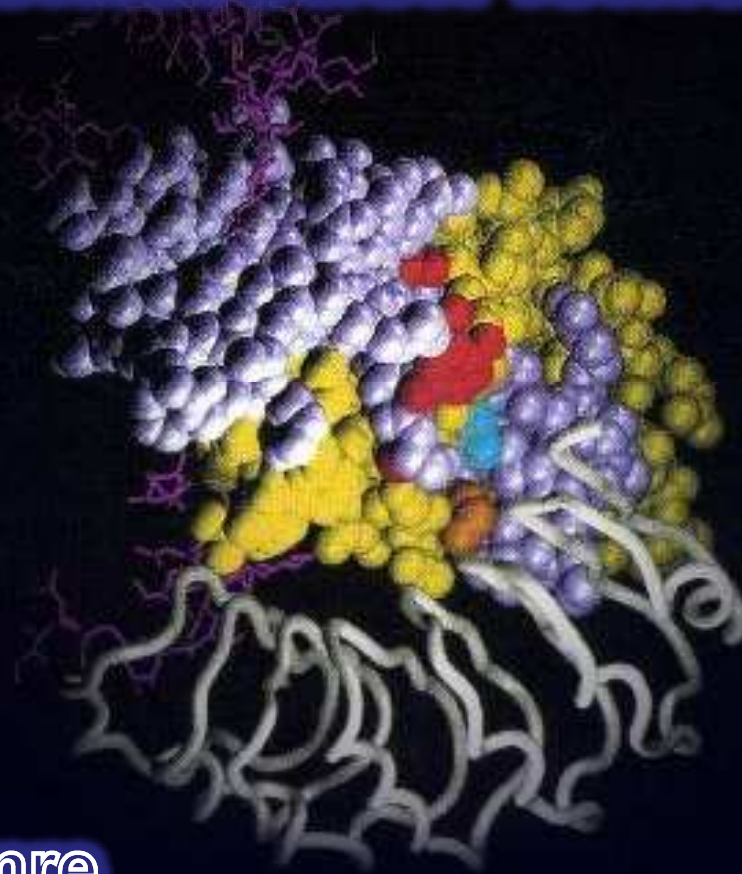


Human choriogonadotropin hormon: az ismeretlen ismerős



Dr. Földesi Imre

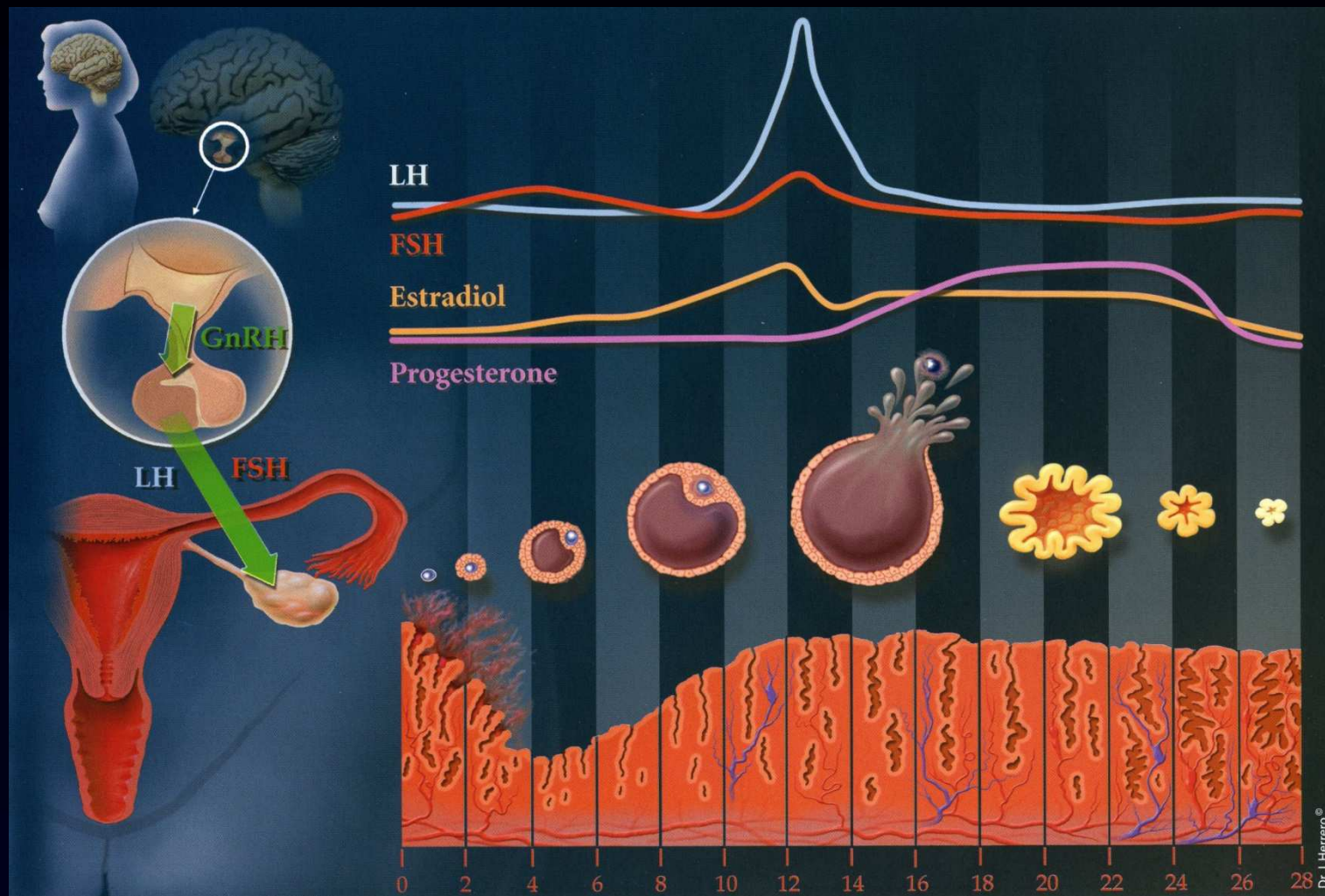
Szegedi Tudományegyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

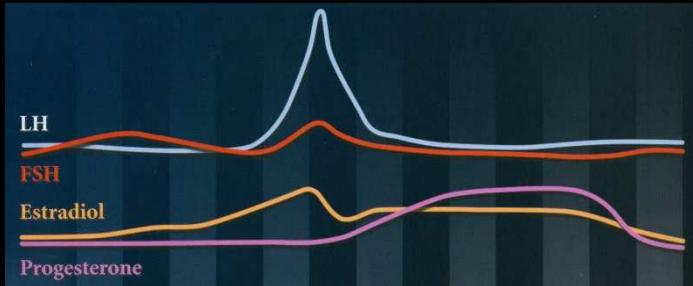
Az előadás szerkezete



- Általános bevezetés, menstruációs ciklus, implantáció, terhesség.
- A terhesség korai jelei, terhességi tesztek.
- A HCG szerkezete, vérszintje, főbb hatásai a terhesség alatt.
- A HCG meghatározás buktatói.
- Fals pozitív HCG tesztek.
- Familiális HCG Syndroma.
- Sulfatált HCG.
- Hyperglycosylált HCG klinikai jelentősége.
- Szerkezet-hatás összefüggések a HCG és receptora között.

A menstruációs ciklus alatti legfontosabb változások

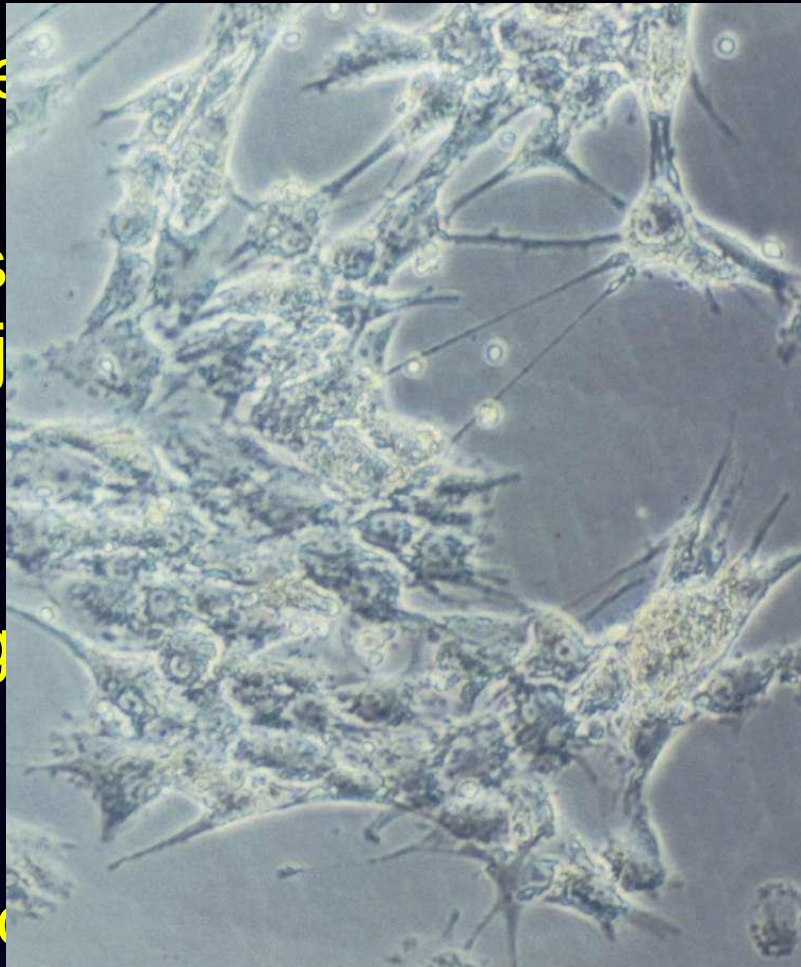




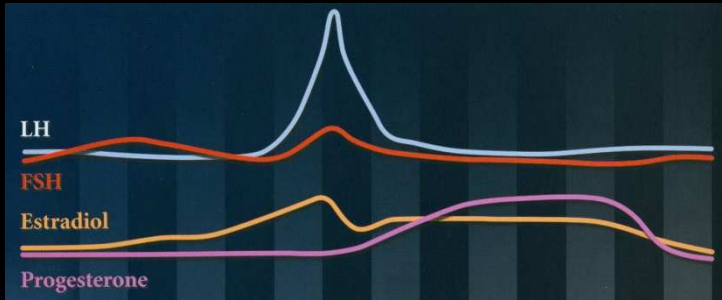
Az FSH szerepe a folliculáris fázisban



- ✓ Serkenti a pre-ovulációs fejlődését.
- ✓ Stimulálja a szteroidogenezist a granulosa sejtekben.
- ✓ Stimulálja az androgén expresszióját a granulosa sejtekben.
- ✓ Stimulálja a gonadotropin termelését.
- ✓ Stimulálja az inhibin B termelését a granulosa sejteken (pre-ovulációs fázisban).



