivel kölcsönhatásba lépve elősegíteni azok regenerációját. Az étkezés során a kellően alapos rágás nem csak az emésztést

könnyíti meg, de az étel bevonásával védi a nyelőcsövet és a gyomornyálkahártyát az irritáló hatásoktól. Mindezeket a hatásokat a nyál elsősorban speciális fehérje-összetételének köszönhetően fejt ki.

A kedvező hatások mellett a nyálfehérjék kétélű kardként is viselkedhetnek: egy részük képes a cariogen baktériumok adhézióját elősegíteni vagy a savtermelő bakteriális tevékenységet fokozni. A nyál fehérje-összetétele az egyénre jellemző, nukleotidpolimorfizmusoknak köszönhetően bizonyos fehérjék expressziója és funkciója is variabilitást mutat. Legújabbban a nyálfehérjék spektrumának változását biológiai markerként kívánják hasznosítani pl. a szájüregi daganatok korai felismerésében.

A NYÁL FEHÉRJE-ÖSSZETÉTELE

Egydimenziós gélelektroforézissel kb. 30 fehérjecsoportot lehet elkülöníteni, a kétdimenziós technikával 100-nál is többet. A legmodernebb eljárások (szeparációt követő tömegspektrometria) alapján legalább 1000 egyedi nyálfehérjét különítettek el, beleértve a fehérjedegradációs termékeket is. A fehérjespektrum körülbelül fele a vérplazmában is kimutatható. A következőkben néhány jellegzetes nyálfehérjét mutatunk be részletesebben. A molekulatömeg szerinti csoportosításban a kisebbtől a nagyobb tömegig haladva a következő fő fehérjecsoportokat különböztetjük meg:

hisztatinok→sztatherinek→lizozim→prolin-gazdag fehérjék→karboanhidráz→amilázok→peroxidázok→laktoferrin→mucin 2→szekretoros IgA→mucin 1.

A főbb fehérjecsaládokat a 11-30. táblázaton összesítettük.

A fogzománc védelmében és az antimikrobiális hatásban részt vevő fehérjék egy része kedvezőtlen biológiai funkciót is betölthet abban az esetben, ha a fogak felszínére kötődik. Itt segítik a baktériumok megtapadását és a savas anyagcseretermékek képződését.

A fehérjék jelentős hányada izoformákban van jelen, pl. a nyál eredetű amiláznak 7 izoenzime ismert. Elsősorban újszülöttekben van jelentősége a nyálállipáznak, ez erősen hidrofób protein, és a tejzsír lebontásában játszik szerepet. A nyál proteázokat is tartalmaz, melyek a saját fehérjéket is emésztik, elősegítve a természetes eliminációt.

A NYÁLFEHÉRJÉK VIZSGÁLATI MÓDSZEREI

Mintavétel

A helyes mintavétel a nyál esetében elsőrendű fontosságú, hiszen a szájüregben rengeteg zavaró tényezővel kell számolni. Alapvetően a nyálmintát a reggeli órákban, éhgyomorra kell venni, 2-3 desztillált vizes öblítés után. Vethetünk nyugalmi és stimuláció (pl. citrommal) utáni szekréciót, a kétféle minta összetétele némileg különbözik. A nyálmintát a fehérjedegradáció megakadályozása érdekében azonnal

érdeemes olvadó jégre tenni és/vagy proteázinhibitorokat adni hozzá. A sejtes elemektől és az egyéb korpuszkuláris szennyeződéstől a nyálát centrifugálással szabadítjuk meg: 3000–10 000 g, 15 perc 4 °C-on. A felülúszót azonnal felhasználhatjuk, –70 °C-on tárolhatjuk, vagy kicsapjuk a nyálfehérjét pl. 10%-os triklórecetsav/aceton/ditiotreitól keverékével vagy etanollal, de ismert olyan módszer is, ahol a nyálát 100-szoros térfogatú vízzel szemben dializálják, majd liofilezik az analízis előtt.

11-30. táblázat. Nyálfehérjecsaládok

Nyálfehérjecsalád	Funkció
savanyú prolingazdag fehérjék	védőbevonat fogzománc kalciumegyensúlyának megőrzése csersavak megkötése
amilázok	szénhidrátemésztés antibakteriális hatás
bázikus prolingazdag fehérjék	csersavak megkötése antibakteriális hatás
karboanhidrázok	védőbevonat
cisztatinok	védőbevonat fogzománc kalciumegyensúlyának megőrzése antibakteriális hatás
hisztatinok	fogzománc kalciumegyensúlyának megőrzése csersavak megkötése antibakteriális hatás
laktoferrin	antibakteriális hatás mikrobákhoz kötődés
lizozim	védőbevonat antibakteriális hatás mikrobákhoz kötődés
mucinok	síkosítás védőbevonat nyelés megkönnyítése mikrobákhoz kötődés
peroxidázok	antibakteriális hatás
sztatherinek	síkosítás védőbevonat fogzománc kalciumegyensúlyának megőrzése
szekretoros IgA	antibakteriális hatás mikrobákhoz kötődés
defenzinek	antibakteriális hatás

Fehérjemeghatározás

A felülírószókból mindenféle manipuláció előtt érdemes a fehérjetartalmat megmérni. Bevált módszer a nyálminta 10-szeres hígítása 1 mol/l NaOH-val, azután a fehérjetartalmat BRADFORD szerint mérjük. A nyugalmi nyál totál proteintartalma 0,2–1,0 g/l között változik.

Fehérjeelektroforézis

Egy- vagy kétdimenziós elektroforézist végezhetünk, a mintákat mindkét esetben a megfelelő protokoll szerint kell előkészíteni (lásd 3. fejezet). Nagyon gyakran a kísérleti modellben felvetett kérdés megválaszolására elegendő az egydimenziós SDS PAGE, esetleg kiegészítve immunoblot vagy tömegspektrometriás analízisekkel. Amennyiben a mintánk fehérjetartalma kicsi, célszerű azt 5-szörös töménységű mintapufferbe felvenni.

Tömegspektrometriás vizsgálatok

A kutatás ma nem csak a lehető legnagyobb számú fehérje detektálására irányul, hanem betegség-specifikus molekulák, fehérje-peptid markerek azonosítására és klinikai alkalmazhatóságuk eldöntésére, lehetőleg non-invazív módon kapott mintákból, mint amilyen pl. a nyál is. Erre a célra széles körben használatos az előzetes elektroforetikus elválasztás és a tömegspektrometria kombinálása. A kisméretű polipeptidok közvetlenül, a nagyobb fehérjék tripszines emésztés után analizálhatók tömegspektrométerben (lásd 7. fejezet). A nyál fehérjetérképe jellegzetes eltéréseket mutat egészségesek és szájüregi daganatokban szenvedők között, a nyálfehérjék közül a potenciális tumormarkerként használható molekulák kutatása igen intenzíven folyik. Ugyanígy vizsgálják a dohányzás vagy egyes autoimmun betegségek okozta jellegzetes fehérjekép-eltéréseket is.

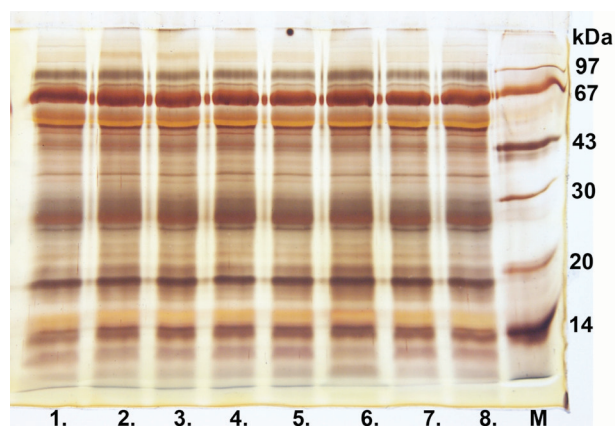
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK

A nyálfehérjék összetételének változását felhasználhatjuk a szájüreget érő kémiai anyagok hatásainak analízisére. Ismert, hogy a vörösborok zamatát tanintartalmuk jelentősen befolyásolhatja, ezért a borok derítése, a polifenolok egy részének eltávolítása a bor előállítási technológiájának része. A tanninok a nyál egyes fehérjeivel – különösen a prolingazdag frakcióval – komplexet képeznek, és a komplex pre-

cipitálódik. Amennyiben a nyálat vörösborral keverjük, majd SDS-PAGE vizsgálatot végzünk, a nyál fehérjemintázata jellegzetes változást mutat a csersavtartalom függvényében. A kontroll, nem kezelt nyálhoz képest a nagy csersavtartalom következtében több fehérjesáv eltűnhet vagy kevesebb fehérjét tartalmazhat. A fehérjeanalízisek egzakt módon egészítik ki az érzékszervi vizsgálatokat.

A nyálfehérjék (pl. parotis-agglutinin, amiláz) baktériumkötődése is tanulmányozható in vitro modellekben. Különböző baktériumtörzsek (pl. *Staphylococcus*, *Streptococcus*) összehozhatók izolált nyálfehérjékkel adhézios, agglutinációs vagy immunfluoreszcenciás assay-kben (analitikai tesztekben) és a kötődés kimutatható. A bakteriális aggregáció egyrészt elősegíti a baktériumok megcsapódását és kiürítését a szájüregből, másrészt amennyiben az a fogzománc felületén történik, kedvez a lokális bakteriális tevékenységnek és a fogszuvasodás kialakulásának.

A fogászati prevencióban használatos szájvizek nyálfehérjékre gyakorolt hatása is tanulmányozható elektroforetikus módszerekkel. A csersavas fehérjekicsapás analógiájára saját vizsgálatainkban az Intézetünkben illóolajokkal kiegészített gyógynövény-tinktúrák szájöblögető oldat hígításait nyálmintával kevertünk össze 1:3 arányban (etanol-végkoncentráció 5%). Kontrollként 40%-os etanolt, PBS-t (fiziológiás sók tartalmazó foszfátpuffer, pH 7,2) és összehasonlító készítményként kereskedelmi forgalomban



11-70. ábra. Szájvizek hatása a nyál fehérje-összetételére (10% SDS-PAGE hordozó és ezüstfestés). 1.: 32-szeres; 2.: 16-szoros; 3.: 8-szoros; 4.: 4-szeres hígítású kezelés saját szájvízzel; 5.: 5% etanol; 6.: 4-szeres hígítású cserszömörccs szájvízes kezelés; 7.: 4-szeres PBS; 8.: kezeletlen nyál, M: markerek)

kapható cserszömörccés szájvizet használtunk ugyanabban az arányban. 10 perces inkubáció után minden mintát Laemmli-féle mintapufferben vettünk fel, 100 °C-on kezeltünk majd centrifugáltunk. 10%-os SDS-PAGE elválasztást követően a géleket kombinált ezüstözéssel festettük (3,4 µg/pászta). Eredményeink azt mutatták, hogy a kezeletlen nyálminta fehérjemintázatával összehasonlítva nem találtunk eltéréseket sem a saját, sem a kereskedelmi oldattal kezelt nyálaknál (11-70. ábra).

A bemutatott kísérlet példa arra, hogy a nyál fehérjemintázata alkalmas komplex vegyületek hatásának detektálására vagy kizárására. Természetesen az egydimenziós elválasztás a finom eltéréseket nem jelzi kellő érzékenységgel.

A bemutatott példák alapján a nyál értékes, könnyen nyerhető testnedv, amelynek klinikai felhasználása várhatóan egyre nagyobb teret fog kapni a közeljövőben.

IRODALOM

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000095/>
TABAK, L. A: In Defense of the Oral Cavity: The Protective Role of the Salivary Secretions. *Pediatric Dentistry* 28(2):110–117, 2006.
- JESSIE, K., PANG, W. W., ABDUL RAHIM, Z. H. et al.: Proteomic Analysis of Whole Human Saliva Detects Enhanced Expression of Interleukin-1 Receptor Antagonist, Thioredoxin and Lipocalin-1 in Cigarette Smokers Compared to Non-Smokers. *Int. J. Mol. Sci.* 11:4488–4505, 2010.
- HU, S., XIE, Y., RAMACHANDRAN, P. et al.: Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* 5:1–15, 2005.
- WU, Z.-Z., WANG, J.-G., ZHANG, X.-L.: Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 15(7): 865–870, 2009.
- SONDEJ, M., DENNY, P. A., XIE, Y. et al.: Glycoprofiling of the Human Salivary Proteome. *Clin. Proteomics* 5(1):52–68, 2009.

Vizeletvizsgálatok

Vizeletvizsgálatok a proteinürítés tükrében

LUDÁNY ANDREA

KLINIKAI LABORATÓRIUMI ANALITIKAI MÓDSZEREK

AZ EMBERI VIZELET FEHÉRJÉI

Ismert, hogy a humán vizelet fiziológiás körülmények között is különböző fehérjét tartalmazhat. E fehérjék összességükben is igen kis koncentrációban, azaz csak „nyomokban” jelennek meg. Ismeretük mind fiziológiai, mind kóreltani szempontból jelentős lehet. Klinikailag a vizeletben fellelhető fehérjék nyolc csoportba oszthatók:

1. *Normál plazmafehérjék vagy fragmentjeik.* Napjainkig már több mint 30 plazmafehérjét azonosítottak a vizeletben. Valószínű, hogy elég érzékeny módszer segítségével valamennyi plazmafehérje kimutatható lehetne. Molekulatömegük széles határok között mozog. Ebbe a csoportba tartozik pl. az albumin, a retinolkötő fehérje, az α_1 -mikroglobulin, a fibrinogén degradációs termékek, a β_2 -mikroglobulin és az IgG-könnyűláncok.
2. *A vesében keletkező és a vizeletbe kerülő fehérjék.* E fehérjék egy része a vesére specifikusan jellemző, csak itt termelődik, másik részük egyéb szervekre is jellemző (pl. az előbbiekhöz a Tamm-Horsfall-protein, az urokallikrein, az eritropoetin, az utóbbiakhoz pedig a basalis membrán antigének, az alkalikus foszfatáz, a γ -glutamil-transzferáz, a lizozomális enzimek tartoznak).
3. *A húgyúti traktusból származó fehérjék.* A húgyúti traktus bármely részének sérülésekor, gyulladásakor szöveti fehérjék fokozott mértékben áramlanak a tubuluslumenbe. Normál körülmények között is kerülnek a vizeletbe fehérjék az epithelsejtekből, a nemi mirigyekből (pl. savi foszfatáz a prostatából) és a vaginalis váladékból.
4. *Nem az urogenitalis traktusból származó szöveti fehérjék.* A különböző szövetek, szervek sérülései folytán sejtféhrjék kerülnek a keringésbe. Azok a fehérjék, amelyek molekulatömege elég kicsi ahhoz, hogy a glomerulusban filtrálódni tudjanak,

megjelennek a vizeletben. Ezek a fehérjék általában szöveti/szervspecifikus antigének.

5. *Terhesség alatt termelődő fehérjék.* Öt fő antigént írtak le a humán placentában, amelyek terhesség alatt a vizeletben is megjelennek. Számos fázis-specifikus foetus-autoantigénről azonban jelenleg még nem igazolt, hogy bejut az anyai vizeletbe.
6. *Tumorantigének.* Számos klinikai jelentőséggel bíró tumorantigént azonosítottak tumoros betegek vizeletében, így pl. carcinoembryonalis antigént, melanomaspecifikus antigént és α -fötöproteint.
7. *Hormonok, szignálszubsztanciák.* A humán koriongonadotropint először terhes nők vizeletéből izolálták, azóta is a hormonizolációk prototípusaként szolgál. Minden ismert hypophysishormont azonosítottak már a vizeletben, egyedül a prolaktinnal kapcsolatosan vetődtek fel kétségek.
8. *Baktérium-, vírus- és gombafertőzés termékei.* Széles körben tanulmányozott téma. Napjainkban nagy figyelmet szentelnek a vírusinfekciót követő korai szakban a sejtek által feleslegben szintetizált, ún. korai fehérjéknek. Ezek a vizeletben megjelennek és valószínűleg kapszid antigének. Bakteriális, ill. gombafertőzésben szintén fellelhetők a vizeletben jellemző antigének. Az említett fehérjék/antigének a vizelet kismolekulatömegű frakciójában találhatók.

A FEHÉRJÉK MENNYISÉGI MÉRÉSE

Teljes proteinkoncentráció

A teljes (össz-) proteinkoncentráció mennyiségi vizsgálatára a klinikai laboratóriumi munkában ma is a hagyományos, sorozatmérésekre alkalmas biuret- vagy az ún. mikrobiuret- (BENEDIKT szerint) módszer használatos. Előnye, hogy együtt méri az összes vizeletfehérjét és proteoglikánt összehasonlítható analitikai érzékenységgel. Hátránya, hogy kis fehérjekoncentrációnál nem elég érzékeny. (Lásd a Minta-előkészítés című fejezet módszertani részét.)

A „vizelet-összfehérje” meghatározás egyébként egyszerű rutin eljárás számos betegség, főképpen a veseérintettséggel járó folyamatok diagnosztikájában. Kiemelt szerepe van a betegségek szűrő jellegű vizsgálatában, ill. a betegség lefolyásának monitorozásában. A vizelettel kiválasztott fehérjék összetétele változhat a proteinuria eredetétől és a betegség okától függően is. A naponta ürített fehérje mennyiségének megítélése

11-31. táblázat. A vizelet összfehérje mennyiségének mérésére elterjedt módszerek

Módszer	Eljárás	A detektálás határa (mg/l)	Referenciatartomány
triklórecetsav (TCA)	nefelometria	100	< 100 mg/l
TCA-HCl	turbidimetria	10	< 70 mg/l
benzthonium-klorid	turbidimetria	60	< 135 mg/24 óra
tanninprecipitáció	a fehérjékhez kötődő FeCl ₃ -tannin színreakciója	30	< 350 mg/24 óra
Coomassie blue-G250 + SDS	festékkötés a proteinmicellákhoz	2	< 120 mg/24 óra
pyrogallol red + molibdát	festékkötés	10	24–140 mg/24 óra
pyrogallol red + molibdát + SDS	festékkötés	35	40–80 mg/24 óra
biuret	réz-fehérje komplex	110	50–240 mg/l

pedig nagymértékben függ a választott analitikai módszertől. A 11-31. táblázat mutatja be az összfehérje mérésére jelenleg ajánlott módszereket, érzékenységüket, és az elfogadott referenciatartományokat.

A táblázatból kiderül, hogy a referenciatartományok jelentős eltéréseket mutatnak attól függően, hogy a használatos fehérjekimutatási eljárás milyen érzékenységi határral rendelkezik. A referenciatartomány megítélésekor mindezt figyelembe kell venni.

Egyedi, célzott vizeletfehérje meghatározás

A diagnosztikában és így a klinikai biokémiai vizsgálatokban általában az egyedi célzott vizeletfehérje meghatározások igénye is felvetődik. Módszertanilag, mivel specifikus fehérjemeghatározásokról van itt szó, az immunkémiai eljárások kerültek bevezetésre. A 11-32. táblázaton foglaltuk össze a vizeletben normál körülmények között is megtalálható fehérjék individuális mérésére alkalmas módszereket és a fehérjék mérhető legkisebb koncentrációit. A mért koncentrációadatok (mg/l) kifejezhetők napi ürítésben is (a vizeletmennyiség ismeretében) vagy kreatininkoncentráció-hányadosban is. Az utóbbi kifejezés módja előnye, hogy nem igényel vizeletgyűjtést.

A VIZELETFEHÉRJÉK MEGOSZLÁSI KÉPÉNEK VIZSGÁLATA

A fehérjekutatásban az egyre fejlődő immunkémiai módszerek mellett kiemelt jelentőséget kapnak a

különböző elektroforetikus technikák is. Régről ismertek azok a módszerek, amelyek mindkettő kombinációját alkalmazzák. Ismert például, hogy a vizeletben megjelenő immunglobulin-könnyűláncok megjelenítésére rutinszerűen immunoelektroforézist, ill. immunfixációt használnak. A klasszikusnak számító kvalitatív, ill. szemikvantitatív meghatározások (pl. Rocket-elfo) szintén ehhez a vizsgálatcsoporthoz tartoznak, jóllehet egyedi fehérjék kimutatására szolgálnak.

A minták fehérjeösszetételének, a különböző fehérjék megoszlási arányának (mintázatának) vizsgálatára a klinikai laboratóriumi munkában ma is a sorozatmérésekre is alkalmas elektroforetikus eljárások terjedtek el leginkább. Az alkalmazott elektroforézistechnikák főképpen a hordozóanyagban különböznek. Agar, agaróz mellett a poliakrilamidgél nyert nagyobb teret az utóbbi években. A Laemmli-féle SDS PAG elektroforézis pl. már bekerült a speciális diagnosztikai laboratóriumok analitikai módszereinek repertoárjába. Mind az egy-, mind a kétdimenziós PAGE (poliakrilamidgél-elektroforézis) elválasztások ismertek a vizeletfehérjék vizsgálatában. Tekintettel a vizeletminták extrém tartományokban változó fehérjekoncentrációira, fontosnak látszott a detektálási érzékenység növelése. Erre az ezüstözési módszerek széles változatai kínálkoznak. Olyan ezüstözést célszerű választani, amely kompatibilis egy esetleg csatlakozó tömegspektrometriás (MS) méréshez is. Tapasztalataink szerint a WILLOUGHBY és munkatársai

által közölt kombinált (gyors) ezüstözési eljárást tartjuk erre a legalkalmasabbnak (lásd 4. fejezet). Mintaként az egydimenziós gélen 2-3 µg protein elegendő a mintázat megjelenítéséhez.

A kétdimenziós elektroforézisek, azaz a nagy feloldású fehérjetérképek készítésében a *minták fehérjetartalmának előzetes dúsítása általában elengedhetetlen*. Munkánkban olyan dúsítási eljárást vezettünk be, amely a normál vizelet fehérjeanalitikai vizsgálatára és fehérjetérképe megjelenítésére is eredményesnek bizonyult. A módszer nem csak egyszerű és gyors, hanem mint későbbi vizsgálatainkból kiderült, a procedura során a fehérjevesztés elhanyagolható (lásd 4. fejezet: A minták fehérjedúsítása és ezüstdetektálása MARSHALL szerint).

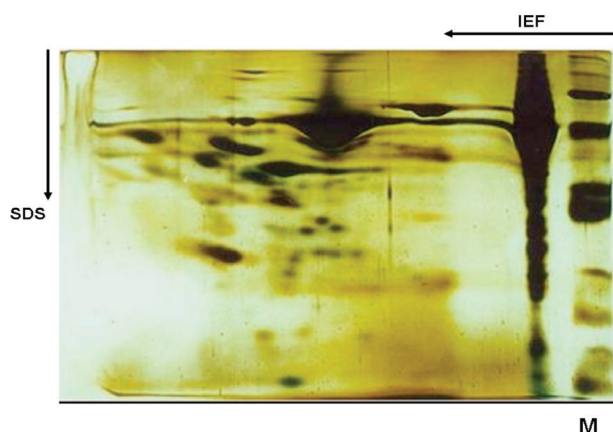
A dúsítási eljárás a vizeletfehérjék *kétdimenziós elektroforéziséhez* mint minta-előkészítő eljárás alkalmazható. A nagy feloldású kétdimenziós elektroforézis géljeinek nagy felületén a fehérjefrakciók megoszlának és további detektálási érzékenység növelést igényelnek. A gélek ezüstözésére ehhez a MARSHALL és munkatársai által kifejlesztett *ezüstözési technikát* használtuk, amelynél a „jel/zaj” arány az ideális kompromisszumra beállítható, és a vizsgálat információs értéke így sokszorosára növelhető (11-71. ábra). További MS vizsgálatok tervezése esetén viszont GROMOVA és munkatársai eljárását javasoljuk.

Áttekintő jellegű módszertani ismertetőnket néhány hangsúlyozott tanáccsal zárjuk. *A vizeletminták fehér-*

11-32. táblázat. Individuális fehérjék normálértékeinek felső határa a vizeletben

Fehérje	Mérési módszer	Normálérték felső határa (cut-off érték)
összfehérje	TCA turbidimetria	70 mg/l
albumin	tesztcsík immunonefelometria turbidimetria radioimmunassay immunkémiai tesztek	20 mg/l 20 mg/l
transzferrin	immunonefelometria	0,2–1,2 mg/l
IgG	immunonefelometria turbidimetria	10 mg/l
α ₁ -mikroglobulin	immunonefelometria turbidimetria	12 mg/l
β ₂ -mikroglobulin	immunonefelometria immunoassay	0,3 mg/l
retinolkötő fehérje	immunonefelometria	0,5 mg/l
β-NAG*	enzimaktivitás-mérés	6,3 U/l
Ig könnyűlánc	immunonefelometria	10 mg/l
hemoglobin, mioglobin	tesztcsík	0,3 mg/l
α ₂ -makroglobulin	immunonefelometria turbidimetria	7 mg/g kreatinin
apolipoprotein A-1	immunonefelometria	0,4 mg/l
CRP	immunonefelometria	6 µg/l

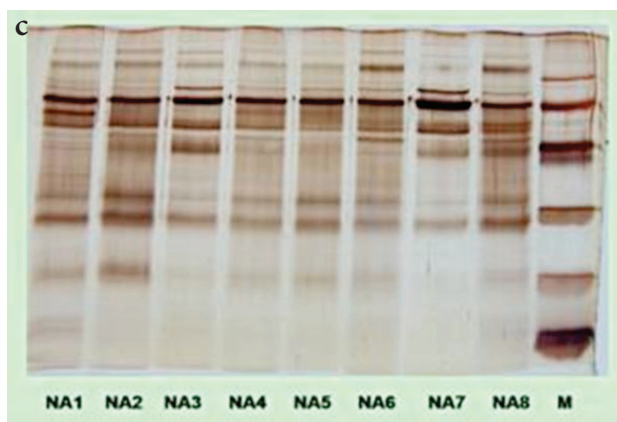
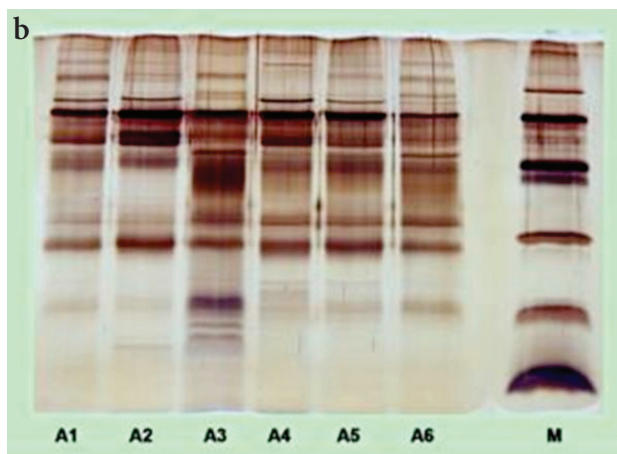
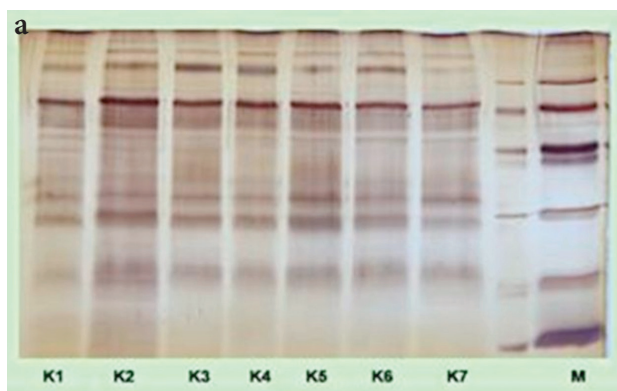
*β-NAG: N-acetil-β-D-glukózaminidaz



11-71. ábra. 50 éves szívbeteg férfi vizeletmintája. Kétdimenziós PAG-elektroforetogram (10% gélkoncentráció, ezüstözés Marshall szerint; vizeletminta-dúsítással, a felvitt proteinmennyiség 250 µg, M: molsúlymarker)

jevizsgálatainál fontos szem előtt tartani a következőket:

- A vizeletminta azonosítása, a mintavétel módja, mennyisége stb.
- Szűrővizsgálatok, üledékvizsgálat.
- A minta mielőbbi előkészítése az analízisekhez: centrifugálás, dekantálás.
- A minta összfehérje- és kreatininkoncentrációjának meghatározása (vonatkoztatások és a későbbi analízisek érdekében).
- Individuális fehérjekomponensek célzott, immunkémiai, ill. kromatográfias műszeres meghatározása, automata analizátorok révén.
- A mért adatok nem koncentrációban, hanem kreatininre vagy total proteinre számítandók.
- A fehérje frakcionálásig mintapufferben tárolása -70°C -on (proteolízisgátlás!).
- Az ezüst-detektáláshoz ajánlott fehérjemintamennyiség SDS ELFO-nál: 2-3 µg/pászta.
- Western blot-hoz ajánlott fehérjemintamennyiség SDS ELFO-nál: 3-4 µg/pászta.
- Fehérjemintázat értékelése: kontroll/beteg, beteg/beteg, betegcsoportok(aktív/non-aktív, akut/krónikus) hasonlításával – kizárólag azonosan kezelt mintákkal és azonos fehérjemennyiségekkel végezhetők (11-72. ábra a-b-c, 11-73. ábra).
- Kétdimenziós O'Farrell-technika fehérjetérképe: Coomassie-detektálásnál 300 µg, ezüstözési technikánál 75–150 µg/géllap. Mintától függően az analízis előtt dúsítás szükséges.



11-72. ábra. Összehasonlító vizeletfehérje-elektroforézis krónikus gyulladásos bélbetegeknél (12,5% SDS gél, kombinált ezüstfestés, pásztánként 2,5 µg protein)

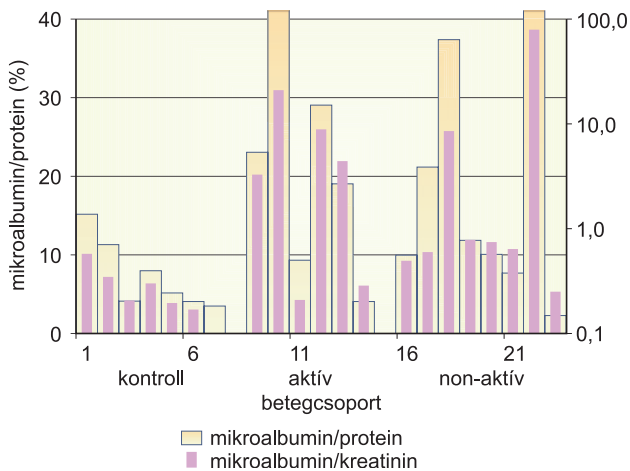
a) A vizeletfehérjék mintázata kontroll mintákban

b) A vizeletfehérjék mintázata aktív betegeknél

c) A vizeletfehérjék mintázata „non-aktív” betegeknél

VIZELETFEHÉRJÉK KLINIKAI BIOKÉMIÁJA ÉS INFORMÁCIÓS ÉRTÉKEI

A fejezet következő részében a vizeletfehérje-analízisek klinikai biokémiai jelentőségét illusztráljuk – a teljesség igénye nélkül – néhány általunk kiemelt példával.



11-73. ábra. Mikroalbumin-vizsgálatok Crohn-betegeknél; totál proteinre és kreatininre számított értékek összevetése

Számos közleményben találunk utalást arra, hogy különböző szisztémás betegségekben a vizelet kétdimenziós fehérjemintázata diagnosztikus támpontul szolgálhat. NORMAN G. és LEIGH ANDERSON betegségekkel asszociált fehérjetérkép-változásokat írt le a „Human Protein Index” című dolgozatban már 1982-ben. Ismert, mint ahogy az a bevezetőben is említésre került, hogy a vizeletfehérjék számos forrásból eredhetnek. Glomerularis betegségek következményeként megváltozik a szelektivitás: nagy molekulatömegű proteinek (60 kDa felettiek), albumin és plazmafehérjék, mint pl. transzferrin, IgG jelennek meg a vizeletben. Tubularis betegségekben a kisebb molekulatömegű proteinek (60 kDa alattiak), mint pl. az α_1 savanyú glikoprotein, α_1 -mikroglobulin, retinolkötő fehérje, β_2 -mikroglobulin, lizozim, β -NAG (de albumin is) mutathatók ki nagyobb mennyiségben.

Az α_1 savanyú glikoprotein a vizeletben normál körülmények között is mérhető fehérje, a leukocyták egy külső membránfehérjéjének fragmentje. Szintjének emelkedése a szérumban és a vizeletben különösen jellemző a *leukocyta proliferációval járó betegségekre* [4]. A β_2 -mikroglobulin szintén a sejtmembrán alkotórésze, hisztokompatibilitási antigénnel asszociált. Az exkréció növekedése diagnosztikus értékű *kadmiummérgezett* munkásokban a proximális tubulus károsodásának jeleként. Emelkedését kimutatták *SLE*-ben és *malignus betegségeken* is. Ma már a plazmasejt-tumoros betegekben monitorozzák a kezelés hatékonyságának ellenőrzésére. Előrehaladott malignus betegségeknél jelentősen fokozódhat

az albuminuria mértéke is [13]. A retinolkötő fehérje az A-vitamin transzportjában vesz részt, szintje emelkedik *vesetranszplantációt, kadmiummérgezést* követően. A Gc-globulin (D-vitamin-kötő fehérje) szintje emelkedik *nephrosis-szindrómában*, nagy valószínűséggel a glomeruluskárosodás jeleként.

Az immunglobulin-könnyűláncok diagnosztikus jelentőségűek. Bizonyos betegségekben, így *myeloma multiplexben* jellemző mind a mennyiségük, mind pedig a láncok fajtája és egymáshoz viszonyított aránya, mert a nagy mennyiségben termelődő monoklonális immunglobulin-könnyűláncok megjelenhetnek a vizeletben. Gyakoribb a λ -lánc mennyiségének emelkedése. Vese-károsodásban is jellemző lehet a λ típusú Bence-Jones-proteinuria. Bence-Jones-proteinuriát találunk még amyloidosisban, Fanconi-szindrómában. Az immunfixációt kombinálva a vizeletfehérje-elektroforézissel biztonságos diagnózishoz juthatunk ezekben az esetekben (Levinson, S.S., 2000).

A *vesekárosodás* jó indikátora a retinolkötő fehérje, a β -NAG, a transzferrin és az IgG emelkedése, amelyek mennyisége a betegség súlyosságával ugyan nem korrelál, de a vese korai károsodását az esetek nagy részében kimutatja [3]. Nephrosis-szindrómában kimutatták a fibrin/fibrinogén degradációs termékek emelkedését, proliferatív glomerulonephritisben mindezekon felül a keresztkötött fibrindegradációs termékek szintje is emelkedett [14]. Nephropathiában diagnosztikus segítség lehet az a tény, hogy az össz-glükóz-aminoglikán szint emelkedett, míg a kondroitin-szulfát/heparán-szulfát arány nem változik [8].

Glomerulonephritisben különböző albuminopolimereket találtak a vizeletben [2]. Mesangiocapillaris glomerulonephritisben pl. az albumin olyan izomerjét írták le, amelynek magasabb az izoelektromos pontja. Lupus-nephritisben ninhidrin-pozitív anyagokhoz kötődő albumint találtak. Így Doman és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az albuminpolimerizáció nem biokémiai műtermék, hanem klinikai jelentősége lehet.

Az elektroforetikus vizsgálatok fontos segítséget adhatnak a *vesetranszplantált betegek* állapotának, a terápia nefrotoxicitásának monitorozásában is. A rejekeiós krízisre jellemző az albuminuria, a kis molekulatömegű fehérjék, valamint a γ -globulinok szintjének emelkedése. Az említett fehérjék kimutatása megkönnyíti a gyulladásos reakció elkülönítését egy esetleges kilökődési krízistől.

A vizeletben lévő albumin mennyisége emelkedik *hypertoniában* a glomerularis hypertensio és basalis membrán sérülése következtében. A IV-es típusú kollagén mennyisége pedig a mesangialis mátrix, ill. szintén a glomerularis basalis membrán sérülése következtében nő meg. Mindezek jellemzőek a hypertrophiás szívbetegségekre és az atheroscleroticus elváltozásokra is [7]. Hypertoniában újabban, mivel a betegség fennállásának idejével korrelál, a microalbuminuria meghatározását is hasznosnak tartják. Szívizombetegségeken a vizelet albumin-, transzferrin-, IgG-tartalma nagymértékben, az α_1 -glikoprotein és az Apo-A1-szint kissé emelkedett, a vizelet össz-fehérjetartalma viszont nem nő szignifikánsan [5].