sok
 expresszióját a
 (om)
 együtt).
 inhibin B
 a granulosa



Az LH szerepe a folliculáris fázisban és az ovulációban

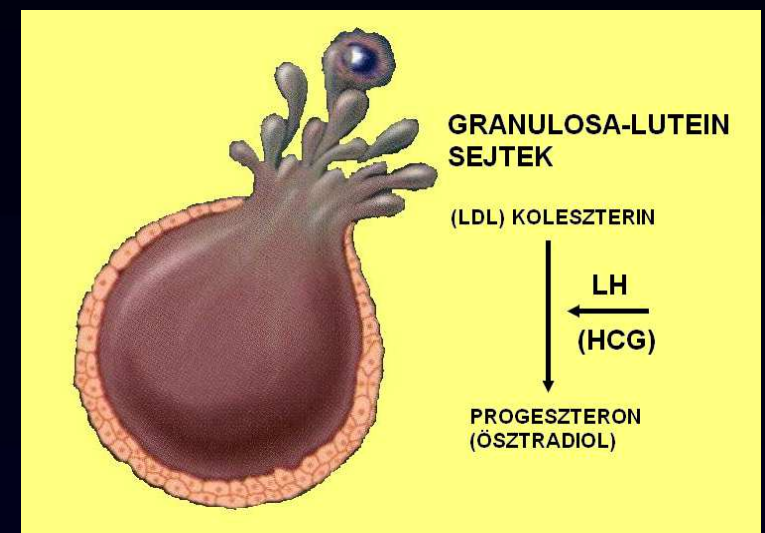
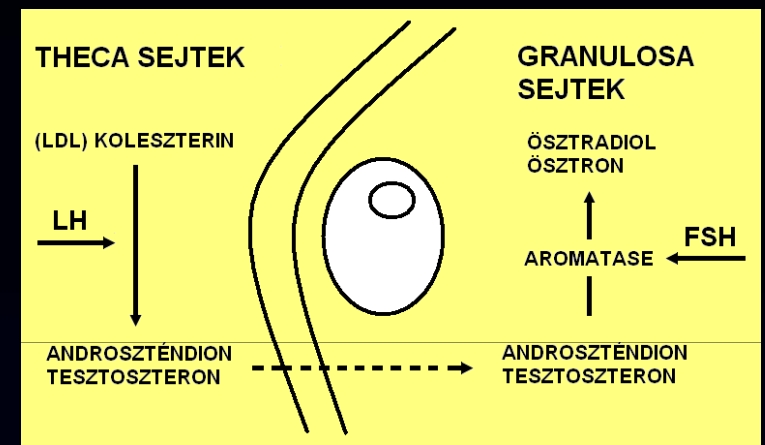
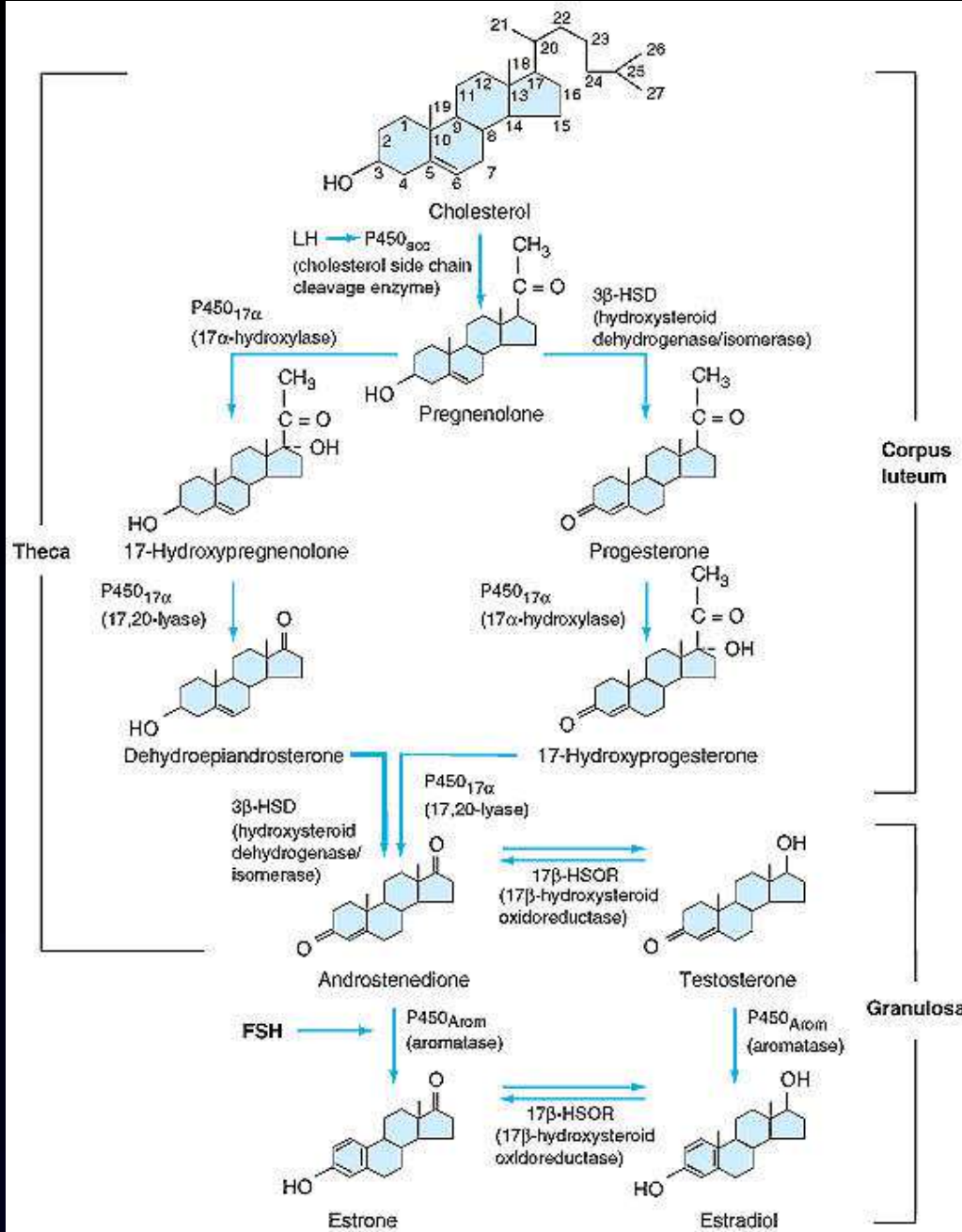


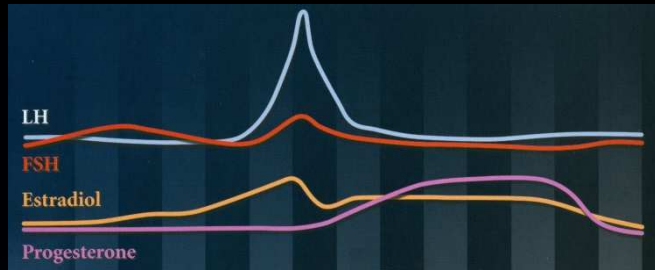
- ✓ Serke (P450)
- ✓ IGF-II gátolja
- ✓ Szintje ovulác
- a fo gya em
- a P
- ✓ Az LH
- hirt
- enz
- csö term



és
genase).
ktiv
st
ára
adulást.
androgén

Az ováriumok szteroid bioszintézise



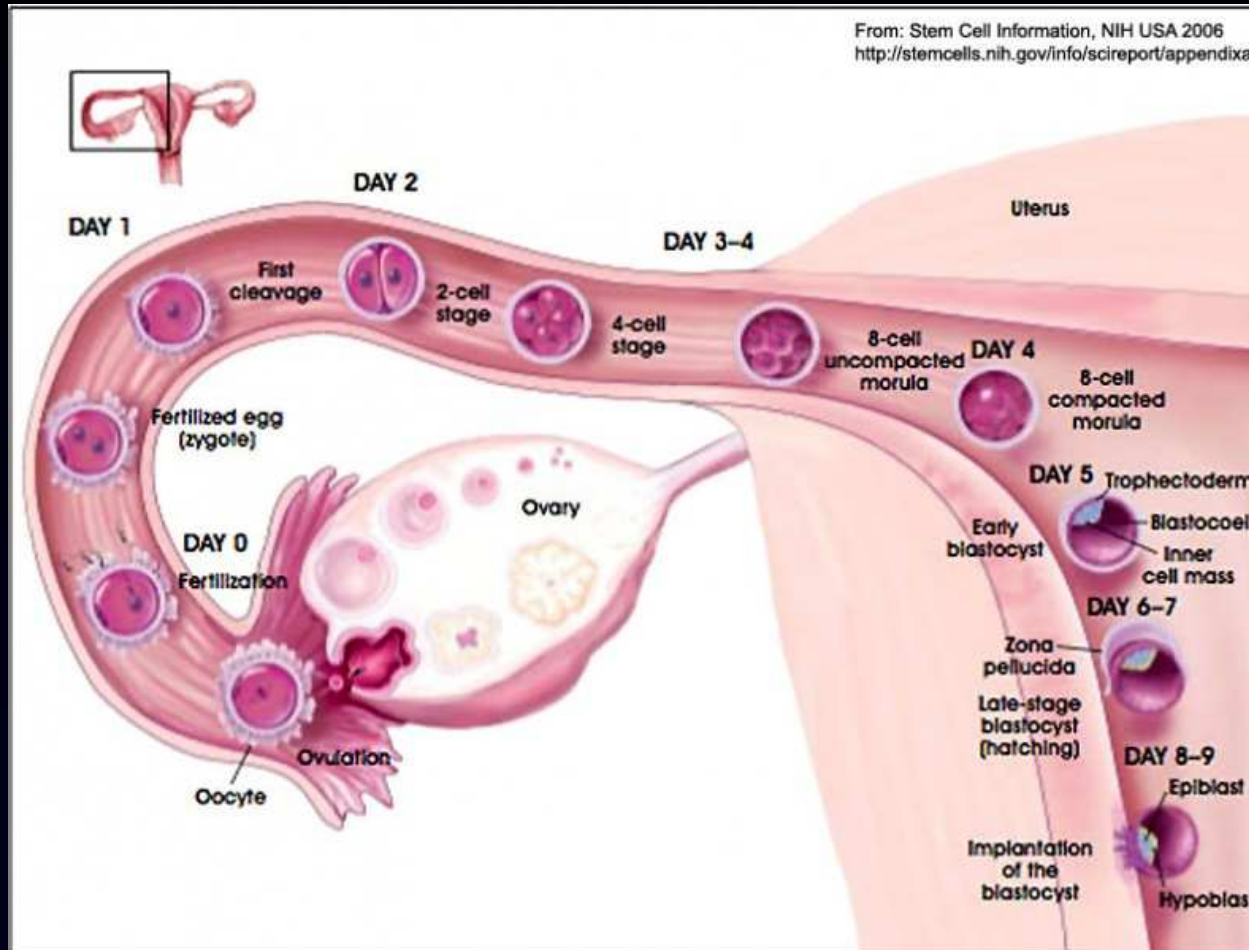


Az LH szerepe a luteális fázisban



- ✓ Az ovulációt követően eltűnik a basal lamina és intenzív vascularizáció kezdődik. A theca sejtekből kis lutein sejtek, míg a granulosa sejtekből nagy lutein sejtek lesznek, kialakul a corpus luteum.
- ✓ Elkezdődik a jelentős mennyiségű P és E2 szintézis.
- ✓ A P csökkenti a GnRH/LH pulzusfrekvenciát.
- ✓ A stimuláció csökkenése a P és E2 szintézis csökkenéséhez vezet. Újabb stimulus (HCG) hiányában az ovulációt követő 13-15. napon bekövetkezik a menstruáció.
- ✓ Az FSH:LH hányados emelkedik (alacsony GnRH pulzusfrekvencia, alacsony E2 szint)
- ✓ Az FSH szint emelkedésével elkezdődik a következő ciklus.

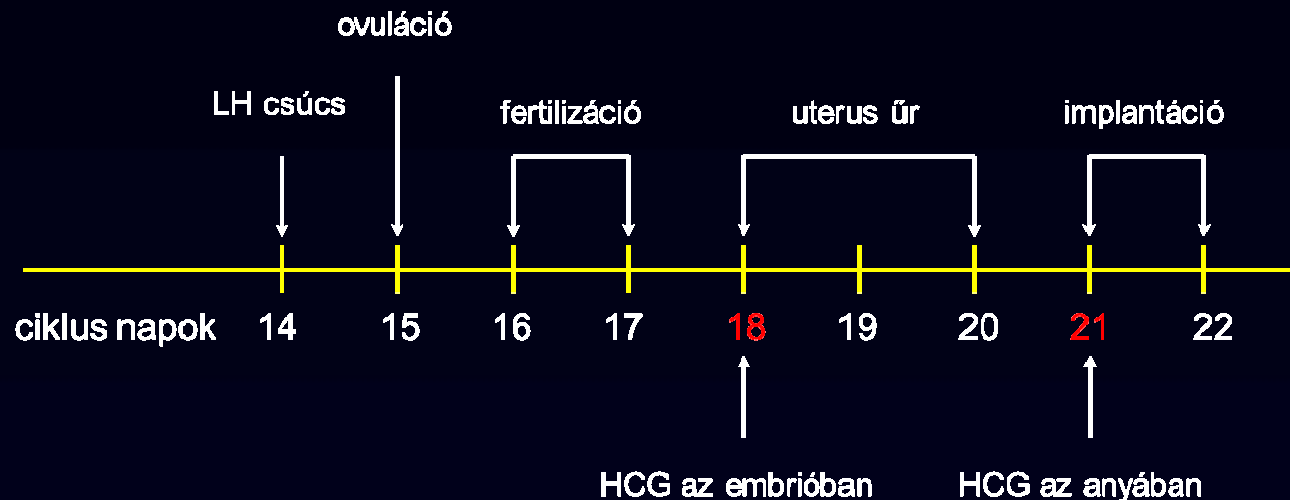
Megtermékenyülés, implantáció



A terhesség korai jelei



- **Early pregnancy factor (EPF)**
 - Már 1-2 nappal a fertilizációt követően megjelenik a keringésben.
 - Implantációig az ovárium, azt követően az embrió termeli.
 - Immunszuppresszív hatása van.
- **Human choriogonadotrop hormon (HCG)**
 - Már a 6-8 sejtes embrióban kimutatható HCG mRNS.
 - 3 nappal a fertilizációt követően (8-12 sejtes állapot) az embrió még az implantáció előtt elkezdi HCG-t termelni (6-7 nappal az ovulációt követően mérhető az anyai vérben).



Az első terhességi tesztek

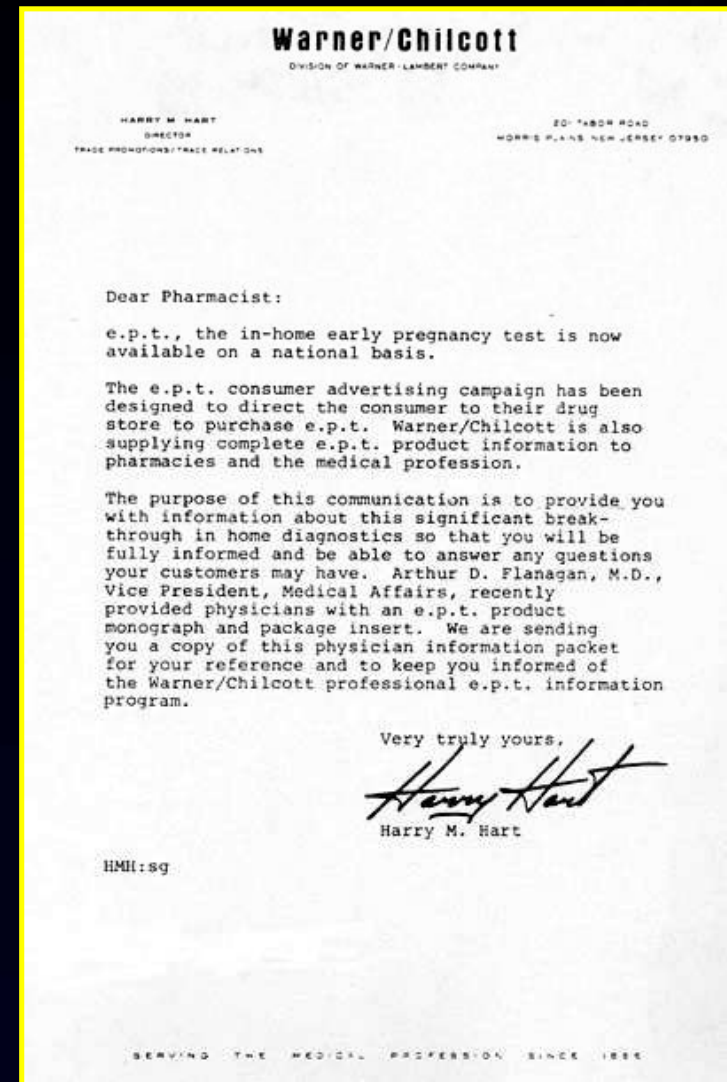
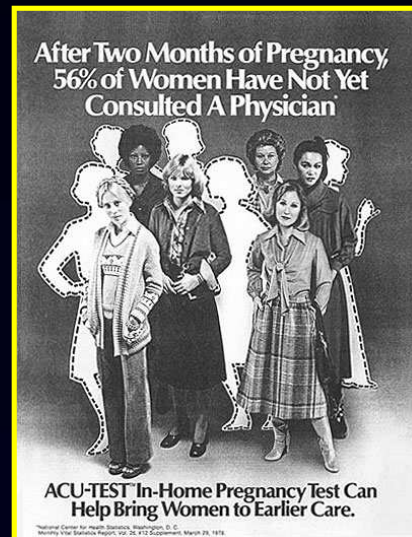


- 1973

Az „Our Bodies, Ourselves” I. kiadása – reggeli első vizelet kell a terhességi tesztekhez.

- 1976

Az első, FDA által elfogadott terhességi teszt otthoni használatra (Early Pregnancy Test, később Error Proof Test).



A terhességi tesztek főbb típusai



- **Bioassay-k (patkány, béka, nyúl)**
- **Indirekt tesztek**
 - haemagglutináció gátlásán alapuló teszt (Menotest)
 - latexagglutináció gátlásán alapuló teszt (Fertitex duo)
- **Direkt tesztek**
 - haemagglutináción alapuló teszt (Neo-Pregnosticon)
 - latexagglutináción alapuló teszt (Fertitex mono)
 - kolloid-fizikai változáson alapuló teszt (Pregcolor)
- **Immunológiai tesztek**
 - microplate EIA tesztek (Ferticheck)
- **Immunkromatográfiás tesztek**
 - Hexagon, Medi-Preg

Érzékenység, specifikusság nő



LUCASFILM
Ltd.

STAR WARS

OFFICIAL
HOME PREGNANCY
TEST



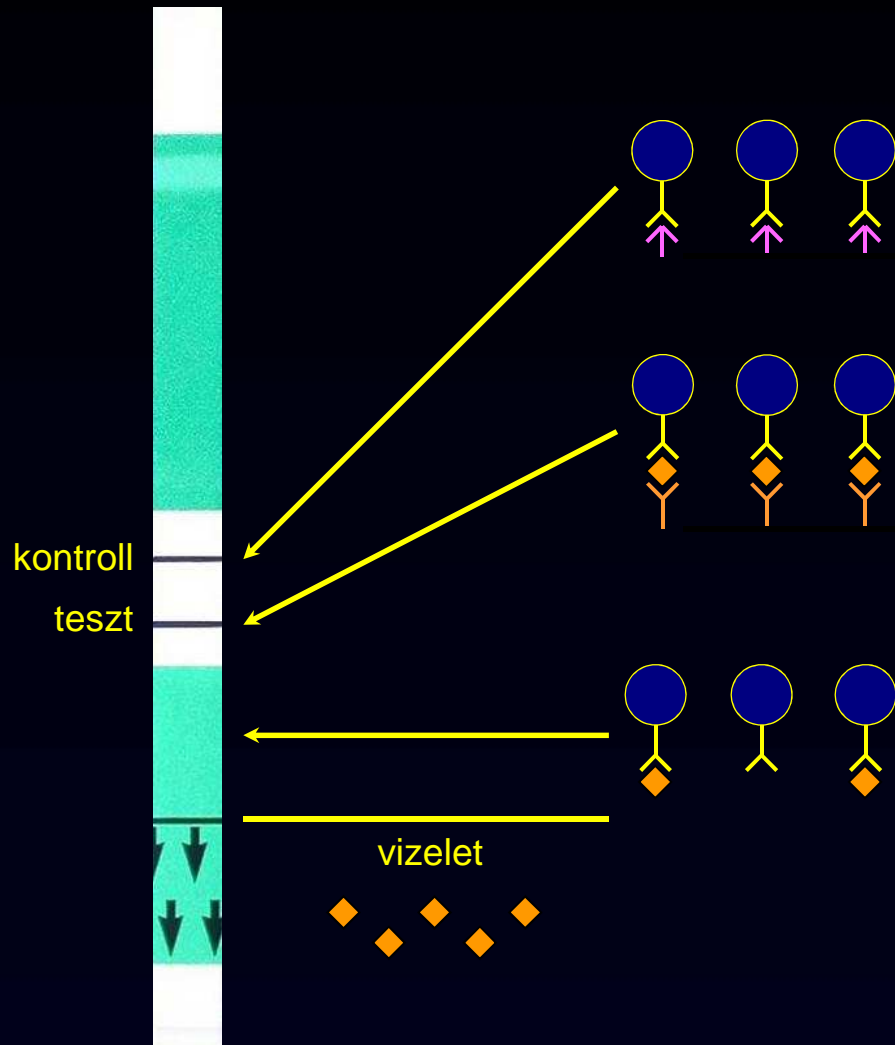
Think that a Jedi knocked you up
in a night of forbidden passion?

Find out now!

WARNING
May cause birth defects



Immunkromatográfiás elven működő terhességi tesztek



◆ vizelet HCG

● HCG antitest latex felszínén (1)

Y HCG antitest kötött (2)

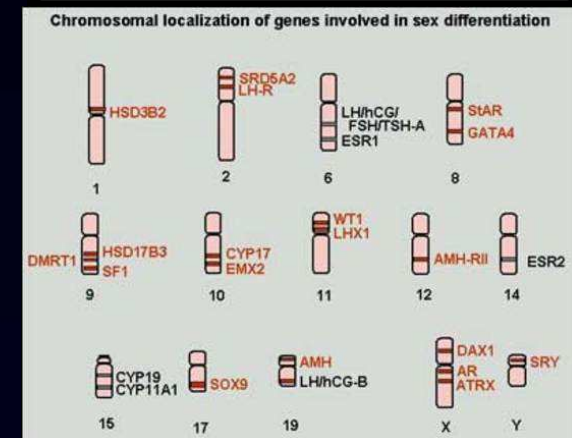
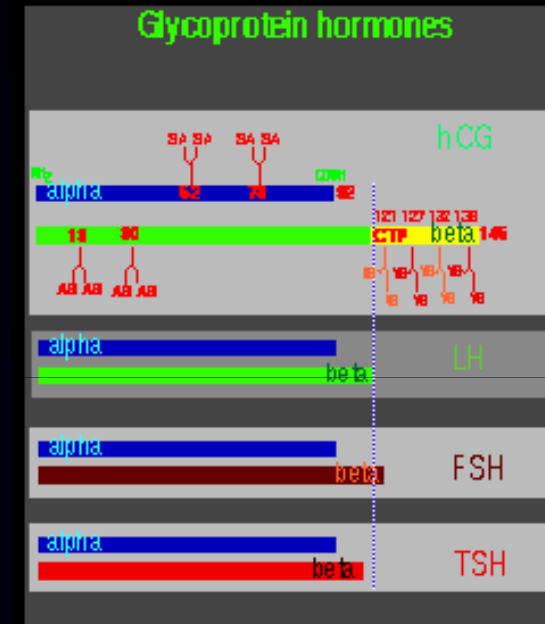
↑ HCG antitest (1) elleni antitest (3)

Érzékenység: 20 - 25 IU/l

A HCG szerkezete



- Molekulatömeg: 36.700 D
- Molekulatömegének 25-30%-a szénhidrát oldallánc (HCG)
- Molekulatömegének 25-41%-a szénhidrát (hyperglycosylált HCG)
- α (92 aminosav) és β (145 aminosav) alegységből áll



A HCG tulajdonságai



➤ LH-szerű hatással rendelkezik, de...

- ✓ nagyobb az affinitása az LH receptorhoz
- ✓ up-regulálja az LH receptorokat
- ✓ nem hat rá feed-back mechanizmus
(a β -alegység transcripciós régiójában nincs hormon response element)
- ✓ Hosszabb a felezési ideje az LH-nál (glycosylált)

A HCG biológiai jelentősége a terhesség alatt



„HCG is a busy hormone during pregnancy”

- ✓ Stimulálja a corpus luteum P termelését.
- ✓ Stimulálja az anti-macrophag inhibitor termelést és aktivitást (immunszupresszív hatás)
- ✓ Angiogen hatású (VEGF-on keresztül).
- ✓ Stimulálja cytotrophoblast-syncytiotrophoblast átalakulást.
- ✓ Elősegíti a föto-maternális vérkapcsolatot (hemochorialis placentatio).
- ✓ Elősegíti a fötus növekedését (HCG/LH receptorok találhatóak számos fötalis szervben: pl. vese, máj).
- ✓ Szabályozza az uterus növekedést (a magzattal együtt növekedik)
- ✓ Relaxálja a myometriumot (szintje terminusban hirtelen csökken, elősegítve ezzel a prostaglandin/oxytocin-indukált kontrakciókat).
- ✓ LH/HCG receptor található a hippocampusban, hypothalamusban és az agytörzsben (hyperemesis gravidarum)