Miközben primer glomerulonephritisben a proteinuria jelenléte és mértéke utalhat a veseelégtelenség kialakulásának lehetőségére, *lupus-nephritisben* még mindig ellentétesek a nézetek a proteinuria és a betegség prognózisának összefüggésével kapcsolatban. Az SLE-s betegek csak mintegy 20%-ában emelkedik az összfehérje mennyisége a vizeletben. Egyéb tünetek hiányában itt is diagnosztikus támpontul szolgálhat az albumin és a retinolkötő fehérje (proximalis tubulus dysfunctióra jellemző) szint együttes emelkedése [6]. Aktív lupus-nephritisben pedig a vizelet C3 komplement tartalmának vizsgálata ajánlott [11]. Az SLE okozta tubulointerstitialis nephritisben a vizelet β_2 -mikroglobulin-szintje emelkedik, a Tamm–Horsfall-glikoproteiné pedig csökken. Szintén mennyiségi növekedést tapasztalhatunk az IL-6 és az IL-8 vonatkozásában is [15].

IgA-nephropathiában, diabeteses nephropathiában a fehérjetérkép révén a nephronsérülés non-invaszív lokalizációja válik lehetségessé. A kétdimenziós fehérjeelektroforézis jól használható annak megállapítására, hogy a károsodás elsősorban glomerularis vagy tubularis. Kimutatták, hogy diabeteses nephropathiában a vizelet albumin-, β -NAG-, ill. β_2 -mikroglobulin-szintje emelkedik. A glomerularis típusú proteinuria a diabetes fennállásának tartamával, a β -NAG-ürítés pedig a diabeteses angiopathia súlyosságával korrelál.

IRODALOM

- [1] ANDERSON, N. G., ANDERSON, N. L., TOLLAKSEN, S. L.: Proteins in human urine. I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin. Chem.* 25/7:1199–1210, 1979.
- [2] BAZZI, C., PETRINI, C., RIZZA, V. et al.: Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritis: Urinary polymers of albumin. *Am. J. Kidney Dis.* 30(3):404–412, 1979.
- [3] CORSO, A., SERRICCHIO, G., ZAPPASODI, P. et al.: Assessment of renal function in patients with multiple myeloma: the role of urinary proteins. *Ann. Hematol.* 78(8):371–375, 1999.
- [4] GAHMBERG, C. G., ANDERSON, L. C.: Leukocyte surface origin of human α -1-acid glycoprotein (orosomucoid). *J. Exp. Med.*, 148:507–521, 1978.
- [5] GRABER, H. U., MARTIG, J.: Urinary protein analysis in cardiomyopathy-affected and healthy cattle by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Zentralbl. Veterinar-med.* 39(10):769–776, 1992.
- [6] GUY, J. M., BRAMMAH, T. B., HOLT, L. et al.: Urinary excretion of albumin and retinol binding protein in systemic lupus erythematosus. *Ann. Clin. Biochem.* 34:668–674, 1997.
- [7] ISHIMITSU, T. et al.: Urinary excretions of albumin and type IV collagen in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertens. Res.* 23(5):459–466, 2000.
- [8] JURETIC, D., CVORISCEC, D., VUKOVIC-HOLJEVAC, A et al.: Urinary glycosaminoglycans in different phases of Balkan endemic nephropathy. *Nephron* 65(4):564–567, 1993.
- [9] MARSHALL, T., WILLIAMS, K. M.: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of urine: concentration of urinary proteins by precipitation with Coomassie Blue. *Clin. Chem.* 39/11:2314–2318, 1993.
- [10] MARSHALL, T., WILLIAMS, K.: Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following concentration by dye precipitation. *Electrophoresis* 17:1265–1272, 1996.
- [11] NEGI, V. S., AGGARWAL, A., DAYAL, R. et al.: Complement degradation product C3d in urine: marker of lupus nephritis. *J. Rheumatol.* 27(2):380–383, 2000.
- [12] NEMES VANDA: Módszertani fejlesztések a vizelet-fehérjék térképezésében. Diplomamunka PTE/ÁOK 2002.
- [13] PEDERSEN, L. M., TERSLEV, L., SLRENSEN, P. G. et al.: Urinary albumin excretion and transcapillary escape rate of albumin in malignancies. *Med. Oncol.* 17(2):117–122, 2000.
- [14] TAIRA, K., MATSUNAGA, T., KAWAHARA, S. et al.: Fragments of urinary fibrin/fibrinogen degradation products and cross-linked fibrin degradation products in various renal diseases. *Thromb. Res.* 53(4):367–377, 1989.
- [15] TSAI, C. Y., WU, T. H., YU, C. L. et al.: Increased excretions of β_2 -microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron* 85(3):207–214, 2000.

A proteinuria klinikai szempontjai

WITTMANN ISTVÁN

FOGALMAK, DEFINÍCIÓK

A *fehérjevizelés (proteinuria)* lehet normális és kóros. A kóros eredete szerint lehet *praerenalis*, *glomerularis*, *tubularis* és *postrenalis*. Praerenalis proteinuriában a kóros körülmények között képződött és filtrált fehérjék jelennek meg a vizeletben (pl. myogloburia, Ig-könnyűlánc-vizelés stb.). A könnyűlánc-proteinuria esetén beszélnek „*túlfolyásos*” (*overflow*) *eredetről* is. Glomerularis proteinuriában a glomerularis molekulatömeg-küszöb feletti (> 65 kDa), tubularis proteinuriában pedig az ez alatti tömegű fehérjék jelennek meg a vizeletben. Vérzések miatt lehetnek plazmafehérjék a vizeletben postrenalis fehérjevizelésben. Amennyiben a napi proteinürítés < 1 g, *enyhe*, ha >3,5g, akkor *nephroticus mértékű* proteinuriáról van szó. Amikor szinte csak albumin ürül a vizeletben, akkor *szelektív*, amennyiben más nagy molekulatömegű fehérjék is, akkor *nem szelektív* proteinuriával van dolgunk.

Microalbuminuriáról akkor beszélünk, ha a vizeletben speciális immunanalitikai módszerekkel mérhető, kis mennyiségű albumin jelenik meg. Alkalmazzák a vizelet-albuminkoncentrációt is, de ez a legkevésbé elfogadott (> 20 mg/l koncentráció esetén micro-, >200 mg/l esetén macroalbuminuria lehetősége vetődik föl).

Az albuminuria definícióját a 11-33, 11-34. táblázat foglalja össze.

11-33. táblázat. Az albuminuriák definíciója 24 órás gyűjtött vizeletből*

Albuminuria	Ürítés 24 órás gyűjtött vizeletben (mg/nap)
normoalbuminuria	<30
microalbuminuria	30–300
macroalbuminuria	>300

*Amennyiben 3–6 hónapon belül végzett 3 mérésből 2 pozitív, akkor beszélünk micro/ vagy macroalbuminuriáról

A PROTEINURIA, MICROALBUMINURIA KIALAKULÁSA

A fehérjék és az albumin keringésben tartását a vese több struktúrája szolgálja. A 65 kDa-nál nagyobb tömegű fehérjék már csak kis mennyiségben jutnak át a glomeruluson, ill. az átkerülő mennyiséget a vesetubulus sejtjei majdnem teljes mértékben reabszorbeálják. A 65 kD-nál kisebb molekulatömegű fehérjék azonban szabadon átjutnak a glomerulus szűrő-rendszerein, de legnagyobb részük szintén reabszorbeálódik a proximális tubularis sejtek *kubilin*- és *megalin*-receptorai segítségével.

A fehérjék visszatartása a vese glomerulusában:

- Első vonalban a glomerularis ér fenesztrált endothelje szolgál, mivel a fenesztrumokat az endothel felszínén található glycocalyx lezárja.
- Második vonalbeli szűrőként a glomerularis basalis membránt említhetjük, amelynek negatív töltése (amit a szialiláltság és a heparinoidok okoznak) és kicsiny pórusátmérője biztosítja a szelektív (kis molekulatömegű és/vagy pozitív töltésű) fehérjék áthaladását, ill. az ettől eltérők visszatartását.
- Harmadik vonalban a glomerulus epithelsejtjei (a podocyta) állábnyúlványai és a közöttük feszülő membrán (slit membrane) tartja vissza a keringésben a fehérjéket.

A glomeruluson mégis keresztüljutó fehérjék az említett módon, aktív reabszorpcióval (ATP felhasználásával) a tubularis epithelsejtekbe jutnak, ahol nagyobb részt degradálódnak. A belőlük képződő

11-34. táblázat. Az albuminuriák definíciója nem gyűjtött vizeletből, az albumin/kreatinin hányados szerint*

Albuminuria	Ürítés nőknél (mg/mmol)	Ürítés férfiaknál (mg/mmol)
normoalbuminuria	<3,5	<2,5
microalbuminuria	3,5–35	2,5–25
macroalbuminuria	>35	>25

*Amennyiben 3–6 hónapon belül végzett 3 mérésből 2 pozitív, akkor beszélünk micro- vagy macroalbuminuriáról.

aminosavak visszakerülnek a keringésbe, de a fehérjék kisebb része többé-kevésbé intaktan ismét szecernálódva a vizelettel kiürül.

A vese glomerularis betegségeiben olyan mennyiségű fehérje kerül a tubulusokba, amennyit az már nem tud reabszorbeálni. Tubularis bajban a szabadon filtrálódó fehérjék egy része nem reabszorbeálódik. Mindkét károsodás a nephron pusztulásához és végeredményben veseelégtelenséghez vezet. Ezért a vizeletfehérje- vagy speciálisan az albuminürítés meghatározása a veseállapot követésének egyik legfontosabb módja.

A PROTEINURIA, MICROALBUMINURIA ELŐFORDULÁSA ÉS JELENTŐSÉGE

Populációs szintű, válogatás nélküli népességen végzett vizsgálatokból tudjuk, hogy a microalbuminuria előfordulása hozzávetőlegesen 6% körüli. Az analízisek szerint a microalbuminuria összefüggése a vesebetegségekkel és a cardiovascularis megbetegedésekkel szoros.

Több mint 105 ezer beteg vizsgálatából az derült ki, hogy az összmortalitás a 0,6 mg/mmol-os albumin/kreatinin hányadoshoz képest 1,1 mg/mmol esetén 20%-kal, 3,4 mg/mmol mellett 63%-kal, 33,9 mg/mmol esetén 122%-kal nő. Sőt mint látható, ez az összefüggés az albuminuria normális tartományában is létezik. Így tehát a vizeletalbumin-ürítés alacsony tartományának vizsgálata is előnyökkel jár a beteg vagy a magát egészségesnek gondoló egyén számára. Tanulmányok arra is rávilágítottak, hogy minél jobban csökkentjük az albuminürítés mértékét a kezelés során, annál jobban csökken a veseelégtelenség és a cardiovascularis betegség kockázata.

A metabolikus szindróma fejezetben leírtaknak megfelelően (lásd 11.16. fejezet, a Metabolikus szindróma WHO kritériumrendszere című részben) korábban az volt az állásfoglalás, hogy a microalbuminuria a metabolikus szindróma része. Az újabb kritériumrendszerek (ATPIII, IDF) ugyan már nem tartalmazzák a microalbuminuriát, de a WHO definíció rávilágított a metabolikus szindróma és a microalbuminuria szoros kapcsolatára. Így tehát microalbuminuriás beteg vizsgálatakor a vesebetegségen kívül keressük a cukorbetegséget, a dyslipidaemiát, az obesitást, a hypertoniát és a micro-, valamint macrovascularis szövődményeket.

AZ ALBUMINURIA MEGHATÁROZÁSA

A vizeletalbumin mérésére kifejlesztett szemikvantitatív módszer (tesztcsík) csak 300 mg/l és a feletti albuminmennyiség kimutatására képes. Az első kvantitatív analitikai módszer, amelyet ennél kisebb koncentrációjú albumin mérésére fejlesztettek ki, egy RIA módszer volt, amelyhez ^{125}I jelölt albumint használtak. Ez azonban túl időigényesnek és költségesnek bizonyult ahhoz, hogy a rutin laboratóriumi vizsgálat részévé váljon. Ezért más immunanalitikai mérőmódszert és automatizálható teszteket fejlesztettek ki, pl. immunnefelometriás és immunturbidimetriás módszert. Ennek során az albumint tartalmazó mintát (szérum vagy vizelet) albuminellenes antitesttel hozzák reakcióba, és az így keletkező immunkomplex optikai tulajdonságát detektálják (turbidimetria vagy fényszórás).

MEGHATÁROZÁS MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIÁVAL

Napjainkban egy új, a méretkizárásos kromatográfián alapuló, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer is rendelkezésünkre áll a microalbuminuria detektálására. Az új módszert alkalmazó első vizsgálat kimutatta, hogy a vizeletalbumin koncentrációját a hagyományos immunológiai módszerek diabeteses betegekben jelentősen alábecsülik. A HPLC-vel mérhető vizeletalbumint ezt követően összes (total) vizeletalbuminnak (t-uAlb) nevezték el. Azon vizeletalbumin-frakciót, amely hagyományos immun alapú módszerrel nem, de HPLC-vel mérhető, nem immunreaktív vagy immunkémiailag nem reaktív albuminnak nevezték el.

A HPLC-vel való mérésekhez használt kit szenzitivitása (mérészhatár): 3 mg/l, méréstartománya: 3–2000 mg/l, inter- és intra-assay pontossága 5,8 és 2,5%). A kit méretkizárásos kromatográfián alapul, és mobil fázisként sótartalmú foszfátpuffert tartalmaz (pH: 6,93).

A PROTEINURIA, MICROALBUMINURIA MEGHATÁROZÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

Klinikai tényezők

Ismert, hogy elsősorban fiatal, egészséges egyéneknél előfordul a testhelyzettől függően, azaz felállást

követően jelentkező, úgynevezett *orthostaticus proteinuria*. Ennek jelentősége vitatott.

Húgyúti fertőzések, a legtöbb gyulladásos betegség, akut lázas állapot, fizikai aktivitás, szívelégtelenség, diétás proteinterhelés kiválthat átmeneti proteinuriát.

Felvetődik annak lehetősége is, hogy cukorbetegekben vagy bármilyen betegségben, amelyben az oxidatív stressz miatt karbonilstressz is létrejön és ez módosítja az albumint, ennek következtében az immunológiai módszerek nem képesek detektálni a vizeletben az albumint. Újabb eredmények szerint azonban ezek a tényezők nem tűnnek fontosnak az albuminuria immunológiai alapú meghatározásában.

Preanalitikai tényezők

Tárolt vizeletből végzett albuminmeghatározás során számítani kell arra, hogy csökkenő koncentrációértéket kapunk. Igaz ez a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tárolásra is. Úgy tűnik, hogy minél alacsonyabb a vizelet pH-ja, annál nagyobb koncentrációban van jelen a vizeletben a szabad SH-csoport, amely felelőssé tehető a vizelet-albumin csökkenéséért. A vizeletben lévő albumin egy része ugyanis enzimatisz emésztésen esett át, és csak diszulfidhidak tartják össze. Ezek felbomlásakor csökkent koncentrációt detektálunk HPLC-vel való, molekulatömegre alapozott meghatározás során.

IRODALOM

- ANDERSON, S., KOMERS, R., BRENNER, B. M.: Renal and systematic manifestations of glomerular disease. The Kidney. pp. 820–940. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008.
- CAMERON, J. S.: The patient with proteinuria and/or haematuria. Oxford Textbook in Clinical Nephrology. pp. 389–414. Oxford University Press, New York, 2005.
- MATSUSHITA, K., VAN DER VELDE, M. et al.: Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375(9731):2073–2081, 2010.
- KRUMME, B., WALB, D.: Diagnostische Massnahmen bei Nierenerkrankungen und Beurteilung der Nierenfunktion. *Nephrologie*. pp. 1–32. Thieme, Stuttgart, 2008.
- MARKÓ, L., CSEH, J., KŐSZEGI, T. et al.: Storage at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ decreases the concentration of HPLC-detected urinary albumin: possible mechanisms and implications. *J. Nephrol.* 22(3):397–402, 2009.
- MARKÓ, L., MOLNÁR, G. A., WAGNER, Z. et al.: Measurement of the modification and interference rate of urinary albumin detected by size-exclusion HPLC. *Physiol. Meas.* 30(10):1137–1150, 2009.
- MARKÓ, L., SZIGETI, N., SZABÓ, Z. et al.: Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 45(12):1440–1448, 2010.
- <http://emedicine.medscape.com/article/238158-overview>
- <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/proteinuria>
- <http://www.kidney.org/atoz/content/albuminuria.cfm>
- <http://emedicine.medscape.com/article/244631-overview>
- <http://www.gpnotebook.co.uk/simplepage.cfm?ID=x20030124010449665170>
- http://care.diabetesjournals.org/content/27/suppl_1/s79.full
- http://www.ifcc.org/index.asp?cat=Publications&scat=eJIFCC_&suba=Vol_20_No_1&subx=LABORATORY%20STANDARDS%20IN%20THE%20DIAGNOSIS%20AND%20MONITORING%20OF%20THERAPY&zip=1&dove=1&zona=full&numero=-&aq=1
- http://hopkins-diabetesguide.org/clinical_tests/renal/full_albuminuria.html
- <https://ssl.adam.com/content.aspx?productId=49&pid=49&gid=150230&site=welldynrx.adam.com&login=well1815>

Száraz-kémiai fehérjekimutatások mint betegágy melletti gyors tesztek (POCT) – A POCT diagnosztikus értékei, a vizsgálatok hitelességének ellenőrzése

LISZT FERENC

A laboratóriumi diagnosztika nem a szokásos laboratóriumi környezetben, hanem a betegellátás közvetlen közelében, legtöbbször nem laboratóriumi képesítéssel rendelkező egészségügyi szakszemélyzet által végzett tevékenysége az angol „Point-of-Care Testing” kifejezés rövidítéséből származó POCT. A POCT laboratóriumi diagnosztika, amelynek számos szinonimája él az angolszász irodalomban (bedside testing, near patient testing, home testing, self-management). Definíció szerint magában foglal minden olyan laboratóriumi vizsgálatot, amelyet a hagyományos központi laboratóriumokon kívül végeznek. Ez végezhető akár fekvőbeteg-intézményekben közvetlenül a betegágy mellett, sürgősségi ellátás keretében vagy az elsődleges ellátásban a háziorvosi rendelőben, ill. a beteg által otthoni környezetben. A sürgősségi betegellátás olyan klinikai helyzetet jelent, amikor életfontos szervi dysfunctio, súlyos trauma, nagy sebészeti beavatkozás, általános anesztézia, súlyos sepsis vagy más súlyos kórképben szenvedő betegeket kell ellátni. Ilyen klinikai helyzetet jelent intenzív osztályon, műtőben, sürgősségi osztályokon, sürgősségi és légi mentés során és a mellkasi fájdalom/trauma/stroke egységekben való betegellátás. Ebben a fejezetben csak a sürgősségi betegellátás keretében végzett POCT-vizsgálatok diagnosztikus értékével foglalkozunk.

A POCT-diagnosztika elterjedését a klinikusok laboratóriumi vizsgálatokkal szemben támasztott rövidebb „turn-around-time” (TAT) igénye és a betegápolási napok lerövidítéséből fakadó gazdaságossági előnyök segítették. A központi laboratóriumi teszthez képest rövidebb leletátfordulási időt nyújtó, sokszor más módszertannal végzett POCT-vizsgálattal szemben egyértelmű elvárás, hogy eredménye a központi laboratóriumi teszthez hasonlóan megbízható és ösz-

szevethető legyen. A nem megfelelő minőségbiztosítással alkalmazott POCT ugyanis a beteg számára veszélyes lehet (pontatlan laboratóriumi eredmények a kivitelezés hibáiból, rossz adatrögzítés, leletdokumentálás miatt). A POCT-vizsgálatok gazdaságossági előnye a betegápolási, leginkább az intenzív osztályon töltött napok számának lerövidülésén keresztül érvényesül, így azok túlzott gyakorisággal vagy központi laboratóriumi szolgáltatással parallel „biztonsági” alkalmazása költséges és felesleges. Az is nyilvánvaló, hogy egyes klinikai állapotokban a gyors laboratóriumi eredményeken alapuló döntéshozatal valóban alapvető a beteg jobb gyógyulási esélyeinek biztosításához, ugyanakkor más helyzetekben a gyors laboratóriumi eredmény csupán a nagyobb fokú betegmegelégedettséget szolgálja.

A betegellátás klinikai eredményességét javító POCT-gyakorlat lehetőségei a sürgősségi és intenzív terápiás ellátásban

A sürgősségi és intenzív betegellátás legfontosabb sajtása, hogy a beteg klinikai állapotában igen gyorsan olyan jelentős változások történnek, ami azonnali terápiás beavatkozást igényel. A vérnyomás, a pulzus, a testhőmérséklet, a légzésszám és néhány biokémiai marker olyan „vitális jeleknek” tekinthetők, amelyek jelzik a beteg állapotának destabilizálódását. A klinikusnak felkészültnek kell lennie ezen kritikus helyzetek gyors diagnózisára és kezelésére annak érdekében, hogy az életfontos szervek és szervrendszerek következményes károsodását elkerülje. Ez a klinikai környezet igen fontos területe lehet a megbízható, pontos POCT-alkalmazásoknak, ami a vitális markerek valós idejű követésével a kialakuló dysfunctio azonnali kezelését teszi lehetővé, így javítva a beteggyógyulás esélyeit.

A sürgősségi és intenzív terápiás betegellátás laboratóriumi tesztpaneljét illetően ugyan általánosan elfogadott javaslat nem létezik, több-kevesebb eltéréssel azonban a laboratóriumi tesztek következő csoportjai használatosak a fekvőbeteg-intézmények sürgősségi gyakorlatában:

- Kardiológiai marker vizsgálatok.
- Gyulladásos marker vizsgálatok.
- Klinikai kémiai tesztek (vérgázok, ionok, vércukor, laktát, a vesefunkció tesztjei, cooximetria).

- Hormonmeghatározások.
- Véralvadási tesztek.
- Toxikológiai vizsgálatok.

Hogy ezek közül mely vizsgálatok azok, amelyek POCT-módszerrel végezve a betegellátás klinikai eredményességét fokozzák, csak a POCT-használat bizonyítékokon alapuló nemzetközi irányelvére támaszkodó ajánlások alapján foglalható össze.

POCT alkalmazása sürgősségi kardiológiai marker vizsgálatokra

A mellkasi fájdalom differenciáldiagnosztikája az intenzív és sürgősségi osztályok egyik legnagyobb kihívása.

Az *akut coronariabetegség* korai kizárása vagy diagnózisa alapvetően meghatározza a beteg további kórházi elhelyezését, kezelését. E betegség differenciáldiagnosztikájában a nemzetközi és magyar szakmai irányelvek a következő biokémiai markerek használatát ajánlják:

- *cardialis troponin-I* vagy *troponin-T*;
- *kreatin-kináz MB izoenzimtömeg*;
- *mioglobin* bizonyos esetekben.

A szakmai ajánlások a diagnosztikára és terápiára vonatkozó ajánlásokkal összhangban a biokémiai markerek a mellkasi fájdalom kezdetétől eltelt időre vonatkoztatott eredményeitől függő döntéshozatalon alapulnak. Ha hagyományos központi laboratóriumi módszerekkel és a kapcsolódó logisztikai mechanizmusokkal a *cardialis* markerek eredménye egy órán belül nem biztosítható, akkor kvantitatív eredményt adó és a központi laboratóriummal összehangolt eredményt biztosító POCT bevezetése ajánlott.

A *krónikus coronariabetegség* kezelésére és diagnózisára vonatkozó irányelv ajánlja az *NT-pro-B natriuretikus-peptid* gyors, betegség melletti meghatározását, mert az echocardiográfiás vizsgálat nem áll mindig rendelkezésre.

POCT-módszerek gyulladásos marker vizsgálatokra

A gyulladásos folyamat diagnosztikája minden orvosi diszciplína központi kérdései közé tartozik. A *C-reaktív protein*, *procalcitonin* és *interleukin-6* marker vizsgálata POCT-készüléken csak részben lehetséges. A CRP meghatározásának elsősorban az alapellátásban, a háziorvosi gyakorlatban, gyermekek

esetében van létjogosultsága. A procalcitonin és az interleukin-6 vizsgálatára módszertani okokból kifo-lyólag csak szemikvantitatív POCT áll rendelkezésre.

POCT-módszerek sürgősségi klinikai kémiai vizsgálatokra

A fekvőbeteg-intézmények sürgősségi és intenzív terápiás osztályai változatos összetételű sürgősségi klinikai kémiai tesztpanel tartanak szükségesnek munkájukhoz. A gyors klinikai döntéshozatal érdekében a vizsgálatok eredményére rövid leletátfordulási időre van szükség, a tesztek egy részét már jelenleg is POCT-műszerekkel végzik. Hogy a gyorsabb teszt-eredmény valóban javítja a betegellátás klinikai eredményességét, az inkább feltételezett, mint bizonyított.

Vérgázok

A vérgázanalízis tipikusan sokféle klinikai környezetben alkalmazott POCT-eljárás. A sürgősségi osztályokon a beteg gyors megítélése nagy előnyökkel jár, hiszen a betegektől gyakran nem nyerhető anamnézis, gyakran korábbi kezeléseikről szóló dokumentáció sem áll rendelkezésre. A POC vérgáz-tesztek alkalmazásával a vérgázeredményekhez való hozzájutás ideje csökken, és bizonyíték vannak arra vonatkozóan, hogy ezáltal nő a betegellátás klinikai eredményessége.

Ionok

Az elektrolit-háztartás (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) POCT-módszerrel való megítélésének klinikai hasznossága sürgősségi ambuláns, intenzív és műtétes osztályok esetében bizonyított, elsősorban a TAT rövidülése és a klinikai eredményesség fokozódása révén.

Vesefunkció: kreatinin, karbamid

Nem ajánlott sürgősségi osztályon lévő betegek karbamid- vagy kreatininszint-meghatározását POCT-módszerrel rutinszerűen végezni. Ugyanakkor rutinszerűen alkalmazható cardiovascularis diagnosztikai laboratóriumokban a karbamid vagy a kreatinin meghatározása POCT-módszerrel, a POCT ebben a környezetben javítja a betegellátás klinikai hatékonyságát.

Vércukor, laktát

A kórházi környezetben POCT-módszerrel vég-

zett vércukor-meghatározás alkalmazása mellett vagy ellen nincs elegendő bizonyíték. A *laktát-POCT* rutinszerű alkalmazása intenzív, sürgősségi és műtétes osztályok klinikusai számára ajánlott.

Cooximetria

Cooximetriának hemoglobinpigmentek egy időben, több hullámhossznál mérő spektrofotometria elvén való meghatározását nevezzük. Általában total hemoglobin, oxigénszaturáció, oxihemoglobinfrafrakció, karboxihemoglobin (HbCO) és methemoglobin (MetHb) mérésére alkalmas. Rutinszerű alkalmazása javasolt influenzaszerű tünetekkel vagy fejfájással sürgősségi osztályra szén-monoxid-mérgezés gyanújával felvett betegek szűrésére, methaemoglobinaemiás betegeknel, sepsis kialakulásának monitorozásában.

POCT-alkalmazás hormonmeghatározásokra

A hormonmeghatározások általában nem tartoznak a tipikusan POCT-módszerrel mérendő tesztek közé, bizonyos klinikai alkalmazások (ectopiás terhesség diagnosztikája, operatív beavatkozások) olyan rövid TAT-ot igényelnek, amely a POCT-használat mellett szólhat.

Vizelet-hCG

A hCG POCT eszközök alkalmasak lehetnek ectopiás terhesség diagnosztikájára, de nem végeztek összehasonlító vizsgálatokat központi laboratóriumi módszerekkel. Nincs elegendő bizonyíték ahhoz, hogy ajánlani lehessen a POC vizelet-hCG-mérő műszereket ectopiás terhességben való alkalmazásra.

Intraoperatív-PTH meghatározás

A gyors PTH-teszt intraoperatív alkalmazása klinikai előnyökkel járhat, ami a parathormon-POCT-módszer bizonyos klinikai alkalmazások során való bevezetését veti fel.

POCT-alkalmazás sürgősségi véralvadási vizsgálatokra

A sürgősségi és intenzív betegellátás területén rövid TAT-igénnyel felvetődő véralvadási tesztek POCT-módszerrel való meghatározásának bizonyított klinikai hasznosságát megítélő National Academy of Clinical Biochemistry irányelv főbb megállapításai a hazai alkalmazások kialakítására vonatkozóan

is irányadók. Rendkívül fontos, hogy valamennyi POCT alvadásmonitorozó készülékkel mért érték egyformán jól reprodukálható és pontos legyen. A POCT PI- és APTI-módszer bevezetése előtt az alkalmazó intézmény feladata, hogy a POCT-módszerrel mért értékek antikoaguláns terápia monitorozására vonatkozó terápiás tartományait, döntési határértékeit meghatározza, interpretálja azok központi laboratóriumi hagyományos tesztekkel való összevetetőségét és kialakítsa a POCT-vizsgálat helyét az intézmény munkafolyamatában.

POCT-alkalmazás sürgős toxikológiai vizsgálatokra

A mérgezett beteg súlyos szervi dysfunciók bekövetkezésének lehetősége miatt intenzív terápiás ellátást igényel, ennek része a mérgezést okozó ágens kimutatása és koncentrációjának meghatározása. Az ismeretlen anyaggal történt intoxikáció eseteiben a sürgős toxikológiai vizsgálatok elsődleges célja a diagnózis bizonyítása és a mérgező vegyület kiindulási koncentrációjának megállapítása a terápia követéséhez. A toxikológiai célra jelenleg elérhető POCT-eszközök valamennyien immunoassay elvén detektálják a vizsgált gyógyszer, gyógyszercsoport jellegzetes metabolitjait, és szűrő módszernek tekintendők. Fontos ismerni más hatóanyag vagy gyógyszer-származék interferenciáját a POCT-tesztben. A műszer cut-off-értékét (a döntési határ értékét) kiválasztásánál mérlegelni kell. A cut-off körüli drogmennyiséget tartalmazó minták negativitásának statisztikai valószínűségét a gyártónak meg kell adnia, olyan módon, hogy a nem laboratóriumi felhasználó is felismerje a tévesen negatív eredményt.

A POCT-gyakorlat kialakításának szakmai kérdései

Hol van szükség POCT-diagnosztika bevezetésére?
Valamennyi fekvőbeteget ellátó intézmény önállóan dönt a POCT-vizsgálatok bevezetéséről. Indokolt lehet minden olyan helyen, ahol a nagymértékben laboratóriumi eredménnyen alapuló orvosi döntéshozatal fokozott sürgősséget igényel és a klinikai-terápiás beavatkozást késleltetné a nem helyszínen végzett diagnosztikai teszt.

A POCT-vizsgálatok bevezetése előtt a következő szempontok mérlegelendők:

- Van-e megalapozott klinikai igény POCT-módszerrel végzendő laboratóriumi teszt bevezetésére?
- A bevezetendő POCT-módszer laboratóriumi és klinikai szempontból egyaránt megfelelő-e?
- A bevezetendő POCT-módszer növeli-e a betegellátás eredményességét klinikai, szervezési vagy gazdaságossági szempontból?
- Mennyire költséghatékony a POCT-módszer a hagyományos laboratóriumi teszthez képest?
- A kellő gyorsaság a már meglévő központi laboratóriumi tesztekkel, azok átfutási idejének csökkentésével biztosítható-e [a preanalitikai idő csökkentése logisztikai átszervezéssel, a hagyományos laboratóriumi vizsgálatok analitikai időigénye és a posztanalitikai idő csökkentése laboratóriumi információs rendszer (LIR) fejlesztésével].

A POCT szükségességének eldöntését követően a leginkább megfelelő készülék kiválasztására kell törekedni. Ennek során feltétlenül figyelembe kell venni azt, hogy a klinikai igény kielégítéséhez milyen analitikai pontosságra, reprodukálhatóságra, ill. detektálási határra van szükség.

Ki döntsön a POCT-diagnosztika szervezési kérdéseiben?

Azok a fekvőbeteg-ellátó intézmények, amelyek POCT laboratóriumi vizsgálatokat alkalmaznak, az intézmény minőségbiztosítási szabályozásának részeként működő intézményi POCT-programban rögzítik a POCT működtetésével kapcsolatos szabályozást.

A POCT-programnak tartalmaznia kell a következőket:

- A POCT-vizsgálatok helyét a fekvőbeteg-intézmény laboratóriumi diagnosztikai stratégiájában. Milyen diagnosztikai területen kívánja a POCT-vizsgálatokat alkalmazni, és azok alkalmazása mennyiben fejleszti az intézmény diagnosztikai ellátását (gyorsaság, központi laboratóriumtól távoli osztályok jobb ellátása stb.). Tervet a POCT-vizsgálatok és a kórházi laboratórium már alkalmazott módszereinek összehangolására.
- A POCT-vizsgálatok költségviselésének, esetleges megosztásának meghatározását az adott intézményben.

- A POCT-programba bevont egységek listáját, az ott alkalmazott POCT-készülékekkel együtt.
- Fejlesztési tervet az intézményi POCT-programra vonatkozóan (milyen további tesztek bevezetése szükséges osztályonkénti lebontásban, költség-hatékonyság analízissel).
- Az intézményi POCT-rendszer szervezési és minőségügyi kérdéseit:
 - A döntéshozó és irányelvek megjelölése a bevezetendő tesztek, műszerek és módszerek kiválasztásával kapcsolatban.
 - A vizsgálatokat végző és értékelő személyek kijelölése, oktatásuk meghatározása.
 - A POCT-eredmény/lelet dokumentálásának módja.
 - Vizsgálatok végzésének szakmai protokollja.
 - A POCT-vizsgálatok végzésének és készülékek minőségi kívánalmainak biztosítását szolgáló dokumentumok (felelősök megjelölésével).
 - A POCT-készülékek karbantartási protokollja.
 - A POCT-vizsgálatok végzésének technikai protokollja.
 - A POCT-vizsgálatok minőségbiztosítási protokollja (belső és külső minőség-ellenőrzés).

A POCT-vizsgálatok szakmai felelőssége

Ezek olyan különleges laboratóriumi vizsgálatok, amelyek technikai kivitelezésében laboratóriumi szakismeretekkel nem rendelkező egészségügyi szakszemélyzet (orvosok, nővérek, intenzív osztályos aszisztensek, műtősnők stb.) is részt vehet.

A vizsgálatok minőségének ellenőrzése, a minőség biztosítása a központi laboratórium vezetőjének felelőssége, aki ezt megfelelő laboratóriumi szakszemélyzeten keresztül biztosítja. Az egyéb laboratóriumi vizsgálatokkal ellentétben a POCT-vizsgálatok eredményei előzetes laboratóriumi orvosi validálás nélkül kerülnek klinikai értékelésre. Ezért a megfelelő (és kielégítően dokumentált) minőség-ellenőrzési paraméterek mellett az egyedi vizsgálati eredmények szakmai felelőssége – ha a vizsgálatot nem laboratóriumi szakember végzi, hanem a betegellátó osztály munkatársa – a betegellátó osztály vezetőjét terheli. A POCT-mérőeszközök csak akkor használhatók, ha a műszerek évenkénti független műszertechnikai ellenőrzését elvégezték.

A POCT-gyakorlat minőségbiztosítása

A POCT-DIAGNOSZTIKA HIBAFORRÁSAI

A laboratóriumi eljárásokhoz hasonlóan a POCT-diagnosztika is ugyanazokkal a – meghatározás preanalitikai, analitikai és posztanalitikai fázisához rendelhető – hibaforrásokkal terhelt. A POCT fő előnye természetesen abban rejlik, hogy számottevően csökkenti a leletátfordulási időt. Ugyanakkor számos olyan vélemény is létezik, amely szerint a preanalitikai fázisban a mintavétel, a mintatranszport, valamint a posztanalitikai fázis adatközlési hibái is eliminálódhatnak. Ez távolról sincs így, ezért a hibák kiküszöbölése legalább akkora kihívás, mint a központosított laboratóriumokban.