A serum HCG+ β HCG koncentrációk alakulása az I. trimeszterben

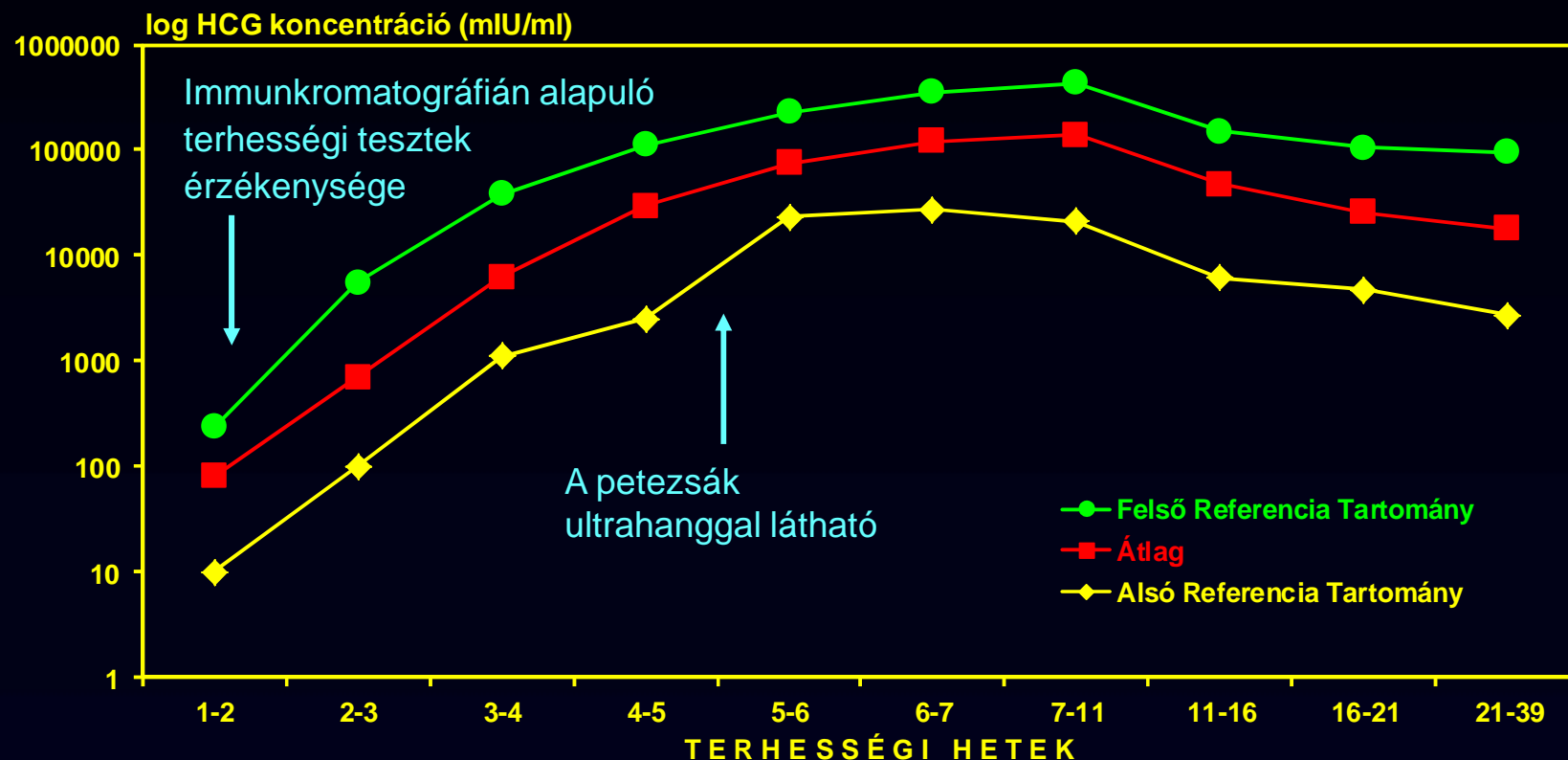


Kb. 1200 IU/l serum szintig a HCG 48-72 óránként megduplázódik (4-5. terhességi hét)

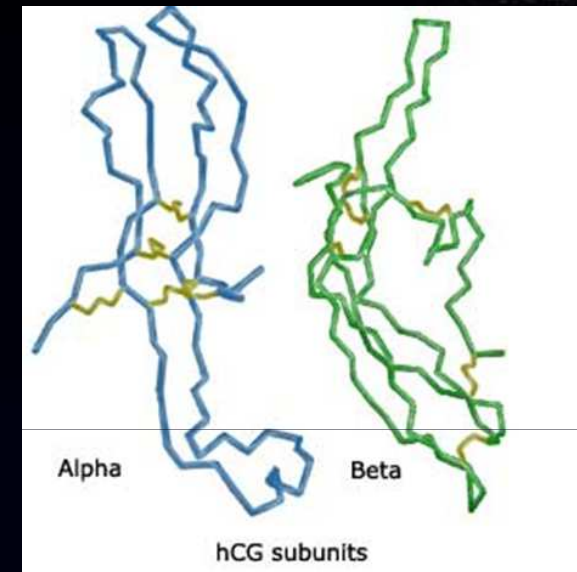
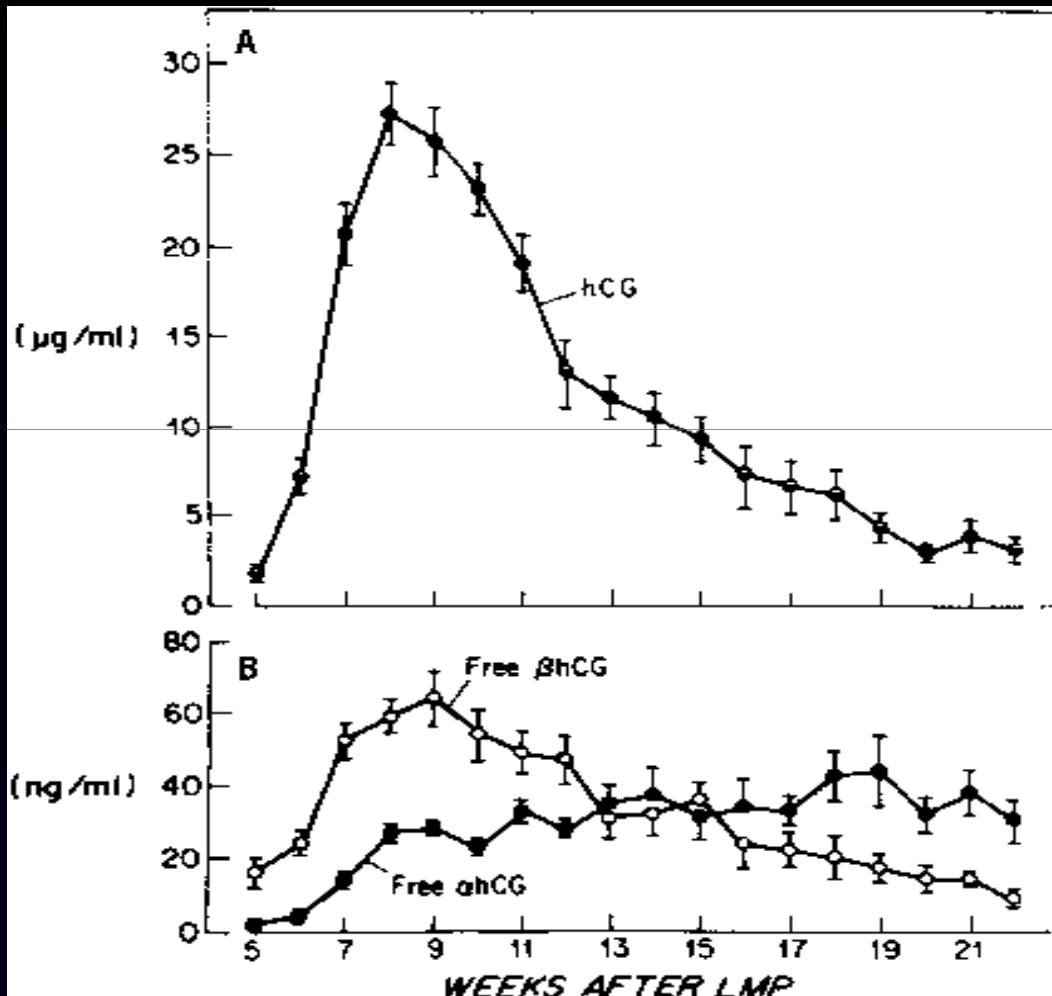
Kb. 1200-6000 IU/l között a duplázódás 72-84 óránként történik (5-7. terhességi hét)

Kb. 2500 IU/l HCG szint felett látható ultrahanggal a terhesség (kb. 5-6. hét)

Kb. 6.000-7.000 IU/l felett a duplázódás mértéke jelentősen lelassul (7. terhességi héttől)

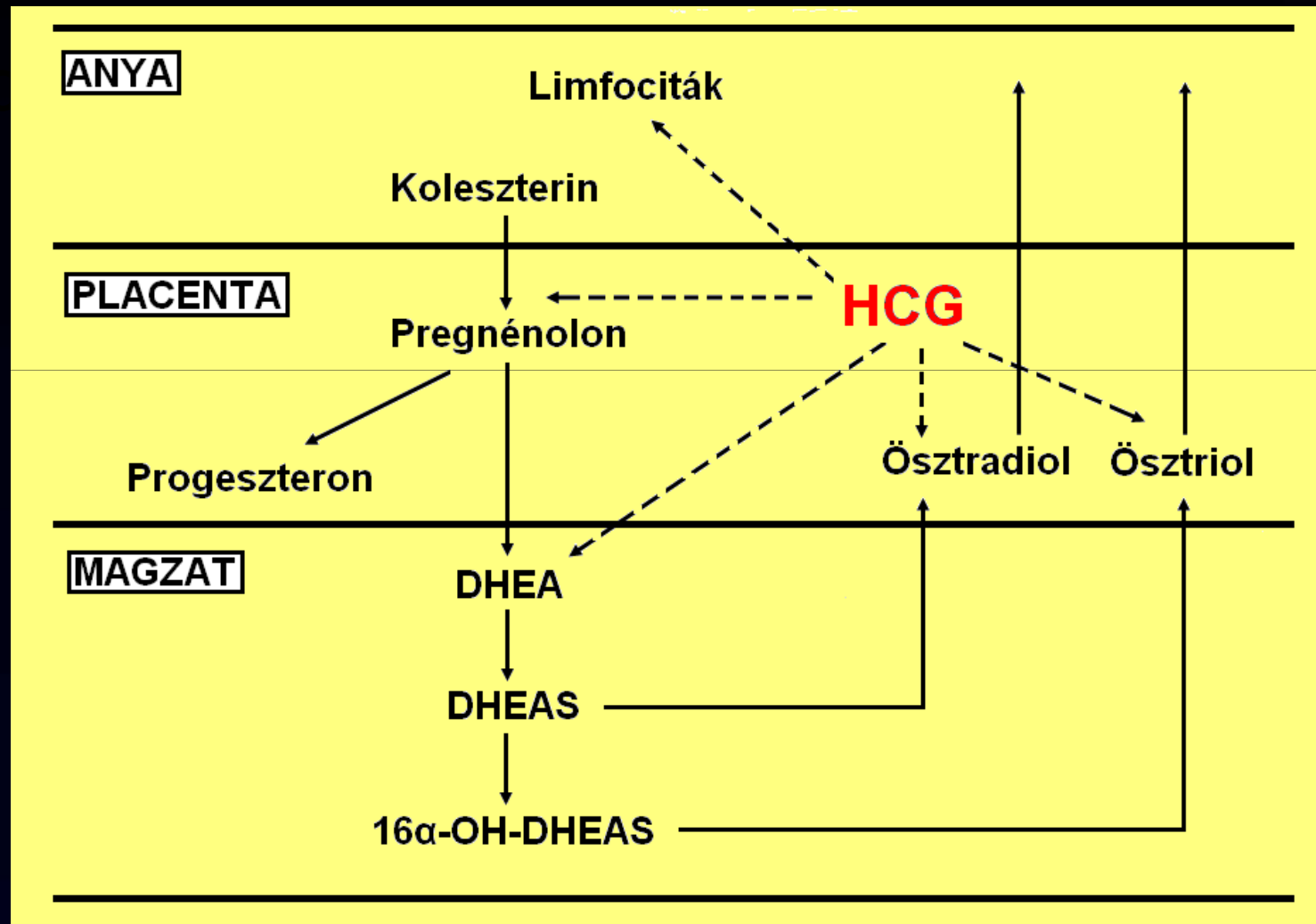


A HCG alegységeinek vérszintjei a terhesség alatt

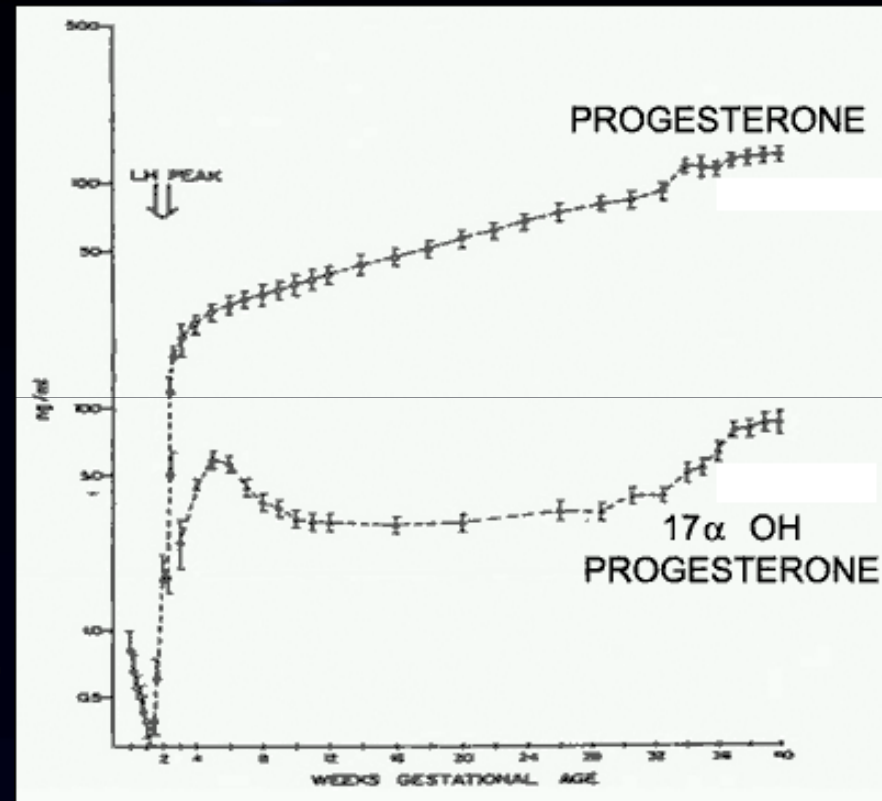
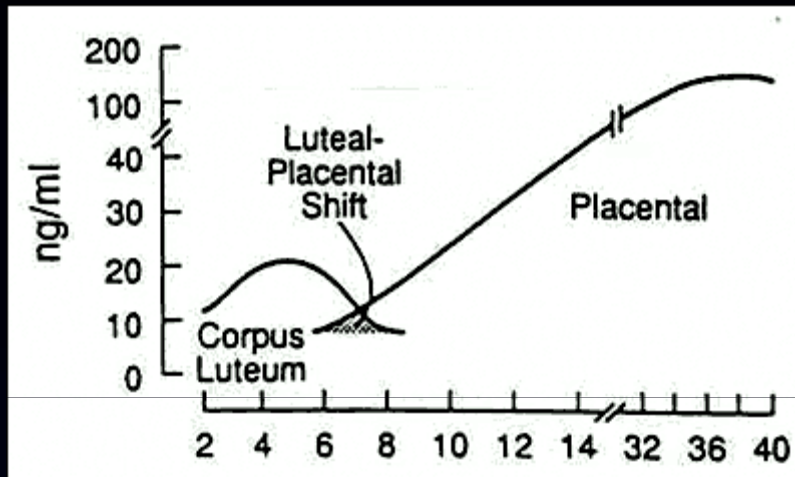
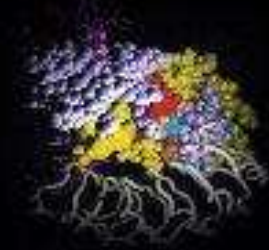


az α -alegység szintje folyamatosan nő a terhesség alatt (1% \rightarrow 30%)
a β -alegység szintje magas az I. trimeszterben, ami terminus felé csökken

A HCG szerepe a terhesség alatti hormon bioszintézisben



A progoszteron szintek alakulása a terhesség alatt



A P szintézis szubsztrátja az anyai LDL,
A corpus luteum, majd a placenta termeli,
(a főtális P szintézis elhanyagolható).

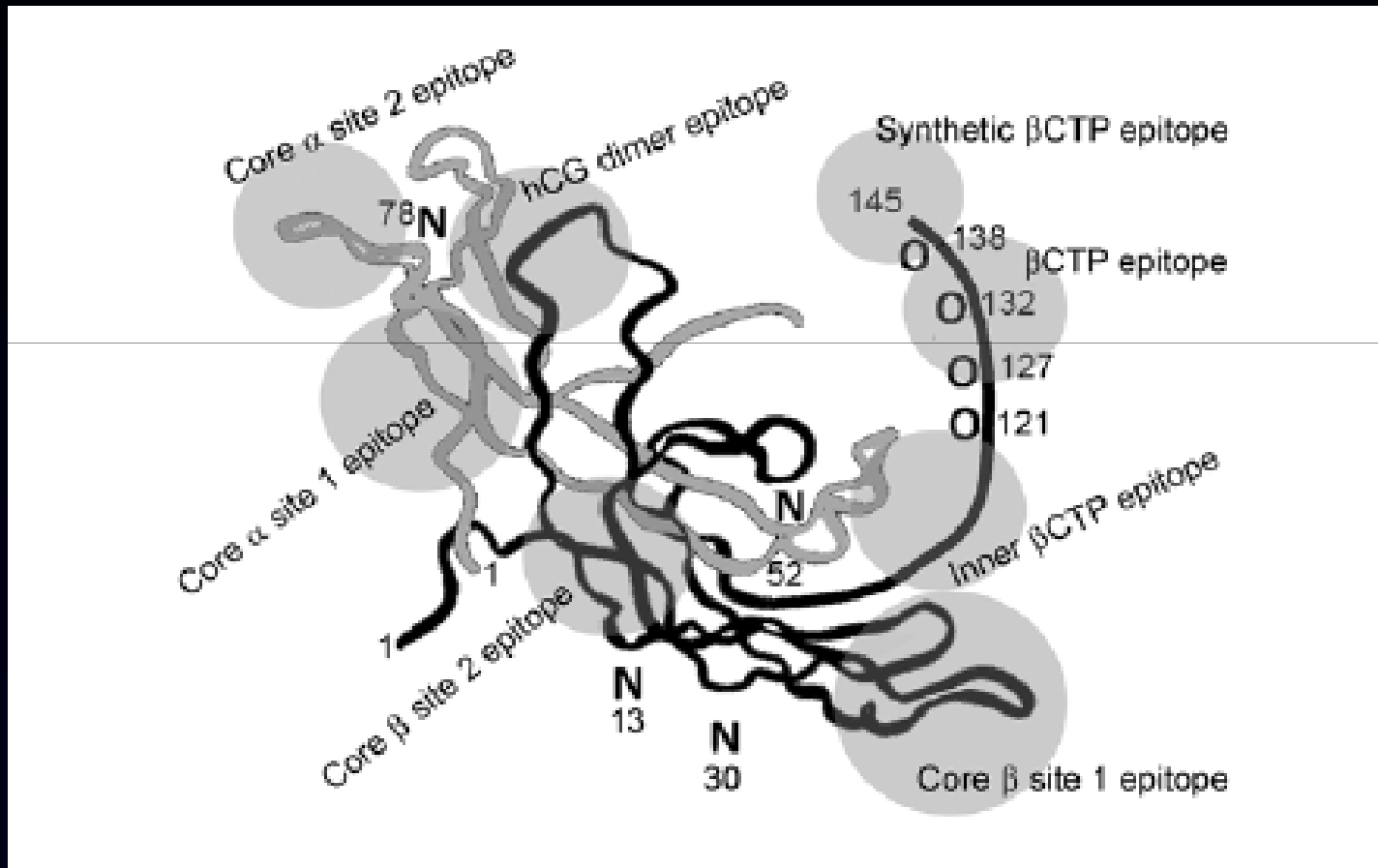
- A kezdeti 17α -OH-P szint a corpus luteum működéséből származik.
- A 10. héttől visszatér az alapállapotba, mivel a placentának csak limitált a 17α -hydroxylase aktivitása.
- A III. trimeszterben a főtális $\Delta 5$ -szulfonált precursorokból a placenta újból elkezd nagy mennyiségű 17α -OH-P-t szintetizálni.

A HCG assay-k



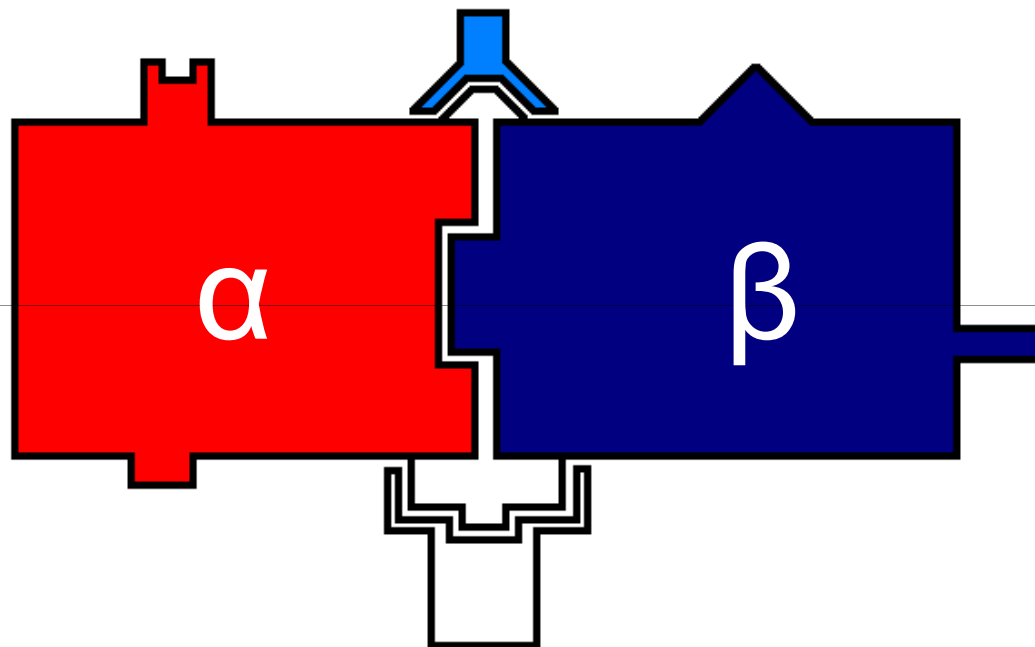
- ✓ Intact HCG assay-k
- ✓ Total HCG assay-k (total β HCG assay-k)
- ✓ Szabad β HCG assay-k

A HCG térszerkezete és a lehetséges antitest képzés helyei



L.A. Cole and S.A. Butler: Human Chorionic Gonadotropin (HCG), Elsevier (London) 2010

Az intakt HCG mérése



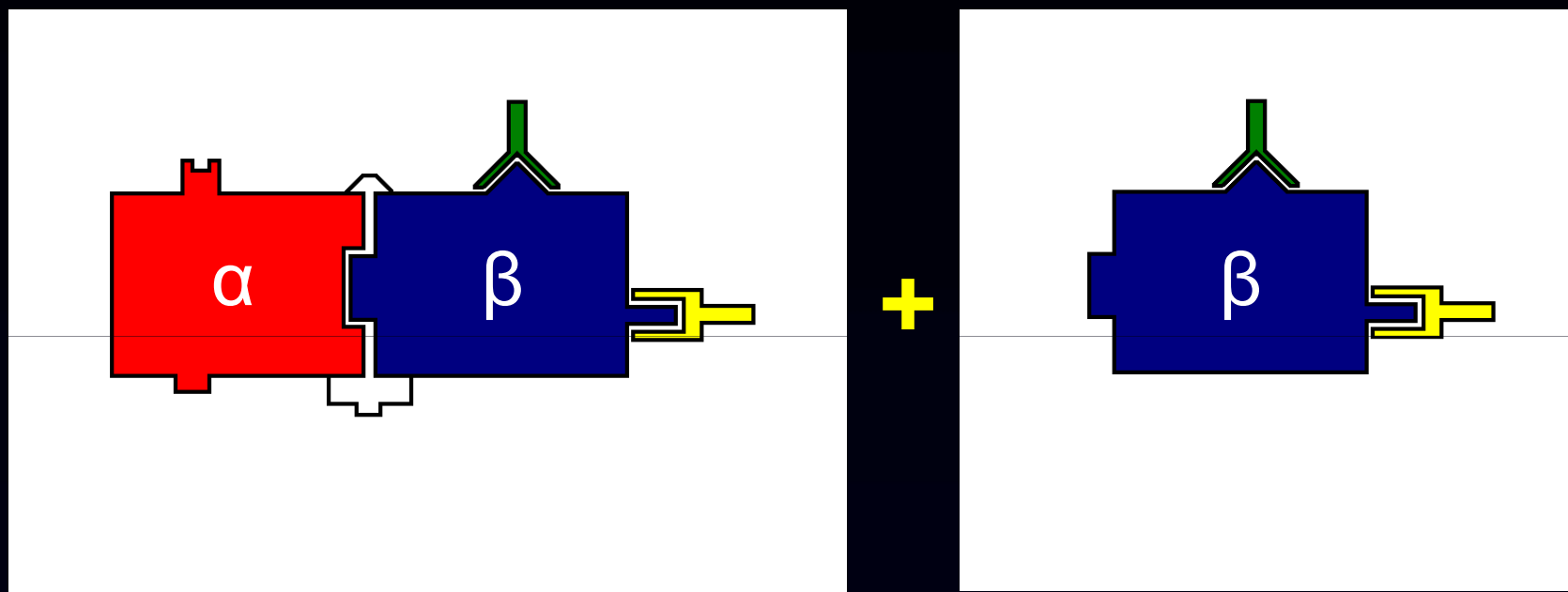
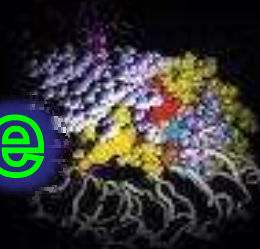
Elecsys/Cobas HCG STAT ECLIA kit (Cat#03300811 190)

Immulite 1000 HCG CLIA kit (Cat#LKCG1)

Immulite 2000 HCG CLIA kit (Cat#L2KCG2)

Vidas HCG ELFA kit (Cat#30405)

A total-HCG (intact+ β) mérés



Abbott Axsym Total β HCG MEIA kit (Cat#7A59)

Abbott Architect Total β HCG CMIA kit (Cat#7K78)