A POCT-folyamatban a következő hibák előfordulására lehet számítani:

- A preanalitikai fázisban:
 - A vizsgálat elrendelésekor nem megfelelő az időzítés (pl. cardialis markerek, troponin, mioglobin, CK-MB panelként kérése konfúziót okoz).
 - A minta nem a megfelelő betegtől származik, vagy nincs meg a szükséges információ a beteggel kapcsolatban.
 - A minta gyűjtése nem megfelelő térfogatú, inkonzisztens mintát eredményez.
- Az analitikai fázisban:
 - A műszer kalibrációja nem megfelelő, ez különösen a nem laboratóriumi képzettségű személyzet miatt jelentkező veszélyforrás.
 - Vizsgálati minta és reagens interakciójának következtében: heterofil antitestek tévesen negatív vagy pozitív értékeket eredményezhetnek különösen az agglutinációval működő meghatározásoknál. Az interferáló anyagok jelenléte ugyan a laboratóriumi meghatározások más típusait is befolyásolhatja, de a POCT-diagnosztikában az eredményeket szinte azonnal felhasználják a beteg kezelésében.
 - Eredménygenerálás, az eredmény a módszer kínálta határokon kívül található.
 - Az eredmény nem validált, hiányos vagy nem létezik minőség-ellenőrzés. A hagyományos laboratóriumi gyakorlatban használt külső minőség-ellenőrzési rendszerek csak módo-

sításokkal alkalmazhatók POCT-rendszerekre, mivel az ún. „laboratóriumi típusú” POCT-rendszerek mellett „cartridge” (mérőkazettás), ill. „tesztcsík” alapú rendszerek is léteznek.

- A posztanalitikai fázisban:
 - A mérési eredmény értékelését, kezelését nem megfelelő mértékegységben, referenciaérték nélkül végzik.
 - A kritikus értékek nincsenek jelezve, a döntéshozó figyelmét semmi nem hívja fel, nincs megfelelően dokumentálva. Mindkét esetben a hibák csökkentése a POCT-készülék(ek) és a beteg adatbázisának közvetlen informatikai összekötésével oldható meg.

RIZIKÓ-MANAGEMENT A POCT TERÜLETÉN

A POCT-diagnosztika biztonságát növelő számos javaslat ellenére (College of American Pathologists, National Institute of Health, USA, ISO) jelenleg az irodalomban a leggyakrabban idézett veszélyforrások a következők:

- A minőség-ellenőrzés végrehajtása és dokumentálása.
- Külső jártassági vizsgálatban nem kielégítő részvétel.
- Megfelelő helyesbítő eljárás megléte nem megfelelő kontrollértékek esetén.
- A gyártó előírásainak maradéktalan betartása.
- Eljárás a mérés végrehajtására és az eredmény közlésére.
- A kalibráció verifikálása háromhavonta, dokumentált formában.
- A személyzet oktatásának és kompetenciájának nyilvántartása.
- A személyzet folyamatos továbbképzésének megvalósítása.

A POCT-GYAKORLAT MINŐSÉGIRÁNYÍTÁSI RENDSZERE

A POCT-diagnosztika minőségirányítási rendszerének biztosítani kell a megbízható központi laboratóriumi teszttel összevethető eredményszolgáltatást és az ezt biztosítani tudó személyzet képzését, valamint a műszerek kiválasztását, ellenőrzését. A minőségirányítás a következő szempontokra terjed ki:

- Az új/alternatív POCT-készülékek, rendszerek kiértékelése.
- A felhasználó javaslatainak és szakmai protokolljainak kiértékelése.
- A műszerek beszerzési és installációs folyamatainak ellenőrzése.
- Reagens- és fogyóanyag-beszerzések, karbantartások gyakorlata.
- A POCT-kezelők folyamatos képzése, jogosítványhoz juttatása és újvizsgáztatása.
- Minőségi kontrollok, minőségbiztosítás.

A POCT-vizsgálatok minőségének biztosítása

A vizsgálatok minőségének biztosítása és annak ellenőrzése a laboratórium feladata. A minőség biztosítása azonos alapelveken alapul, mint a laboratóriumban elvégzett egyéb vizsgálatok minőségének biztosítása. Módszerleírásokban kell rögzíteni a POCT-vizsgálatok módszertani alapelveit, a módszer korlátait, a kvantitatív mérés elvégzésének kritériumait, analitikai és diagnosztikai érzékenységét és specificitását. Meg kell határozni a kötelező belső kontrollvizsgálatok gyakoriságát és a teendőket nem elfogadható kontrollok esetén. Nyomon kell követni a mérési bizonytalanságot, a visszavezethetőséget, és dokumentálni kell a POCT-módszerrel és hagyományos laboratóriumi módszerrel egyaránt mért paraméterek egymással való összevethetőségét.

A POCT-vizsgálatokat kötelező bevonni a külső minőség-ellenőrzés körébe. POCT- és hagyományos laboratóriumi vizsgálattal egyaránt végzett vizsgálatok esetében minden kétséget kizáróan megállapíthatónak kell lenni, hogy az adott külső minőség-ellenőrzési eredmény melyik módszerrel készült. A POCT-műszerek rendszeres, gyártó által előírt karbantartási protokollját és a karbantartás elvégzésének tényét dokumentálni kell. A laboratóriumi szak személyzetnek a minőségbiztosítási feladatok ellátása céljából mindenkor szabad bejárást kell biztosítani a POCT laboratóriumi berendezésekhez.

A POCT-vizsgálatok kivitelezése, a vizsgálatokat végző személyzet oktatása

POCT-vizsgálatot kizárólagosan erre kioktatott, írásban felhatalmazott személyzet végezhet az előzetesen engedélyezett, azonosítóval ellátott helyen, az adott fekvőbeteg-ellátó intézmény POCT-szabályzatában rögzített minőségügyi és módszerleírások alapján.

Az oktatást a laboratórium vezetője köteles megszervezni és dokumentálni. Az oktatásba be kell vonni az érintett klinikai osztályok vezetőjét is. Az oktatásnak ki kell térni a POCT-berendezések biztonságos és szakszerű használatára, a műszer korlátaira, a minta típusára, a mérési interferenciákra, a műszer sajátjaiból adódó interpretációs kérdésekre, a felhasználó által elkövethető leggyakoribb hibákra, a minőségbiztosítás kivitelezésére és a vizsgálatok elvégzése során a személyzetet érintő veszélyforrásokra. Oktatni kell az elvégzett vizsgálatok dokumentálásának módját. Fontos a kapott POCT-eredmények értékelésének és alarm értékek esetén a teendők meghatározásának oktatása. Az oktatást (oktató, résztvevők) írásban dokumentálni kell, és meg kell határozni a kapott „jogosítványok” érvényességi idejét és az újraoktatás időpontját.

A POCT-vizsgálatok adatkezelése

A POCT-vizsgálatokat a laboratóriumi vizsgálatokkal azonos módon kell dokumentálni. Az eredményről, leletről másolatot kell készíteni a laboratórium számára, és azt a laboratóriumi informatikai rendszerben (LIR) rögzíteni kell (a betegeredmények követhetősége, OEP-elszámolás érdekében) olyan módon, hogy a POCT-mérések egyértelműen elkülöníthetők legyenek a hagyományos laboratóriumi tesztekétől (pl. a mérést végző, ill. elfogadó személy kódjának feltüntetésével).

IRODALOM

- CASAGRANDA, I.: Point-of-care testing in critical care: the clinician's point of view. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48(7):931–934, 2010.
- COWIE, M. R.: Clinical applications of B-type natriuretic peptide (BNP) testing. *European Heart Journal* 24:1710–1718, 2003.
- DI SERIO, F.: Integration between point-of-care cardiac markers in an emergency/cardiology department and the central laboratory: methodological and preliminary clinical evaluation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43(2):202–209, 2005.
- MONTENY, M.: Point-of-care C-reactive protein testing in febrile children in general practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44(12):1428–1432, 2006.
- MORROW, D. A.: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Characteristics and Utilization of Biochemical Markers

- in Acute Coronary Syndromes. <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2006.084194>
- NICHOLS, J. H. (ed.): Laboratory Medicine Practice Guidelines Evidence-Based Practice for Point-of-Care Testing. American Association for Clinical Chemistry. 2006.
- NICHOLS, J. H.: Executive summary. The National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guideline: Evidence-based practice for point-of-care testing. *Clinica Chimica Acta* 379:14–28, 2007.
- PFÄFFLIN, A.: Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Anal. Bioanal. Chem.* 393:1473–1480, 2009.
- PLEBANI, M.: Does POCT reduce the risk of error in laboratory testing? *Clinica Chimica Acta* 404:59–64, 2009.
- PRICE, C. P.: Improving healthcare accessibility through point-of-care technologies. *Clin. Chem.* 53:1665–1675, 2007.
- ZANINOTTO, M.: PATHFAST NT-proBNP (N-terminal-pro B type natriuretic peptide): a multicenter evaluation of a new point-of-care assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48(7):1029–103, 2010.

Fehérjék mint tumormarkerek az orvosi laboratóriumokban

KŐSZEGI TAMÁS

A tumormarkerek jellemzői

A TUMORMARKER DEFINÍCIÓJA

Tágabb értelemben a daganatos állapotot jelző minden olyan eljárás, molekulakimutatás, amely segíti a klinikust a daganatos betegséggel kapcsolatos kérdések megválaszolásában és az orvosi döntések meghozatalában. Szűkebb értelemben az emberi szervezetből vett mintákban olyan molekulák és/vagy folyamatok nyomon követését jelenti, melyek mennyiségi és minőségi változásai összefüggésbe hozhatók a daganatmegelőző állapotokkal, ill. a már kifejlődött tumoros megbetegedéssel.

A tumormarkerek alapvetően két csoportra oszthatók:

- *Elsődleges (primer) markerek.* Olyan molekulák, amelyeket a daganatsejtek termelnek, és mennyiségi változásuk a vérből vagy a daganatszövetből kimutatható. Szerkezetük szerint igen sokfélék lehetnek: fehérjék, kis molekulatömegű hormonok, nukleinsavak stb. A daganatos sejtek sokszor „nem felejtene”, azaz részlegesen differenciálódnak azzá a szöveté, amelyből transzformálódtak, és képesek sok olyan molekula termelésére, amelyet az eredeti szövet is produkált. Így alakulnak ki pl. a hormontermelő tumorok vagy a plazmasejtes daganatok (myeloma malignum).
- *Másodlagos (szekunder) markerek.* A tumor növekedési sajátosságaiból és a szervezet válaszreakcióiból származó molekulák. Elvben bármilyen mérhető laboratóriumi paraméter felfogható szekunder markernek. Néhány példa: a csontrendszeret érintő folyamatoknál kalcium, kollagén-kereszt-kötések, epeút-elzáródásakor bilirubin, alkalikus foszfatáz, γ -GT, kiterjedt daganatoknál leukocytosis, thrombocytaszám, a CRP emelkedése stb. Ezek a paraméterek egyáltalán nem daganatspecifikusak, de jelzik a szervezet érintettségét.

Általános szempontok

A malignus transzformáció során szinte kivétel nélkül *egyetlen sejt alakul át* korlátlan osztódásra alkalmas állapotba. A transzformáció a sejt genetikai anyagának finom változásait jelenti (különböző mutációk, idegen nukleinsav beépülése, a DNS károsodása, kromoszómarendellenességek), egyszerre több változásnak is be kell következnie. Mindezek összességükben az egész genom információtartalmához képest elenyészően kicsiny eltérések, így amennyiben a transzformált sejt túlél, az átírt géntermékek (fehérjék) gyakorlatilag alig különböznek a kiindulási sejt fehérjéitől. A különbség az egészséges és a daganatos sejtek közt elsősorban a transzkripció megváltozásában rejlik, azaz a malignus sejtekben a sejtosztódást szabályozó fehérjék mennyiségi eltolódása következik be. Így válhatnak pl. a normálisan is átíródó protoonkogének valódi onkogénné. A valóság természetesen ennél sokkal bonyolultabb, de annyi bizonyos, hogy a daganatsejtekben elsősorban a szintetizálódott fehérjék mennyiségében és nem minőségében jön létre változás.

A másik fontos szempont a *daganatsejtek kimene-külése a szabályozási folyamatok alól*. Érvényes ez a növekedési sajátosságokra (invazív növekedés) és az általuk termelt biológiailag aktív molekulákra (növekedési faktorok, hormonok). A visszacsatolási folyamatok (feedback) a tumoros szöveteknél nem működnek, a daganatsejtek autonóm módon megtermelik a saját szaporodásukhoz szükséges növekedési faktorokat (pl. parakrin vagy autokrin szekrécióval), ill. a szervezet szükségleteitől függetlenül szintetizálják és szekretálják a hormontermészetű molekulákat. Sajátos mechanizmus működik myeloma multiplex esetében, itt a kóros plazmasejtté transzformálódott klón nem csak korlátlan szaporodásra képes, de kontrollálatlan immunglobulin-szekrécióra is. A transzformáció érinti az immunglobulin géneket is, a szintetizált termékek nem töltönek be hasznos védőfunkciót (paraproteinek), és az esetek egy részében nem is a teljes molekula termelődik, hanem annak egy lánc (nehézlánc-betegség, Bence–Jones-fehérje vagy szabad könnyűlánc).

A fehérje természetű primer tumormarkereknél nagy jelentőségűek a *poszttranszlációs mechanizmusok*. A megszületett fehérjék intracellulárisan vagy a

keringésben módosulnak, a leggyakrabban cukrok-kal lépnek kapcsolatba. Nagyon sok tumormarker glikoprotein vagy ún. mucingazdag protein, és módosult szerkezetük különbözhet az egészséges sejtekben termelt hasonló fehérjékétől.

Az orvosi terminológiában szokás a markereket tumorantigéneknek is nevezni. Ez általában helytelen, mert legtöbbjük az egészséges sejtekben is megtalálható gének produktuma, így a szervezet számára nem antigén sajátosságú. Amennyiben a markerek valóban antigének lennének, az immunrendszer képes lenne hatékonyan védekezni a daganatsejtek ellen. Létezhetnek azonban valódi, ún. *neoantigének* is, amelyek mutáció vagy poszttranszlációs módosulás következtében ténylegesen különböznek a normális génproduktumoktól. A tumorantigén kifejezés onnan ered és arra utal, hogy ha a tisztított tumormarkerrel egy idegen fajt (leggyakrabban egér, nyúl, kecske stb.) immunizálunk, akkor a beoltott állat specifikus immunoglobulinokat termel a beadott antigén ellen. Az állati eredetű, tisztított antitestek felhasználhatók a tumormarker kimutatására és/vagy mennyiségi meghatározására.

Peptid-fehérje tumormarkerek

A FEHÉRJE TERMÉSZETŰ TUMORMARKEREK EXTRACELLULÁRIS TÉRBE KERÜLÉSÉNEK MECHANIZMUSA

A sejtekben szintetizálódott fehérjék alapvetően két-féle funkciót tölthetnek be:

- Szerepük a sejten belül van, pl. struktúrfehérjék vagy a metabolizmusban vesznek részt.
- Funkciójukat az extracelluláris térben töltik be (pl. vérárvadási faktorok, albumin).

A primer tumormarkerek jelentős hányada peptid-fehérje természetű és az első csoportba tartozik. Ezért elsődlegesen akkor kerülnek ki az extracelluláris térbe, amikor a daganatsejtek elpusztulnak. A malignus sejtekre jellemző a fokozott turnover, a rövid generációs ciklus, pusztulásuk elsősorban nekrozissal történik a szervezet védekezése, a daganat esetleges rossz vérellátása vagy éppen a terápiás beavatkozások következtében. Mindezek ellenére a második típusú mechanizmus is előfordul, ilyenkor a malignus sejtek a markereket aktívan szekretálják (pl. peptidhormonok, paraproteinek). A szisztémás keringésbe jutó markerek egy része a vizeletben is megtalálható, ép vesefunkciónál csak az albuminnál kisebb (filtrációs küszöb alatti) molekulák, károsodott veséknél akár teljes immunoglobulinok is a vizeletbe kerülhetnek.

Az extracelluláris térbe kerülést befolyásoló egyéb tényezők

A tumormarkerek vérszintjét a fentiekén kívül még egyéb tényezők is befolyásolják (11-35. táblázat).

Az ideális fehérje természetű tumormarker jellemzői

1. Legyen specifikus, vagyis csak malignus folyamat esetében legyen kimutatható.
2. Legyen kellően érzékeny, hogy a daganatos folyamatot minél korábbi stádiumában jelezze.
3. Legyen szövet/sejt specifikus.
4. Vérszintje korreláljon a tumorsejtek mennyiségével.
5. Legyen jósló (prediktív, azaz maximális előrejelző) értéke.
6. Legyen megbízhatóan mérhető.

Sajnos az eddigiekben vázoltak alapján az első három pontban felsorolt követelmények nem teljesülnek maradéktalanul. A laboratóriumi vizsgálatoknál

11-35. táblázat. Tumormarkerek vérszintjét befolyásoló mechanizmusok

Meghatározó tényező	Mechanizmus
produkció	a szintézis sebessége a sejtben
szekréció	a sejtől való kiáramlás sebessége (aktív vagy passzív folyamatok)
a szövet vérellátása	oxigenizációs, nutritiós tényezők
szövetszétesés	a sejt-turnover sebessége, terápiás beavatkozások
elimináció	a külvilág felé (pl. vizelet útján) vagy természetes metabolizmussal

ismert, hogy egy módszer diagnosztikai specificitása és szenzitivitása gyakorlatilag sohasem éri el a 100%-ot; ha a diagnosztikus küszöbérték változtatásával növeljük a szenzitivitást, akkor csökken a specificitás és fordítva. Mindennek oka az, hogy az egészségesekre jellemző referenciatartomány átfedést mutat a betegekre jellemző patológiás tartománnyal.

Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a legtöbb marker referenciatartománya az egyénre jellemző és ebben az örökletes tényezőkön kívül életmódi szokások (pl. dohányzás) is szerepet játszhatnak. A tumormarkerek jelentős hányada ezen kívül nem szövetspecifikus, vagyis ugyanazt a markert többféle daganatsejt is termelheti.

Ugyanakkor a felsorolás utolsó három feltétele jó részt teljesül. A vérszint jó korrelációt mutat a malignus sejtek számával, vagyis a daganat tömegével. Itt jegyzendő meg, hogy a mai érzékeny analitikai módszerekkel is kb. 1 g tumormassza (kb. 10^9 sejt) szükséges ahhoz, hogy a vérbe kihíguló marker mennyisége detektálható legyen. A prediktív értékről, a klinikai felhasználásról és a mérési technikákról a fejezet későbbi részeiben lesz szó.

A peptid-fehérje tumormarkerek felosztása és jellemzői

• Onkofötális markerek

CEA, carcinoembryonalis antigén

Normálisan az embrionális életben termelődő sejt-felszíni glikoprotein, a sejtadhézióban tölt be fontos szerepet. A születés után szintézise gyakorlatilag a kimutathatóság határára csökken. Felnőttekben először emésztőrendszeri daganatoknál mutatták ki emelkedett vérszintjét, az ILszelektin és az E-szelektin ligandja, szerepe valószínűleg a metasztázisok kialakulásában fontos. Colontumoron kívül gyomor-, hasnyálmirigy-, tüdő-, emlő- és medullaris carcinoma markere is lehet, típusos példáját adva annak a ténynek, hogy a markerek jelentős része nem szövetspecifikus. Nem tumoros folyamatokban is emelkedett lehet: erős dohányosoknál, gyulladásos bélbetegségekben, májcirrhosisban.

AFP, α -fötoprotein

Szintén a magzati életben, az embriózsák és a máj által termelt fehérje, amely ekkor az albuminhoz hasonló funkciót tölt be. 591 aminosavból álló glikoprotein, felnőttkorban szintézise minimálisra csök-

ken, funkciója ismeretlen. Az AFP több izoformában fordul elő a keringésben. Rutinszerű meghatározásakor az összes (total) AFP mennyiségét mérjük, de ma már lehetőség van az L3-forma szelektív mérésére is. Az L3 részesedése a total AFP-ből (L3%) prognosztikai marker: minél nagyobb az L3 százaléka, annál nagyobb a májcarcinoma kifejlődésének kockázata és a rossz prognózis lehetősége. Az AFP-értékek emelkedettek hepatocellularis carcinomában és csírasejtes (de nem seminoma) daganatokban. Krónikus, nem malignus májbetegségekben is emelkedett az AFP (krónikus hepatitis, májcirrhosis).

• Hormonok

Kalcitonin

32 aminosavból álló polipeptid, a pajzsmirigy parafollicularis sejtjeiben (C-sejtek) termelődik. Emelkedett szérumszintet mutat a pajzsmirigy medullaris carcinomájában, a CEA markerrel együtt.

PTH, parathormon

84 aminosavból álló polipeptid, a mellékpajzsmirigy sejtjei termelik. A mellékpajzsmirigy adenomájában vérszintje megemelkedik (primer hyperparathyreosis). Primer folyamatoknál előfordul, hogy ectopiás (nem a célmirigyben, hanem azon kívüli) hormontermelés jön létre. A sebészi eltávolítás során lehetőség van ún. intraoperatív PTH-meghatározásra, mert a PTH féléletideje a periférián 4 perc. Sikeres műtéti beavatkozás után a PTH-szintnek a referenciatartományba kell visszatérnie.

PTH related protein, parathormonszerű fehérje

A PTH-hormoncsaládhoz tartozó fehérje, fiziológián a csontrendszerre és az emlőmirigy fejlődésére hat endokrin, parakrin, autokrin mechanizmusokkal. Emelkedett vérszintje többféle malignus tumorhoz társulhat: emlő-, tüdő laphámsejtes carcinoma. A hormont szekretáló daganatok esetében a szérumkalciumszint megemelkedik, gyakran ez a jelenség hívja fel a figyelmet a malignus folyamatra (paraneoplasias tünet).

β -hCG, β humán koriongonadotropin

A hCG elsődlegesen terhesség alatt termelődik nagy mennyiségben, először a fejlődő embrió, később a placenta által. A hCG 244 aminosavból álló dimer (α - és β -alegység), az α rész az LH, FSH és TSH hasonló alegységével azonos. Csírasejtes tumorok és trophoblastrendellenességek (mola hydatidosa, choriocarcinoma) esetében a β -alegység vérszintje igen

magas lehet. Fontos a β -alegység szelektív mérési lehetősége – monoklonális antitestekkel –, hogy az esetleges keresztreakciókat az LH, FSH, TSH hormonnal elkerüljük.

- **Enzimek**

PAP, prostata savi foszfatáz

Mérésének ma már nincs különösebb jelentősége, mert a PSA-vizsgálat lényegesen több információt ad.

PSA, prostataspecifikus antigén

34 kDa tömegű szerin típusú proteáz, amely gyakorlatilag csak a prostatában termelődik. Feladata az ondó elfolyósodásának és a cervicalis nyák feloldásának, így a megtermékenyítésnek az elősegítése. A PSA a vérben szérumfehérjéhez kötött és nem kötött, úgynevezett szabad PSA (fPSA) formában van jelen. Ma már lehetőség van külön a total PSA (tPSA) mérésére, ahol mindkét formát detektáljuk és külön az fPSA meghatározására. fPSA-mérést csak akkor végzünk, ha a tPSA meghaladja az adott életkorra jellemző referenciatartomány felső határát. Az fPSA/tPSA arány számításának külön információs értéke van, kóros tPSA és 25% alatti fPSA arány malignus folyamatot valószínűsít, míg 25% feletti arány esetében inkább jóindulatú prostatahypertrophia jön szóba. A prostata betegségein kívül a PSA ritkán emelkedett lehet emlő, tüdő, méh- és vesedaganatoknál is.

- **Mukoprotein markerek (CA)**

CA 15-3

Nagy molekulatömegű, mucinban gazdag fehérje, amely megtalálható egészséges és daganatos szövetek hámsejtjeiben (emlő, bél, tüdő, petefészek, hasnyálmirigy). A MUC 1 gén terméke, glikoprotein, amelynek glikozilációja malignus folyamatokban az egészségesre jellemzőtől eltérő lehet. Monoklonális antitestekkel a CA 15-3 detektálható és mennyiségiileg meghatározható. Elsősorban emlőtumorban alkalmazzuk.

CA 125

A MUC 16 gén terméke, glikoprotein. Funkciója elsődlegesen a hámsejtek védelme pl. a cornea, a tüdő és a női nemi szervek esetében a kórokozókkal és a kiszáradással szemben. Malignus folyamatokban elsősorban petefészekrákban találhatunk emelkedett értékeket. Emellett ritkán más tumoros állapotban is jelezhet (tüdő, emlő, bélrendszeri stb.). Kismértékű vérszintnövekedést láthatunk a hasüregben zajló

benignus gyulladással járó folyamatoknál, egyéb petefészek-rendellenességeknél és terhességben.

CA 19-9

Glikoprotein, nagy szíalsavtartalommal (másképpen *szíalsavas Lewis (a) antigén*). A hasnyálmirigy, a gyomor és a vastagbél daganatsejtjeinek adhézióját segíti. Gyakran negatív eredményt ad daganatos betegségekben és hamis pozitívat benignus folyamatokban, pl. az epevezeték és a máj betegségeiben.

CA 72-4

Más néven tumorasszociált glikoprotein (TAG 72). Nagyon nagy molekulatömegű, mucinban gazdag fehérje, amelyet sokféle malignus tumorban kimutattak (emlő, vastagbél, hasnyálmirigy, gyomor). Jelenleg a gyomordaganatoknál vizsgálják klinikai használhatóságát, mert a gyomortumorsejtek gyakran nem szekretálnak markereket (némák). Benignus folyamatoknál is emelkedhet a vérszintje (pl. krónikus májkárosodás, benignus ovariumdaganatok).

- **Egyéb fehérje markerek**

CYFRA 21-1

Citokeratin 19 fragmens, 30 kDa molekulatömegű. A citokeratinok az intermedier citoszkeleton filament családba tartoznak, a hámsejtekre jellemzőek. A daganatos sejtekből (pl. nekrosis következtében) kiszabaduló filamentek degradálódnak és így kerülnek a keringésbe. A CYFRA 21-1 nevű fragmens meghatározása a nem kis sejtű tüdődaganatoknál a legeredményesebb, jóllehet figyelembe kell venni, hogy benignus légzőrendszeri betegségekben és más malignus daganatokban is emelkedett vérszinteket találhatunk (urológiai, nőgyógyászati, emésztőrendszeri daganatok).

TPA

Szöveti polipeptid-antigén. Keringő fehérjekomplexek, amelyeket a citoszkeleton 8-as, 18-as és 19-es citokeratin komponensének degradációs termékei alkotnak. A citokeratinok minden hámsejtben megtalálhatók, így a hámsejt eredetű tumorokban is (tüdő, emlő, bél, hólyag).

A fokozott sejtproliferáció jelzője, univerzális tumorasszociált antigénnek tekinthető. Felezési ideje egy nap, ebből következően gyorsan és érzékenyen jelzi a tumoros folyamatok változását.

β_2 -mikroglobulin

Az MHC I. osztályú hisztokompatibilitási antigén része, minden magvas sejt felszínén megtalálható.

Myeloma malignum esetében a kóros plazmasejtklónból fokozott mértékben kerül a keringésbe részben a sejtek elhalása, részben aktív szekréció által, így a betegség aktivitását tükrözi. Kis molekulatömegű, ezért a vese filtrálja, de ép veseműködésnél a tubulusokból reabszorbeálódik.

Tireoglobulin (Tg)

660 kDa tömegű fehérje, a pajzsmirigy sejtjei termelik, részt vesz a tirozin jodinálásában és a kész pajzsmirigyhormonok tárolásában. Vérszintje a működő pajzsmirigyszövet mennyiségével arányos, ezért tumor miatti pajzsmirigy-eltávolítás után – amennyiben a műtét sikeres volt – szérumkoncentrációjának a kimutatási határ alá kell csökkennie. Mindezek alapján a Tg-t tumormarkernek is tekintjük.

Ferritin

A ferritin óriásmolekula, alapvető funkciója a felszívódott vas tárolása és leadása a szervezet vasszükségleteinek megfelelően. Elsősorban a májban és a bélhámsejtekben termelődik, vérszintje a vasraktárak telítettségét tükrözi. Emelkedett ferritinszintet találtak emlő-, máj-, vese- és néhány hematológiai malignitás esetében, a vasztátustól függetlenül. Feltételezhető, hogy a tumoros sejtek fokozott szétesése vagy aktív ferritinszekréciója miatt emelkedik a ferritinkoncentráció a vérben, de nem kizárt a daganatos betegséget kísérő gyulladásos válaszreakció sem (akut fázis fehérje). Mindent együttevén a ferritin az egyik legkevésbé specifikus tumormarkernek tekinthető.

Timidin-kináz

Két izoformája fordul elő, az 1-es és a 2-es. Katalizálják a timidin foszforilálódását. A TK1 citoplazmatikus lokalizációjú és aktivitása a sejtciklust követi, ezért szérumkoncentrációja arányos a sejtproliferáció mértékével. E sajátosságának köszönhetően tumormarkerként is alkalmazható különböző lymphomákban és leukaemiákban, ill. szolid tumorokban is (kissejtes tüdő-, prostata-, emlő-, colorectalis carcinoma, lap-hámsejtes fej-nyaki rákok) önállóan vagy más markerekkel kombinálva.

S100 protein

Kalciumkötő, kisméretű fehérjecsalád, számos sejtfunkció szabályozásában vesz részt. α - és β -alegységek különböző kombinációiban fordul elő, eredetileg az agyban mutatták ki, vérszintje egészségesekben alacsony, de agysérülések, idegsebészeti beavatkozások, agyi hypoxia következtében megemelkedik. Az

α - β alegységgel jellemezhető proteint a melanomasejtek is szintetizálják, így az a melanoma malignum tumormarkerének is tekinthető. Sajnos kezdeti stádiumban a vizsgálat nem mutat kellő szenzitivitást, a progresszióval azonban klinikai jelentősége nő. Meghatározható külön az S100B protein is, a β -alegység ellen termeltetett antitest segítségével.

HE4, humán epididymisprotein-4

Az ovarium hám eredetű, serosus malignus tumorokban szekretált glikoprotein, amelynek expressziója a transzformált sejtekben megnő. Benignus folyamatokban és cystákban vérszintje nem vagy alig emelkedik, ezért érzékenyebb markernek tekinthető a Ca 125-nél. A legjobb eredmény akkor várható, ha a két marker meghatározását együttesen használjuk a betegek követésekor.

A neuroendokrin rendszer fehérje markerei

Lásd A fehérjék, mint neuroendokrin hormonok a klinikai laboratóriumi kutatásokban című fejezetben.

Tumormarkerek használata az orvosi gyakorlatban

Szűrés

A legtöbb marker specificitása és szenzitivitása túl alacsony ahhoz, hogy a daganatos betegséget korai stádiumban jelezze. Ezért a tumormarkerméréseket szűrésre nem alkalmazzuk, néhány kivételtől eltekintve.

A kalcitoninmeghatározást akkor végezzük ilyen célból, ha a beteg családjában már volt medullaris carcinoma betegség, mert családi halmozódás előfordulhat. A kalcitoninmérés érzékenysége és fajlagossága ilyen esetben megközelíti a 100%-ot.

A tPSA-meghatározást általában 50 éves életkor felett széles körben alkalmazzák szűrésre. A felső küszöbértéket (nálunk ez általában 4,0 ng/ml) meghaladó eredmény esetében az fPSA-mérést is elvégezzük. A módszer szenzitivitása és specificitása meghaladja a 90%-ot, jóllehet rengeteg tanulmány foglalkozik a PSA-teszt klinikai eredményességével, és sokan megkérdőjelezik annak hatékonyságát.

Egy biztos: sohase feledjük, hogy a tumormarkerméréseket ki kell egészíteni más vizsgálóeljárásokkal (pl. fizikális, képalkotó, szükség esetén biopszia).

Diagnózis felállítása

Tumormarker-eredmény alapján sohasem szabad definitív diagnózist megállapítani. Ennek oka nem csak a markerek eddig felsorolt biológiai korlátja, hanem jónéhány analitikai interferenciával és következetes hamis eredménnyel is számolhatunk. A betegek egy részében a rheumafaktor titere magas lehet, vagy rendelkeznek heterofil állati immunglobulin-ellenes antitestekkel. Sok betegben autoimmun folyamat eredményeként magas az anti-Tg autoantitest mennyisége a vérben. Ilyenkor az endogén antitestek a tumormarker-meghatározás során alkalmazott immunoassay-kben interferálhatnak a módszerrel és hamisan alacsony vagy magas értéket eredményezhetnek. A tumormarkermérések valójában inkább megerősítő jellegűek, jóllehet elsősorban a neuroendokrin rendszer daganataiban az első, tumort valószínűsítő észlelet gyakran a nagy biológiai hatást kifejtő hormon szintváltozásának kimutatása. Azonban itt is egyéb megerősítő vizsgálatokat kell végezni. A helyzetet nehezíti, hogy a neuroendokrin tumorok általában igen kis méretűek és kimutatásuk képalkotó eljárásokkal nehéz.

A betegség és a terápia követése (monitorozás)

A tumormarkermérések klinikailag legjobban alátámasztott területe a monitorozás. Ennek legfőbb oka, hogy a markerek vérszintje és a tumorsejttömeg viszonylag jó korrelációt mutat egymással. A követéses vizsgálat legfontosabb szempontjai:

- Mindig legyen kiindulási, a terápia megkezdése előtti markerszint az összehasonlíthatóság érdekében.
- Annnyiféle markert monitorozunk, amennyi biológiailag és technikailag lehetséges, a markerkombinációk több esetben lényegesen emelik a szenzitivitást.
- A monitorozás gyakoriságát általában nem a marker féléletideje határozza meg, hanem a betegség súlyossága és az alkalmazott terápia intenzitása.
- A markereket mindig ugyanabban a laboratóriumban és ugyanazzal a módszerrel monitorozzuk, mert az eredmények sokszor készülék- és módszerfüggők.

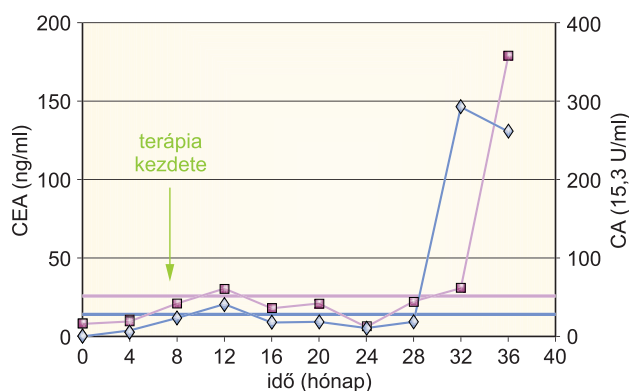
- Eredményes terápia során átmeneti markerkoncentráció-növekedés is lehet a fokozott sejtpusztulás következtében.
- A követés során, amennyiben konzekvens markerszint-emelkedést észlelünk (akár a referenciatartományon belül), a relapszus lehetősége fennáll

Prediktív érték

A követéses vizsgálatoknál a tumormarker-vizsgálatoknak mind a negatív, mind a pozitív prediktív (jósló) értéke jónak mondható, azonban függ az adott marker diagnosztikai érzékenységétől és specificitásától. Az 11-74. ábrán egy metasztatikus emlődagában szenvedő nő CA 15-3 és CEA értékeinek követését látjuk.

A referenciatartományon belüli növekedés jelzi a relapszust, a terápia során átmeneti markerszint-emelkedés látható. A terápia kezdeti sikerét a markerkoncentráció csökkenése jelzi, majd az újabb relapszust a meredek emelkedés. A nagy markerkoncentrációk a betegség kedvezőtlen prognózisát jelzik (pozitív prediktív érték).

A tumoros állapotra jellemző peptid-fehérje spektrum kutatása az elválasztási módszerek és a tömegspektrometria fejlődésével egyre inkább előtérbe kerül. Különösen az albuminnál kisebb méretű, gyakran a fehérjék degradációja során kialakult peptidek mutatnak az egészséges egyénétől eltérő mintázatot. Erről az ígéretes módszerről a tömegspektrometriát tárgyaló fejezetekben olvashatnak.



11-74. ábra. Emlőtumoros beteg követése

IRODALOM

- KOPROWSKI, H., HERLYN, M., STEPLEWSKI, Z. et al.: Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 212(4490):53–55, 1981.
- UGORSKI, M., LASKOWSKA, A.: Sialyl Lewis a: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochimica Polonia* 49(2): 303–311, 2002.
- PERKINS, G. L., SLATER, E. D., SANDERS, G. K. et al.: Serum tumor markers. *Am. Fam. Physician* 68:1075–1082, 2003.
- DIAMANDIS, E. P., FRITSCH, H. A., LILJA, H. et al. (eds): *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*. AACCC Press, 2002.
- HANAUSEK, M., WALASZEK, Z. (eds.): *Tumor marker protocols*. Humana Press, 2010.
- https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=12676
- http://tlc.istep.org.tw/ntu/Stream/nano/sec11/%E5%A5%88%E7%B1%B3%E7%94%9F%E7%89%A9%E6%8A%80%E8%A1%93_3.pdf

Cardialis markerek laboratóriumi diagnosztikája és információs értéke a klinikumban

LUDÁNY ANDREA, KŐSZEGI TAMÁS

Az akut myocardialis infarctus diagnózisa

A cardialis laboratóriumi markerek szerepének megítélése egyre nagyobb hangsúlyt kap a mellkasi fájdalmak és az akut coronaria-szindrómára gyanús esetek diagnosztikájában, a rizikó (a veszélyeztetettség) megállapításában és a sikeres kezelésben. Néhéz a „klinikai diagnózis”, ha a betegség klinikai jelei hiányoznak, mint pl. az ún. tünetmentes akut coronaria-szindrómában. A legtöbb betegben a kezdeti EKG sem diagnosztikus értékű. Ez magyarázza, hogy a későbbiekben szívinfarctusnak nem bizonyult és osztályra felvett betegek nagy számával ellentétben, a fel nem ismert esetek száma ma is 1,5–2,0%-ra tehető a nemzetközi adatok szerint.

A ma érvényes amerikai és európai kardiológiai útmutatóban (ACC és ESC) az akut myocardialis infarctust (AMI) egybehangzóan újradefiniálták. E szerint a szívmarkerek és főként a cardialis troponin az akut myocardialis infarctus új definíciójának középontjába került.

Az akut myocardialis infarctus diagnózisa most, az útmutató szerint a következő *kritériumok* egyikén alapul:

1. A cardialis biomarkerek (lehetőleg a troponin) szintjének emelkedése, csökkenése vagy mindkettő; legalább egy értéknél a felső referenciahatárt meghaladóan, és a felsoroltak közül legalább egy, a myocardialis ischaemiára utaló nyilvánvaló jellel:
 - Ischaemiás tünetek.
 - Az EKG-n új patológiás Q-hullám.
 - Ischaemiás EKG-változások (új ST-T vagy új bal szárblokk).
 - Új nyilvánvaló változások a képalkotó vizsgálatnál.
2. A percutan coronariabeavatkozás során az eredetileg normál troponin alapérték a referencia felső határérték több mint háromszorosára emelkedése.

3. Hirtelen váratlan szívhalált megelőző típusos klinikai tünetekkel, EKG-jelekkel vagy a coronaria angiográfia/bonclelet friss thrombosis igazolásával.
4. A myocardialis infarctus patológiai elváltozásai.

Az eredeti WHO beosztástól az AMI új definíciója szignifikánsan különbözik. Azt a beteget, akinek emelkedett troponin értéke van negatív CK-MB mellett, korábban instabil anginaként diagnosztizálták (minor myocardialis károsodásként), ma mint non-ST-szegment emelkedést, myocardialis infarctusként diagnosztizálják (NSTEMI) még akkor is, ha hiányoznak az EKG diagnosztikus jelei. Az új standardok alkalmazása a myocardialis infarctus definíciójában jelentős előrelépést jelent a cardialis biomarkerek használatában. Gondoljunk például a sürgősségi betegellátásra akut coronaria-szindróma gyanúja esetén.

Az instabil anginával és az AMI-val foglalkozó kórélettani tanulmányok közös patológiás utat állapítottak meg, amely az érfali plaque (felrakódás) akut felszakadásával kezdődik. A thromboticus események sorozata vezet végül a thrombus kialakulásához. Az infarctus vagy ischaemia ezt követő klinikai eseményei az elzáródás mértékétől és a kollaterális vérátáramlás (ha van egyáltalán) jelenlététől függnak. Kórélettani tényekre támaszkodva az akut coronaria szindróma kifejezést (ACS) ma egy egész klinikai spektrumra használjuk, mely a kezdődő anginától terjed az ST szegment emelkedéssel járó akut myocardialis infarctusig (STEMI).

Az akut coronaria-szindróma jelenlegi cardialis markerei

Cardialis troponinok

A troponinok a vázizomban és a szívizomban található szabályozó proteinek. A három alegység, amelyet identifikáltak, troponin I-t (TnI), troponin T-t (TnT) és troponin C-t (TnC) tartalmaz. A troponin C (TnC) vázizom és cardialis izoformáit kódoló gének identikusak, úgy hogy nincs strukturális differencia közöttük. Ezzel szemben a troponin I és a troponin T szeptális és cardialis alformái különböznek, és az immunanalitika eljárások különbséget tesznek közöttük. Ez a cardialis troponinok szívspecifikusságának különlegessége. A szeptális TnI és TnT strukturáli-

san különböző. Nincs keresztreakció a szeptális és cardialis TnI és TnT között egy adott tesztben (11-75. ábra).

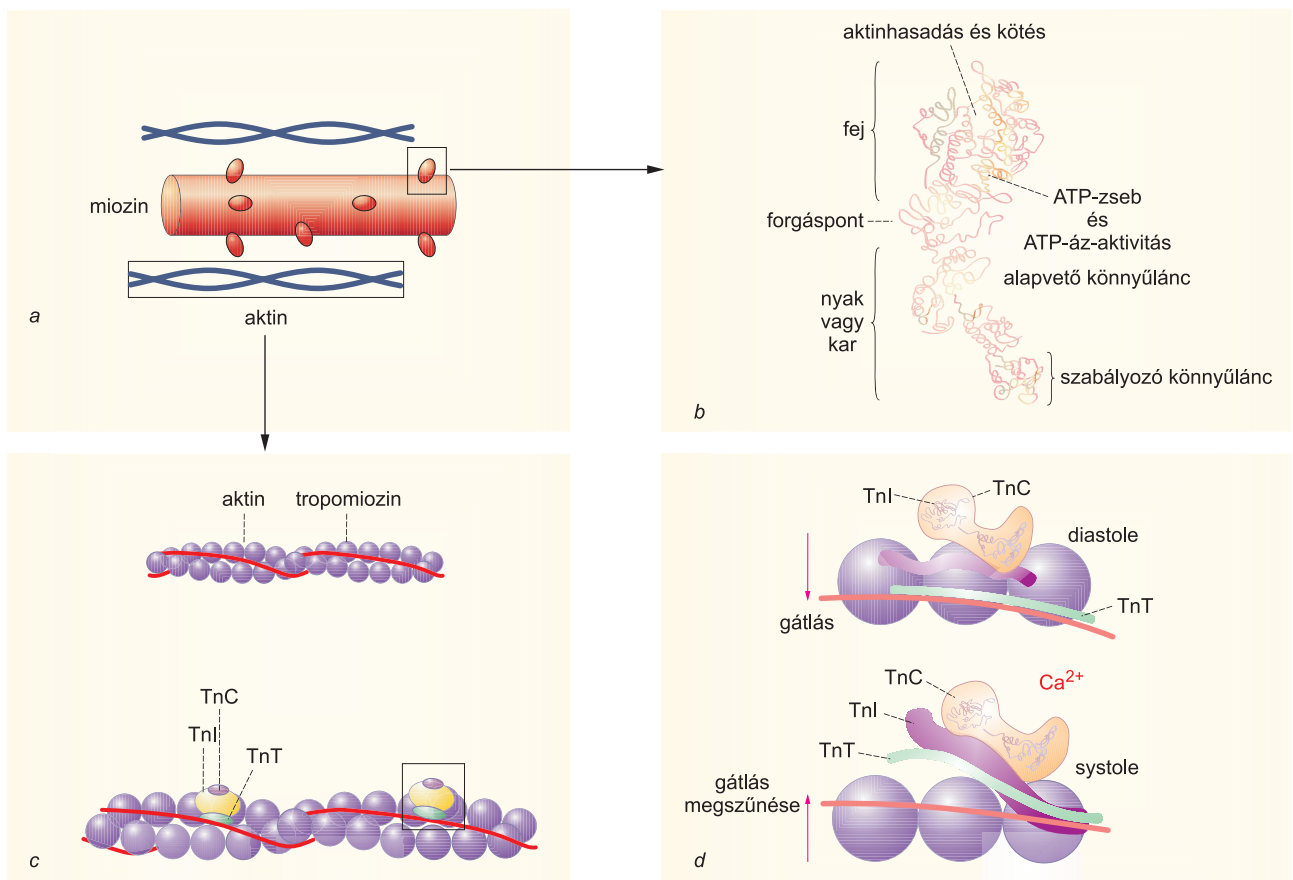
A cardialis troponinok release-kinetikájára irányuló korai tanulmányok azt jelezték, hogy ezek a sejt-komponensek nem tartoznak a cardialis nekrosis korai markereihez. A korai generációjú troponintesztek a szimptómák kezdetétől számított 4–8 órán belül szolgáltattak pozitív eredményeket, hasonló idő elteltével mint a CK-MB-kiáramlás. Ám a troponin 7–10 napig is emelkedett maradt az AMI kezdete után.

A cardialis troponinok kezdeti vizsgálataikor felfigyelték egy olyan instabil anginas maradék betegcsoportra, akiknél a CK-MB normális, de troponinértékeik emelkedettek voltak. Ezeknél a betegeknél nagyobb arányban fordult elő szerencsétlen cardialis esemény (halál, AMI) a felvételt követő 30 napban és a kórtörténet nagyon hasonlított az NSTEMI-betegkére.

Az emelkedett troponinérték alkalmas akut coronaria-szindrómás betegek *rizikóbeosztására*, és a magas rizikójú betegek olyan megelőzésére, mint akiknél nem kívánt kardiológiai esemény (halál, AMI) az elkövetkező 6 hónapban megtörténhet. Klinikai troponin- és CK-MB-tanulmányok megerősítik azt a megfigyelést, hogy bár az AMI diagnózisához mindkettő elég érzékeny és specifikus, de a CK-MB-nek sem prediktív, sem prognosztikus értéke nincsen.

A *cardialis troponinok* érzékeny kardiospecifikus markerek és prognosztikus információkat nyújtanak az akut coronaria-szindrómás (ACS) betegekről, ezért ezeket az *ajánlott cardialis markerként tartják számon*.

A fokozott (emelt) érzékenységgű és pontossággű troponintesztek bevezetésével az AMI-betegek 80%-ában a sürgősségi osztályra érkezést követő 2-3 órán belül emelkedett troponinértékeket kapunk. Ez a korábbi troponintesztek esetében csak mintegy 8–10



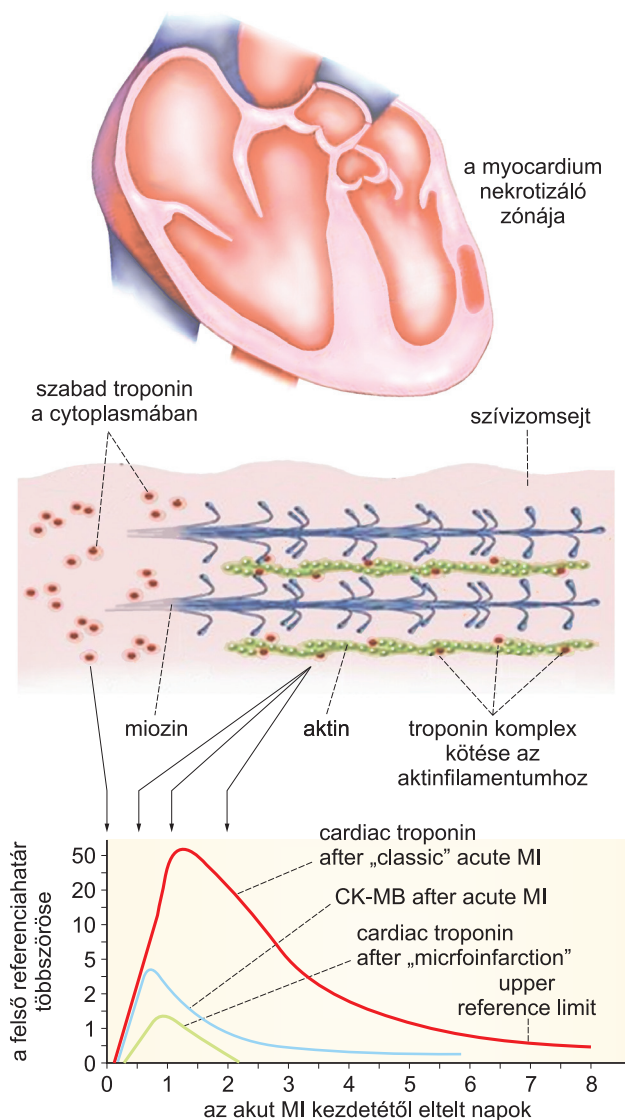
11-75. ábra. A troponinok organizációjának sematikus ábrázolása

- Aktin és miozin
- Miozinféj és -nyak
- Vékony filamentum
- Troponin I és troponin T

óra elteltével teljesült, és gyakran később emelkedett, mint a CK-MB-szint.

Az új troponintesztek az ún. korán emelkedő biomarkereket – mint pl. a mioglobin vagy a CK-MB-izomformák – kezdik a klinikai használatból kiszorítani (11-76. ábra).

2007-ben az Amerikai Kardiológiai Kollégium (ACC) egymást követő troponinméréseket ajánlott a nem típusos MI-betegek (NSTEMI) esetében a definitív diagnózishoz: a felvételt követő ún. alapérték és a 6–9 órás érték meghatározásával. Az AMI diagnózisához – a megállapított cut-off-érték fölött – csak egy emelkedett érték szükséges. A troponinértékek változása (emelkedése vagy süllyedése) szükséges a perzisztálóan magas troponinértékektől való elkülönítéshez (pl. vesebetegségeknel).



11-76. ábra. A szérum szívmarkereinek időbeni követése akut myocardialis infarctusban (AMI-ban)

Kreatin-kináz – MB-izoenzimek

A cardialis troponinok bevezetése előtt az ajánlott biokémiai marker az AMI diagnózisához a CK-MB-izoenzim-aktivitás volt. Kritériumként az AMI megállapításához a következő volt az elfogadott:

Két egymást követő emelkedés a diagnosztikus határérték (cut-off) felett, vagy egyetlen eredmény, amely magasabb, mint a felső referenciahatárérték kétszerese.

Jóllehet a CK-MB jóval koncentráltabb a myocardiumban (mintegy 15%-a a total CK-nak), a vázizomban is jelen van. A CK-MB szívspecifikussága nem 100%. Hamis pozitív értékek fordulnak elő számos klinikai állapotban, beleértve a traumát, a fizikai megerőltetést és a myopathiákat.

A CK-MB-release kinetikájának ismerete a klinikus számára fontos lehet. A CK-MB először 4–6 órával a tünetek kezdete után jelenik meg, a maximális szint 24 óránál jelentkezik, és 48–72 óra elteltével tér vissza a normális tartományba. Az AMI korai és késői (>72 óra) diagnózisában sajnos limitált a vizsgálat értéke. Kiáramlási kinetikája viszont igen hasznos lehet a reinfarctus felismerésében, az AMI-t követő csökkenés ilyenkor ismét emelkedő értékeket mutat.

A thrombolyticus terápiánál megállapították, hogy bár a CK-MB érzékeny és specifikus vizsgálat, a váratlan és veszélyeztető cardialis események előrejelzésében nem hasznosul és nincs prognosztikus értéke. Nagyszámú akut coronaria-szindrómás (ACS) beteg vizsgálata során azt találták, hogy az izolált CK-MB-emelkedésnek limitált prognosztikus értéke van ST-elevációval nem járó esetekben.

Relatív index, CK-MB és total CK

A relatív indexet a CK-MB (tömeg, mass)/totál CK arányából számítják. Segíthet a klinikusnak a hamis pozitív CK-MB-értékek – amelyek a vázizomból származnak – elkülönítésében. Ha az arány kisebb mint 3, ez a vázizomeredet mellett szól. Ha az arány nagyobb mint 5, szíveredetre utal. A 3–5 arány a „szürke zóna”, határozott diagnózist nem enged meg anélkül, hogy ismételt időbeni vizsgálatokkal emelkedést detektálnának.

A CK-MB/CK relatív indexet a CK-MB-emelkedés AMI infarctusspecifikusságának növelésére vezették be. Az érzékenysége viszont AMI-ban csökken, ha a cardialis és szkeletális izomkárosodás együtt van jelen. Ilyenkor pl. intenzív osztályokon a relatív inde-

xeken kívül az abszolút CK-MB-értéket is figyelembe szokták venni, ezáltal a specificitás kissé növelhető, az érzékenység egyidejű csökkenése mellett.

Végül is megállapítható, hogy a relatív index használata csak akkor „működik”, ha vagy cardialis, vagy vázizom-károsodás áll fenn, de nem mindkettő. Fontos megjegyezni, hogy a relatív indexet egyedül nem használjuk az AMI diagnózisához, ugyanis emelkedett lehet akkor is, ha a total CK vagy a CK-MB normális tartományon belül van. Az index klinikailag csak akkor alkalmazható, ha mindkét érték emelkedett.

Mioglobulin

A mioglobin felé azért fordult az érdeklődés, mert a myocardialis infarctus (MI) korai markereként tartják számon. Ismert hem protein, mind a vázizomban, mind a szívizomban megtalálható. Kis molekulatömege felel a gyors kiáramlási kinetikáért. A mioglobin az infarctus kezdetét 2–4 órával követően tipikusan emelkedik, a csúcsot 6–12 óra után éri el, és 24–36 órában tér vissza a normális értékre.

A rendelkezésre álló gyors mioglobin- (POCT-) tesztek nem szívspecifikusak. Egymást követő, 1-2 óránként ismételt vizsgálatokkal némileg növelhető a szenzitivitás és a fajlagosság. Az emelkedés vagy 1-2 óra elteltével 25–40%-os különbség egyértelműen sugallja az AMI-t. A legtöbb tanulmányban a mioglobin 90% diagnosztikus szenzitivitást ér el AMI-ban. A mioglobin negatív prediktív értéke nem elég nagy az AMI diagnózisának kizárására. A mioglobint értékelő eredeti régebbi tanulmányok, az AMI-t (WHO definícióként) még a CK-MB-re standardizálták. Az ESC/ACC troponinra standardizált új AMI-definíciónál a mioglobintesztek diagnosztikus érzékenysége jelentősen csökkent. Ez szignifikánsan csökkentette alkalmazását is, és a legújabban kifejlesztett troponintesztek a mioglobinméréseket talán szükségtelenné teszik.

Kreatin-kináz MB izoformjai

A kreatin kináz MB-izoenzimnek 2 izoformja van: CK-MB1 és CK-MB2. A CK-MB laboratóriumi meghatározása a CK-MB1 és CK-MB2 izoformnak mindegyikét jelenti. A CK-MB2 a szöveti izoform, és AMI után ez áramlik ki a myocardiumból. A periférián a szérumban CK-MB1-gyé alakul át. A tünetek kezdetét követően ez gyorsan történik.

A CK-MB-izoformokat nagyfeszültségű elektroforézissel lehet vizsgálni. Gyors leletmegfordulási idővel (turnaround time, TAT) bíró automata analizátorok is rendelkezésre állnak a mérésre. Számolják a CK-MB2/CK-MB1 hányadosát. Normálisan a CK-MB1 van túlsúlyban, ezért az arány jellemzően kisebb mint 1. Az eredmény pozitív, ha a CK-MB2 emelkedett és az arány több mint 1,7.

A CK-MB-izoformok kiáramlási sebessége nagy. A CK-MB2 a szérumban 2–4 órával a kezdet után detektálható, és a csúcsok 6–9 óra között jelentkeznek. Ez az AMI-nak egyik korai markere. Használatát két nagyobb tanulmányban értékelve az érzékenységét 6 órával a tünetek kezdetét követően 92%-nak találták, szemben a CK-MB 66% és a mioglobin 79% értékével. A hátránya ennek a módszernek, hogy kivitelezése személy- és időfüggő.

Mi a legjobb markerstratégia?

Minden egyes cardialis marker kiszabadulási kinetikájának megismerése a szimptómák kezdete óta eltelt idő jelentőségét hangsúlyozza. Az amerikai és az európai kardiológusok (ACC/ESC) által elfogadott útmutató az AMI diagnózisában a cardialis troponint tartja egyértelműen a legjobb markernek.

Az újabb cardialis troponintesztek bevezetése (nagyobb érzékenységük és kisebb cut-off-értékük miatt) a hagyományos korai markereket – mint a mioglobin és a CK-MB-izoformok – kiszorítja a használatból.

A sürgősségi ellátásban az amerikai orvosok legjobb cardialis markerstratégiaként olyan 3 szintű B-változatot ajánlanak, amely ki tudja zárni az ST-emelkedés nélküli myocardialis infarctust (NSTEMI) a sürgősségi osztályokon fekvő betegeknek:

- Egyetlen(?) negatív CK-MB, troponin I vagy troponin T a tüneteket követő 8–12 órában.
- Negatív mioglobin párosítva negatív CK-MB-mass méréssel, vagy negatív troponinmérési eredmény a felvételtől és 90 perc múlva, ha a beteg a tünetek kezdete óta 8 órán belül van.
- Negatív 2 órás CK-MB δ -érték együtt negatív 2 órás troponin I δ -értékkel, ha a beteg a tünetek kezdete óta 8 órán belül van.

Megjegyzésünk erre az ajánlatra:

Természetesen ez az ajánlat számos buktatót rejt magában, különösen az említett „egyetlen” troponinmeghatározás mint kritérium a viszonylag korai

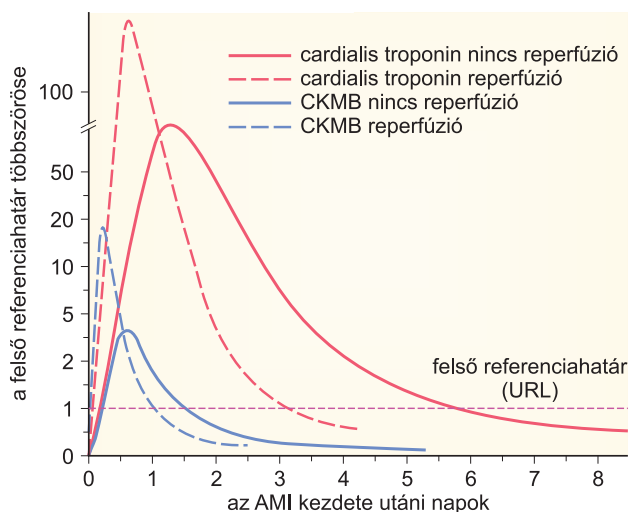
időperiódusban. A szimptómák megjelenését követően több mint 24 óra elteltével ajánlatosak inkább a troponinmeghatározással a beteget megítélni.

Az ajánlott ún. „ δ ”-mérések természetesen igénylik az adott tesztek variációs koefficienseinek az ismertetését is, és nem szabad azt sem elfelejteni az értékelésnél, hogy a referenciatartomány felső határ (cut-off) értékétől is függ a mérés pontossága adott tartományban.

További instrukciók

Folytatva az ajánlott instrukciókat, a laktát-dehidrogenáz végkép kihagyandó a marker stratégiából. A rendelkezésünkre álló cardialis markerekkel *ismételt mintanyerésből* kinetikát nyerhetünk. A minta nyelés ajánlott időpontjai a markertől függenek. A korai diagnózis fontossága esetén a 3-4 órás mintavétel, míg más esetekben a 6-9 órás mintavétel vezet célra.

Mikor tekinthetnek el a kardiológusok a cardialis marker eredmények ismeretétől? Ha a betegnek típusos ischaemiás mellkasi fájdalma van diagnosztikus EKG eltéréssel (ST eleváció), a beteg azonnali trombolitikus terápiának vagy érplasztikának a váromnyosa. A terápiás beavatkozás ilyenkor nem várhat a cardialis markerek eredményeire, annál is inkább, mert a szimptómák kezdete óta eltelt igen rövid idő (6 órán belül) miatt a teszt alacsony detektálási érzékenysége várható. Ilyenkor a re-perfúziós terápia azonnal elvégzendő (11-77. ábra).



11-77. ábra. Cardialis markerek követése a reperfúziós terápia sikerének megítélésében (STEMI: ST-elevációval járó myocardialis infarctus)

A cardialis markerek szerepe az akut coronaria-szindróma terápiás döntéseiben

Fejezetünkben azt hangsúlyoztuk, hogy a cardialis markerek döntőek mind diagnosztikus, mind prognosztikai szempontból. Klinikai vizsgálatok alapján napjainkban kezdik felvetni azt a kérdést, hogy mint indikátorok használhatóak-e az akut coronaria-szindróma specifikus terápiás beavatkozásaihoz. Jelenleg a terápiás stratégiák akut coronaria-szindrómában elsődlegesen csak a klinikai indikációkra szorítkoznak (pl. ischaemiás mellkasi fájdalom) vagy az EKG változásokra (pl. ST-eleváció vagy -depresszió). Nincs érvényes terápiás algoritmus olyan esetekre, amelyek klinikai és EKG-jelek hiányában izolált pozitív markereredményeken alapulnak.

Az ilyen kiemelt esetek klinikai vizsgálatai megerősítették, hogy a pozitív troponineredmény egyedülként független indikátora a magas rizikónak. Ezért az alacsony molekulatömegű heparin terápia (LMWH) és/vagy a thrombocytaaggregáció-gátlók (GIIB/IIIA inhibitorok) alkalmazása indokoltnak látszott és a legerősebbnek, legeredményesebbnek bizonyult az ilyen betegeknek, akiknél az emelkedett cardialis troponin magas rizikót jelzett.

Laboratóriumi medicina és a troponinok

A technológia fejlődése jelentősen megváltoztatta a cardialis troponinok klinikai laboratóriumi vizsgálatait. A harmadik generációs tesztek bevezetésével a kimutatási határérték egy századára csökkent a troponin T-nél (1 ng/ml-ről 0,01 ng/ml-re). A tesztek-nél a keresztreakció a vázizom eredetű troponinnal elhanyagolható. Más részről a point-of-care (POCT-) tesztek bevezetésével a leletmegfordulási idő a teljes vér analíziseknél jelentősen felgyorsult.

A gyors tesztek (POCT)

A szívmarkerek vizsgálatát a nap 24 órájában, a hét minden napján és 1 órán belül kell elvégezni (NACB ajánlás). A POCT olyan betegágy melletti eljárás, amely gyors eredményeket kínál minden olyan esetben, amikor a kórházi laboratórium nem tudja teljesíteni az előbbieket.

POCT-vizsgálatokra gyártott tesztek a CK-MB-re, a mioglobinra és a cardialis troponinokra (TnI és

TnT) egyaránt elérhetők kereskedelmi forgalomban. A TnT-nél viszont csak kvalitatív POC-teszt kapható, de TnI/POC tesztet mind mennyiségi, mind minőségi vizsgálatra forgalmazznak. Használatuk sürgősségi osztályokon különösen indokolt.

A troponinok döntési határértékei

Az értékeléshez néhány laboratóriumi alapfogalommal kell tisztában lennünk. Egy adott módszer *kimutatási határértéke* az a legalacsonyabb szint, amelyet a módszer jelezni képes, noha ennél a pontnál a mérés pontossága nem megfelelő. A 99 percentil a felső referenciahatár, a vizsgálat normális tartományának felső határát jelenti, és feltételezetten még normális, egészséges populációból származik. Azaz az egészséges felnőtt populáció 99%-ának értékei e határérték alatt vannak. A cut-off alatt az értékek feltehetőleg „normálok”, bár végül is a cut-off-érték a mindenkori módszer érzékenységétől függ.

Itt szükséges megjegyezni, hogy a döntési küszöbérték (cut-off) változtatásával egy teszt szenzitivitása és specificitása ellentétesen változik.

A jelenleg is használt módszerek értékelését óvatosan kell kezelni. Az aktuálisan a teszthez mellékelt referenciatartomány ugyanis egy heterogén betegpopulációra vonatkozhat – azaz a „valódi” normális csoporton kívül olyan egyének kis értékeit is tartalmazhatja, akik a magas rizikójú betegcsoportba tartoznak. Ez azt is jelenti, hogy a valódi normális populációhoz tartozó 99 percentiles cut-off-értékeknek valójában lényegesen (akár 10–50-szer) alacsonyabbnak kell lenniük a jelenleg megadottaknál. Vagyis általánosságban sürgetővé vált az ultraszenzitív troponinmérő módszerek kifejlesztése. Az ultraszenzitív troponintesztekhez végül is alacsonyabb cut-off-érték tartozik, ami a teszt diagnosztikus értékét növeli.

A variációs koefficiens (CV, vagy relatív standard deviáció) egy teszt eredményeinek változását (ingadozását, reprodukálhatóságát) fejezi ki. Akkor kapjuk, ha ugyanazt a mintát ismételten analizáljuk, és az átlagtól való eltérést százalékban fejezzük ki. Általában a CV-érték emelkedik, ha a mérési eredmény kicsi. A legalacsonyabb szintnél olyan magas a CV, amely jelzi ebben a tartományban a mérés pontatlanságát. Egy 10%-os CV még elfogadható, de akkor ideális, ha kisebb mint 10% a 99 percentil cut-off-szintnél. A jelenlegi troponinmérési módszerek leg többjénél ez nem teljesül.

A forgalomban kapható tesztek érzékenysége, fajlagossága és pontossága igen különböző. Ez visszavezethető a standardizáció hiányára, a különböző monoklonális antitestekre, a detektálandó TnI- és TnT-molekulák patológiás módosulataira, az ellenanyagok keresztreakcióira, amelyek a detektálható TnI-molekulák degradációiból erednek. Általában az immunkémiai analitikai technikák lumineszcens kimutatási elven alapulnak.

A TnT-módszert egyetlen előállító szabadalmaztatta, így a különbségek ennél a tesztnél elhanyagolhatóak. Mind a 99 percentiles cut-off-érték, mind a 10% CV a troponin T-tesztekre megállapított. Ezzel szemben akár 20-szoros különbségek fordulhatnak elő a kereskedelmi forgalomban jelenleg kapható nagyszámú TnI-teszt eredményei között, a saját 99 percentil cut-off-értékük magasságában és 10% CV mellett. Ezzel a problémával extrém esetben akkor találkozunk a klinikus, ha a kevésbé érzékeny gyors (POCT) TnI-tesztet követően a mintát újravizsgálják egy érzékenyített TnT-módszerrel a központi laboratóriumban.

Összefoglalva mind a sürgősségi orvosnak, mind a laboratóriumnak ismerni kell a rendelkezésre álló troponintesztek cut-off-értékeit a 99 percentil referenciahatárnál és az ehhez tartozó CV-értékeknél. Emlékeztetni kell arra az ACC/ESC által kidolgozott megegyezései definícióra, amely a következő: bármely emelkedése a mért troponinnak 10% CV vagy a 99 percentil referenciahatár fölött megfelelő klinikai állapotban myocardialis infarctusnak tartandó.

Cardialis markerek krónikus vesebetegségben és nem ischaemiás szívbetegségben

Krónikus vesebeteg

Hemodializált krónikus vesebetegek halálának 50%-ban cardiovascularis betegség az oka. Ezeknek a betegeknek fokozott a rizikója coronaria-artériás betegségre vagy akut coronaria-szindrómára. A rizikó megítélésére cardialis markereket használtak. Már korábbi tanulmányok is bizonyították, hogy ezeknél a hemodializált vesebetegeknél az emelkedett cardialis troponin nagy gyakorisággal jelentkezik. A TnT-pozitív eredmények igen nagy (30–70%) előfordulásáról számoltak be cardialisan tünetmen-

tes vesebetegeknél. Az emelkedett troponin I előfordulása ugyanakkor kisebb volt. A CK-MB-emelkedés okilag közvetlen összefüggésben van a vese-clearance értékkel.

Biokémiai tanulmányok azt mutatják, hogy a troponinszint-emelkedés a myocardiumból származik (így ez nem hamis pozitívítás), és nincs összefüggésben a vesebetegséggel kapcsolt myopathiával. A legújabb adatok azt sugallják, hogy a tünetmentes betegeknél az emelkedett troponinok szubklinikai microinfarctusokra utalhatnak, ami klinikailag különbözik az akut coronaria-szindrómától. A krónikus vesebetegnek gyakran van pangásos szívbetegsége és magas vérnyomása, ami függetlenül emelheti a troponinértéket.

Az emelkedett troponinérték klinikai szignifanciája vitatott. A legalaposabb tanulmányok megerősítették, hogy a TnT-emelkedés és a cardialis mortalitás között összefüggés van. Veseelégtelenség és emelkedett TnT együtt a legnagyobb globális rizikó a mortalitásra vagy az AMI-ra.

A dialízis nincs befolyással a troponinértékekre. A CK-MB-molekula dializálható, ezért a vesepótló kezelést követően a szérumban/plazmában csökken a szintje. Az emelkedett troponin megítélése ezért a krónikus vesebetegeknél nem egyszerű. Mérsékelt magas rizikójú betegeken végzett sorozatos troponinmérések – keresve a troponinértékek emelkedését – szükségesek az AMI felismerésére. Ugyanakkor a csekély rizikójú, egyébként is tünetmentes páciensek esetében a klinikus az emelkedett troponinszintet hamis pozitívitásként értékeli.

Troponinok nem ischaemiás szívbetegségekben

A különböző fokú myocardialis károsodásnak klinikailag fokozott morbiditás és mortalitás a következménye. Az emelkedett troponinérték olyankor is érzékeny markere a rejtett myocardialis károsodásnak vagy nekrozisnak, ha a klinikai állapot nem ischaemia következménye. Ischaemia nélküli pangásos szívbetegségekben vagy bal kamrai funkciózavarokban a TnT-szintnek rizikót jelző, prognosztikailag értékelhető jelentéstartalma van. Különböző klinikai állapotok, mint subarachnoidalis vérzés, pulmonalis embolia, akut pulmonalis hypertenziót követő jobb kamrai feszülés emelkedett troponinszinttel járnak. Az itt következő felsorolásban olyan állapotok vagy betegségek szerepelnek, amelyek közvetlenül nincse-

nek összefüggésben atheroscleroticus koszorúér-betegségekkel:

- Beültetett pacemaker.
- Szapora és nem ritmusos szív működés.
- Magas vérnyomás.
- Szívizomgyulladás.
- A szívizom zúzódása.
- Heveny és krónikus pangásos szívbetegség.
- Szív műtét.
- Vesebetegség.
- Tüdőembolia.
- Subarachnoidalis vérzés.
- Sepsis.
- Csökkent pajzsmirigyműködés.
- Shock.

Sürgősségi cardialis markerek

A laboratóriumi medicinában igen sok cardialis markert vizsgáltak idáig és vizsgálnak napjainkban is folyamatosan. Keresik azt az ideális paramétert, amely pl. az akut coronaria-szindrómára 100%-ban érzékeny és 100%-ban specifikus. Újabban felismert markerek:

Natriuretikus peptidek

A cardiovascularis rendszert idegi hormonális mechanizmusok befolyásolják. A sympathicus rendszer aktiválásával a katekolaminok révén, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) aktiválásával, a vazopresszin aktiválással (ADH-hatásra vízvisszatartás) és a natriuretikus peptidek felszabadulásával. Máig megkülönböztethetjük a következő natriuretikus peptideket:

- ANP (A típusú natriuretikus peptid; korábban mint A: atrialis, vagyis pitvari natriuretikus peptidet jelölték).
- BNP (B típusú natriuretikus peptid; korábban mint B: brain jelölték, a kamrából származik).
- CNP (C típusú natriuretikus peptid; az érfali endothelsejtekből származik).

A natriuretikus peptidek elnyomják a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert: csökken a perifériás ér-ellenállás, megnő a nátriumürítés és a vízkiválasztás a vesén keresztül.

Noha a CNP nem natriuretikus, hanem csak értágító hatással rendelkezik, kémiai hasonlósága miatt

sorolják az ANP-vel és a BNP-vel azonos csoportba. A natriuretikus peptidek nem folyamatosan termelődnek és tárolódnak az izomsejtekben, hanem a tárgulás és a nyíróerő hatására géntranszkripció aktiválása révén képződnek.

A BNP (B típusú natriuretikus peptid), mint említettük, a kamrai szívizomból – a kamrafal feszülésére (nyomás- és térfogat-növekedéskor) válaszként – kerül a véráramba. A klinikai laboratóriumokban automatizált immunmódszerekkel határozzák meg az NTproBNP-t (az elnevezés a hormon N-terminális hasítási termékére utal). Lehetőség van az aktív BNP hormon mérésére is. Mindkét meghatározás nagyon költséges.