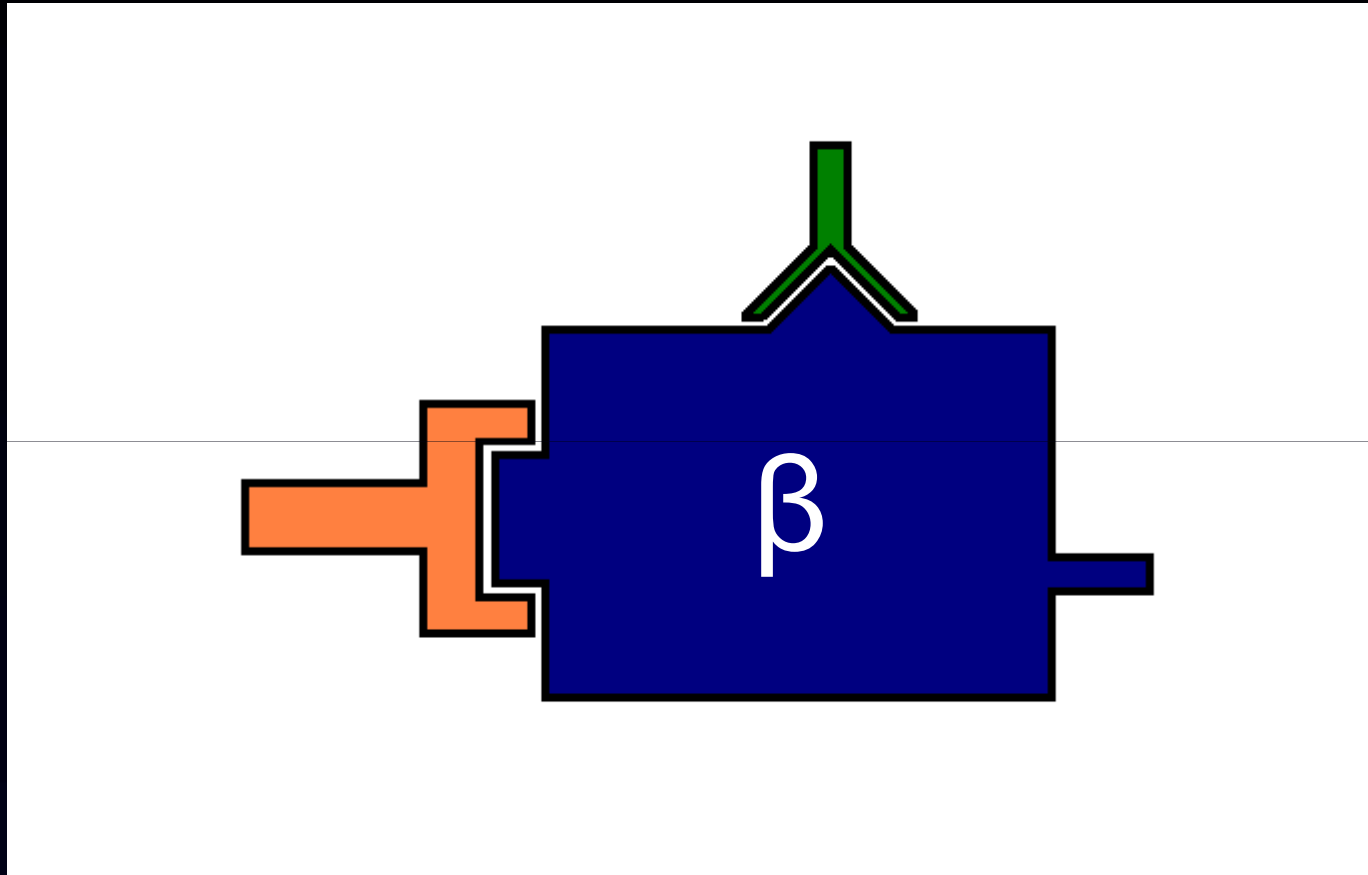
Advia Centaur Total HCG CLIA kit (Cat#00641527)

Beckman Coulter Access Total β HCG CLIA kit (Cat#33500)

Elecsys/Cobas HCG+ β ECLIA kit (Cat#03271749 190)

Liaison HCG CLIA kit (Cat#312311)

A szabad β HCG mérése



Diagnostic Automation INC Free β HCG ELISA (Cat#4221Z)

IBL Free β HCG ELISA (Cat#RE53181)

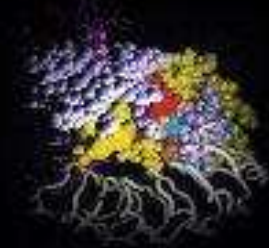
Immulite 1000 Free β HCG CLIA kit (Cat#L2BCG1)

Immulite 2000 Free β HCG CLIA kit (Cat#L2KFB2)



Total HCG mérés ~~=~~ Total β HCG mérés

A HCG standardizálása



- 1st HCG IS = 6 cég által vizeletből előállított HCG (1939)
- 2nd HCG WHO IS = 10 g vizelet HCG (Organon) (1960)
- 3rd HCG WHO IS (75/537) = WHO 1st IRP
- 4th HCG WHO IS (75/589) = tisztított WHO 1st IRP
 - α HCG (75/569)
 - β HCG (75/551)
- 1st IRR = 6 HCG izoforma

HCG izoforma	IFCC név	WHO kód
intact HCG	HCG	IRR 99/688
nicked HCG	HCG _n	IRR 99/642
HCG α -subunit	HCG α	IRR 99/720
HCG β -subunit	HCG β	IRR 99/650
nicked HCG β -subunit	HCG β _n	IRP 99/692
HCG β -core fragment	HCG β cf	IRR 99/708

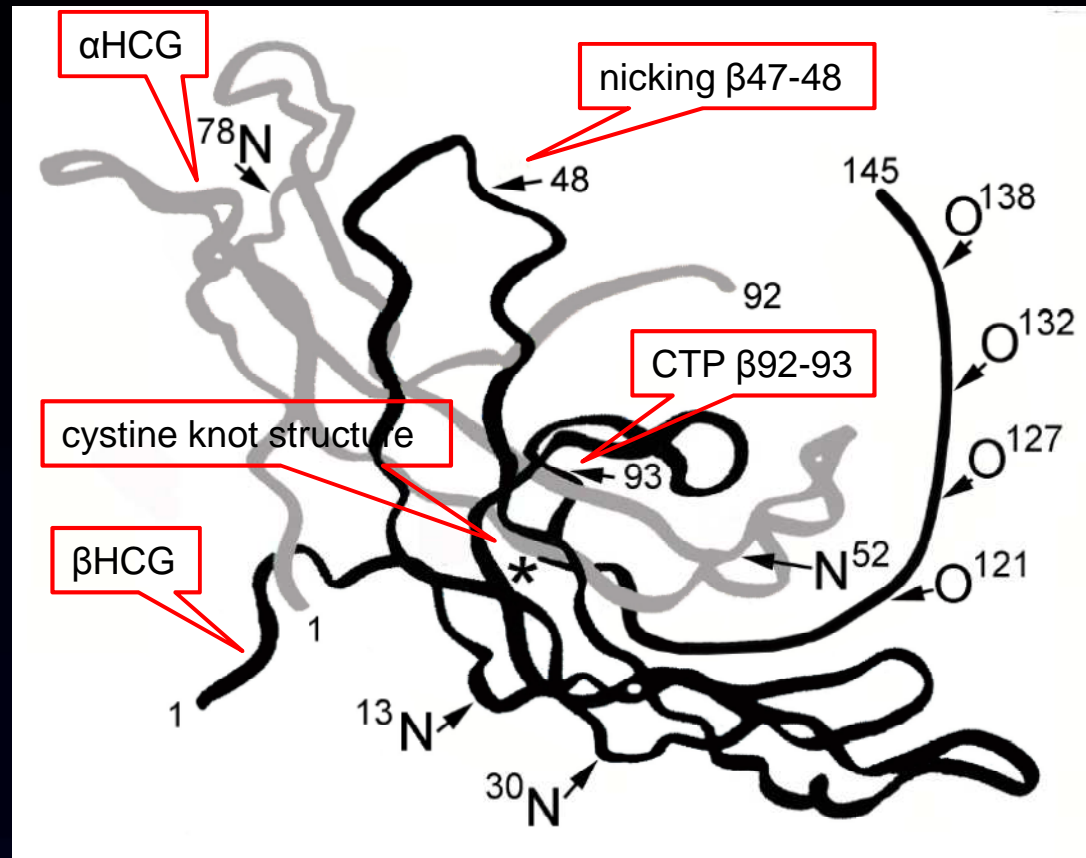
IS: International Standard
IRP: International Reference Preparatum
IRR: International Reference Reagent

A HCG mérésre leggyakrabban használt tesztek kalibrációja



Automata (tesztnév)	QualiCont kód	A teszt katalógus száma	A standard visszavezethetősége
Access (total β HCG)	40 BE	33500	4th WHO IS 75/551
Advia Centaur (total HCG)	16 BG	00641527	4th WHO IS 75/589
Architect (total β HCG)	40 AB	7K78	4th WHO IS 75/589
Axsym (total β HCG)	6 AB	7A59	3rd WHO IS 75/537
Elecsys (HCG+ β)	17 RO	03271749 190	4th WHO IS 75/589
Elecsys (HCG Stat)	17 RO	03300811	4th WHO IS 75/589
Immulite 1000 (free β HCG)	18 DI	L2BCG1	4th WHO IS 75/551
Immulite 2000 (free β HCG)	18 DI	2KFB2	4th WHO IS 75/551
Immulite 1000 (HCG)	18 DI	LKCG1	3rd WHO IS 75/537
Immulite 2000 (HCG)	18 DI	L2KCG2	3rd WHO IS 75/537
Liaison (HCG)	16 DO	312311	3rd WHO IS 75/537
Vidas (HCG)	20 AX	30405	3rd WHO IS 75/537

A HCG molekula 3D modellje



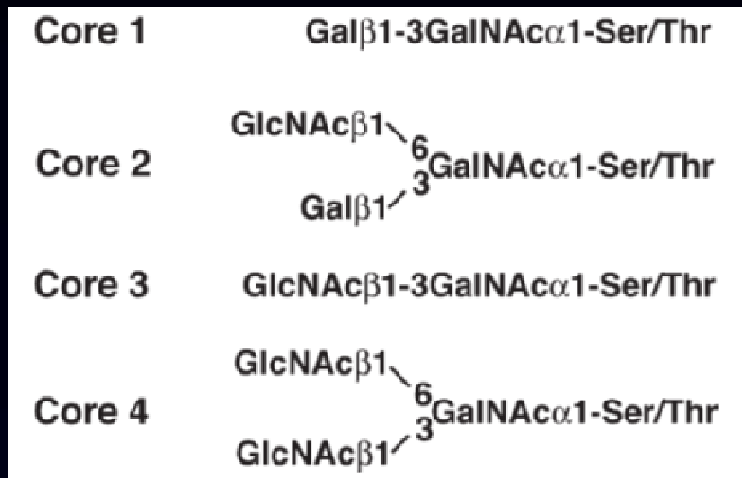
A terhességből származó átlagos β-alegység:

O-kapcsoltan: 75-85% trisaccharid/tetrasaccharidot és 15-25% hexa/pentasaccharidot

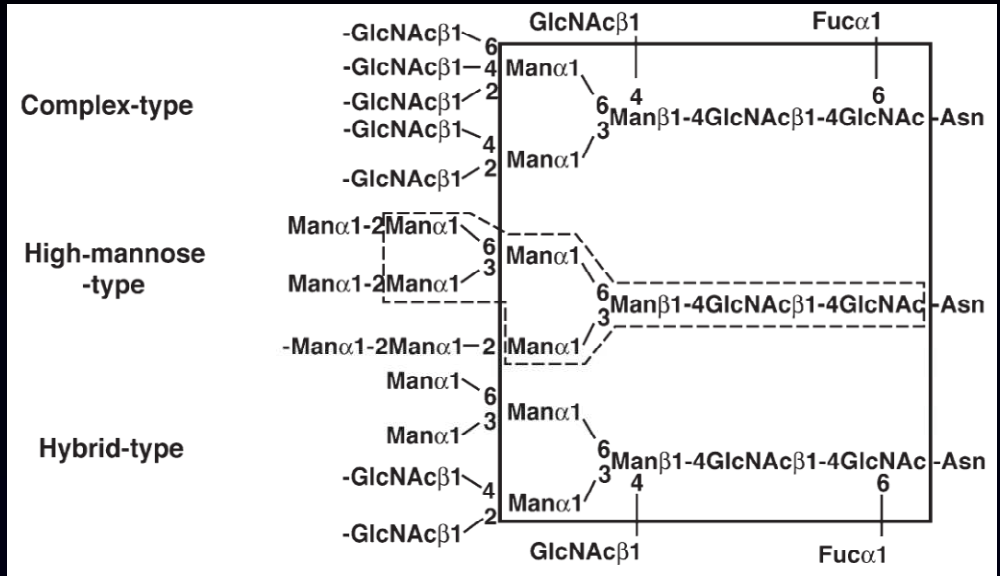
N-kapcsoltan: 47% SSF, 31% SS, 12,5% SSSF, 5,4% SM szerkezeteket tartalmaz