A BNP fontosnak tűnik a klinikusok számára. Edigi ismereteink szerint a BNP alacsony értékének igen nagy a negatív prediktív értéke a kamrai diasztolés nyomásfokozódás megítélésében. Ezért a differenciáldiagnosztikában is fontos szerepe van. Az akut coronaria-szindrómás betegek rizikójának megállapításához is használatos. Számos vizsgálati adat utal a BNP akut coronaria-szindrómát (ACS) jósló indikátor szerepére. Továbbá nem csak az ACS, hanem fenyegető váratlan cardialis események, akár a szívhalál előrejelzője is lehet, különösen ha a troponinérték is emelkedik.

C-reaktív protein

A C-reaktív protein mint nem specifikus gyulladásos marker közvetlenül részt vesz a scleroticus érfali lerakódás (plaque) kialakulásában. Rendkívül kiterjedt klinikai tanulmányok igazolták már a kilencvenes évek elejétől, hogy a kardiológiai betegek gondozásában, a megelőzésben az emelkedett CRP-értékek előre jelzik a jövőben veszélyeztető cardialis eseményeket. Ezért használják a betegek cardialis rizikóprofiljának a kialakításában. A független „prediktorok” (jósló, előrejelző paraméterek) csoportjába tartozik. A TnI-vel és a BNP-vel együtt használatos, de nem specifikus természetű miatt diagnosztikus markerként korlátozott az értéke. A klinikai laboratóriumokban az újabban bevezetett nagy érzékenységgű automatizált módszert (High-Sensitive CRP, HS CRP) alkalmazzák mérésére, csökkent cut-off-érték mellett.

Mieloperoxidáz

A mieloperoxidáz (MPO) leukocytáenzim, reak-

tív oxigéneket hoz létre, amelyek prothromboticus lipoxidációs termékekkel, plaque-instabilitással, plaque-képződéssel és nitrogén-monoxid (NO) csökkenéséből fakadó érösszehúzóddással vannak kapcsolatban.

Szignifikánsan emelkedett MPO-értékeket találtak angiográfiával igazolt koszorúér-betegségben. Használják továbbá cardiovascularis rizikót jelző független prediktorként is sürgősségi osztályokon, mellkasi fájdalmak esetén. Negatív troponin T „baseline”-érték mellett akár korai markerként is jelentkezhethet, a tünetek fellépte után 2 órán belül. A teszt korai markerkénti használata a plaque-ok sérülékenységet jelző képességén alapszik. További MPO-ra irányuló tanulmányok szükségesek a mellkasi fájdalommal, sürgősséggel felvett betegpopulációnál: még meghatározásra vár a vizsgálat szenzitivitása, specificitása, pozitív, valamint negatív prediktív értéke.

Ischaemia által módosult albumin

A jelenlegi cardialis markerek – beleértve a troponint és a CK-MB-t – érzékenyek a szívizomnekrózis kimutatásában. A sejthalál jelzői, amely az AMI-ban jön létre. A legtöbb akut coronaria-szindrómás betegnél viszont a myocardialis ischaemia infarctus nélkül zajlik le. Azok a szívmarkerek viszont, amelyek képesek jelezni az ischaemiát, értékes kiegészítői lehetnének a diagnosztikus eljárásnak.

Az ischaemia ilyen új markere lehetne, az ischaemia okozta módosult albumin (IMA). Akkor keletkezik, ha a keringő szérumban albumin közvetlen kontaktusba kerül az ischaemiás szívizommal. Az IMA mérése az albumin kobalt-kötésén (ACB) alapszik, ugyanis a módosult forma nem képes kötni a kobalt(II)iont. Egy 30 perces leletmegfordulási (TAT) idővel rendelkező, tehát gyors IMA tesztet fejlesztettek ki és dobtak piacra a myocardialis ischaemia markereként.

A kezdeti kísérletes és klinikai vizsgálatok nagyon biztatóak, mert az értékeléshez szükséges paramétereket is meghatározták. Egyéb molekuláris, ill. EKG-vizsgálatokkal kombinációban szenzitivitása és negatív prediktív értéke tovább növelhető, de specificitása elmarad a kívánatos értéktől. Hasznosulása azokban az ACS esetekben lesz várható, ahol az EKG és a troponinszintek nem diagnosztikusak. Figyelembe kell venni azonban, hogy a szérumban az emelkedett IMA-koncentráció néhány óra alatt lecseng, féléletideje 2-3 óra.

IRODALOM

- SCHREIBE, D., MILLER, SUZANNE M.: Use of Cardiac Markers in the Emergency Department – (Updated: Jul 8, 2009) <http://emedicine.medscape.com/article/811905-overview>
- Dörner, K.: Klinische Chemie und Hämatologie. pp. 407–414. 6. aktualisierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart–New York, 2006.

A liquorfehérjék újabb vizsgálati módjai

KOMOLY SÁMUEL

A liquor cerebrospinalist (továbbiakban „liquor”) hagyományos felfogás szerint az agykamrák plexus chorioideusai termelik részben filtrációval, részben aktív transzport útján.

A liquor minőségi fehérje-összetétele fiziológiásan lényegben megegyezik a vérszéruméval, kivétel a β_2 -transzferrin. A liquor fehérjetartalma azonban a vérszéruménál sokkal kisebb (150–400 mg/l), tehát a liquor egyfajta „ultrafiltrátumnak” tekinthető. Megjegyzendő, hogy a liquor fehérjetartalma újszülöttekben nagyobb, és szintén nem mindig kórjelző, ha 60 év felett mérsékelten emelkedett összfehérjeértéket találunk.

A liquor széruménál lényegesen kisebb fehérjetartalmát az magyarázza, hogy a liquorteret és a központi idegrendszert egészében a szervezet vizeitől ún. gátrendszerek választják el. Ilyen vér-liquor, ill. vér-agy gát, szintén létezik egy ilyen barrier-funkció a liquorteret a koponyacsont felől határoló lágyagyhártyában is. A vér-liquor gát biológiai szubsztrátuma a plexus chorioideust borító epithelsejtek közötti szoros kapcsolódás, amit sejtmorfológiai fogalomként zonula occludensként ismerünk. Hasonló módon zonula occludensekkel kapcsolódnak egymáshoz a vér-agy gát kulcselemei, az agyi ereket bélelő endothelsejtek is. Az utóbbiak még abban is különböznek, a többi szervünkben található endothelsejtektől, hogy nem fenesztráltak (nincsenek bennük pórusok). A meningealis barrier szubsztrátuma az egyik lágyagyhártya (arachnoidea, pókhálóhártya) sejtjeit összekapcsoló zonula occludensek rendszere.

A liquorvizsgálat indikációi

A liquorvizsgálat nélkülözhetetlen neuroinfekciók azonosításában (meningitis, encephalitis), segíthet egyes neuroimmunológiai betegségek diagnosztikájában és differenciáldiagnosztikájában: sclerosis multiplex, dysimmun neuropathiák (Guillain–Barré-szindróma, krónikus inflammatív demyelinisációs neuropathia, CIDP). Liquorvételezésre szükség lehet a subarachnoidalis vérzés diagnosztikájában, amennyiben

subarachnoidalis vérzésre utaló jellegzetes tünet mellett (a beteg élete legrosszabb, legerősebb fejfájását éli meg) a CT-vizsgálat nem mutat vérre utaló hiperdenzitást a subarachnoidalis térben. Liquorvizsgálat igazolhatja továbbá egyes malignus betegségek intracranialis propagációját (pl. lymphomák, leukaemiák, carcinomák: meningosis carcinomatosa) a liquorban található tumorsejtek kimutatásával.

A liquorból végzett fehérjeanalízis alapelvei

A korrekt liquorfehérje-vizsgálat alapfeltétele, hogy a liquormintát vevő orvostól a laboratóriumban dolgozó szakemberek megfelelő tájékoztatást kapjanak a liquorvételezés indikációjáról, helyéről, a levett liquor betegágy melletti makroszkópos észlelése során megfigyeltekről.

Liquorminta nyérése

Lumbálpunkciót QUINCKE végzett először 1891-ben. A liquort az esetek döntő többségében lumbálpunkcióval veszik. Ennek technikai részletei megtalálhatók tankönyvekben. Amennyiben a lumbálpunkció technikai vagy egyéb okból nem végezhető vagy kontraindikált, ugyanakkor a liquorvizsgálat abszolút indikált, liquor nyerhető cisternapunkcióval: a nyakszirtcsont és az első nyakcsigolya közötti résben behatolva, röntgen képerősítő kontrollja mellett. A mintavételre lehetőség van más okból behelyezett agykamradrénen keresztül is. Tudni kell azonban, hogy a liquor fiziológiás fehérjetartalma az agykamrai és a cisternalis liquorban kisebb (~100–200 mg/l), a lumbalis durazsákból vett liquorban viszont eléri a 400 mg/l értéket.

A levett liquor makroszkópos értékelése

A punkcióval nyert liquor fiziológiásan víztiszta, átlátszó. Víztiszta liquort két frakcióban (más ajánlások szerint, mintegy 12 ml liquort 3–4 csőben szétosztva), véres liquort 3–5 frakcióban, frakciónként 1,5–2 ml-t bocsátunk le steril csövekbe.

Ha a frakciókban gyűjtött véres liquor feltisztul, *arteficiális vérzésről* van szó, azaz a punkció során valószínűleg megsérült egy véna az epiduralis vénás plexusban; ez a vérzés spontán szűnik. Amennyiben az egyes frakciók vétele során a liquor nem tisztul fel, akkor a liquort le kell centrifugálni. Patológiás vérzés esetén a centrifugált liquor színe megtört lehet, spekt-

rofotometriával a felülúszóban hemoglobin-bomlás-termékek mutathatók ki. Arteficiális vérzés esetén a felülúszó víztiszta. *Arteficiális vérzésre utal az is, ha a félretett véres_liquorban alvadék képződik.* Subarachnoideális vérzés esetén a véres liquor nem alvad meg: félretéve a liquort, a vörösvérsejtek néhány óra alatt a kémcső aljára ülepednek, de a liquort felrázva a levételkor észlelt homogénen véres liquort látjuk.

Ha az első lumbálpunkció során kapott és lecentrifugált liquor *felülúszója sárga*, az nagyon nagy valószínűséggel néhány nappal a punkció előtt történt patológiás vérzésre utal (elsősorban aneurysmaruptura, esetleg intraparenchymás vérzés liquortérbe törése). Magas szérumbilirubin-szint esetén vagy kivételesen nagy dózisz – ma már nagyon ritkán alkalmazott – tetracyclinkezelés mellett is észlelhetünk sárga színű liquort.

A liquorvétellel egy időben vért is kell venni a betegtől, ugyanis az albuminhányados és az intrathecalis IgG-szintézis megítéléséhez a szérum parallel vizsgálata is szükséges. A liquor- és vérmintákat hűtés nélkül, lehetőség szerint egy órán belül a vizsgálatokat végző laboratóriumba kell szállítani, és egy órán belül javasolt elvégezni a vizsgálatokat. A 3-4 órás tárolás 4 °C-on még elfogadható, ezt követően a liquor felülúszóját és a szérumot centrifugálás (pl. 8000–10 000 rpm-en, 15 percig) után mélyhűteni kell (ideálisan ~-70 °C-on). Ezekből a mintából már csak fehérjeanalízis végezhető.

Pándy-reakció

PÁNDY KÁLMÁN módszerét 1910-ben írta le a betegágy melletti azonnali, helyszíni tájékozódó vizsgálatra a modern kézikönyvek még mindig ajánlják. A módszer lényege, hogy óraüvegbe öntött telített karbolsavas oldathoz néhány csepp liquort adunk: ha nem alakul ki opaleszcencia, a liquorösszeférje nem emelkedett. Opaleszcencia kialakulásának számos oka lehet, amelyek közül a helyes ok kiválasztására a modern liqordiagnosztikai módszerek adnak lehetőséget.

A liquorfehérjék újabb vizsgálati módjai

Mind a mai napig nincs nemzetközileg egységesen használt „referencia”-metódika, ezért minden laboratóriumnak be kell állítani az általa használt metódika saját normálértékeit, normáltartományait. Természe-

tesen az azonos metódikával dolgozó laboratóriumok célszerű, ha minőségbiztosítási rendszerhez (pl. nemzetközi INSTAND hazai viszonylatban a QualiCont) csatlakoznak.

Mennyiségi fehérjeanalízis

Az Esbach-, Nogouchi-, Nonne-Apelt-, Takata-Ara-, Lange-reakció ma már elavult eljárásnak tekinthető. A Mancini-féle radiális immundiiffúzió munkaidényes és nagy gyakorlatot igénylő eljárás. Az említett eljárások helyébe a legtöbb laboratóriumban az immunnefelometriás mérés lépett, egyes esetekben ELISA és RIA is alkalmazható speciális fehérjemeghatározásokra. Egyre több előre összeállított mérőszett (kit, gyári teszt) kapható kereskedelmi forgalomban, ami egyszerűsíti, pontosabbá és összehasonlíthatóvá teszi a különböző laboratóriumok munkáját, mérési eredményeit.

Ma már nem elégedhetünk meg csak az összfehérje meghatározásával. Minimális követelmény az összfehérje emellett a liquor-, a szérumalbumin és az IgG-koncentráció meghatározása. A liquor és az egyidejűleg vett szérumminta albumin- és immunoglobulin-koncentrációit nem csak azonos módszerrel, hanem lehetőleg azonos mérési sorozatban is kell meghatározni.

Elengedhetetlen a liquor- és szérumminták párhuzamosan futatott izoelektromos fókuszálással végzett elektroforézisének elvégzése is, megfelelő készülékkel (Pl. SEBIA® CSF-electrophoresis system). További információ az interneten található [4].

Elektroforézishez a liquort jellemzően natívan (magasabb összfehérjénél hígított formában) egyidejűleg viszik fel a hordozó közegre, általában 200-szorosára hígított szérummal.

A liquor- és a szérumalbumin, valamint az IgG-koncentráció ismeretében lehetséges két, diagnosztikailag informatív index (Q) meghatározása:

1. Albuminhányados

$$Q_{\text{Alb}} = \frac{\text{liquoralbumin}}{\text{szérumalbumin}}$$

2. IgG-index (leírója után *Link-index*)

$$Q_{\text{IgG}} = \frac{\text{liquor-IgG} \times \text{szérumalbumin}}{\text{liquoralbumin} \times \text{szérum-IgG}}$$

Az albuminhányados és az IgG-index egyaránt dimenzió nélküli szám. IgA- és IgM-index is meghatározható, ezeknek azonban nincs igazi gyakorlati jelentőségük. Az albuminhányados a gátrendszerek integritásának vizsgálatára alkalmas, normálértéke az életkorral változik.

Az IgG-index az intrathecalis immunglobulin-szintézisről nyújt felvilágosítást általában 0,7 felett tartják kórosnak. Leírója szerint (H. LINK) az emelkedett IgG-index csak akkor értékelhető az intrathecalis IgG-képzés jelének, ha az albumin hányados fiziológiás tartományban van. Az intrathecalis IgG

forrásaként a gátrendszerek agyi, liquor felőli oldalán elhelyezkedő lymphocytás-plazmasejtes infiltrációk valószínűsíthetők, amelyek jellemzően a kis erek perivascularis terében lokalizálódnak (11-78. ábra). Az oligoklonális gammopathia (OGP) agarózgél-elektroforézisnél általában 2–5 extra csík formájában jelenik meg, izoelektromos fókuszálásnál pedig 6–9-es pH-tartományban kettőtől akár 9–15 diszkrét csík formájában is látható (11-79. ábra a, b, c).

Biomarker fehérjék vizsgálata a liquorban

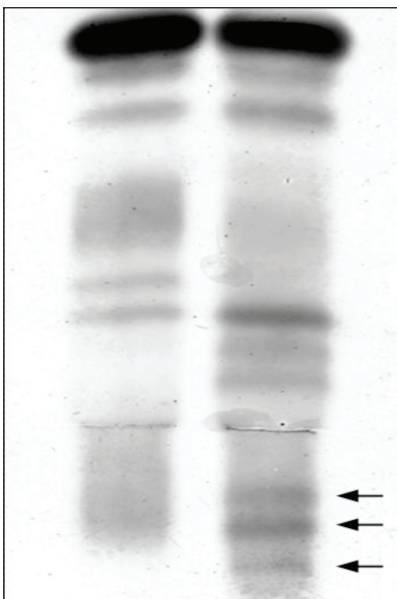
Az utóbbi évek törekvése, hogy neurodegeneratív betegségek iv vivo diagnosztikájának felállításához liquorban specifikus és szenzitív biomarker fehérjéket azonosítsanak.

Tau-protein és amyloid β -peptid

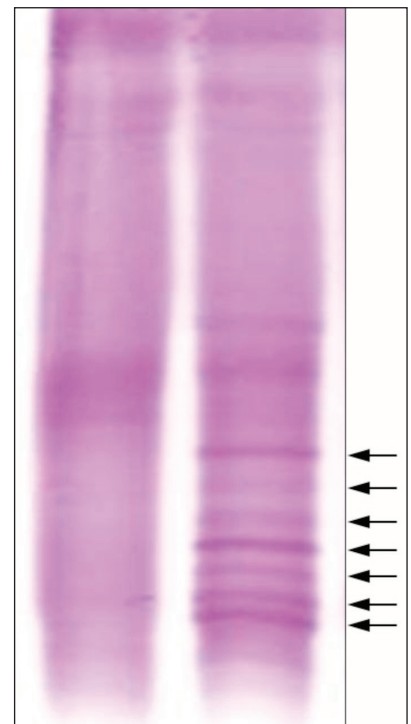
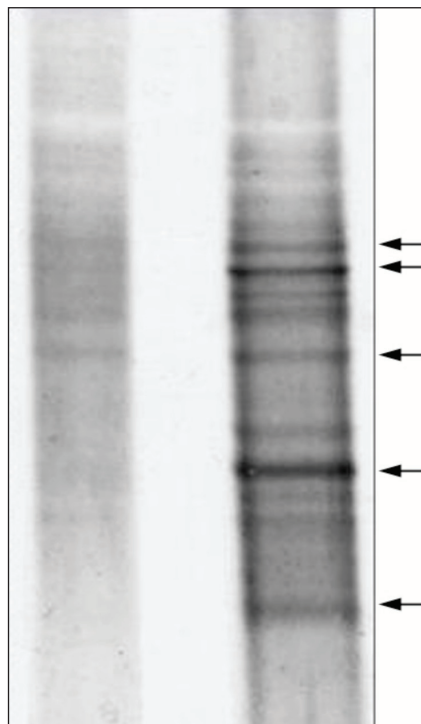
Az Alzheimer-kór keletkezésében a jelenlegi elméletek szerint fontos szerepet játszhat a tau- (τ) protein (ennek is kórosan foszforilált formái), ill. a β -amyloid prekursor proteinből a β - és γ -sectertasok által kihasított $A\beta_{1-42}$ peptidek. A tau- és foszforilált tau-szint emelkedését az egyidejűleg észlelhető alacsony $A\beta_{1-42}$ peptid koncentrációt tartják Alzheimer-kórra specifikus jelenségnek. Az említett fehérjék, ill. peptidek meghatározására kereskedelmi forgalomban kapható szendvics-ELISA kiteket ajánlanak.



11-78. ábra. Az intrathecalis IgG-képzés helye



11-79. ábra. Oligoklonális gammopathia (OGP) agaróz-gélelektroforézise



14-3-3 protein

A szervezetben mindenütt előforduló protein, emelkedett lehet *prionbetegségekben*, ezen belül is jellemzően sporadikus *Creutzfeldt–Jakob-betegségben*. Kimutatását Western-blot vagy kereskedelmi forgalomban kapható kvantitatív ELISA-technikával végzik. Tudni kell azonban, hogy a 14-3-3 protein koncentrációja a liquorban megemelkedhet más dementiaformákban, metabolikus és hypoxiás encephalopathiákban is.

Amennyiben Creutzfeldt–Jakob-betegségre utaló klinikai tüneteken (progresszív dementia, myoclonusok) túl a liquorban 14-3-3 protein is kimutatható, az megerősíti ennek a ritka betegségnek (prevalenciája 1/10⁶ lakos) a gyanúját, azonban a betegség definitív diagnózisa csak post mortem neuropatológiai vizsgálattal, a betegségre jellemző kóros prion protein immunhisztokémiai vizsgálatával lehetséges.

β_2 -transzferrin

Ez a fehérje a szérumban nem, csak a liquorban fordul elő. Izoelektromos fókuszálással mutatható ki, amelyet az egyik technika szerint immunifixáció, majd ezüstözés követ. Kimutatásának akkor van gyakorlati jelentősége, ha liquorcsorgás gyanúja vetődik fel. Ez többnyire fejsérülések (koponyaalapi törések) után alakul ki, de létezik előzmény nélküli spontán liquorfolyás az orrüregből vagy a külső hallójáratból. Amennyiben az említett nyílásokon ürülő nedvben a β_2 -transzferrin kimutatható, akkor igazolt a liquorcsorgás (szenzitivitás 80–100%, specificitás 95%).

S-100 protein

Referenciatartománya liquorban: < 5 µg/l (szérumban < 0,2 µg/l).

Kalciumkötő fehérje többek között a Schwann-sejtekben, az astrogliában, a melanocytákban is kimutatható. Érzékenyen jelzi a központi idegrendszer, a vér-agy gát károsodásait. Fejsérülés, hypoxia hatására is emelkedik a szintje.

Neuronspecifikus enoláz (NSE)

Referenciatartománya liquorban: < 25 µg/l (szérumban < 13 µg/l).

Agyi infarctus esetében több nappal az insultus után szintje megemelkedik, agyödémában szintén. Alzheimer-kórban nem változik. Intracerebrális vérzés utáni prognosztikai marker, 100 µg/l feletti érték esetén diffúz kéregkárosodásra utal.

Kreatin-kináz BB izoenzim (CK-BB)

Referenciatartománya liquorban: < 5 U/l.

Az agyi eredetű CK-BB izoenzim a szérumban gyakorlatilag minimális mennyiségben található. Liquorban szintje emelkedik stroke-ban, fejsérülésekben, demyelinisatiós betegségekben, tumorokban, meningitisben.

IRODALOM

- [1] PÁNDY K.: A cerebrospinalis folyadék vizsgálatának újabb módjai. Orv. Hetil. 4:72–73, 1910.
- [2] Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. European Journal of Neurology 13:913–922, 2006.
- [3] EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. European Journal of Neurology 16:760–770, 2009.
- [4] <http://www.laboratorytalk.com/news/anc/anc128.html#ixzz1DNwDWuQj>

A fehérjék mint neuroendokrin hormonok a klinikai laboratóriumi kutatásokban

MEZŐSI EMESE, KŐSZEGI TAMÁS

A neuroendokrin rendszer és hormonjai

A neuroendokrin rendszer

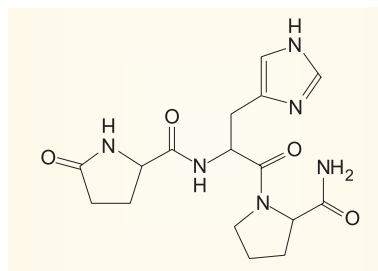
A neuroendokrin rendszer anatómiailag többlépcsős felépítése alkalmas arra, hogy a szervezetben mindig az aktuális szükségleteknek megfelelő mennyiségű, hatékony szabályozó funkcióval rendelkező hormon termelődjön. Szokás a többszintű hormonális szabályozó rendszert „endokrin tengelyeknek” is nevezni.

A legfelső szinten az agykéreg áll, a kérgi válaszok képesek direkt az agy célhormon termelő- és szabályozó struktúráira hatni (gátlás vagy serkentés), ill. a szervezet különböző válaszreakcióin keresztül a hormontermelést befolyásolni. Amennyiben a kérgi befolyást kikapcsolnánk, az agy specifikus területei akkor is képesek a periférián keringő hormonszinteket vagy egyéb kulcsfontosságú vezérlő komponenseket érzékelni és az annak megfelelő gátló vagy stimuláló választ közvetíteni (feedback).

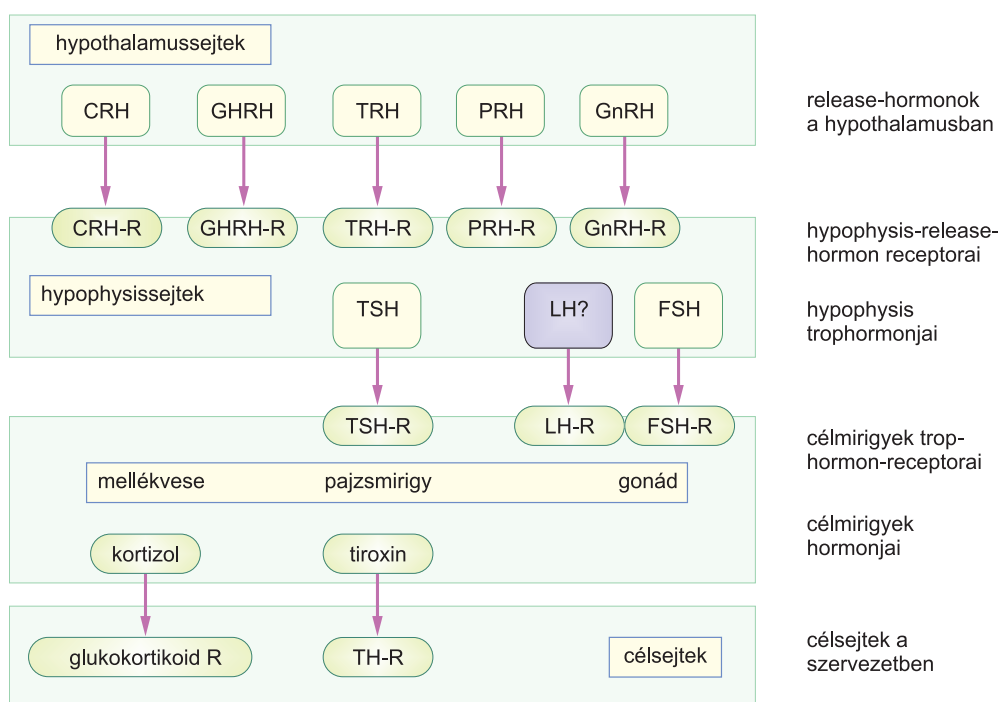
A többlépcsős szabályozó „tengely” sematikusán a 11-80. ábrán látható.

A hypothalamus és a hypophysis áll a szabályozás középpontjában. A hypothalamus a perifériás vérben keringő hormonszinteket érzékelve csökkenti vagy növeli a hypophysist stimuláló release-hormon elválasztást. Ezek általában peptid természetű molekulák, pl. a pajzsmirigy „tengelyben” a TRH (tirotrop releasing hormon), ez mindössze 3 aminosavból álló tripeptid (11-81. ábra).

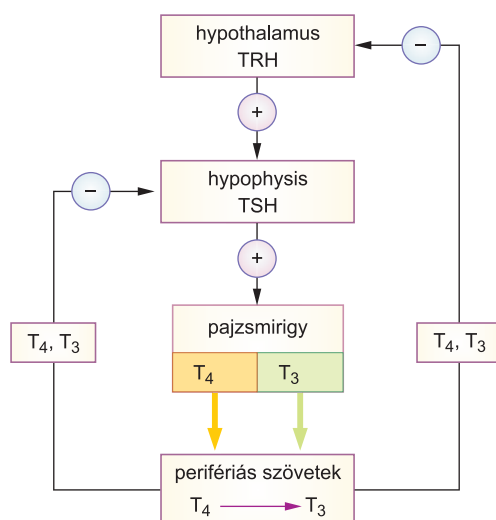
A releasing hormonok a hypophysisbe jutva trop (serkentő) hormontermelést váltanak ki, amely hormonok azután a véráramba kerülve eljutnak a endokrin célmirigyhez, ahol stimulálják annak „utolsó lépcsős” hormontermelését, azét a hormonét, amely a szervezet célsejtjeire hat. Ez a látszólag túlbiztosított szabályozás képes a mindenkori hormonegyensúlyt fenntartani, és szükség esetén a célsejtek funkcióját



11-81. ábra. A TRH szerkezete: pGlu-His-Pro-NH₂ (piroglutamil-hisztidil-prolinamid)



11-80. ábra. A neuroendokrin szabályozás főbb tengelyei



11-82. ábra. A pajzsmirigyhormonok elválasztásának szabályozása

nagymértékben befolyásolni (pl. nemi hormonok). Az utolsó lépcsőben gyakran nem fehérje természetű hormonok szintetizálódnak (pl. szteroidok), a peptid - fehérje hormonok a karmester szerepét töltik be a magasabb szintű agyi regulációban. A visszacsatolásnak (feedback) nagy jelentősége van a szabályozásban, ezt a pajzsmirigyhormonok elválasztásának példáján keresztül mutatjuk be (11-82. ábra).

A negatív visszacsatolás elve: a keringő szabad hormonszintek érzékelése alapján a hypothalamus és a hypophysis a serkentő hormonok szintézisét csökkenti vagy fokozza.

A neuroendokrin rendszer fehérje- és peptidhormonjai

A hormonok kivezetőcső nélküli *endokrin mirigyekben* termelődnek, és a vérárammal jutnak el a távoli célsejtekhez. A sejtek összehangolt működésében a klasszikus endokrin szabályozás mellett a sejtek közötti információcsere egyéb formái is fontos szerepet játszanak. *Parakrin szekréció* során a hormon a környezetében található sejtek működésére hat, amelyekhez diffúzióval jut el. *Autokrin hatásról* akkor beszélünk, ha a hírvivő molekula az őt elválasztó sejtre fejt ki hatását. A hormonok kémiai szerkezetük alapján glikoproteinek, peptidek, aminosavszármazékok és lipidek (pl. szteránvázas vegyületek) lehetnek. Ebben a fejezetben részletesen a fehérje- és peptidhormonokkal foglalkozunk.

A neuroendokrin rendszer betegségei, a hormontermelés változásai

A polipeptidhormonok általában prohormonként termelődnek, az aktív hormon további enzimatis hasítás során alakul ki. Példa erre a proinzulin, ahol a harmadlagos szerkezet kialakulása során a peptidlánc két vége között diszulfidhidak keletkeznek, majd a molekula középső részén található C-peptid kihasad. A C-peptid-szint mérésének alapvető jelentősége van az endogén inzulinszekréció megítélésében diabetes mellitusban szenvedő betegen, valamint az insulino-ma diagnosztikájában. A megsztetizált aktív hormon szekréciós granulumokba kerül, ahonnan specifikus inger hatására szabadul fel. Előfordul, hogy egy nagy fehérjemolekulából számos hormon keletkezik, pl. a proopiomelanokortin a prekursora az ACTH, α -MSH, β -MSH, β -lipotropin és enkefalin hormonnak. A polipeptidhormonok sejtfelszíni receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A receptorok szerkezetéről és a jelátvitel módjáról az utóbbi években tudásunk jelentősen gyarapodott, lehetőséget adva a hormonhatás receptor szintű módosítására. A klinikai gyakorlatban legfontosabb peptidhormonokat (a teljesség igénye nélkül) a 11-36. táblázat foglalja össze.

Az endokrin betegségek négy fő kategóriába sorolhatók:

- Fokozott hormontermelés.
- Csökkent hormontermelés.
- A célszövetek megváltozott érzékenysége a hormonnal szemben.
- Az endokrin mirigyek tumorai.

A hormonszekréció rendellenességei

A hormontúlermeléssel és hormonhiánnyal járó kórképek változatos klinikai tünetekkel jelentkeznek. A tünettán ismerete nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a megfelelő laboratóriumi vizsgálatot kérjük a diagnózis felállításához. A túlermelés és a hiány egyaránt lehet a hypothalamus, a hypophysis és a perifériás endokrin mirigy szintjén. A perifériás endokrin szervek rendellenességei a leggyakoribbak, ilyenkor *primer funkciózavar*ról beszélünk. Lényegesen ritkábban fordulnak elő a hypophysis betegségei (*szekunder funkciózavar*) és extrém ritka a hypothalamus működészavara következtében létrejövő kórkép (*tercier funkciózavar*). A pajzsmirigy primer túlmű-

11-36. táblázat. Peptidhormonok a klinikai gyakorlatban

<i>Hormon</i>	<i>Termelőds helye</i>	<i>Aminosavtartalom</i>
gonadotrop releasing hormon (GnRH)	hypothalamus	10
növekedési hormon serkentő hormon (GHRH)	hypothalamus	44
tireotrop releasing hormon (TRH)	hypothalamus	3
kortikotrop releasing hormon (CRH)	hypothalamus	41
vazopresszin	hypophysis	9
oxitocin	hypophysis	9
szomatosztatin	hypothalamus	28, 14
adrenokortikotrop hormon (ACTH)	hypophysis	39
tireotrop hormon (TSH)	hypophysis	211
luteinizáló hormon (LH)	hypophysis	204
folliculusstimuláló hormon (FSH)	hypophysis	210
növekedési hormon (GH)	hypophysis	191
prolaktin	hypophysis	199
inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1)	máj	70
pitvari natriuretikus peptid	szívpitvar	28
parathormon (PTH)	mellékpajzsmirigy	84
inzulin	pancreas β -sejt	51
kalcitonin	C-sejt	32
glukagon	pancreas α -sejt	29
leptin	zsírszövet	167
ghrelin	gyomor	28

kódése esetén a pajzsmirigyhormonok szintje emelkedett, a hypothalamus és a hypophysis ezt érzékeli, és negatív feedback-mechanizmus következtében a TRH- és a TSH-termelés lecsökken. A laboratóriumi leletben tehát alacsony TSH- és emelkedett szabad T_4 - és T_3 -érték látható. Ha azonban a hypophysis TSH-termelő adenómája okoz pajzsmirigy-túlműködést, a TSH emelkedett és ezt a pajzsmirigyhormonok magas szintje kíséri. A pajzsmirigy elsődleges alulműködésében a pajzsmirigyhormonok csökkent értéket mutatnak, a TSH szintje pedig emelkedett. A pajzsmirigy alulműködésének hátterében általában autoimmun gyulladás, a mirigy műtéti eltávolítása vagy előzetes radiojódkezelés áll. A hypophysis betegsége miatt létrejövő másodlagos pajzsmirigy-alul-

működésben a TSH termelése csökkent és ehhez a pajzsmirigyhormonok alacsony szintje társul. A hypophysis-pajzsmirigy és a hypophysis-gonad tengely működésének megítéléséhez az alaphormonszintek mérése általában elegendő. A hypophysis-mellékvese és a GH-IGF-I tengely működése azonban gyakran csak stimulációs vagy szuppressziós tesztekben ítéltető meg. Ezek részletes tárgyalása meghaladja a jelen fejezet kereteit.

Neuroendokrin tumorok jellemzése a fehérjetermékek szintjén

Hormonhatású anyag termelése a neuroendokrin tumorok jelentős részében kimutatható. A klasszikus hormontúltermeléssel járó kórképek közé tartoz-

nak a *hypophysis elülső lebeny adenomái*. Ezek közül a leggyakoribb a *prolaktintermelő* tumor, amelyre diagnosztikus a 150 ng/ml feletti prolaktinszint. Ritkábban fordulnak elő a *növekedési hormont termelő daganatok*, amelyek a pubertás előtt gigantismust, ezt követően acromegáliát okoznak. A diagnosztikában perdöntő az orális glukóztolerancia-tesztben nem szupprimálódó növekedési hormon szint (>1 ng/ml) és a korra és nemre normalizált IGF-I emelkedett értéke.

Az *ACTH-termelő daganatok* laboratóriumi diagnosztikája különösen nehéz. Átfedés lehet a normális felső tartomány és a hypophysistumor által termelt ACTH-szint között, ezért ACTH-termelő daganat gyanúja esetén fontos a diurnális ritmus vizsgálata (adenoma esetén a diurnális ritmus eltűnik) és a kortizolszint szupprimálhatóságának kimutatása (dexamethasonszuppressziós tesztek), e tesztek számos típusa ismert. A hypophysisadenoma által okozott Cushing-kór nehezen különíthető el a benignus hörgőcarcinoid ACTH-termelése következtében kialakult ectopiás Cushing-szindrómától. Jelentősen emelkedett ACTH-szint mérhető rosszindulatú kissejtes hörgőcarcinomában, ennek elkülönítése általában nem okoz problémát.

A hypophysis tumorai gyakran nem csak egy hormont termelnek, előfordul GH és prolaktin együttes szintézise, ill. FSH–LH–TSH termelés és számos egyéb kombináció. A hypophysisfunkció vizsgálatkor és a hormontúltermeléssel járó kórképek diagnosztikájában ezért valamennyi hypophysishormon és a perifériás hormonok vizsgálata is szükséges (TSH–fT₄, LH–FSH–tesztoszteron, ACTH–kortizol, GH–IGF-I). Számos, korábban inaktívnak gondolt hypophysistumor α -alegységet termel (ez közös a TSH, az LH és az FSH hormonban), így ennek vizsgálata további előrelépést jelenthet a diagnosztikában.

A *pajzsmirigy rosszindulatú daganata* a *medullaris carcinoma*, amely a C-sejtekből indul ki, és kalcitonintermelése által mutatható ki. A kalcitonin fontos tumormarker, amelyet használunk a pajzsmirigygöbök preoperatív diagnosztikájában és a medullaris carcinoma miatt operált betegek posztoperatív követésében is.

A *mellékpajzsmirigy adenomája* következtében létrejövő elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködés gyakori kórkép, ennek laboratóriumi diagnózisa az emelkedett szérumkalciumszinttel együtt mért emel-

kedett parathormonkoncentráció alapján mondható ki. A parathormonmeghatározásnak van intraoperatív formája is, amikor műtét során a műtét eredményességének igazolására használják a parathormonmérést, erre a parathormon rövid féleletideje ad lehetőséget.

A széruminzulin meghatározása a *hasnyálmirigy β -sejtjeiből kiinduló daganat* gyanúja esetén jelent segítséget. Ezek a betegek az alacsony vércukorszint tünetei miatt fordulnak orvoshoz, a diagnosztikában az inzulin mellett a C-peptid és esetenként a proinzulin meghatározására is szükséges lehet. Diagnosztikus értékű az alacsony vércukorszint mellett észlelt emelkedett inzulin- és C-peptid-szint.

Általános neuroendokrin tumormarkerek tekintethető a *kromogranin-A*, amely az utóbbi időben terjedt el a klinikai gyakorlatban. A kromogranin-A az endokrin és neuroendokrin sejtek szekretoros granulumaiban található 439 aminosav hosszúságú fehérje, amely a hormonokkal együtt szekretálódik. Álpozitív emelkedés észlelhető súlyos hypertóniában, veseelégtelenségben és protonpumpagátló gyógyszer adása során. Elsősorban a carcinoid tumorok diagnosztikájában használjuk.

A fehérje- és peptidhormonok meghatározásának klinikai jelentősége és nehézségei

A hormonok a keringésben igen kis koncentrációban vannak jelen, ezért meghatározásuk csak olyan módszerrel lehetséges, amely nagy érzékenységgel és jó specificitással rendelkezik biomolekulák kimutatására. Ezek a módszerek a hagyományos laboratóriumi eljárásoknál több nagyságrenddel érzékenyebbek. A szenzitív TSH meghatározás pl. femtomoláris (10^{-15} mol) mennyiségben képes meghatározni a TSH-molekulák mennyiségét. A TSH-meghatározás az egyik legérzékenyebb módszer, a többi peptidhormon méréstechnikája sajnos jóval elmarad a TSH-mérés mögött. Az endokrinológiában az antitestkötésen alapuló módszerek a leggyakoribb vizsgálóeljárások. Ennek során a fehérjemolekula specifikus epitópja ellen termelt antitest és a kérdéses peptidhormon között reverzibilis immunkémiai reakció zajlik. Kezdetben radioimmunoassay-eket használtak, napjainkban elterjedtek a nem izotóp jelölésű (alternatív) és au-

tomatizált módszerek. Az immunanalitikai módszer alapelvéből azonban számos hibalehetőség adódik. Az egyik legfontosabb probléma, hogy az immunreaktív molekulák koncentrációja nem mindig arányos a biológiai aktivitással. Erre példa a parathormonmeghatározás, amelynek első generációs assay-i egy antitestet használtak, és bemérték az inaktív C-terminális fragmenseket is. A második generációs assay-k két antitesttel dolgoznak, az egyik a molekula N-terminális, a másik a C-terminális régiója ellen irányul, az intakt, biológiailag aktív parathormon meghatározását célozva. Előfordulhat, hogy a monomer hormon polimerré kapcsolódik, emiatt biológiai aktivitása csökken, immunreaktivitása azonban megmarad. Ez történik pl. macroprolactinaemia esetén, amikor tévesen mérünk emelkedett prolaktinszintet. További probléma, hogy az antigén-antitest reakciót befolyásolja a közeg, amelyben zajlik: a plazmában a fehérjefrakciók, az ionerősség vagy a pH változása. A módszert autoantitestek vagy heterofil antitestek is zavarhatják. Immunometrikus módszerek alkalmazásakor fordul elő, hogy a mintában lévő rendkívül nagy koncentrációjú antigén az első antitest kötőkapacitását meghaladja, és a jelet adó második antitestet is telíti, így tévesen alacsony hormonszintet mér („*high-dose-hook*” effektus).

A PEPTIDHORMONOK KUTATÁSÁNAK EREDMÉNYEI

A peptidhormonok kutatása kiemelt jelentőségű, a gyógyászatban való alkalmazásuk igazi sikertörténet, és napjainkban is bevezetés előtt állnak új készítmények. Az *inzulin* felfedezése volt az első jelentős lépés, amit rövidesen követett az első beteg kezelése (1922), és azóta betegek millióinak életét mentette meg az inzulin. Az elhúzódó hatású inzulin előállítása a farmakológia fejlődésének újabb állomásait jelzi. Mérföldkőnek számít az inzulin aminosavszekvenciájának megismerését követően a géntechnológia fejlődése révén a rekombináns technikával előállított humán inzulinok világméretű elterjedése. Az inzulinkezelés alapját ma a humán inzulinok adják, Magyarországon a kilencvenes évek elejétől érhetők el ezek a készítmények. A fehérjekutatás újabb jelentős eredménye volt az inzulinanalógok előállítása a humán inzulin aminosavszekvenciájának megváltoztatása révén. A cél a hatás megrövidítése vagy megnyújtása volt az élettanihoz leginkább hasonló inzulinkinetika elérése

érdekében. Az inzulinterápia ugyanis minden törekvés ellenére korlátokkal bír: nem a megfelelő időben, mennyiségben és nem a megfelelő helyre kerül az inzulin, így az étkezést követő gyors inzulincsúcs nem utánozható és az étkezések között feleslegesen magas marad az inzulinszint. Az első gyors hatású inzulinanalóg a lispro-inzulin volt, ahol a B-lánc 28. és 29. helyén lévő két aminosav sorrendjét megcserélték (prolin-lizin helyett lizin-prolin). A lispro-inzulin rövid idő alatt monomer formát vesz fel, ezért gyorsabban szívódik fel, hatásmaximuma nagyobb, hatástartama pedig rövidebb, mint a humán inzuliné. Ennek számos előnyét élvezik a betegek: nem kell várni az inzulin beadása és az étkezés között (humán inzulinnál a várakozási idő 30-40 perc), étkezés után kevésbé emelkedik meg a vércukor, elhagyhatók a főétkezések közötti étkezések. Ma két további gyors hatású inzulinanalóg is forgalomban van, az aszpart-inzulin és a glulizin, amelyek farmakokinetikája nagyon hasonló a lispro-inzulinéhoz. Problémát jelentett a megfelelően hosszú hatástartamú, naponta egyszer adható bázisinzulin előállítása is. A két, klinikai gyakorlatban használt hosszú hatástartamú inzulinanalóg a glargin és a detemir, amelyek hatása már közelíti az ideális bázisinzulint. A glargin molekulában az A-lánc 21. helyén aszparagin helyett glicin van, a B-lánc végéhez pedig két további arginin kapcsolódik. A molekulaszerkezet ilyen módosításával sikerült elérni, hogy az oldhatóság megváltozott, alacsony pH-n oldható, a subcutisban lévő neutrális pH-n pedig kicsapódik az inzulinmolekula, ami a felszívódást jelentősen megnyújtja. A detemir hatástartamát más mechanizmussal sikerült megnövelni. Itt a B-lánc 30. aminosava hiányzik, a 29. aminosavhoz pedig egy zsírsavlánc kapcsolódik, ami autoasszociációra teszi hajlamosá a molekulát, és fokozza az albuminhoz való kötődést is. A detemir lassabban szívódik fel és a keringésben az albuminról fokozatosan válik le, hatástartama 12-20 óra.

Az inzulin után rekombináns technikával előállított következő hormon a *növekedési hormon* volt, ez megoldást jelentett a gyermek-, majd később a felnőttkori súlyos növekedési hormon hiány ellátására. Hormonkészítmények egész sora került a következő években a gyógyászatba. Néhány további példa a teljesség igénye nélkül: a GnRH-analógok alapvető szerepet játszanak a prosztaták, az emlőrák, az endometrioszis kezelésében, alkalmazzák őket az asszisztált

reprodukciós programokban. Az utóbbiban a rekombináns FSH és LH is nélkülözhetetlen. A szomatostatatin analógjai (octreotid, lanreotid) a neuroendokrin tumorok, az acromegalia kezelésének hatékony eszközei. A rekombináns TSH a pajzsmirigy differenciált carcinomáinak radiojódkezelésében kapott szerepet. A dezmozpresszin a centrális diabetes insipidus szuverén szere. A teriparatid, a parathormon N-terminális 1–34 aminosavfragmentuma rendkívül hatékony az osteoporosis kezelésében.

2010-ben kerültek hazánkban forgalomba a GLP-1- (glukagonszerű peptid-1) *agonisták*, amelyek a 2-es típusú diabetes mellitus új kezelési lehetőségét jelentik (exenatid, liraglutid). Az első tapasztalatok rendkívül kedvezőek. A GLP-1 a bélrendszer distalis részében, a nyálkahártya L-sejtjeiben termelődik. Plazmaszintje a táplálékfelvétel hatására jelentősen emelkedik. Fokozza az inzulin szintézist, ugyanakkor gátolja a glukagon elválasztását, lassítja a gyomorürülést és csökkenti az étvágyat. Testsúlycsökkentő hatása járulékos előny a diabetes mellitus kezelésében. A GLP-1 szekréciója 2-es típusú diabetesben jelentősen csökkent. A GLP-1 rendkívül gyorsan metabolizálódik a keringésben, felezési ideje < 2 perc. A lebontást a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) enzim végzi. A GLP-1-agonisták klinikai alkalmazásának feltétele volt az élettartam megnövelése. Az exenatid előállításában egy Arizonában élő gyík nyálából izolált polipeptid, az exendin-4 segített. Ez a molekula aminosavszekvenciájában 53% homológiát mutat a humán GLP-1-gyel, de rezisztens a DPP-IV-gyel szemben. A GLP-1-receptoron agonistaként működik. Az exenatid az exendin-4 szintetikus változata. A liraglutid a natív GLP-1 egy aminosavban és egy 16 szénatomos oldalláncban módosított analógja, a DPP-IV hatásával szemben az albuminhoz való kötődés védi meg.

A neuroendokrin hatású anyagok rohamosan bővülő tárházát jelentik az *adipokinek*, a kizárólag vagy döntően a zsírszövetben termelődő hormonok. A korábban már jól karakterizált leptin mellett ide tartozik az adiponektin, a rezisztin, a viszfatin, az apelin, a vaszpin, a hepcidin, a chemerin és az omentin, amelyek fiziológiás funkciója még csak részben ismert.

A kutatások egyik fő célpontja az étvágy szabályozás megismerése. Az étvágy szabályozásban az adipokinek mellett a bélhormonok is alapvető szerepet játszanak, a GLP-1 mellett kiemelt fontosságú a ghrelin, a peptid YY és az oxintomodulin. Az elhízás incidenciája a világon aggasztó mértékben emelkedik, a testsúlygyógyszeres csökkentése pedig jelenleg megoldatlan, némi reményt csak az előbb említett GLP-1-agonisták jelentenek. A bélben és a zsírszövetben termelődő hormonok a szervezet tápláltsági állapotáról szállítanak információt a hypothalamus étvágy szabályozó központjaiba. Hatásuk jobb megismerése új terápiás célpontokat jelenthet az elhízás és az ehhez kapcsolódó civilizációs betegségek terápiájában.

IRODALOM

- CHAUDHRI, O. B., WYNNE, K., BLOOM, S. R.: Can gut hormones control appetite and prevent obesity? *Diabetes Care* 31(S2):84–89, 2008.
- DRAB, S. R.: Clinical studies of liraglutide, a novel, once-daily human glucagon-like peptide-1 analog for improved management of type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 29:43S–54S, 2009.
- FREEMAN, J. S.: Insulin analog therapy: improving the match with physiologic insulin secretion. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 109(1):26–36, 2009.
- HARTMAN, I.: Insulin analogs: impact on treatment success, satisfaction, quality of life, and adherence. *Clin. Med. Res.* 2008; 6(2):54–67.
- KOVÁCS L. G., TOLDY E., LÖCSEI Z., MEZŐSI E.: *In: Debreceni L., Kovács L. G. (szerk.): Endokrinológiai laboratóriumi vizsgálatok. Gyakorlati laboratóriumi medicina.* 397–425. old. *Literatúra Medica Kiadó, Budapest*, 2008.
- LEÖVEY A., NAGY V. E., PARAGH G. et al.: Az endokrin és anyagcsere betegségek gyakorlati kézikönyve. 403–415. old. *Medicina Könyvkiadó, Budapest*, 2011.
- MODLIN, I. M., GUSTAFSSON, B. I., MOSS, S. F. et al.: Chromogranin A-biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann. Surg. Oncol.* 17(9):2427–2443, 2010.
- PREGUN I., BODOKY G., RÁCZ K. et al.: Carcinoid daganatok. *Orv. Hetil.* 151(46):1885–1894, 2010.
- WOZNIAC, S. E., GEE, L. L., WACHTEL, M. S. et al.: Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig. Dis. Sci.* 54(9):1847–1856, 2009.

A csontanyagcsere fehérjemarkerei

KŐSZEGI TAMÁS

A csontrendszer

A csontrendszer funkciói

A csontszövet nagyon sokrétű feladatot lát el. Amellett, hogy szilárd vázat képez a test és az izomrendszer számára, a csontvelőben képződnek a vörös- és fehérvérsejtek, a csont óriási kalciumraktárként is funkcionál, hatékonyan részt vesz a sav-bázis egyensúly szabályozásában és részese az endokrin folyamatok szabályozásának is. Mindez csak úgy képzelhető el, hogy a csontszövet rendkívül dinamikusan képes válaszolni a szervezetet érintő hatásokra, elsősorban biológiaiilag aktív fehérjék termelésével és a sejtés állomány funkciójának gátlásával vagy stimulációjával. Ez a fejezet elsősorban a csontanyagcserét érintő legfontosabb folyamatokat foglalja össze, a fehérje természetű komponensekre fókuszálva.

A csont összetétele

A csontszövet alapvetően anorganikus és organikus összetevőkre bontható. Az anorganikus komponens elsősorban vízből (ez a nedves súly 40%-a) és hidroxipatit kristályokból áll, míg az organikus rész a sejtés elemeket is magába foglaló „mátrixból” (11-37. táblázat).

A csontszövet felépítése

Sejtés elemek

Osteoblastok. Az osteoblastok mononukleáris sejtek, a csontújdonképződés helyein találhatók és oszteoidnak nevezett, elsősorban kollagéntartalmú csontszövetprekurzort termelnek. Pluripotens me-

senchymalis őssejtekből származnak, amelyek egy része adipocytává is képes differenciálódni. A csontfelépítésben vesznek részt (lásd később), éretlen csontsejteknek (osteocyták) is tekinthetők. Feladatuk elvégzése után a differenciált osteoblastok megnyúlt, lapos „lining” sejtekké is alakulhatnak, ill. apoptotikus mechanizmusok által el is pusztulhatnak.

Osteoclastok. Többmagvú, nagy sejtek, a monocytá őssejtvonalból származnak. A csontlebontásban vesznek részt, a lebontás helyein ún. lacunákban találhatók, és aktivitásukkal üregeket képeznek az osteoblastok és az új csontszövet számára. Fagocitózisra képes sejtek, valamint lebontó enzimeket is termelnek (részletesen lásd később). Mind az osteoblastok, mind az osteoclastok aktív mozgásra képesek.

Osteocyták. Érett csontsejtek, az osteoblastokból alakulnak ki, amelyek a mineralizációs folyamat során mintegy befalazzák magukat és osteocytává differenciálódnak. Az osteocyták is aktívak maradnak: részt vesznek a kalciumhomeosztázis fenntartásában, a mineralizációban, információkat közvetítenek a lebontó és felépítő sejtek felé. Mechanoreceptorként működve szabályozzák a csont terheléstől függő átépülését.

A csont mint dinamikusan átépülő szövet

Az első pillantásra statikusnak látszó, nagy szilárd-ságú csontrendszer rendkívül élénk anyagcserét folytat egész életünk során. Körülbelül 10 évente a teljes csontállomány ásványi anyagának egésze kicserélődik. A születés után igen intenzív csontosodási és növekedési folyamatok zajlanak, majd 20 és 30 éves kor közt éri el a csontsűrűség (BMD, bone mineral density) a maximumát. Az átépülési folyamatok felnőttkorban sem állnak le, de a menopauza után a nemek között nagy különbség alakul ki a lebontó és felépítő folyamatok egyensúlyában. Az angol irodalom a folyamatos csontátépülésre a „remodeling” kifejezést

11-37. táblázat. A csontszövet összetétele

Csontalkotók csoportjai	Arányuk a csontszövetben	Alkotórészek
anorganikus összetevők	kb. 60–65% száraz súlyra vonatkoztatva	hidroxipatit (kalciumfoszfát kristály), magnézium, egyéb elemek
mátrix (organikus összetevők)	kb. 30–55% száraz súlyra vonatkoztatva	I-es típusú kollagén, egyéb fehérjék sejtés elemek (osteoblast, osteoclast, osteocyta)

használja. Érthető, hogy a remodeling szabályozásában a biológiailag aktív fehérjék, a nemi és egyéb hormonok és a kalcium-anyagcserét befolyásoló D-vitamin is részt vesz. A karmester jellegű fehérjék egy részét a csontszövet sejtes elemei termelik. A folyamatos csontátépülés a terheléshez való alkalmazkodást és a csontot érő mikrosérülések helyreállítását szolgálja. Az aktív metabolizmus és átépülés ellenére a reszorpció és mineralizációs folyamatok az időtengelyen relatíve lassan mennek végbe, néhány hét szükséges a teljes átépüléshez.

A csontanyagcsere

OSTEOBLASTOK ÁLTAL TERMELT FAKTOROK

Oszteoid

A csont organikus mátrixának fő alkotója, több fehérjéből álló komplex struktúra.

Legfontosabb fehérje alkotói a következők:

I-es típusú kollagén. Csontspecifikus óriásmolekula, két α_1 - és egy α_2 -láncból álló tripla hélix. Prokollagén monomerként születik, a lizin és a prolin aminosav poszttranszlációs hidroxiláción megy keresztül, majd a monomerek szekretálódnak és mindkét végükről (N- és C-terminális) részleges proteolízissel peptidok hasadnak le. A termékek „ragadóssá” válnak, és hosszú lineáris polimereket képeznek, amelyeket a hidroxilált lizineken keresztül kereszt-kötések stabilizálnak. A hidroxilációs folyamatokhoz C-vitamin kofaktor szükséges, ennek hiányában skorbut alakul ki.

Oszteokalcin. Nagy mennyiségben termelődő kis molekulatömegű fehérje, aktiválásához K-vitamin szükséges, amely elősegíti a γ -szénatom karboxilációját. A karboxiláció a szomszédos glutamát mellett alakul ki, az így létrejövő két szomszédos karboxilcsoport képes lesz a kalciumion megkötésére. A Ca^{2+} megcsapódáshoz integrinkötő szialoprotein is szükséges, az immobilizált komplex ezután kristályosodási magot képez, és kialakul a hidroxipapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Az oszteokalcin működéséhez még egy másik gén átírására is szükség van, amelyet a D-vitamin specifikus kötőfehérjeje aktivál.

A nem karboxilált oszteokalcin egy része a kerin-

gésbe kerül, és fokozza az inzulinválasztást, ill. növeli a zsírszövet inzulinérzékenységét, ezáltal stimulálja az adiponektintermelést. Így az oszteokalcin a szervezet anyagcseréjét is befolyásolja.

Oszteonektin. Az oszteoid komplex része, és összeköttetést biztosít a hidroxipapatit és a kollagénmátrix közt.

Csontspecifikus alkalikus foszfatáz (BAP). Az alkalikus foszfatáz (AP) izoenzimje, az osteoblastok felszínére lokalizálódik, és foszfatáz aktivitásával részt vesz a mineralizációban. A fokozott osteoblastaktivitás a magyarázata annak, hogy az aktív csontnövekedés időszakában a szérumban AP-aktivitása a felnőttértékekhez képest jóval nagyobb.

Citokinek. Az IL-1 és az IL-6, az osteoclastok érését segíti elő. Az érési folyamat bonyolult, az osteoblastok felszínén található és szekretált RANKL (receptor-aktivált nukleáris faktor κ -B ligand) összekapcsolódik az osteoclast prekursor sejteken lévő RANK fehérjével, elindítva az osteoclastok érését.

A gp 130 citokincsalád. Az utóbbi néhány évben több biológiailag aktív fehérjét azonosítottak, amelyek döntően befolyásolják a csontanyagcserét, és hatásuk a gp 130-nak nevezett közös jelátviteli rendszeren keresztül valósul meg. Ide tartoznak: IL-6, IL-11, onkostatinnal M, leukaemiainhibitor faktor (LIF), kardiostrofin-1. Ezek a citokinek molekuláris felépítésükben nagyon hasonlóak egymáshoz, a szolubilis gp 130 rendszeren keresztül mind az osteoclastokra, mind az osteoblastokra hatnak, és szerepük patológiai állapotokban is jelentős (pl. oszteolitikus csont-áttek, Paget-kór).

Egyéb növekedési faktorok. A csontátépülést az eddig felsoroltakon kívül még számos biológiailag aktív fehérje szabályozza, amelyek a csontsejtekben, a csontmátrixban és a környező szövetekben termelődnek. Hatásmechanizmusuk még nem teljesen tisztázott, csak néhányat emelünk ki közülük. Transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), csont eredetű növekedési faktor (BDGF), fibroblast növekedési faktor család (FGF), PDGF, egyéb csontnövekedési faktor (bone morphogenetic protein, BMP). A TGF- β család kiemelt szerepet játszik az osteoblastok proliferá-

ciójában, amelyek azután BMP-t választanak ki, megindítva ezzel a mineralizációt.

Mátrix metalloproteinázok, kollagenázok. Úgy tűnik, az osteoblastok által szekretált proteolitikus enzimek a még nem mineralizálódott oszteoidot képesek feloldani, ami kemotaktikus úton vonzza az osteoclastokat, és azok tovább folytatják a reszorpciót, mintegy helyet készítve az osteoblastok számára. Így a létrejövő kis üregekben megindul a csontújdonképződés és a mineralizáció.

Oszteoprotegerin. Képes a RANKL-molekulához kötődni, így inaktiválja azt. Az osteoclastaktiváció a RANKL és az oszteoprotegerin expresszió egyensúlyától függ.

OSTEOCLASTOK ÁLTAL TERMELT FAKTOROK

Az osteoclastok differenciálódásához szükség van a felsorolt faktorokon kívül macrophag kolónia stimuláló faktorra (MCSF) és prosztaglandin E-re is. Mindezen folyamatokat a parathormonelválasztás is szabályozza. Az osteoclastok képesek protonszekrécióra, így a csont anorganikus összetevőit savval oldják fel. Az organikus komponenseket lizoszomális enzimek segítségével emésztik meg.

Lizoszomális savanyú hidrolázok. Nagyon sok enzim sajátos fehérje tartozik ide, amelyek többek közt a kollagén lebontását is végzik. A teljesség igénye nélkül néhány: tartarátrezisztens savanyú foszfátáz, katepszin-molekulacsalád, szulfatázok, glikozidázok stb.

A CSONTANYAGCSERE ENDOKRIN SZABÁLYOZÁSA

A vérplazma ionizált kalcium szintje a meghatározó az endokrin szabályozásban, ugyanis a mellékpajzsmirigy speciális sejtjei képesek az ionizált forma koncentrációjának érzékelésére.

Parathormon (PTH). A mellékpajzsmirigyben termelődő, 84 aminosavból álló polipeptid, alacsony ionizált kalcium szint stimulálja, magas pedig gátolja a szekrécióját. Féléletideje a keringésben 4 perc. Az osteoclastok aktivitását stimulálja, így emeli a vér kalciumszintjét. A stimuláció nem közvetlenül, hanem

az osteoblastokon keresztül valósul meg: az osteoblastok a magas PTH-szint következtében fokozzák az IL-1, IL-6 és más citokinek, ill. az MCSF és a RANKL termelődését, fokozva az osteoclastok érését. Hosszú távú hatást a PTH-szekrécióra a szervezet aktív D-vitamin-szintje fejt ki.

Kalcitonin. Polipeptidhormon, a pajzsmirigy C-sejtjeiben termelődik, a PTH-val ellentétesen a kalciumszintet csökkenti. Jelentősége jóval kisebb, még nagy kalcitoninkoncentrációnál (pl. kalcitonint termelő tumornál) sem okoz problémát a kalciumhomeosztázisban.

Növekedési hormon (hGH). 191 aminosavból álló fehérje, a hypophysisben termelődik, elválasztását a hypothalamus szabályozza. Nélkülözhetetlen a csontok hosszanti növekedéséhez, hiánya törpenövést, túlprodukcója gigantismust eredményez. Hatását indirekt módon fejt ki, fokozva a máj inzulinszerű növekedési faktor szekrécióját.

Inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1). Az inzulinhoz hasonló szerkezetű polipeptid, degradációját specifikus kötőfehérje akadályozza meg. Képes a csontban a mineralizált területeken deponálódni más növekedési faktorokkal együtt (TGF- β , thrombocyt eredetű növekedési faktor, PDGF) és ott hosszú ideig aktív állapotban maradni. Parakrin módon hat, a chondrocyták stimulációjával és az osteoblastok osztódásának serkentésével. Az IGF-1 hatása kiegyensúlyozottabb, mint a hGH-é, de a növekedés szabályozásában mindkettő egyaránt fontos. A csontban deponálódott növekedési faktorok elősegítik a csonttötteket adó tumorok gyors proliferációját.

Pajzsmirigyhormonok. Elengedhetetlenül szükségesek a normális csontmetabolizmushoz, de hatásukról még keveset tudunk. A trijód-tironin (T_3) hormon nukleáris támadáspontú, és a génátírást szabályozza, a DNS-hez specifikus kötőfehérjéken keresztül kapcsolódik. Újabban kimutatták, hogy a TSH (thyroideastimuláló hormon) az osteoclastok aktivitását gátolja. A nem kezelt veleszületett hypothyreosis is törpenövést eredményez.

Szteroidhormonok. Nem fehérje természetű molekulák, de a csontmetabolizmusban mégis fontos szere-

pet töltnek be. Az androgének és ösztrogének szintén nukleáris támadáspontúak, de hatásuk nagyon összetett. Az ösztrogének gátolják az osteoclastok tevékenységét, stimulálják az oszteoprotegerin szekrécióját és gátolják az osteoclastaktivációt elősegítő faktorok szintézisét. Megfelelő ösztrogénszintnél a csontvesztés lassú, a menopauza után ez felgyorsul. Férfiakban az androgén hormonok mennyisége csak időskorban csökken számottevően, ezért a csontok ásványi anyagának vesztese a nőkhöz képest jóval később következik be.

A *glukokortikoidok* egyaránt hatnak a felépítő és a reszorpciós mechanizmusokra. Gátolják az osteoblastokban a kollagén, az oszteokalcin és az oszteoprotegerin szintézisét, fokozzák a RANKL-produkciót. Ennek következtében nő az osteoclastok száma és aktivitása, fokozódik a csontvesztés.

A fizikai aktivitás szerepe

Régóta ismert, hogy a fizikai inaktivitás csontsűrűségvesztést eredményez. A csont mechanikai terhelését az osteocyták érzékelik, egyelőre kevésbé ismert mechanizmusok alapján, és képesek szintén alig ismert molekuláris folyamatokkal információt közvetíteni a szomszédos osteoblast- és osteoclastsejtek felé. Ily módon a fizikai terhelés befolyásolja, stimulálja a csontmetabolizmust, a mechanikai szükségleteknek megfelelően átépülnek a csontgerendák. Újabban azt is feltételezik, hogy az izom-összehúzódások közvetítette erőhatás az izmok tapadási helyén szintén aktiválja az osteocytákon keresztül a lebontó és felépítő folyamatokat. A megfelelő fizikai aktivitás így módon segíti elő a csontsűrűség megőrzését.

Táplálkozás

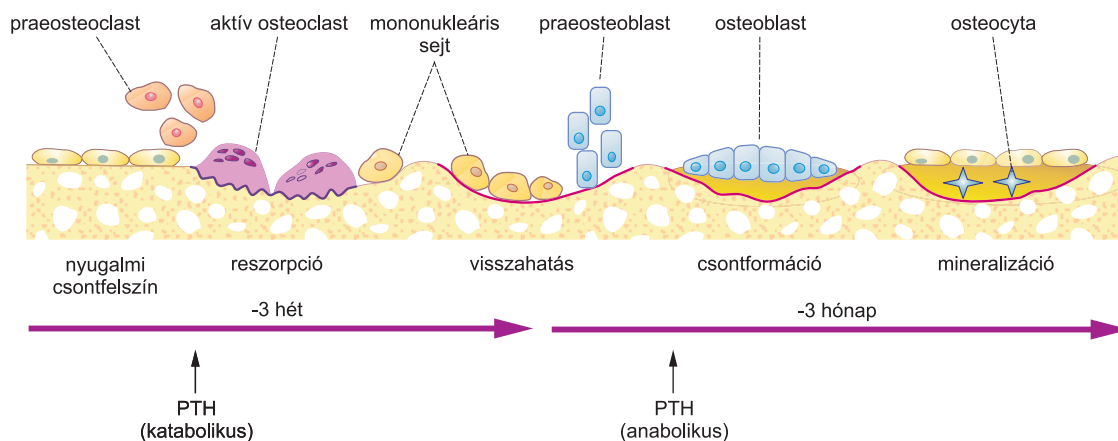
Ahogy az előzőekben láttuk, a csontanyagcsere hat az egész szervezet metabolizmusára az inzulinválasz módosításán keresztül. Ugyanakkor a szervezet tápanyag-ellátottsága is visszahat a csontmetabolizmusra a *leptin* mediálta folyamatok következtében. A leptint az adipocyták termelik (szokás ezért *adipokinnek* is nevezni), és vérszintje az egyén zsírraktárának nagyságával arányos. A leptin szintje diurnális ingadozást mutat, mennyisége a táplálékfelvételtől is függ. Elsődlegesen az agyban fejt ki hatását a hypothalamuson keresztül. A hypothalamus impulzusai a sympathicus neuronokon keresztül stimulálják a β_2 -adrenerg receptorokat (noradrenalinválasz). Az osteoblastok és az osteoclastok aktivitása a stimulustól függően nőhet vagy csökkenhet, egyelőre a mechanizmusáról keveset tudunk. Egy azonban biztos, a tápláltsági állapot és a csontsűrűség között összefüggés van, pl. anorexia nervosában alacsony leptinszintet és osteoporosist látunk.

A 11-83. ábrán a csontátépülés folyamatai láthatók.

A leggyakoribb csontanyagcsere-betegségek

Osteoporosis

Az osteoporosist népbetegségként tartja számon az irodalom, holott természetes biológiai folyamatok eredménye. Amiért mégis betegségként is foglalkoznunk kell vele, azt az a körülmény magyarázza, hogy a civilizációs, táplálkozással-életmóddal összefüggő tényezők fokozottan segítik kialakulását. Szerepet játszik ebben a fizikai inaktivitás, az ásványi anyagokban szegény táplálkozás, a fokozott foszfátbevitel



11-83. ábra. A csontátépülés ciklusai

(pl. foszforsavat tartalmazó üdítő italok és ömlesztett sajtok fogyasztása), ami acidosist és következményes kalciumkiáramlást eredményez a csontokból.

Az osteoporosis diagnózisa egyértelműen képalakító technikákon alapul, de ezek a módszerek nem mondanak semmit a csontmetabolizmus dinamikájáról. Osteoporosisnál ugyanis a csontturnover fokozódik, de a formáció mindig kisebb mértékű a reszorpciónál, ezért csökken a BMD. Az állapottel-mérés helyes stratégiája a csontsűrűségméréshez hozzárendelt biokémiai marker meghatározás. A betegség követéséhez ezután a továbbiakban elegendő a biokémiai paraméterek monitorozása.

Laboratóriumi monitorozás

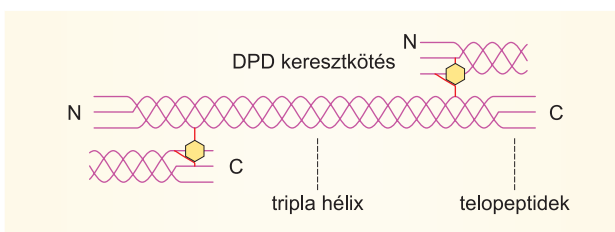
Csontfelépülést jelző (formációs) markerek:

- Oszteokalcin (jobb a teljes, de labilis molekula helyett annak degradációs termékét meghatározni, ezt „N-MID-oszteokalcin” névvel jelölik).
- Prokollagén propeptidek (N- vagy C-terminális I. típusú prokollagén propeptid, P1NP).
- Csont eredetű alkalikus foszfatáz.
- D-vitamin: $25(\text{OH})\text{D}_3$ és/vagy $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Csontleépülést jelző (reszorpciós) markerek:

- Tartarátrezisztens savanyú foszfatáz (TRAP).
- N- vagy C-terminális I. típusú kollagén telopeptid.
- Vizelet-piridinolin- és dezoxi-piridinolin-ürítés.

A kollagén hármas hélixének stabilizálásában a kollagén monomerek két végén (N- és C-terminális) lineáris szakaszok, ún. telopeptidek találhatók. A telopeptidek gyűrűs vegyületek (piridinolin, PYD és dezoxi-piridinolin, DPD) segítségével kovalensen kötődnek a szomszédos kollagénrostok helikális régiójához (11-84. ábra).



11-84. ábra. A csont eredetű kollagén stabilizációja (kereszt-kötés) (DPD: dezoxi-piridinolin)

A reszorpciós markerek széles skáláját határozhatjuk meg, a kis molekulatömegűeket (PYD és DPD) elsősorban a vizeletből, ebben az esetben a mért értékeket a vizelet kreatininkoncentrációjának hányadosaként adjuk meg. A vérszérumból mérhetjük az ún. β -kereszt-kötést, amely a C-terminális telopeptid 8 aminosavból álló stabil degradációs terméke. Az NTX és CTX nevű reszorpciós marker a telopeptidek amino- és karboxi-terminális degradációs termékei, szintén a vérszérumból határozzuk meg őket.

Paget kór

Ismeretlen eredetű betegség, ahol az osteoclastok aktivitása (csontreszorpció) fokozódik és a csontfelépítés ezt nem tudja kompenzálni. A biokémiai követésnél a reszorpciós markerek mennyiségi növekedését tapasztaljuk.

Daganatos csont áttétek

A malignus folyamatok jó részében a daganatra jellemző tumormarkerek mérése terjedt el. A tumormarker-koncentrációk növekedése azonban nem mond semmit a folyamat szöveti lokalizációjáról. Csontmetasztázisok gyanújakor nagyon hasznos lehet a csontszövet érintettségének megítélése szempontjából a reszorpciós markerek követése.

IRODALOM

- ALI, S. M., DEMERS, L. M., LEITZEL, K. et al.: Baseline serum NTx levels are prognostic in metastatic breast cancer patients with bone-only metastasis. *Annals of Oncology* 15:455–459, 2004.
- SRIVASTAVA, A. K., VLIET, ELIZABETH L., LEWIECKI, E. M. et al.: Clinical Use of Serum and Urine Bone Markers in the Management of Osteoporosis. *Curr. Med. Res. Opin.* 21(7):1015–1026, 2005.
- BUCKLEY, K. A., FRASER, W. D.: Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann. Clin. Biochem.* 39(6):551–556, 2003.
- CZUPALLA, C., MANSUKOSKI, H., RIEDL, T. et al.: Proteomic Analysis of Lysosomal Acid Hydrolases Secreted by Osteoclasts. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:134–143, 2006.
- HELMBERG, A.: Bone metabolism. <http://helmberg.at/bone-metabolism.htm>
- HEYNMANN, D., ROUSSELLE, A.-V.: gp 130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12(10):1455–1468, 2000.