Lathorn et al. Crystal structure of HCG. Nature 369:455-461. (1994)

A HCG β alegységhez kapcsolódó glycosidok



O-kapcsolt glycosidok a beta alegységen



N-kapcsolt glycosidok a beta alegységen

GlcNAc =N-acetyl-glucoseamine, GalNAc=N-acetyl-galactoseamine

A különböző HCG molekulák diagnosztikai jelentősége



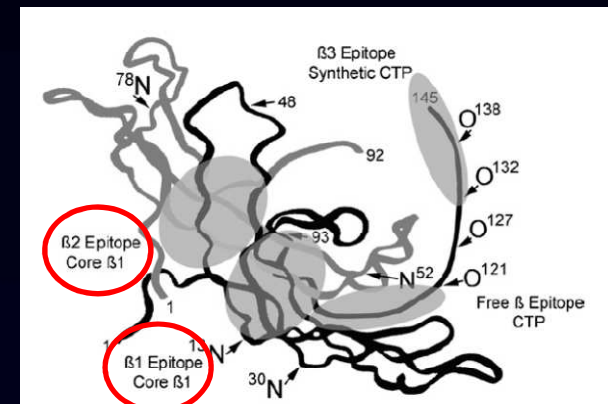
Molekula	Szintézis helye, jelentősége
HCG	Terhesség alatt termelődik.
Hyperglycosylált HCG	A korai terhesség elsődleges HCG molekulája (nélkülözhetetlen az implantációhoz). Trysomia esetében is emelkedik (Down syndroma szűrés).
	Az elsődlegesen termelődő molekula choriocarcinoma, trophoblast eredetű neoplasia és persistáló hydatidiform mola terhesség esetében.
Nicked HCG	Terhesség alatt jelen van a vérben és a vizeletben. Ectópiás terhesség, spontán abortus esetében növekszik az aránya a HCG frakcióban.
Nicked és hyperglycosylált HCG	Az elsődlegesen termelődő molekula choriocarcinoma, trophoblast eredetű neoplasia és persistáló hydatidiform mola terhesség esetében.
Nicked HCG hiányzó β CTP	Gyakran kimutatható a serumban és vizeletben choriocarcinoma és hydatidiform mola esetében. Ectópiás terhesség, spontán abortus esetében növekszik az aránya a HCG frakcióban.
	Familiális HCG syndromában termelődik.
Asialo HCG	Normál terhesség alatt és trophoblast betegség esetében is termelődik. TSHr antagonist!
HCG β	Szintje emelkedik koraterhességben és Down syndroma esetében. HCG β és a hyperglycosilált HCG β előrehaladott malignus betegségek esetében termelődik. β Core-frakcióként jelenik meg a vizeletben. Kimutatható familiális HCG syndroma esetében is.
Nicked HCG β	A legtöbb előrehaladott malignus betegségben kimutatható a vérben és a vizeletben.
β -Core fragment	A legtöbb előrehaladott malignus betegségben kimutatható a vizeletben. Ectópiás terhesség, spontán abortus esetében kimutatható a vizeletben.

A total HCG assay-k használhatósága a különböző HCG frakciók meghatározására



	ABBOTT	ABBOTT	Beckman	Beckman	Ortho	ROCHE	Bayer	Advia	Siemens	Manuális
Serum standard	Architect	AxSym	Access 2	Dxl800	Vitros EciQ	Elecsys	ACS180	Centaur	Immulite 2000	RIA
HCG	96	103	103	100	112	109	105	104	96	99
Hyperglycosylált HCG	86	85	120	98	68	78	102	81	105	92
Nicked HCG	70	99	84	71	80	69	85	66	115	98
Nicked HCG hiányzó CTP	0	0	0	0	0	12	0	0	109	95
Nicked hyperglycosylált HCG	40	46	46	51	80	100	70	40	103	70
Asialo HCG (desialinizált)	35	69	48	46	85	46	81	39	114	126
HCG β	87	94	142	136	47	102	126	47	111	86
Nicked HCG β	33	51	56	63	19	53	72	19	107	80
β -Core fragment	1	1	1	1	1	16	0	1	35	76
Gyenge detektálás	6/9	5/9	6/9	7/9	5/9	5/9	5/9	7/9	1/9	2/9
LH keresztreakció	0,01	0,01	0,01	0,01	0,32	0,01	0,01	0,01	0,04	0,36
Vizelet standard										
Vizelet HCG	103	118	69	85	58	100	106	108	107	101
Vizelet HCG β	84	80	119	111	11	86	nd	44	120	nd

Cole et al. Clinica Chimica Acta 412: 2216-2222. (2011)



Fals pozitív HCG tesztek



- Fals pozitív eredmények az első RIA kitekkel még a 70-es években.
- Fals pozitív eredmények a több-antitestet használó immunometrikus analitikai módszerek megjelenését követően a 80-as években.
 - human anti-mouse AB (HAMA),
 - human anti-animal antibodies (HAAA),
 - heterophil antitestek,
 - keresztreakciók

Fals pozitív HCG tesztek



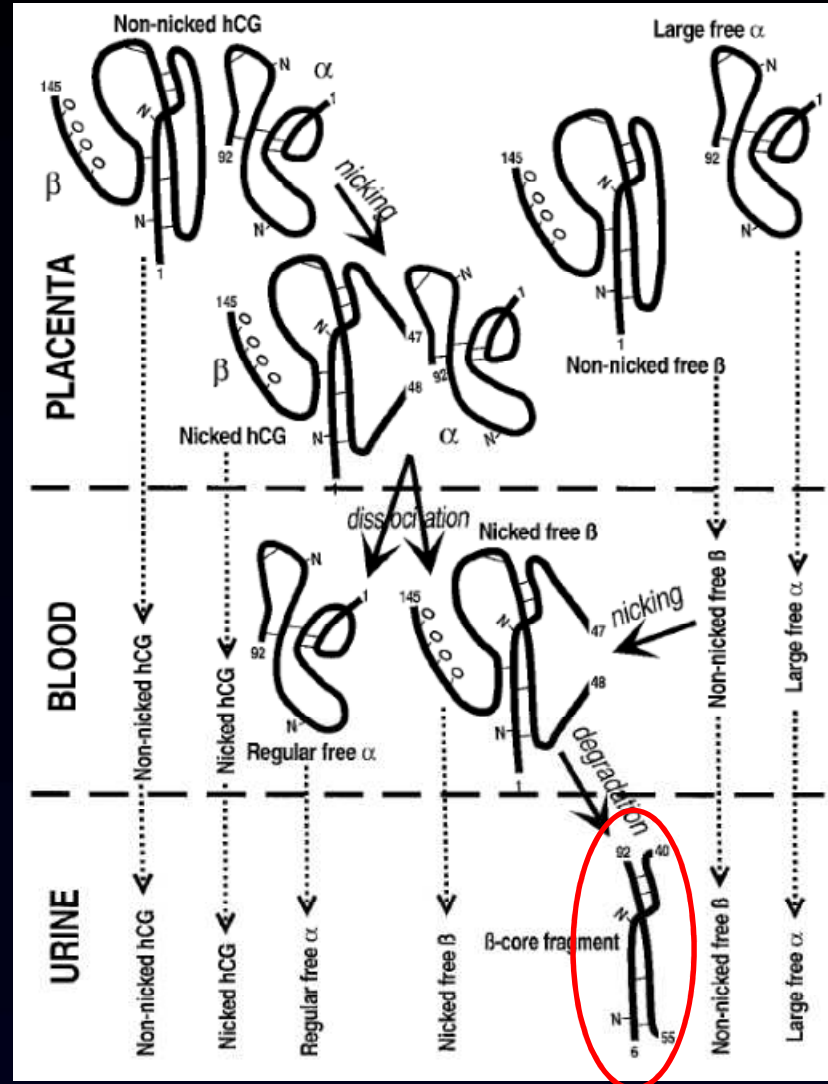
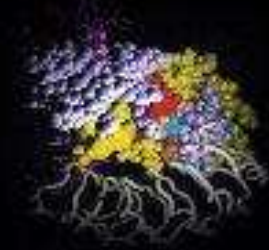
- 1999-ig nem fordult elő ilyen eset az immunometrikus érában.
- Az USA-ban regisztrált esetek:
 - 1999-ben 5 eset
 - 2000-ben további 7 eset
 - 2004-ig újabb 40 (!) eset
- Az 52 esetből 34 (!) kemoterápiában részesült vagy megoperálták (10 hysterectomia, 3 bilateralis-salpingo-oopharectomia-n esett át)!

HCG Reference Service



- Hogyan szűrjük ki a fals pozitív HCG eredményeket?
 - Ha gyanús valami mérjünk HCG-t a vizeletből is:
 - A HAMA, HAAA és heterophil AB **nem jut át** a vizeletbe. Az eredmény *negatív* lesz.
 - A HCG core- β fragmentuma a vesében keletkezik és csak a vizeletben van jelen. Ha β -core fragmentumot mérünk a vérben, az interferáló AB jelenlétére utal.
 - A kérdéses mintát be kell küldeni a referencia laboratóriumba.

A HCG degradációja



Cole, Clinical Chemistry 43: 2233-2243. (1997)

Familialis HCG Syndroma



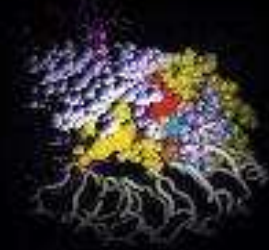
- Emelkedett HCG koncentráció terhesség, daganat és egyéb HCG termelő betegség nélkül, tünetmentesen.
- **Férfiakat és nőket egyaránt érint**
- **Az USA-ban 1998-2011 között összesen 425 olyan esetet regisztráltak, ahol nem terhesség miatt mértek magas HCG-t. Ebből 10 esetben találták diagnózisként a familiális HCG syndromát.**
- **A mért HCG serum koncentrációk <1-216 IU/l.**
- **A 10-ből egy esetben csak a vizelet volt pozitív!**

Familialis HCG Syndroma



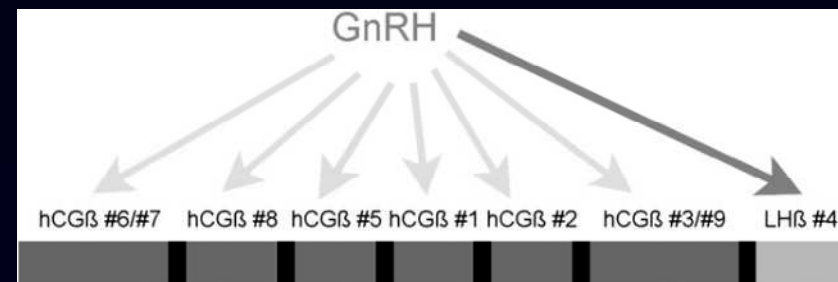
- A 10 (5 férfi és 5 nő) eset alapján 32 családtagot is megvizsgáltak. Közülük 24-nél találtak HCG immunoreaktivitást mutató molekulát.
- 10-ből 8 esetben csak az egyik szülőnél volt HCG pozitivitás (domináns öröklődés?), a maradék kettőnél mindkét szülő pozitív volt.
- A családok negatívak voltak hyperglycosylált HCG-re (nem volt malignus betegség a háttérben).
- Negatív volt a vizelet β -core fragmentum is.
- Minden minta pozitív volt a következő HCG molekulákra:
HCG β , HCG β - vagy HCG β -alegység hiányzó CTP

Sulfatált HCG

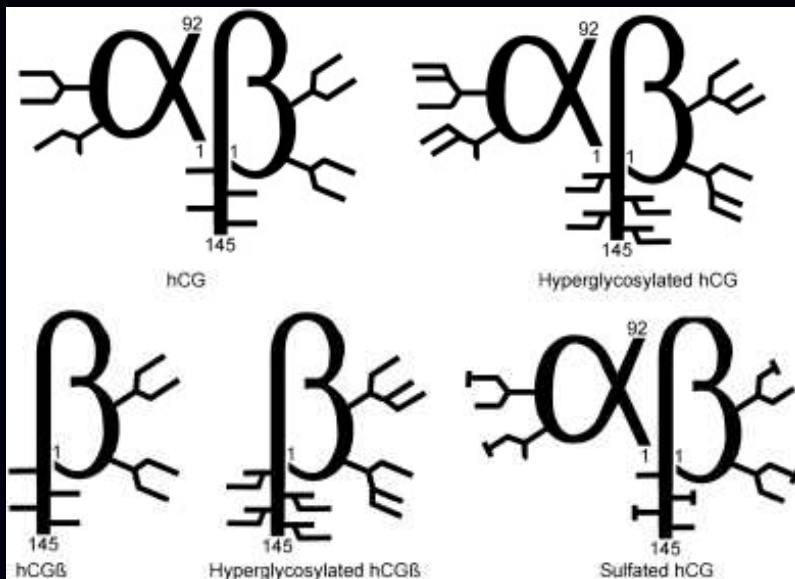


- A hypophysis termeli. Sulfatált oligosaccharid oldalláncot tartalmaz.
- A menstruációs ciklus alatt alig kimutatható, koncentrációja párhuzamosan változik az LH-val (az LH csúcs alatt $1,54 \pm 0,90$ IU/l).
- Szerepe lehet az LH-val együtt a luteális progeszteron termelés fenntartásában.
- Menopausában (E2 és P hiány) a GnRH pulzus maximális. Fokozott FSH LH és *HCG* szintézis (akár 40 IU/l is lehet).