- HILL, PA, ORTH, M.: Bone remodelling. *British Journal of Orthodontics* 25: 101–107, 1998.
- ROBLING, A. G., CASTILLO, A. B., TURNER, C. H.: Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodelling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8:455–498, 2006.
- Utility of Bone Markers in Osteoporosis. <http://emedicine.medscape.com/article/128567-overview>
- VESPER, H., COSMAN, F., ENDRES, D. B. et al: Application of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Assessment and Monitoring of Bone Diseases; Approved Guideline. NCCLS document C48-A (ISBN 1-56238-539-9), NCLLS Pennsylvania USA, 2004.

A metabolikus szindróma és a fehérjék

WITTMANN ISTVÁN

A metabolikus szindróma jelentőségét az adja, hogy a mai magyar és általánosságban a nyugati típusú életmódot folytató populációkban folyamatosan és drasztikusan növekvő arányban fordul elő, ill. ezekben a populációkban a mortalitási statisztikák élén járó kardiovaszkuláris betegségek legfőbb kockázati tényezője. Ráadásul újabb adatok alapján úgy tűnik, hogy a nyugati típusú életmódot folytató népeségek második legjelentősebb haláloka, a rákos halálozás kialakulásában is szerepet játszhat.

A metabolikus szindróma komponenseinek száma az utóbbi időben állandó vita tárgya volt. A különböző kritériumrendszerek eltérő komponenseket soroltak ide (lásd később). Mégis mindegyikben közös az anyagcsere-eltérések és a vérnyomás (a hemodinamikai változások) egy tünetegyüttesben való szerepeltetése. Sőt a hemodinamika- és az anyagcsere-zavarok kapcsolatának megjelölésére számos elnevezés is született. Bízást állíthatjuk, hogy egyik elnevezés sem ideális abból a szempontból, hogy a kockázati tényezők és következményeik koherens, együttes megnevezését rövid formában jelenítse meg. A jelenleg egyre elterjedtebben használt kardiometabolikus elnevezéssel kapcsolatban több kritika is felvetődött. Egyrészt ebből az elnevezésből teljesen hiányzik a hypertonia megjelölése, holott az nagyon fontos komponense a szindrómának, és ráadásul ez a terápiásan leginkább befolyásolható. A kardiometabolikus megjelölés úgy tűnteti fel a szindrómát, mintha a szív- és anyagcsere-betegségek közös kockázatát jelölné, holott a szívbetegség kockázataul szolgáló anyagcsere- és magasvérnyomás-betegséget jelöli. Hozzá kell tenni ehhez azt is, hogy nem csak a szívbetegség, hanem minden artériás, macrovascularis betegségnek a kockázati tényezőit összegzi, azaz fennállása esetén nem csak az ischaemiás szívbetegséget, hanem a perifériás, az agyi és egyéb artériás betegséget is keresni, megelőzni és szükség esetén kezelni kell.

Mi több, az utóbbi időben azt is felismerték, hogy a nyugati civilizáció egyik legköltségesebb egészségügyi kezelési eljárásának, a vesepótló kezelésnek az indokát jelentő végállapotú veseelégtelenség kialaku-

lásában is meghatározó szerepet játszik a metabolikus szindróma.

A metabolikus szindróma definíciói

Mint a címből is kitűnik, a metabolikus szindrómának az utóbbi években számos definíciója született. Sőt néhány éve magának a szindrómának a létét is kétségbe vonták. Ezzel kapcsolatban a klinikusok álláspontja az, hogy a megelőzés és a kezelés szempontjából a metabolikus szindróma létezésének hipotézisét szükséges fenntartani, mert legeredményesebb az együtt jelentkező tünetek egyidejű megelőzése és kezelése, az ún. holisztikus, teljességre törekvő megközelítés. Tudományos szempontból a patofiziológiai megközelítés, amely a metabolikus szindróma középpontjába az inzulinrezisztenciát állítja, szintén a szindróma fogalmának megtartása mellett érvel. Az epidemiológiai szempontú nézetek szerint továbbra is kétséges a szindróma léte.

A metabolikus szindróma kritériumrendszerei közül csak a legismertebbek kerülnek bemutatásra. A legkorábbi a WHO által megadott kritériumrendszer [13].

A WHO kritériumrendszere:

1. *Inzulinrezisztencia*, amit a következők valamelyikével identifikálunk:
 - 2-es típusú diabetes mellitus.
 - Emelkedett éhomi plazmaglukózszint (IFG).
 - Csökkent glukóztolerancia (IGT).
 - Pozitivitás hyperinsulinaemiás–euglykaemiás clamppel.
2. Ezenkívül bármelyik kettő a következőkből:
 - Antihipertenzív kezelés és/vagy $> 140/90$ Hgmm vérnyomás.
 - Szérumtriglicerid-szint $> 1,7$ mmol/l.
 - Szérum HDL-koleszterinszint:
 - férfi $< 0,9$ mmol/l;
 - nő $< 1,0$ mmol/l.
 - Testtömegindex (BMI) > 30 kg/m² és/vagy a csípő–derék hányados (WHR):
 - férfi $> 0,9$ (ffi);
 - nő $> 0,85$.
 - Vizelet-albuminürítés (UAER) > 20 µg/min, vagy az albumin-kreatinin hányados (ACR) > 30 mg/g kreatinin.

A *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III Report (ATPIII)* szerinti kritériumrendszer a következőképpen alakul [14]:

1. *Abdominalis obesitas*; derékkörfogat:
 - férfi > 102 cm;
 - nő > 88 cm.
2. Ezenkívül bármelyik kettő a következőkből:
 - Szérumtriglicerid-szint > 1,7 mmol/l.
 - Szérum HDL-koleszterin-szint:
 - férfi < 1,04 mmol/l
 - nő < 1,29 mmol/l
 - Vérnyomás > 130/85 Hgmm.
 - Éhomi plazmaglukóz-koncentráció > 6,1 mmol/l.

A *Nemzetközi Diabetes Szövetség (IDF)* definíciója [15]:

1. *Centralis obesitas*, derékkörfogat:
 - férfi > 94 cm;
 - nő > 80 cm.
2. Ezenkívül bármelyik kettő a következőkből:
 - Szérumtriglicerid-szint > 1,7 mmol/l.
 - Szérum HDL-koleszterin-szint:
 - férfi < 1,03 mmol/l;
 - nő < 1,29 mmol/l.
 - Vérnyomás > 130/85 Hgmm vagy kezelt hypertonia.
 - Éhomi plazmaglukóz-koncentráció > 5,6 mmol/l vagy 2-es típusú diabetes mellitus.

Az IDF legutóbbi, 2009-es definíciós revíziója szerint az előző kritériumrendszer annyiban *módosult*, hogy a centralis obesitas egyenrangúvá vált a többi komponenssel. Azaz bármely három komponens együttes jelenléte esetén a metabolikus szindróma diagnóza kimondható [16].

A metabolikus szindróma előfordulása

A metabolikus szindróma előfordulási adatai hatalmas szórást mutatnak az alkalmazott kritériumrendszer és a vizsgált populáció szerint. Az USA-ban a National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) tanulmányban az ATPIII-kritériumrendszerrel 33,9%, a WHO-kritériumok használatával 36,9% volt a metabolikus szindróma előfordulása. Két másik amerikai tanulmányban (FOS, SAHS) 21–27%

közötti értékeket találtak az ATPIII-kritériumokat alkalmazva. Két francia tanulmányban (STANISLAS, DESIR) az ATPIII kritériumrendszerét alkalmazva 6–9% közötti értékek adódtak, jelentős nemi differenciával. Ráadásul úgy tűnik, hogy az előfordulás gyakoribbá válik, a NHANS-vizsgálatban 1988–1994 és 1999–2000 között 5,6 mmol/l-es éhomi plazmaglukózt alapul véve 28-ról 31,9%-ra, 6,1 mmol/l-es éhomi plazmaglukózt véve 23,1-ről 26,7%-ra nőtt. Mi több, a legutóbbi, 2009-es IDF-kritériumrendszert alkalmazva a 20 év feletti populációban 40,1%-osnak adódott a metabolikus szindróma előfordulási értéke, férfiak körében 41,9, nők körében 38,3%-kal.

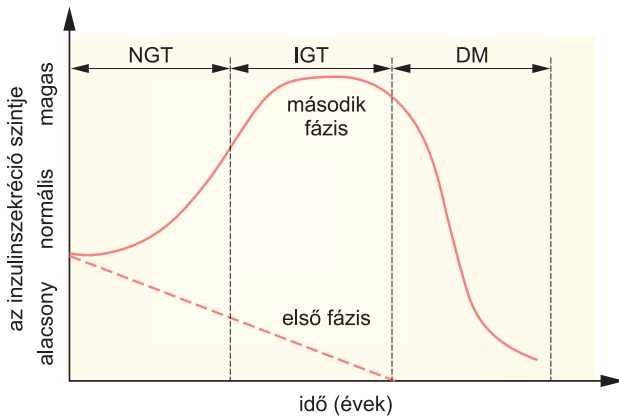
A metabolikus szindróma patogenezise

AZ INZULIN SZEREPE

Kétféle megközelítés különíthető el, amelyek a kritériumrendszerekben is megnyilvánultak. Az egyik szerint (lásd WHO-kritériumrendszer) a metabolikus szindróma kialakulásának központi eleme az inzulinrezisztencia, a másik megközelítés (lásd ATPIII- és IDF-kritériumrendszer) a zsírsejtek eltéréseit helyezi a középpontba. Ez utóbbit a szubklinikus gyulladás során írjuk le részletesen és az inzulinrezisztencia kialakulásának okát is később tárgyaljuk.

Az *inzulinrezisztencia* következményeképpen hyperinsulinaemia, szénhidrát- és zsírsanyagcsere-zavar alakul ki. Érdekes módon az inzulinszekréció két fázisa – az első vagy korai és a második vagy késői fázisa – eltérően változik (11-85. ábra) [17].

A kezdeti normoglykaemiás (normális glukóz-tolerancia, NGT) fázisban általában csak obesitas van, esetleg nem komplett vagy komplett metabolikus szindrómával és csökkenő első, ill. emelkedő második fázisú inzulinszekrécióval. A betegség progressziója során csökkent glukóztolerancia (IGT) alakul ki, és tovább csökken az első, ill. maximálisra nő a második fázisú inzulinszekréció. Amikor a második fázisú inzulinszekréció is csökkenni kezd a pancreas-szigetek β -sejtjeinek kimerülése miatt, akkor diagnosztizáljuk a 2-es típusú diabetes mellitust (DM). Az inzulinszekréció károsodását az is jelzi, hogy az inzulinrezisztencia előrehaladtával folyamatosan nő a keringésben a proinzulin/inzulin arány, jelezve, hogy az inzulinszekréciós granulumokban az inzulin érési



11-85. ábra. Az inzulinsekreció első (korai) és második (késői) fázisának változása a betegség fennállásának előrehaladtával

folymata is károsodik. Ráadásul az emelkedő vércukorszint miatt mind nagyobb lesz a működésében károsodott, nem enzimatikusan glikált inzulin és inzulinreceptor aránya.

Amennyiben a metabolikus szindrómás betegeknél károsodik a vesefunkciója (említettük, hogy a metabolikus szindróma a veseelégtelenség leggyakoribb oka), akkor csökken a kis molekulatömegű fehérjék eliminációja is. A vesében ugyanis a 65 kDa molekulatömeg alatti fehérjék szabadon filtrálódnak, majd a proximális tubularis sejtek által reabszorpcióra kerülnek. A reabszorpció után túlnyomó részük a tubularis sejtekben lebomlik. Így tehát veseelégtelenségben a csökkenő filtráció miatt megemelkedik az inzulin, sőt a C-peptid szintje is, ami miatt az inzulinrezisztencia ezekben a betegekben kevésbé szembetűnő, ill. kezelésük során a gyógyszerek és az inzulin dózisa gyakran csökkenthető. A C-peptidről szerkezeti, fiziológiai, szabályozási információ az interneten olvasható [18].

FEHÉRJÉK AZ INZULIN KIVÉTELÉVEL

OBESITASBAN A ZSÍRSEJTEK ÁLTAL TERMELT PROTEINEK

Obesitasban a zsírsejtek extracelluláris mátrixfehérjéket, anyagcsere, immun hatású és egyéb proteinek termelnek:

- *Extracelluláris mátrixfehérjék:* α_2 -makroglobulin, katepszin B, D, L, S, kollagén α_1 III, IV, VI,

XIV, XV, XVII, kollagén α_2 I, IV, VI, kollagén α_3 VI, disztroglikán, entaktin, fibulin 2, 3, fibronektin, galektin-3-kötő fehérje, gelzolin, laminin α_4 , β_1 , γ , lizil-oxidáz, matrilin-2, mátrix-metalloproteináz 1–24, szöveti metalloproteináz inhibitor 1–4, oszteonektin, perlekan, prokollagén C-proteináz aktiváló protein, protein-lizín-6-oxidáz, spondin-1, tenacin, trombospondin 1, 2.

- *Anyagcsere-hatású termékek:* adiposzin, adiponektin, apelin, apo-E, IGF-1, IGF-1-kötő fehérje, lipoprotein-lipáz, leptin, éhezés indukálta obesitasfaktor, PAI-1, rezisztin, retinolkötő protein-4, vaszpin, viszfatin.
- *Immunhatású proteinek:* α_1 savas glikoprotein, kolóniasztimuláló faktor-1, komplementkomponens-inhibitor C1, komplement C1, C2, C3, C4, C7, komplementfaktor B, C és D, CRP, haptoglobulin, interleukin 1- β , interleukin 4, 6, 7, 8, 10, 12, 18, lipokalin 24p3, macrophagmigrációgátló faktor-1, monocita kemoattraktáns protein-1, szérumamiloid A3, TNF- α .
- *Egyéb proteinek:* angiopoetin 1, 2, angiotenzinogén, kalcitonin, kemerin, ciklofilin A, C, extracelluláris szuperoxid-dizmutáz (SOD), galektin-1, fibroblastnövekedési faktor, májnövekedési faktor, aldosteron-releasing faktor, idegnövekedési faktor, pigment-epithelium eredetű faktor, transzferrin, stroma eredetű faktor-1, transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), szöveti faktor, vascularis endothelialis növekedési faktor.

Ezek közül a fehérjék közül a következőkkel foglalkozunk részletesebben, tekintettel arra, hogy szorosabb a kapcsolatuk a metabolikus szindrómával: extracelluláris mátrixfehérjék, tumornekrozis-faktor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1), leptin, adiponektin, rezisztin, retinolkötő protein-4, viszfatin, aldosteron-releasing faktor.

Extracelluláris mátrixfehérjék

Obesitasban a zsírsejtek megváltoztatják az extracelluláris mátrix összetételét, ami lokális gyulladáshoz vezet. Ectopiás zsírszövet képződik az erek és a szív körül, amely károsítja működésüket, talán éppen citokinek termelése révén is. Ma még nem

tudjuk, hogy az extracelluláris mátrix megváltozása oka vagy következménye-e az obesitasban látott eltéréseknek.

TNF- α [19]. Szérumszintjének emelkedése a sejtek felszínén megtalálható citokinreceptor aktivációján keresztül intracelluláris oxidatív stresszt indukál. Ennek mechanizmusa a NADPH-oxidáz enzim aktivációja, ami fokozott szuperoxid szabadgyöktermelést indít meg. A szuperoxid szabad gyököt a SOD emzim diszmutálja hidrogén-peroxiddá, amely gátolja az inzulin intracelluláris jelátvitelét és ezáltal inzulinrezisztenciát vált ki. A folyamat pozitív visszacsatolást idézhet elő azáltal, hogy az intracelluláris oxidatív stressz az NF- κ -B nukleáris receptort aktiválva további citokin- és citokinreceptor-expressziót indukálhat és ezzel circulus vitiosus alakulhat ki.

Interleukin-6 (IL-6) [20]. Az inzulinrezisztenciával való kapcsolata ellentmondásos. Egyesek szerint az inzulinreceptor-szubsztrát ubikvitin keltette degradációját okozza a májban és a zsírsejtekben. A vázizomban azonban fizikai aktivitás során, amikor az inzulinérzékenység jelentősen javul, drámai IL-6-emelkedést írtak le.

Monocytic kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) [21]. A zsírsejtek által termelt MCP-1 kemotaktikus hatása a macrophagokra. A zsírszövet macrophaginfiltrációja fontos szerepet játszik a szubklinikus gyulladás kialakulásában, amely nagy jelentőségű az inzulinrezisztencia létrejöttében (nem kis részben szerepe van ebben a macrophagok által termelt citokineknek, lásd a TNF- α -nál).

Leptin [22]. Elnevezése a görög leptosz (sovány) szóból ered. Ez a 167 aminosavból álló hormon elsősorban a zsírsejtekben termelődik, és az étvágyat, valamint az energi-felhasználást szabályozza. Túltáplálás hatására termelése nő, éhezéskor csökken. Receptorra a citokinreceptor-családba tartozik, jelátvitelében szerepel az inzulinreceptor-szubsztrát is. Növeli a citokintermelést és ezáltal is befolyásolja a szubklinikai gyulladást. Fölvetődött a leptinkezelés lehetősége obes, metabolikus szindrómás betegek esetében, a kezelés azonban hatástalannak bizonyult, mert leptinrezisztencia alakult ki a betegekben. A legmagasabb leptinszinteket szérumban metabolikus szindrómás,

uraemiás betegekben lehet mérni, ennek szerepe lehet az uraemiás fogyás kialakulásában.

Adiponektin [23]. Ezt a 30 kDa-os molekulatömegű proteint is a zsírsejtek termelik; szérumszintje inzulinrezisztenciában csökken. Polimer formában van jelen a keringésben, oligomer (trimer, hexamer) és polimer (18-szoros) formája is előfordul. Inzulinérzékenységet javító formája nagymértékű polimerizációs fokot mutat. Ubikviter két receptorán (AdipoR1 és AdipoR2) keresztül fejt ki hatását, amely többek között az AMP-kinázon (AMPK) keresztül jön létre.

Rezisztin [24]. Ez a 12 kDa molekulatömegű, homodimerként szekretálódó fehérjehormon zsírsejtekben és macrophagokban is expresszálódik. Kimutatták kapcsolatát az inzulinrezisztenciával, gátolja az inzulin kiváltotta glukóz- és zsírsavfelvételt. Úgy tűnik, hogy szoros, de ellentmondásos kapcsolatban áll a gyulladásos folyamatokkal. Lipopoliszaharid (LPS) növeli a rezisztin termelődését, és a rezisztin hatására emelkedik a TNF- α -képződés. Ugyanakkor néhány sejtkísérletben ezeket az eredményeket nem sikerült megerősíteni és humán epidemiológiai vizsgálatokban az egyéb adipokinre való korrigálás után a rezisztin inzulinrezisztenciára kifejtett hatása kismértékűnek tűnt.

Retinolkötő protein-4 [25]. Overexpressziója során inzulinrezisztenciát írtak le, sőt a szérumszintje összefüggést mutatott a metabolikus szindróma komponenseivel, az obesitással, a magas systolés vérnyomással, a szérumtriglicerid-szinttel és a HDL-koleszterin-koncentrációval. Szoros inverz korrelációt találtak a zsírszöveti GLUT-4 (az inzulinfüggő glukóztranszporter) expressziójával. Mivel a retinolkötő protein-4 az A-vitamin transzportere, a továbbiakban szükség lesz annak megvizsgálására, hogy van-e összefüggés az A-vitamin metabolizmusa és a metabolikus szindróma között.

Viszfatin [26]. A zsírsejtekben és a macrophagokban termelődő adipokin. Korai B-sejt-növekedési faktorként ismerték meg először, és csak később derült ki, hogy hat a szénhidrát-anyagcserére is. Számos gyulladásos folyamatot befolyásol, ezért úgy tekinthetünk rá, mint primeren gyulladásos mediátorra. A vércukorszintet csökkenti, az inzulinrezisztenciát mérsék-

li. Ezt a hatását azzal éri el, hogy növeli az IRS-1 és az IRS-2 tirozin-foszforiláltságát és aktiválja az Akt-t. Érdekes módon a viszfatin kötődik az inzulinreceptorhoz, de más pozícióban, mint az inzulin. Szérum-szintje nem változik az étkezéssel párhuzamosan, és koncentrációja csak mintegy tizede az inzulinénak.

Aldoszteon-releasing faktor [27]. A 2003-ban közölt adatok arra utalnak, hogy a zsírszövetek termelnek egy speciális fehérje természetű hormont, amely a mellékveséből aldoszteronszekréciót indukál. Az aldoszteron pedig intracellulárisan oxidatív stresszt kelt, gátolja az inzulinreceptor-szubsztrát tirozinjának foszforilálását és serkenti a szerin foszforilálását. Ez csökkenti az inzulin-jelátvitelt (a részleteket lásd még később).

Az endoplazmatikus retikulum stressz

Az endoplazmatikus retikulum az a sejtorganelum, amely a fehérvér szintézisét végzi. Fokozott fehérjeszintézis esetén az endoplazmatikus retikulum nem tud megbirkózni a feladattal és károsodik működése, ilyenkor endoplazmatikus retikulum stresszről beszélünk. Következménye, hogy a fehérvér „folding”-ja nem történik megfelelően, és a fehérvér az endoplazmatikus retikulumban akkumulálódik. Ennek hatására a sejt speciális folyamatokat indít be (*unfolded protein response, UPR*), amelyek eredménye citokintermelés és gyulladás lesz. Az endoplazmatikus retikulum stressz során az inzulinreceptor-szubsztrát szerin-foszforilációja alakul ki, amely önmagában inzulinrezisztenciát kelt.

EGYÉB HORMONOK

Sok hormon esetében igazoltak inzulinrezisztenciát okozó hatást. Közismert a glukokortikoidok, a pajzsmirigyhormonok, a növekedési hormon (IGF-1), a sympathicus idegrendszer jelátvivőinek és a glukagonnak a kontrainzuláris hatása.

Gastrointestinalis hormonok

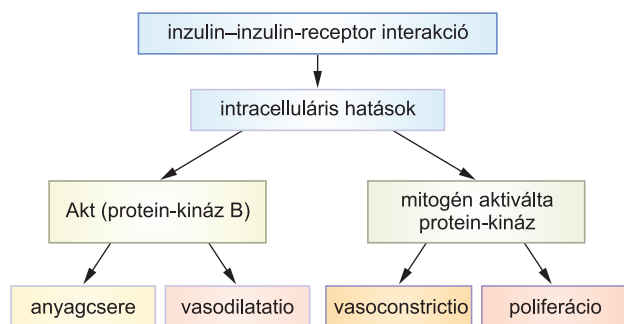
Ghrelin [28]. A ghrelin génnek 3 terméke ismert: az acil-ghrelin, a dezacil-ghrelin és az obesztatin. Az acil-ghrelin 28, a dezacil-ghrelin 27, az obesztatin 23 aminosavból áll, és a preproghrelinből proghrelinen keresztül képződnek. Az acil-ghrelin (GHS-R1a és GHS-R1b) és a dezacil-ghrelin (GHS-Rx) receptora

ismert, de az obesztatiné nem. Az acil-ghrelin a gyomor X/A sejtjeiben képződik, növeli a gastrointestinalis traktus motilitást, képes átlépni a vér-agy gáton és fokozza az étvágyat, de az obesztatin nem képes passzálni a vér-agy gátat. Az acil-ghrelin csökkenti az inzulinszekréciót és az inzulinérzékenységet. Ezzel szemben a dezacil-ghrelin növeli az inzulinszekréciót és javítja az inzulinérzékenységet. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az acil- és dezacil-ghrelin aránya fontos lehet az inzulinérzékenység szempontjából és a dezacil-ghrelinnek talán terápiás szerepe is lehet a metabolikus szindrómában. Ezirányú további vizsgálatok szükségesek.

Inkretinek [29]. Hagyományosan két hormont szokás itt megemlíteni, amelyek a metabolikus szindróma szempontjából fontosak lehetnek: a *glukagonszerű peptid-1-et (GLP-1)* és a *glukózdependens inzulinotrop peptidet (GIP)*. Az inzulinrezisztenciával járó 2-es típusú diabetes mellitus kezelésében mind szélesebb körben alkalmazott ún. inkretinkezelés ezek befolyásolásán vagy hatásuk imitálásán keresztül valósul meg. A GLP-1 az ileum és a vastagbél L-, a GIP a duodenum K-sejtjeiben termelődik. Mindkettő glukózsztartékon függően stimulálja az inzulinszekréciót, elsősorban a korai (első) fázist. Ez a hatásuk a nervus vagus afferenciájának befolyásolásán keresztül valósul meg. A GLP-1 gátolja a gyomorürülést, csökkenti a táplálékfelvételt és így a testsúlyt is, gátolja a glukagonszekréciót, de mindezekre a GIP nincs hatással. A GLP-1 és a GIP lebontását végző enzim, a dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-4) percek alatt hatástalanítja ezeket a hormonokat. A DPP-4 enzim gátlók nagy számban kerültek forgalomba az utóbbi években az obes, 2-es típusú cukorbetegség kezelésére. GLP-1-mimetikus hatással rendelkező, a DPP-4-inaktivációra rezisztens készítmények is elérhetők, amelyeknek testsúlycsökkentő hatásuk van.

Az inzulin intracelluláris jelátvitelében szerepet játszó proteinek és működésük károsodása metabolikus szindrómában

Az inzulin intracelluláris jelátvitelére egy olyan fehérjefoszforilációs kaskádrendszer jellemző, amely az inzulinjelet döntően négy irányba továbbítja (11-86. ábra).



11-86. ábra. Az inzulin intracelluláris jelátvitelének sematikus ábrázolása

A folyamat részletei az interneten megtalálhatók:

Inzulin-jelátvitel, vasodilatatio, AKT, eNOS [30], [31].

Inzulin, sejtsztódás, MAPK-rendszer [32], [33].

Szabad gyökök, inzulin, inzulinrezisztencia, jelátvitel [34], [35], [36] [37].

Az anyagcsere- és a vasodilatációs hatás kialakulásában egyrészt az Akt (protein-kináz B) út vonal játszik döntő szerepet. Ebben a foszforilációs rendszerben ugyan fontos szerepe van az Akt-nak, de annak csak egy eleme, hiszen előtte az inzulinreceptor-szubsztátok (IRS, 1-4 izoenzim), a PI-3 kináz, a PDK (foszfoinozítiddependens protein-kináz) és utána is számos kináz játszik abban szerepet, hogy kialakuljon az inzulin anyagcserehatása. Ez által transzlokálódik a glukóz izomra és zsírszövetre jellemző inzulinfüggő transzportere, a GLUT-4 (glukóztanszporter-4) az intracelluláris kompartmentből a plazmamembránba, aminek segítségével bejuthat a glukóz a sejtekbe. Másrészt viszont az Akt közvetlen módon foszforilálja az aktiválóhelyen az endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) enzimet és ez által vasodilatációt okoz.

Harmadrészt a mitogén aktiválta protein-kináz (MAPK) rendszeren keresztül sejtprolifériációt, differenciációt, valamint endotelinszekréciót vált ki. Az endotelin-1 pedig vasoconstrictor hatású.

Az inzulin tehát egyszerre hat az anyagcserére és a hemodinamikára (a vérnyomásra), azaz megadja a metabolikus szindróma anyagcsere-eltéréseinek és a vérnyomás emelkedésének a közös kulcsát.

Metabolikus szindrómában *inzulinrezisztencia* van, amely azonban több szempontból is szelektív. Egyrészt szervszelektív, azaz a vesében az inzulin

nátriumot retineáló hatása megtartott marad, így a hyperinsulinaemia nem képes kompenzálni az inzulinrezisztencia miatt kiesett anyagcserehatást, de a vesében a fokozott nátriumretenció miatt folyadék-visszatartáshoz és vérnyomás-emelkedéshez vezet. Másrészt pedig szelektív az inzulinrezisztencia olyan szempontból is, hogy míg az Akt-út vonal nem működik jól, addig a MAPK-út vonalon normális a jelátvitel. Ennek az utóbbinak az a következménye, hogy a második fázisú fokozott inzulinszekréció hatására létrejövő hyperinsulinaemia fokozott mitogén hatása következtében az érfali simaizomban sejtprolifériáció alakul ki, amely az atherosclerosis korai jellegzetessége. Sőt újabban ennek a fokozott MAPK-hatásnak szerepet tulajdonítanak a metabolikus szindrómában jelentkező megnövekedett tumorkockázatnak is.

Végül az inzulinrezisztenciában az inzulin intracelluláris jelátvitelének megtartott MAPK-út vonala az említett módon az endotelin-1 fokozott termeléséhez és felszabadulásához vezet, ami ellensúlyozza az inzulin–eNOS–nitrogén-monoxid út vonal vasodilatációs hatását, sőt vasoconstrictiót okoz, amely vérnyomás-emelkedéshez vezet.

Felvetődik a kérdés, hogy mi okozza az inzulin-jelátvitelnek ezt a szelektív károsodását. A korrekt válasz erre a kérdésre az, hogy ma még nem tudjuk pontosan. Néhány újabb biztató eredmény szerint szerepe lehet ebben a jelátviteli fehérjék nem enzimatis glikációjának, valamint az enzimatis O-glikozilációnak.

Ugyancsak szerepet játszhat a folyamatban a fehérjék redoxregulációja. Ismert ugyanis, hogy az inzulin jelátvitelében fontos szerepe van a hidrogén-peroxidnak, amely az inzulin hatására részben a NADPH-oxidáz, részben a szétkapcsolt eNOS aktiválása révén termelődik. Az eNOS szétkapcsolódásának számos oka lehet metabolikus szindrómában, pl. az eNOS glutationilációja révén is. A hidrogén-peroxid az adozin-monofoszfát-kináz (AMPK) aktivációján keresztül befolyásolja az inzulin anyagcserehatását, valamint az extracelluláris receptor-kináz (ERK) aktiváló foszforilációját bontó foszfatáz enzim SH-csoportjának oxidálása révén is. A foszfatázt inaktíválva az ERK foszforilációját és így aktivitását is stabilizálja. Ez utóbbi a MAPK-út vonal aktiválódásában, sejtprolifériációban és vasoconstrictióban jelenik meg. Azt is kimutatták, hogy a hidrogén-peroxid akut hatása az inzulin anyagcserehatásának növekedéséhez, króni-

kus hatása annak csökkenéséhez vezet, valószínűleg az IRS-1 foszforilációjának megváltoztatása révén.

Tovább bonyolítja a képet, hogy az Akt és a MAPK-rendszer között intracellulárisan egy ultra-rövid visszajelzéses rendszer is működik, amely az mTOR–IRS (mammalian target of rapamycin, az Akt útvonal egyik effektora) és az ERK–IRS vonatkozásában valósulhat meg, így az inzulin-jelátviteli utak egymás aktivitását is szabályozzák.

*

Összefoglalás. A metabolikus szindrómára úgy kell tekintenünk, mint korunk legjelentősebb egészségügyi kihívására. A fehérjék szintjén az extracelluláris mátrix proteinektől a hormonokon és a citokineken át az intracelluláris foszforilációs kaszkádban részt vevő proteinekig számtalan közreműködő identifikálható a tünetegyüttes kialakulásában.

IRODALOM

- [1] ALBERTI, K. G., ECKEL, R. H., GRUNDY, S. M. et al.: International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640–1645, 2009.
- [2] ANTUNA-PUENTE, B., FEVE, B., FELLAHI, S. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34(1):2–11, 2008.
- [3] CHEN, C. Y., ASAKAWA, A., FUJIMIYA, M. et al.: Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol. Rev.* 61(4): 430–481, 2009.
- [4] GILES, W. H.: A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 26(3): 575–581, 2003.
- [5] FORD, E. S., GILES, W. H., MOKDAD, H.: Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 27(10): 2444–2449, 2004.
- [6] GRAHAM, T. E., YANG, Q., BLÜHER, M. et al.: Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 354(24):2552–2563, 2006.
- [7] HALBERG, N., WERNSTEDT-ASTERHOL, I., SCHERER, P. E.: The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37(3):753–768, 2008.
- [8] MAUMUS, S., MARIE, B., SIEST, G. et al.: A prospective study on the prevalence of metabolic syndrome among healthy french families: two cardiovascular risk factors (HDL cholesterol and tumor necrosis factor- α) are revealed in the offspring of parents with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 28(3):675–682, 2005.
- [9] PANG, S. S., LE, Y. Y.: Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol. Immunol.* 3(1):29–34, 2006.
- [10] RABE, K., LEHRKE, M., PARHOFER, K. G. et al.: Adipokines and insulin resistance. *Mol. Med.* 14(11-12): 741–751, 2008.
- [11] RASOULI, N., KERN, P. A.: Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(11. Suppl. 1.):S64–S73, 2008.
- [12] VACHHARAJANI, V., GRANGER, D. N.: Adipose tissue: A motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life* 61(4):424–430, 2009.
- [13] http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf
- [14] <http://circ.ahajournals.org/cgi/reprint/109/3/433>
- [15] (http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf)
- [16] <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/120/16/1640?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=metabolic+syndrome+joint+statement&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT> (metabolikus szindróma 2009. évi definíciója)
- [17] <http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin>
- [18] <http://en.wikipedia.org/wiki/C-peptide>
- [19] http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha
- [20] http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_6
- [21] http://www.scitopics.com/Monocyte_chemoattractant_protein_1.html
- [22] <http://en.wikipedia.org/wiki/Leptin>
- [23] <http://en.wikipedia.org/wiki/Adiponectin>
- [24] <http://en.wikipedia.org/wiki/Resistin>
- [25] http://en.wikipedia.org/wiki/Retinol_binding_protein_4
- [26] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691043>
- [27] <http://www.pnas.org/content/100/24/14211.long>
- [28] <http://en.wikipedia.org/wiki/Ghrelin>
- [29] <http://www.glucagon.com/pdfs/CellMetabolism2006.pdf>
- [30] <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/full/28/5/463>
- [31] <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/101/13/1539>
- [32] <http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/141/3/922>
- [33] <http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/content/full/16/2/429>

- [34] http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T38-51P9YB8-2&_user=10&_coverDate=12%2F13%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=4ef2847708edb8103de1-fe3224d3dc86&searchtype=a
- [35] <http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/abstract/50/2/384>
- [36] http://www.medscape.com/viewarticle/448389_3
- [37] <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/short/23/5/599>

A proteomika kutatási eredményei a jelen és a jövő klinikai laboratóriumában

MÁRK LÁSZLÓ

A patológiás körülményekre jellemző molekuláris folyamatok diagnosztikája során a legváltozatosabb típusú és koncentrációjú biomolekulák, többek között proteinek, peptidek, hormonok, gyógyszermetabolitok megbízható minőségi és mennyiségi vizsgálatát igényli. Ennek a kihívásnak megfelelően a klinikai laboratóriumok a legmodernebb analitikai módszerekkel vértetik fel magukat, ebben az eszköztárban többek között megtalálható a gáz- és folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria is. A különböző polaritású és szerkezetű biomarkerek vizsgálata során szinte az összes ionforrás- és analízistípust alkalmazzák, de a legelterjedtebbek az elektropray és a lézerdeszorpciós ionizáció alapuló, valamint a kvadrupól, ioncsapdás és repülési idő analízissel, ill. ezek kombinációjával ellátott készülékek. A jelenlegi gyakorlatban a tömegspektrometriát elsősorban a kis molekulatömegű vegyületek meghatározására használják, így nagy jelentősége van az újszülöttkori szűrés, az endokrin betegségek diagnosztikája, a toxikológia és a farmakológia területén. A biopolimerek, elsősorban peptidek, polipeptidek és fehérjék tömegspektrometriára épülő diagnosztikus vizsgálata teljesen új és rendkívül perspektívus irányt képvisel a laboratóriumi medicina területén. Segítségével nem csupán a vegyületek mennyiségi vizsgálatát lehet elvégezni, de egyaránt megvalósítható a potenciális biomarkerek szekvenciájának, poszttranszlációs kémiai módosításainak és metabolitjainak vizsgálata.