Cole, Clinica Chimica Acta 143: 48-65. (2012)



A hyperglycosilált HCG molekulák biológiai (diagnosztikai) jelentősége



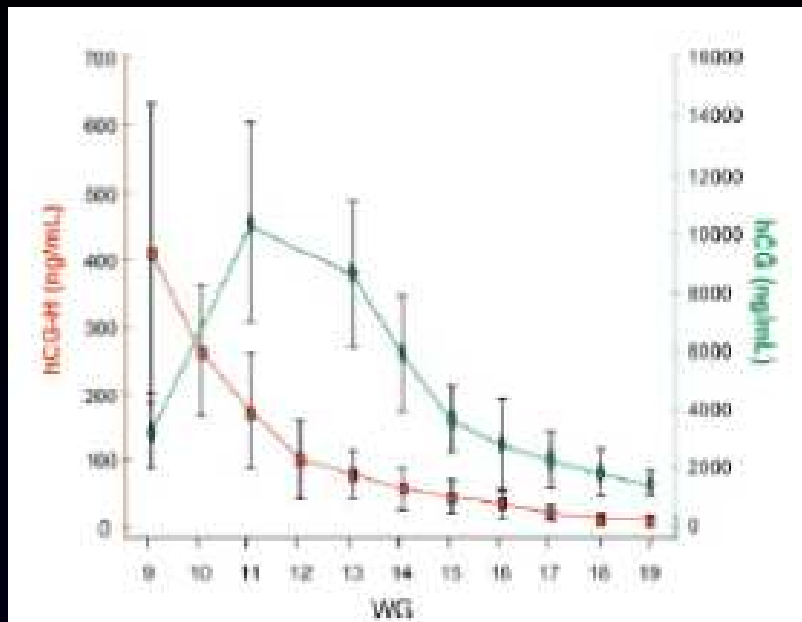
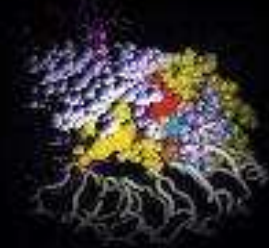
Hyperglycosilált HCG

- TGFβ-rokon szerkezet (antagonista).
- Cytotrophoblast sejtek termelik
- Autokrin hatás
- Kulcsszerepet játszik az implantációban, irányítja a cytotrophoblast inváziót
- Szintje magas choriocarcinomában

Hyperglycosylált βHCG, βHCG

- Choriocarcinoma és egyéb reproduktív daganatok markere.
- A legtöbb előrehaladott malignus daganat termel βHCG immunoreaktív molekulát.

A hyperglycosylált HCG, mint a korai trophoblast invázió markere



Az implantáció 2-3 nappal az embrió uterus ürbe jutását követően kezdődik (6-8 nappal a fertilizációt követően)

Az implantáció 3 folyamata:

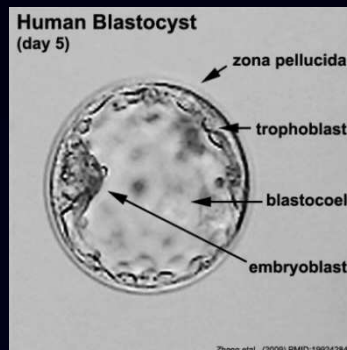
- Appositio (blastocysta és az uterus epithelium)
- Adhesio
- Invasio

1. A trophoblast betör a uterus epitheliumba
2. A trophoblast bejut a epithelium bazális membránja alá
3. A trophoblast és az epithelium sejt fúziója következik be
4. Az embrio collagenase és plasminogén activator enzimeket szintetizál, amelyek megemésztik az intercelluláris matrixot

A trophoblast két irányban differenciálódik: villózus és extravillózus cytotrophoblast sejtek képződnek.

A **villózus trophoblastból alakul ki a syncytiotrophoblast** (HCG hatás) (gázcsere, táplálékcsera az anya és magzat között, illetve ez a placenta endokrin szövete ebből alakul ki)

Az **extravillózus trophoblast felelős az invázióért** (decidua, myometrium felső harmad, arteriolák)

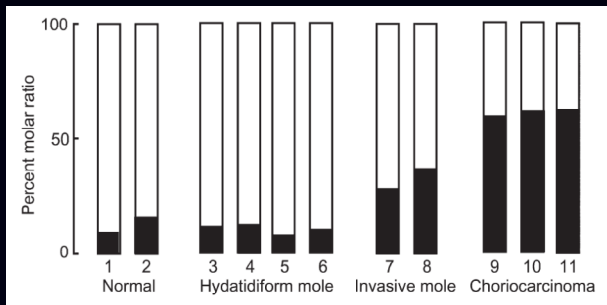


Az invazív extravillózus cytotrophoblast a fő forrása a HCG-H-nak.

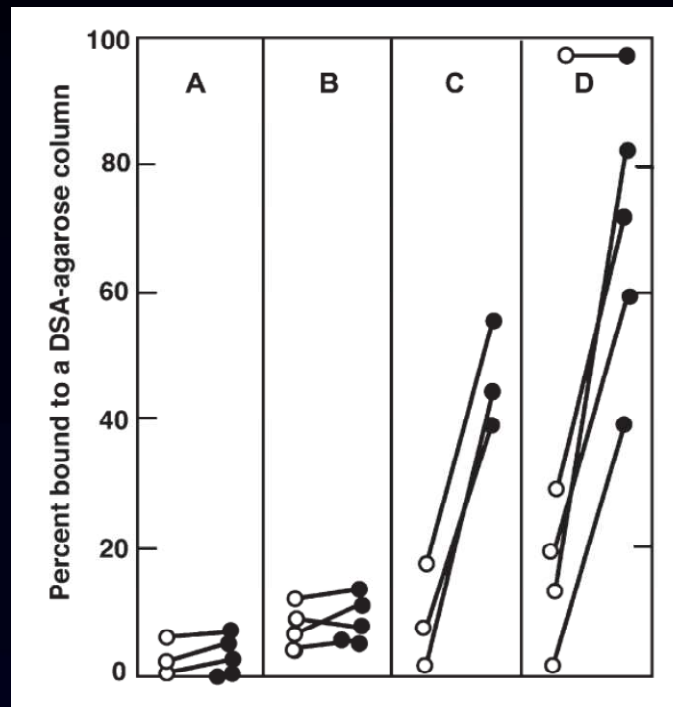
Glycosilált HCG, mint a trophoblast eredetű betegségek markere



- Az a teszt, amelyik képes azt a HCG-t mérni, amelyik Gal β 1-4GlcNAc β 1-4(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man oldalláncot tartalmaz, alkalmas az invazív mola terhesség illetve a choriocarcinoma elkülönítésére a normál terhességtől és a hydatidiform molától.



Core 1 és 2 maggal rendelkező, O-kapcsolt szénhidrát oldalláncok aránya vizelet HCG-ben

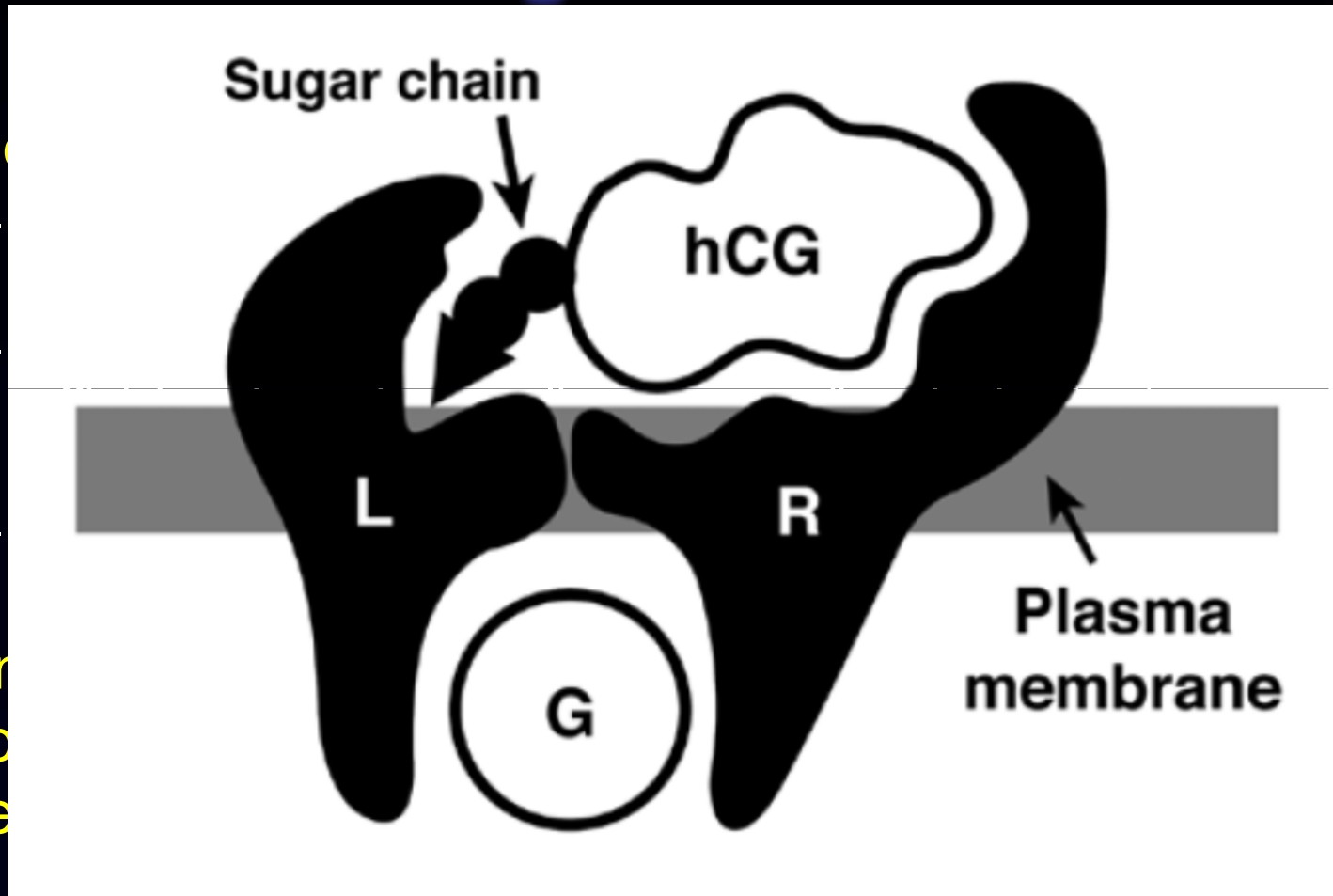


A: normál terhesség
 B: hydatidiform mola
 C: invazív mola
 D: choriocarcinoma
 Sialidase emésztés előtt ●
 és után ■

Szerkezet-hatás összefüggések a HCG és receptora között

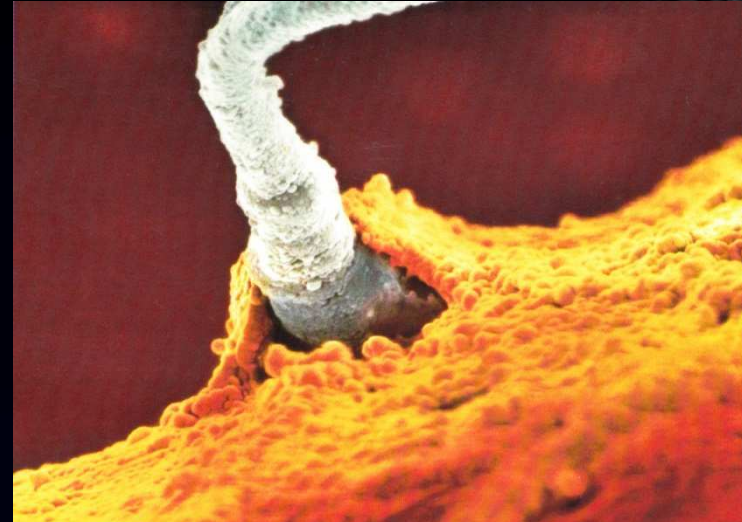


- A
- m
- E
- k
- v



ása
sta
Ini a
zt

The journey of the human life by Lennart Nilsson





Köszönöm a figyelmet!

Foto: Michael Clancy 1999