A tömegspektrometria alkalmazása a proteomikában

A proteomika napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő tudományága, amely az elmúlt évtizedekben mind módszertanát, mind bioinformatikai hátterét tekintve forradalmi változásokon ment keresztül. A proteomika kifejezést először 1995-ben kezdték el használni egy sejt, szövet vagy szerv összes fehérjéjének kvalitatív és kvantitatív meghatározására. A proteom a genom által kifejezett teljes fehérjeállományt jelenti, így e fogalom az élő szervezetben előforduló összes,

szerkezetében akár a legkisebb mértékben eltérő fehérje megismerésével foglalkozó tudományterület, amely a genommal kapcsolatos kutatás kiegészítőjeként jött létre. Mára már önálló területté nőtte ki magát a tudományos köztudatban. Jelentőségét az is nagyon jól bizonyítja, hogy a proteomikai vizsgálatok a korszerű gyógyszerkutatás és az orvostudomány továbbfejlesztésében, ill. a mainál hatékonyabb diagnosztikai eljárások és terápiás szerek kifejlesztésében elengedhetlenné vált. A proteomika kutatási területébe tartozik az egyes fehérjék eredetének felderítése, rendszertani besorolása, a különböző forrásból származó, de azonos biológiai funkciót ellátó proteinek szerkezetének és lokalizációjának meghatározása, jelenlétének vagy hiányának igazolása. A modern fehérjeanalitikai eljárások segítségével lehetővé vált a komplex biológiai rendszerek teljes proteomjának akár szubfemtomol tartományban végzendő kvalitatív és kvantitatív vizsgálata. A tömegspektrometriás eljárások nagy érzékenységűeknek, rendkívüli specifikusságúknak, széles koncentrációtartományon belüli alkalmazhatóságuknak, reprodukálhatóságuknak, ill. automatizálhatóságuknak köszönhetően kiválóan alkalmazhatóak a klinikai diagnosztikában. Az MS – a jelenleg általánosan alkalmazott rutin-diagnosztikai eljárásokkal szemben – olyan dinamikus analitikai szemléletmódot tesz lehetővé, amely egyedülálló lehetőségeket nyújt többek között a diagnosztikai jelentőségű biomarkerek kimutatása, a lipidomika, ill. a metabolomika területén. Segítségével lehetőségünk van a már jól bevált és pontosan validált diagnosztikai biomarkereken túl azok analógjainak, izoformáinak, metabolitjainak és molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálatára, ill. új diagnosztikus jelentőségű biomolekulák kimutatására. A tömegspektrometria további előnye, hogy az archivált tömegspektrumok kiértékelése és statisztikai elemzése bármikor megismételhető, így a jövőben olyan paraméterek és komponensek is elemezhetővé válnak, amelyek patológiás és diagnosztikai szerepe a vizsgálatok lefolytatásakor még nem ismert.

A tömegspektrometria igen gyors és hatékony diagnosztikai módszer lehet a fertőző humán patogének kimutatására. Különböző intakt mikroorganizmusok, mint baktériumok, vírusok és gombák kimutatására elsősorban a MALDI TOF tömegspektrometriát alkalmazzák, amelynek többek között rendkívüli előnye nagy mintaáteresztő képessége és egyszerű mintaelőkészítési igénye, valamint az, hogy

széles tömegtartományban (kb. 50 Da-tól 500 000 Da-ig) alkalmazható. A módszert hatékonyan alkalmazzzák olyan tömegesen előforduló fertőzések esetében, mint pl. a HIV, a mikobakteriális fertőzések és a malária, de nem csupán a kórokozók kimutatása végezhető el a MALDI TOF MS segítségével, hanem meghatározható az új multidrogrezisztens patogének jelenléte és kialakulása egyaránt. A humán patogének proteomjának meghatározása alkalmas fajspecifikus diagnózis felállítására, amelyet kiválóan kiegészít a kórokozókra jellemző kisebb molekulatömegű komponensek, pl. mycobacterium esetében a sejtmembrán felépítő specifikus mikolsavak azonosítása. Rendkívül perspektivikus alkalmazási terület a vírusfertőzések (HIV, HBV, HCV, HPV stb.) során a fertőzött sejten belül tapasztalható proteomikai változások tömegspektrometriás vizsgálata, amelyre 2D-PAGE gélelektroforézist, MALDI TOF MS-t, folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriát, SELDI proteinchipet és proteinmikroarray technikákat lehet alkalmazni. A gazdasejt expressziós proteomikai elemzésén kívül diagnosztikai szempontból jelentős lehet a gazdaszervezet immunválaszára jellemző biopolimerek, biomarkerek kimutatása és a fertőző patogén proteomjának és annak módosulásainak evolúciós vizsgálata.

Az újszülöttkori szűrések esetében a tömegspektrometria jól bevált, hatékony diagnosztikai módszer, azonban főként a különböző lipidek és egyéb kis molekulatömegű biomarkerek (pl. aminosavak) kimutatására használják. Viszonylag kevés az olyan applikáció, amelyben diagnosztikai jelentőségű peptidek és fehérjék kimutatását végzik el. Ezek közül az egyik legjelentősebb a hypophysis adenilát-cikláz-aktiváló polipeptidje (PACAP) jelenlétének, lokalizációjának és koncentrációjának vizsgálata.

A tömegspektrometriára épülő peptidomika és proteomika egyik legnagyobb felhasználási területe az onkológia. A belignus és malignus elváltozások korai fázisban végzett kimutatása és differenciálása, valamint a gyógyszeres és sugárterápia nyomon követése egyaránt elvégezhető a modern tömegspektrometria segítségével. Számos olyan vizsgálat látott napvilágot, amelyekben különböző testfolyadékok (vér, szérum, vizelet, nyál stb.) proteomikai vizsgálatát végezték el tumorokra jellemző, korai fázisban is kimutatható biomarkerek keresése céljából. Többek között ilyen potenciális tumorbiomarker lehet az

annexin 1 és 2, valamint a peroxiredoxin-2, amelyek hatékonyan mutathatók ki nem invazív módon pl. a betegek nyálából is.

A központi idegrendszerben igen kis mennyiségben előfordulóuropeptidek és proteinek nagyhatékonyságú vizsgálata az egyik legfontosabb alkalmazási területe a tandem tömegspektrometriának. Ennek kiváló példája a már említett PACAP MALDI TOF és ESI tömegspektrometriás vizsgálata (11-87. ábra). A PACAP legnagyobb mennyiségben a központi és a perifériás idegrendszerben fordul elő, de kimutatható más szövetekben is, ilyenek pl. az endokrin mirigyek, az ivarszervek, a gastrointestinalis traktus teljes hossza és a cardiovascularis rendszer. A PACAP számos endokrin hatása ismert (pl. a pajzsmirigy, a gonadális szteroidogenezis, a spermiogenezis és az ovarialis follicularis fejlődés befolyásolása, a pancreas inzulintermelésének és a mellékvese katekolaminszintézisének stimulációja és a memóriafolyamatok serkentése). Központi szerepet játszik a ritmusszabályozásokban (pl. alvásszabályozás, hőszabályozás). Részt vesz a húgyúti szervek vizeletürítési reflexében, a simaizom reflexáns hatásában és a stresszadaptációs magatartás szabályozásában. A PACAP-nál beszélünk kell neurotrofikus és neuroprotektív hatásról is. A PACAP különböző jelátviteli utakon keresztül fejti ki antiapoptotikus, protektív hatásait, amelyek egymással szorosan konvergálnak. A citoprotektív hatásokért, majdnem minden esetben a PAC1-receptor felelős, de a hatások közvetítésében a VPAC is szerepet játszik. E vegyület neuroprotektív hatásával szorosan összefügg az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepe. A PACAP és receptorai már igen korán megjelennek az új idegrendszerben, és szerteágazó hatásaik vannak a neurogenézisre, a neuronális differenciációra, az idegrendszeri mintázat kialakítására és a gliasejtek fejlődésére.

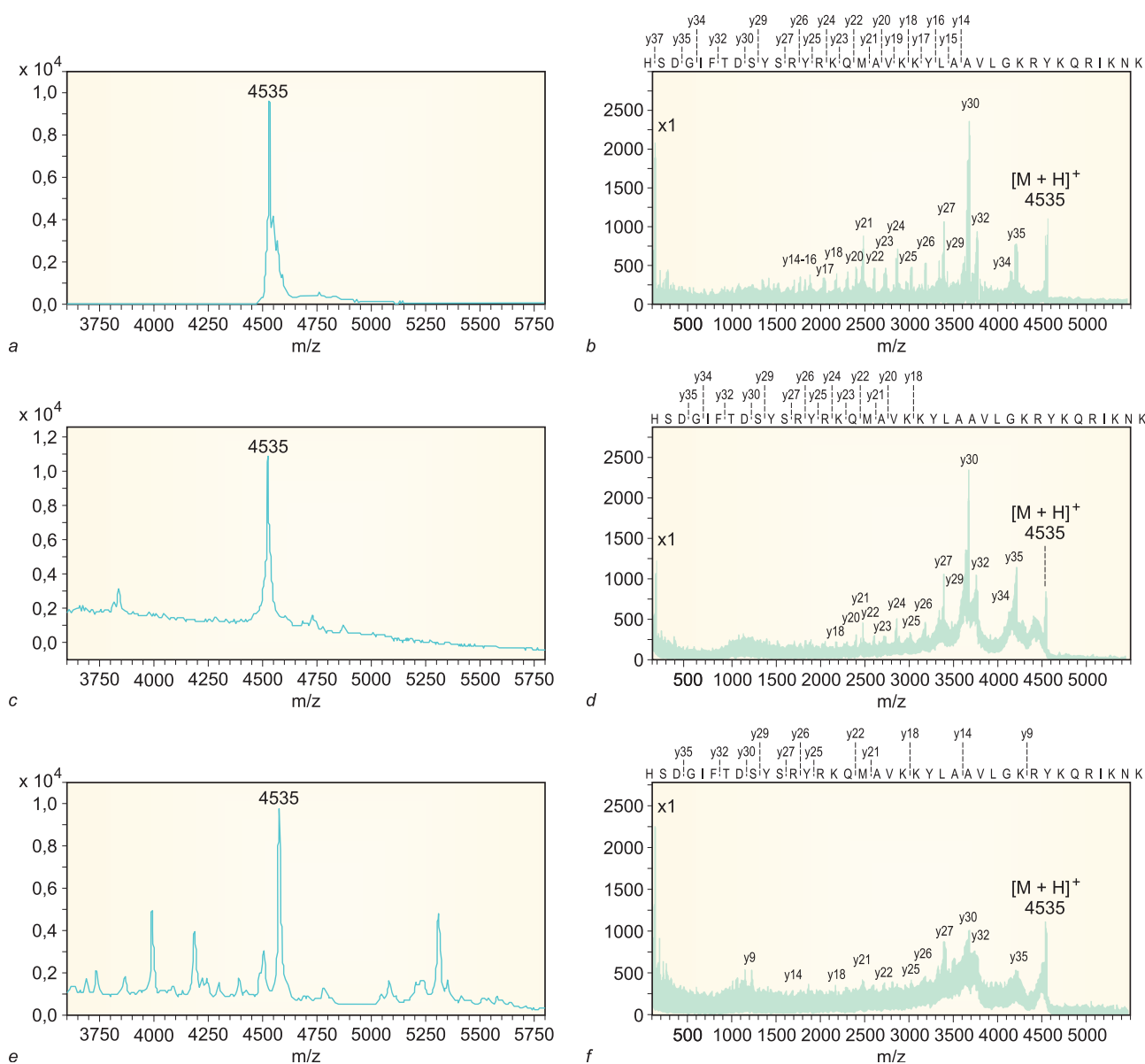
Napjaink egyik legígéretesebb peptid és protein biomarker diagnosztikai alkalmazása a MALDI TOF/TOF tömegspektrometriára épülő képalkotó módszer (MALDI Imaging), amelynek során egy speciális mintatartóra 10-20 mikronos szövettani metszetet és mátixot szárítunk. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több ezer tömegspektrumot veszünk fel, ezeket a megfelelő szoftver az egyes m/z értékekhez tartozó intenzitások eloszlását képeként jeleníti meg. A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (in vivo fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT

IR) képalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát.

A tömegspektrometria a közeljövőben a modern diagnosztikai laboratóriumok egyik leghatékonyabb, kulcsfontosságú költségkímélő eszköze lesz. Specifitása, érzékenysége, kitűnő automatizálhatósága és széles spektrumú alkalmazhatósága révén forradalmasíthatja az egyes betegségek és kórokozók kimutatásának technológiáját.

IRODALOM

- GROSS, J. H.: Mass Spectrometry: A Textbook. Springer, Heidelberg, 2004.
- LIPTON, M. S., PASA-TOLIC, L.: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Humana Press, New York, 2009.
- TALIÁN Cs. G., MÁRK L., MELEGH B.: Tömegspektrometria. In: Debreczeni L., Kovács L.G. (szerk.): Gyakorlati Laboratóriumi Medicina. 477–492. old. Literatura Medicina Kiadó, Budapest, 2008.
- VÉKEY, K., TELEKES, A., VÉRTES, A. (eds): Medical Applications of Mass Spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2008.



11-87. ábra. A PACAP jelenlétének tömegspektrometriás igazolása:

a, b) PACAP standard

c, d) Humán szérum

e, f) Anyatej

A daganatok epidemiológiai biomarkerei

KISS ISTVÁN

A daganatok a fejlett országokban a második legfontosabb halálokot képezik, de ha nem a halálozások abszolút számát, hanem az elvesztett éveket vesszük alapul, akkor számos országban már az első helyre kerültek.

Ennek ellenére az is tény, hogy az utóbbi évtizedekben a daganatos betegségek terápiájának hatékonysága folyamatosan növekedett, bár néhány daganattípus esetében még napjainkban sem túl jók az ötéves túlélési arányok (pl. hasnyálmirigy-daganatok, tüdőrák). Az említett javulás részben új gyógyszerek és új kezelési stratégiák (pl. célzott terápia, monoklonális antitestek, antiszensz oligonukleotidok) kifejlesztésének, részben a meglevő kezelési módok továbbfejlesztésének (pontosabb, hatékonyabb besugárzás), részben pedig a daganatok korábbi diagnózisának tudható be.

Daganatszűrés

A daganatok előfordulási mintázatait, az ötéves túlélések változását, valamint a halálozási adatokat elemezve egyértelmű, hogy a felsorolt tényezők közül populációs szinten a legnagyobb jelentősége a korai diagnózisnak van. Éppen ezért a daganatos betegségek terén kiemelt fontossága van az igen korai, még tünetmentes állapotban való diagnosztizálásnak. Mivel tünetmentes stádiumról van szó, a beteg nyilvánvalóan nem fordul orvoshoz; épp ellenkezőleg, az egészségügy részéről van szükség aktív magatartásra, ami az „egészséges” népesség (ill. annak kiválasztott csoportjai) szűrővizsgálatát jelenti. Mivel itt nem klinikai vizsgálatokról van szó, hanem nagy lélekszámú tünetmentes populációk teszteléséről, ezekkel a vizsgálatokkal kapcsolatban speciális kívánalmak érvényesülnek. A szűrővizsgálatok kockázatának a klinikai vizsgálatoknál sokkal kisebbnek kell lennie, a várható mellékhatások és szövődmények ritkább előfordulásával, továbbá jóval egyszerűbbnek, olcsóbbnak is kell lenniük, cserében specifitásuk általában kisebb mértékű a diagnosztikus vizsgálatokénál. A daganatok szűrésére számos lehetőség áll rendelkezésre, pl. megtekintés (melanoma), fizikális vizsgálat,

mammográfia, kolonoszkópia stb. Mivel e módszerek többsége egyelőre nem tökéletes, ill. számos daganatot illetően nem is létezik megfelelő szűrőmódszer, folyamatos kutatás irányul olyan szenzitív és specifikus biomarkerek kidolgozására és validálására, amelyek alkalmasak lennének nagy populációk daganatos szűrővizsgálatára. Ezek a biomarkerek – a tumormarkerek – tehát nem csak a klinikus számára fontosak, hanem még inkább hasznosak lennének az epidemiológia, ill. a közegészségügy és a betegségmegelőzés területén.

Tumormarkerek

A tumormarkerek kutatása nem korlátozódik a fehérje-, ill. peptid természetű markerekre, a vizsgálati lehetőségek skálája igen széles. Próbálkoztak már többek között keringő tumorsejtek kimutatásával, mutációt hordozó sejtek detektálásával, keringő vagy a vizeletben található szabad nukleinsavak vizsgálatával, DNS-metilációs vagy mikroRNS-mintázatok azonosításával különböző vizsgálati anyagokban. A jelenlegi gyakorlatban mégis szinte kizárólag fehérje alapú tumormarkerek használatosak.

A tumormarkerek jelenlegi legfőbb felhasználási területe a klinikai alkalmazás: Számos tumor markert alkalmaznak rutinszerűen a terápia hatékonyságának monitorozása és az adott betegség kiújulásának észlelése céljából. Ezzel ellentétben az epidemiológiai, szűrési, betegségmegelőzési célzatú felhasználás ma egyelőre nagyon korlátozott keretek között mozog. A fehérje, ill. peptid alapú tumormarkerek populációs szintű felhasználását egyrészt technikai, másrészt elvi problémák nehezítik.

A *technikai nehézséget* a kiválasztott fehérjék megfelelően szenzitív és specifikus kimutatása jelenti. Az emberi szérumban található egyedi fehérjék koncentrációja igen széles tartományban mozog (úgy hogy 22 fehérje adja az összfehérje-mennyiség 99%-át), a 40 g/l koncentráció körül jelen lévő albumintól a néhány pg/l-nyi különböző citokinen át a csak komoly metodikai nehézségek árán mérhető, jelenlegi módszereinkkel a kimutathatóság határát súroló molekuláig. Önmagában, tiszta oldatból a kimutatás nem jelentene ekkora problémát, de a nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban jelen lévő egyéb fehérjék megnehezítik a kis mennyiségben megtalálható biomarkerek kimutatását. A specifikus fehérjedepolimerizációs eljárások (pl. az albumin immundepolimerizációja) eltávolít-

ják ugyan a nagy mennyiségű, zavaró fehérjét, de nagyon gyakran ezek a fehérjék részben vagy egészben megkötik a vizsgálandó fehérjemolekulákat, így azoknak a koncentrációja is jelentősen csökkenhet.

A technikai nehézségek mellett *elvi problémák* is jelentkeznek. Számos biomarker inter- és intraindividuális variabilitása meglehetősen nagy mértékű, ami nagyon megnehezíti szűrővizsgálati alkalmazás során a megfelelő határérték kijelölését. A szűrővizsgálatokkal ellentétben az interindividuais variabilitás nem okoz gondot a klasszikus (azaz klinikai) tumormarkerként való alkalmazásban, mivel itt a vizsgált személy korábban mért értékeihez – amelyet tehát alapértéknek tekintünk – viszonyíthatunk. További nehézséget okoz az intraindividuális variabilitás, amely egyrészt random fiziológiás variabilitást jelent, másrészt pedig a tumormarkerek szintje nem csak a daganat jelenléte miatt emelkedhet meg, hanem más betegségek, állapotok is növekedést okozhatnak, sőt egyes markerek értéke az életkor előrehaladásával is változik. Leggyakrabban jóindulatú daganatok, gyulladások, az érintett szerv hypertrophiája vezet emelkedett tumormarkerszinthez, vagyis téves pozitívításhoz.

E problémák miatt jelenleg csakugyan széles körben mindössze egyetlen tumormarkert használnak szűrési céllal, a *prostata specifikus antigént (PSA)*, amely kiválóan alkalmas az epidemiológiai-prevenációs jellegű felhasználás minden problémájának illusztrálására.

A PSA alkalmazását 1986-ban kezdték meg szélesebb körben, prosztatárakos betegeknél, a terápia nyomon követésére és az esetleges rekurrens daganatok észlelésére. Ugyanakkor már vizsgálatok folytak az esetleges szűrési célú alkalmazás tekintetében is, amely azután a kilencvenes évektől vált elterjedté, elsősorban az Amerikai Egyesült Államokban. A szűrővizsgálatok hatására a betegség incidenciája először természetesen jelentős emelkedést mutatott, majd valamelyest csökkent. Jelentősen csökkent ugyanakkor a prosztatárak-mortalitás – és ebben matematikai modellezések szerint 45–70%-nyi szerepe lehetett a szűrővizsgálat alkalmazásának –, ill. eltolódás mutatkozott az újonnan felfedezett prosztatárakok stádiumát illetően, a kedvezőbb stádiumú, ill. grádusú esetek irányába. Mindmáig e tényezők szolgáltatják a legfőbb érvet a PSA-szűrés mellett. Ugyanakkor más epidemiológiai vizsgálatok ellentmondani látszanak

a PSA-szűrések hasznosságát igazoló eredményeknek. Az USA 9 régiójának prosztatárak-mortalitási elemzése pl. nem talált jelentős különbségeket, annak ellenére, hogy a PSA-szűrések gyakoriságában, alkalmazásában igen nagy eltérések voltak az egyes régiók között. Egy másik vizsgálatban pedig a Seattle és Connecticut régió összevetése azt mutatta, hogy míg Seattle környékén a szűrés gyakorisága több mint ötszöröse volt a Connecticutéinak, prostatapiopsziát pedig több mint kétszer olyan gyakran végeztek, a mortalitás mégis gyakorlatilag ugyanannyi volt. A PSA-szűrés hatékonyságát vizsgáló korai tanulmányok is egymástól jelentősen eltérő eredményeket mutattak. A PSA-szűrések szenzitivitása és specifitása sajnos meglehetősen csekély. A nem kielégítő szenzitivitást jelzi, hogy egy vizsgálat a 2 ng/ml-nél alacsonyabb PSA-szintet mutató férfiak körében 33,7%-os prosztatárak-gyakoriságot talált. A specifitást egy másik vizsgálat a 2,6–10 ng/ml-es tartományban kb. 25–35%-nak írta le. Ezek az adatok a szűrővizsgálati használhatóságot tekintve jóval elmaradnak pl. a kolonoszkópia 96,6% szenzitivitásától és 100%-os specifitásától (ha végpontként az adenocarcinomát tekintjük). A PSA-szűrővizsgálatok egyébként különböző határértékeket használnak. A legelterjedtebb a 4 ng/ml volt, de ezt számos országban, ill. intézményben lecsökkentették 2,5 ng/ml-re, de van, ahol 2 ng/ml-t javasolnak. Újabban nem ritkán figyelembe veszik azt is, hogy a PSA-szint az életkorral növekszik, vagyis életkor-specifikus határértékeket adnak meg.

A PSA-szűrések hatékonyságának értékelését évtizedeken keresztül nehezítette az a tény, hogy nem végeztek e területen igazán nagy, randomizált kísérleti epidemiológiai vizsgálatokat. Jelenleg azonban két nagy randomizált vizsgálat is folyik, az egyik az USA-ban zajlik (PLCO), a másik pedig egy multicentrikus európai vizsgálat (ERSCP). Az amerikai tanulmány eddigi eredményei szerint a mortalitás nem különbözött szignifikánsan a szűrt és a kontrollcsoportok között, az incidencia pedig valamivel magasabb volt a szűrt csoportban. Ugyancsak nem volt eltérés a talált daganatok stádiummegoszlását illetően, viszont a Gleason 8–10-es daganatok valamivel gyakoribbak voltak a kontrollok körében. Az ERSCP-tanulmány az amerikai vizsgálattal ellentétben enyhé, de statisztikailag szignifikáns túlélési előnyt talált a PSA-szűrt csoportban a kontrollhoz képest. Ez a túlélési előny az 55–69 éves korosztályra korlátozódott.

Az ERSCP-vizsgálat keretében a PSA-szűrővizsgálatok 16,2%-a adott pozitív eredményt, amelyből az elvégzett biopsziás vizsgálatok alapján 75,9% bizonyult hamis pozitívnak. Az adatok szerint egyébként egy élet megmentéséhez 1410 ember szűrése, ill. 48 ember kezelése volt szükséges.

Az ismertetett bizonytalan mortalitási előnnyel szemben a másik oldalon jelentős potenciális hátrányok állnak. Így például egy 67 éves ember esetén a szűréssel megtalált prosztaták kezelése átlagosan 7 évvel a klinikai tünetek várható megjelenése előtt kezdődik. Ugyanakkor csak minden negyedik prosztatát érintő beteg halna meg 15 éven belül. A kiterjesztett szűrővizsgálatok legnagyobb veszélye tehát a túldiagnózis és a túlkezelés. Olyan prosztatákat is nagy számban diagnosztizálnának, ahol a beteg élete során egyébként soha nem derülne ki a prosztaták, mivel az esetek jó részénél a kórfejlődés meglehetősen lassú. Ezek a betegek azután (feleslegesen) kezelésben részesülnek, aminek súlyos szövődményei, mellékhatásai lehetnek, ill. az életminőségük jelentős csökkenéséhez vezetnek (ezek közül a legfontosabb az inkontinencia és az erektilis zavarok). A PSA-szűrés tehát eddigi ismereteink szerint nem alkalmas arra, hogy megbízhatóan elkülönítse a várhatóan gyors növekedést mutató tumorokat, ahol valóban lenne értelme a korai kezelésnek. A sok hamis pozitív diagnózis ráadásul komoly pszichés terhelést jelent az érintetteknek, amely hosszabb ideig is fennállhat.

Az eddigiek ismeretében nem meglepő, hogy a mértékadó testületek, társaságok (Európai Urológusok Szövetsége, Japán Urológusok Szövetsége, Amerikai Rák Társaság, Amerikai Preventív Medicina Kollégium) nem javasolják a rutin PSA-szűrést a prosztaták megelőzésére (ellentétben pl. a vastagbél-daganatokkal, cervixtumorokkal, emlőrákkal, ahol a rendszeres szűrés jól kidolgozott, konszenzuson alapuló protokollon nyugszik, és fejlett országokban szinte "kötelező erővel" ajánlott). Az ajánlások általában az érintett korosztály (többnyire 55 vagy 50 év feletti férfiak) tájékoztatását javasolják a várható előnyökről és hátrányokról, és a döntést az érintettekre bízák, azzal a megjegyzéssel, hogy 75 éves kor felett e szűrés már semmiképpen nem ajánlott. Egyetlen jelentősebb kivétel az Amerikai Urológusok Szövetsége, amely ajánlja a rendszeres szűrővizsgálatot, de – a PLCO és az ERSCP eredményei alapján – kritériumrendszerét átdolgozva, nem egységes PSA-li-

mitet javasol, hanem mindenkinek a 40 éves korban mért saját PSA-szintjéhez viszonyított határértéket. A PSA-szűrés mellett szóló érv viszont a terápia folyamatos fejlődése, differenciált kezelési (ill. aktív surveillance-) sémák kidolgozása a különböző stádiumú betegségekre, a szövődmények és a mellékhatások csökkentésére szolgáló erőfeszítések, amelyek együttesen a szűrt csoportokban idővel jelentősebb mortalitáscsökkenéshez vezethetnek.

További lehetséges biomarkerek kutatása

Ráadásul a prosztaták az idős kor betegsége, ezért gyakorisága a várható átlagos élettartam emelkedésével várhatóan tovább nő, vagyis különösen fontos lenne olyan biomarkerek azonosítása, amelyek a jelenlegi egyszerű PSA-vizsgálatnál hatékonyabban és specifikusabban lennének alkalmazhatók a prosztaták szűrésére. Az e téren folyó intenzív kutatások több irányban is biztatóak. Ígéretesnek tűnik egyrészt a PSA vizsgálatának továbbfejlesztése, pl. életkor- vagy akár személyspecifikus határértékek kidolgozása, a PSA-sűrűség vizsgálata, a szabad/teljes PSA arány mérése, komplex PSA, PSA-sebesség, ill. PSA-izoformák (pl. proPSA) vizsgálata formájában. Tesztelik továbbá a PSA helyett/mellett további fehérje vagy nem fehérje természetű (pl. PCA3 RNS mennyisége a vizeletben, DNS-metilációs mintázatok) tumormarkerek szűrővizsgálati alkalmazhatóságát is. További szóba jöhető fehérjetermészetű marker pl. a hK2 (humán kallikrein 2), amely a PSA-val mintegy 80%-os homológiát mutató szerin-proteáz), amely – úgy tűnik –, hogy az agresszív, extracapsularisan terjedő prosztaták prediktív biomarkere. Az uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) felhasználásának elvi alapját az adja, hogy a prosztaták terjedése során az extracelluláris mátrix degradációjában szerepe van a plazminogénkaskád aktiválódásának. A plazminogénaktivátor receptornak (uPAR) megnövekedett koncentrációja már bizonyítottan a rossz prognózis jele emlő-, vastagbél- és tüdőrákban. Újabb vizsgálatok szerint e biomarker alkalmas lehet a prosztaták szűrésére is. A prostataspecifikus membrán antigén (PSMA) a prostata epithelsejtek membránjának alkotórésze. Eddigi vizsgálatát elsősorban műtési anyagokból vagy biopsziából vett szövetekben vizsgálták, de szűrővizsgálati alkalmazhatóságát is tesztelik, a szérumból végzett Western-blot vagy ELISA alapú meghatározással. A

korai prostatarák-antigén (early prostate cancer antigen, EPCA, ill. az ugyancsak mátrixprotein EPCA-2) nukleáris mátrix protein, amely nagyobb mennyiségben van jelen prostatarákos szövetben, mint egészségesben. Egy – sajnos meglehetősen kis elemszámon végzett – szűrővizsgálati jellegű tesztben a prostatarákot az EPCA és EPCA-2 biomarker segítségével 92%-os szenzitivitással és 94%-os specificitással tudták detektálni. Több vizsgálat irányult a kaveolin-1 (cav-1) lehetséges biomarker felhasználhatóságának tisztázására. A fehérje a sejtmembrán-invaginációkban található membránalkotórész, és szerepe van pl. a molekuláris transzportfolyamatokban, a sejtadhézió során, ill. a jelátviteli folyamatokban. A szérum emelkedett cav-1-koncentrációja alkalmasnak bizonyult olyan prostatarákos betegek azonosítására, akiknél a PSA-szint két év során sem emelkedett 1,5 ng/ml fölé.

Az eddig felsoroltak mellett számos más potenciális tumormarkerral folynak vizsgálatok, pl. a komplement 4a komponens (C4a), a protein-C inhibitor, a cink- α_2 -glikoprotein, a PEDF (pigment epithelium-derived factor); remélhetőleg mihamarabb sikerül epidemiológiai markerként, magas specificitással és szenzitivitással széles körben alkalmazható biomarkereket találni.

További lehetséges markerként jönnek szóba egyes tumorantigénekkal szemben termelődő autoantitestek. Prostatarákos betegek tumorantigénjeire adott humorális immunválasz elemzésével sikerült kidolgozni egy autoantitestpanelt, amellyel 81,6%-os szenzitivitást és 88,2%-os specificitást értek el a daganat azonosításában. Ugyancsak számos multidimenzionális proteomikai vizsgálatot végeztek, főként tömegspektrometria, MALDI-MS vagy SELDI-MS alkalmazásával. Kapilláris-elektroforézis és tömegspektrometria alkalmazásával egy 9 polipeptidből álló mintázat segítségével, vizeletminta vizsgálata alapján prostatarákos betegeket tudtak azonosítani, 92%-os szenzitivitással és 96%-os specificitással. A szérumproteinek nagy dinamikus tartománya által okozott problémákat esetleg kiküszöbölheti, ha a vizeletfehérjéket próbáljuk meg vizsgálni. Itt viszont technikai problémát jelenthet a szervesen sok nagy koncentrációja.

Az imént felsorolt, kísérleti jelleggel végzett vizsgálatok némelyike meglepően magas szenzitivitással és specificitással rendelkezett. Azonban ezeket a vizsgálatok kis csoportokon végezték, laboratóriumi kö-

rülmények között, tehát minden esetben szükség van még nagyobb populációkon való validálásra. A széles körű felhasználás lehetőségét korlátozhatja még a vizsgálatok bonyolultsága és drágasága, de egészen bizonyos, hogy amennyiben nagy sorozatban kerülnek alkalmazásra, az árak jelentősen csökkenni fognak.

Egyelőre nem létezik a PSA-n kívül – ill. mint láthattuk a PSA alkalmazása is meglehetősen vitatott – olyan tumormarker, amelyet rutinszerűen alkalmaznának nagy, egészséges populációk daganatszűrésére. Éppen ezért itt nem térünk ki a klinikai tumormarkerek tárgyalására. Erről a területről mindössze annyit szükséges megemlíteni, hogy egyes tumormarkereket „kvázi-szűrés” céllal szokás alkalmazni, vagyis pl. daganatkutatás során az adott tumormarkerek meghatározását szokásos elvégeztetni. Az ilyen célból alkalmazott markerek egy része erősebben, de többségük inkább kevésbé daganatspecifikus, és felhasználásuk általában azon az elven alapul, hogy a tumorsejtekből olyan fehérjék is a keringésbe jutnak (pl. differenciálatlan, az embrionális fejlődési stádiumhoz közelebb álló sejteket jellemző fehérjék), amelyek egészséges sejtekből nem vagy csak igen kis mennyiségben. Klasszikus tumormarkereknek számít a carcinoembryonális antigén (CEA), amelyet a hatvanas évektől használnak, és mára már megtalálta helyét, pl. a vastagbél-daganatok klinikai markerei között. Ugyancsak viszonylag gyakran kerül sor CA 15.3 vagy CA 19.9 marker vizsgálatára, ill. klasszikus embrionális jellegű marker az α -fötóprotein (AFP) és a humán koriogonadotropin (hCG). Különösen az olyan tumoroknál lenne fontos szűrésre alkalmazható biomarkereket fejleszteni, amelyeknél más szűrő módszerek egyelőre nem állnak rendelkezésre vagy nem elég hatékonyak, pl. hasnyálmirigy-daganatok, ovariumtumorok. Ez utóbbi daganattal kapcsolatban sok vizsgálatot végeztek a CA 125-tel kapcsolatban, de úgy tűnik, a szűrővizsgálati alkalmazás kivitelezése nem lehetséges.

A tumormarkerek kutatásának legizgalmasabb és legtöbbet ígérő fejezete tehát az *epidemiológiai markerek* kutatása. E területen van égetően nagy szükség új tumormarkerekre, ugyanis a daganatepidemiológia elmúlt ötven éve bebizonyította, hogy ott tudunk igazán eredményesek lenni a mortalitás csökkentésében, ahol sikerül igazán korai diagnózist felállítani. A fehérjekutatás új eredményei bizakodásra adnak okot megfelelő szűrővizsgálati módszerek kifejlesztésére.

tését illetően. Mindazonáltal ezek a módszerek valószínűleg nem egy fehérje vizsgálatán fognak alapulni (dacára annak, hogy több százra rúg az e területen vizsgált vagy vizsgálatra alapos okkal javasolt fehérjék száma), az eddigi kutatások alapján nem várható, hogy egyetlen fehérje a kellő szenzitivitást és specifitást tudná biztosítani. Az analitikai módszerek, a laboratóriumi medicina és a biomatematika fejlődése a komplex proteomikai markerek irányába mutat, amelyeknek a széles körben való elterjedése az utóbbi időben megjelent publikációk alapján remélhetőleg már nem sokáig várat magára.

IRODALOM

- ETZIONI, R., TSODIKOV, A., MARIOTTO, A. et al.: Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control* 19:175–181, 2008.
- STROPE, S. A., ANDRIOLE, G. L.: Prostate cancer screening: current status and future perspectives. *Nat. Rev. Urol.* 7:487–493, 2010.
- ANDRIOLE, G. L., CRAWFORD, E. D., GRUBB, R. L. 3rd et al.: Mortality results from a randomized prostate cancer screening trial [published erratum in *N. Engl. J. Med.*, 2009. 360. 1797]. *N. Engl. J. Med.* 360:1310–1319, 2009.
- SCHRÖDER, F. H., HUGOSSON, J., ROOBOL, M. J. et al.: Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N. Engl. J. Med.* 360:1320–1328, 2009.
- SMITH, R. A., COKKINIDES, V., BROOKS, D. et al.: Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J. Clin.* 60:99–119, 2010.
- LIN, D., BEYOND, W.: PSA: utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. *Urol. Oncol.* 26:315–321, 2009.
- GION, M., DAIDONE, M. G.: Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *Eur. J. Canc.* 40:2613–2622, 2004.

A tananyag elsajátításának ellenőrzéséhez segítséget nyújtanak a <http://tamop.etk.pte.hu/adatbazis/> címen elérhető kérdések.