



### FELELŐS SZERKESZTŐ

Merkely Béla  
merkely.bela@kardio.sote.hu

### FŐSZERKESZTŐK

Gál János  
janos.gal67@gmail.com

Langer Róbert  
roblanger@hotmail.com

### SZERKESZTŐBIZOTTSÁG

#### Graduális képzés

Matolcsy András  
matolcsy@korb1.sote.hu

#### PhD-képzés

Szél Ágoston  
szel@ana2.sote.hu

#### Szakorvos-továbbképzés

Szathmári Miklós  
szatmik@bel1.sote.hu

#### Rezidens- és szakorvosképzés

Préda István  
predadr@gmail.com

#### Tagok

Ádám Veronika, Bereczki Dániel, Bitter István, Csermely Péter, de Châtel Rudolf, Dobozy Attila, Eckhardt Sándor, Édes István, Fazekas Árpád, Fejérdy Pál, Fekete György, Halász Béla, Karádi István, Kárpáti Sarolta, Kásler Miklós, Keller Éva, Kollai Márk, Kopper László, Ligeti Erzsébet, Losonczy György, Magyar Kálmán, Mandl József, Muszbek László, Nagy Károly, Nardai Sándor, Nemes Attila, Németh János, Noszál Béla, Palkovits Miklós, Papp Gyula, Papp Zoltán, Petrányi Győző, Répássy Gábor, Rigó János, Réthelyi Miklós, Romics Imre, Romics László, Rosivall László, Sótonyi Péter, Szendrői Miklós, Szirmai Imre, Szollár Lajos, Telegdy Gyula, Tompa Anna, Tóth Miklós, Tulassay Zsolt, Tulassay Tivadar, Vasas Lívía, Vincze Zoltán, Zelles Tivadar

#### Szerkesztőségi titkár

Szelid Zsolt  
orvoskepzes@kardio.sote.hu

Az ORVOSKÉPZÉS megjelenik negyedévente. Megrendelhető a Kiadótól.

Szerzői jog és másolás: minden jog fenntartva. A folyóiratban valamennyi írásos és képi anyag közzési joga a szerkesztőséget illeti. A megjelent anyag, illetve annak egy részének bármilyen formában történő másolása, ismételt megjelentetéséhez a szerkesztőség hozzájárulása szükséges.

### ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális képzés folyóirata  
Alapítva 1911-ben  
Különszám  
2011; LXXXVI. évfolyam,  
S3:245-292.

#### Orvosképzés Szerkesztőség:

1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

#### Kiadja és terjeszti:

Semmelweis Kiadó  
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

**Telefon:** 210-4403

**Fax:** 210-0914, 459-1500/56471

#### Internet honlap:

www.semmelweiskiado.hu

**E-mail:** info@semmelweiskiado.hu  
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu

#### Szerkesztő:

VINCZE JUDIT  
vincze.judit@mail.datanet.hu

#### Kiadásért felel:

TANCOS LÁSZLÓ  
tancos@mail.datanet.hu

#### Hirdetésszervező:

KOVÁCS VERONIKA  
**Telefon:** 215-1401, 06 20/ 221-5265  
kovver@net.sote.hu

#### Nyomdai előállítás:

Avaloni Kft.

ISSN 0030-6037



Semmelweis Kiadó  
www.semmelweiskiado.hu



## ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális képzés folyóirata alapítva 1911-ben  
Különszám  
2011; LXXXVI. évfolyam, S3: -.

## E-ORVOSKÉPZÉS

Töltse le a folyóiratot a  
[www.semmelweiskiado.hu](http://www.semmelweiskiado.hu)  
oldaláról!

## Semmelweis Egyetem

### Laboratóriumi Medicina kötelező szinten tartó tanfolyam

Újabb laboratóriumi eljárások (OFTEX)

Budapest, Elméleti Oktatási Központ  
(1094 Budapest, Tűzoltó utca 37-47.)  
2011. április 18-21.

#### A TANFOLYAM ELNÖKE

*Dr. Szabó Antal*, az MTA doktora  
egyetemi tanár, mb. igazgató  
Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet  
1085 Budapest, Bókay utca 54.  
E-mail: [szabant@gyer1.sote.hu](mailto:szabant@gyer1.sote.hu)

#### TANFOLYAMSZERVEZÉS

*Dr. Vásárhelyi Barna*, az MTA doktora  
tudományos főmunkatárs, igazgató helyettes  
Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet  
1085 Budapest, Bókay utca 54.  
E-mail: [vasbar@gyer1.sote.hu](mailto:vasbar@gyer1.sote.hu)

*Dr. Szombath Dezső*, szaktanácsadó, titkárságvezető  
Semmelweis Egyetem Továbbképzési Központ  
E-mail: [szombath@cme.usn.hu](mailto:szombath@cme.usn.hu)

#### TOVÁBBKÉPZÉSI INFORMÁCIÓK

*Akkreditáció:*

*Dr. Szathmári Miklós*, az MTA doktora, egyetemi tanár  
ÁOK Szakmai Tanácsadó Testület elnöke  
Tel.: 459-1500/52535  
E-mail: [szathmari@cme.usn.hu](mailto:szathmari@cme.usn.hu)

## FOTÓT kérek háttérrel

DR. VÁSÁRHELYI BARNA  
tudományos főmunkatárs



DR. SZABÓ ANTAL  
egyetemi tanár

## Kedves Munkatársak! Kedves Olvasók!

Szeretettel és tisztelettel köszöntjük Önöket a 2011. évi *Laboratóriumi medicina kötelező szinten tartó továbbképző tanfolyamon*, melyre három év után ismét sor kerül az új továbbképzési ciklus kezdetén.

A laboratóriumi medicinában világszerte az elmúlt évtizedekben alapvető változások történtek. A munka mind nagyobb hányadát automatizálják, a humán tényező a mérések végzésében egyre kisebb szerepet kap. Ráadásul a korábban csak a kutatásra szorító eljárások fokozatosan megjelennek a mindennapok gyakorlatában, azaz az eddig csak tudományos közleményekben bemutatott vizsgálatok egyre inkább a modern diagnosztika részét képezik.

A laboratóriumi medicina gyors ütemű fejlődését nem egyszerű nyomon követni. A többnapos továbbképző rendezvény egyik célkitűzése az újdonságokban való eligazodás segítése. Ezért kerül sor olyan korszerű technológiák, mint a tömegspektrometria, az áramlási citometriás vizsgálatok vagy molekuláris biológiai technikák bemutatására, melyek már most egyes magyar laboratóriumokban hozzátartoznak a metodikai fegyvertárhoz.

Ez volt az egyik oka annak, hogy az előadások a szakma széles és változatos területét érintik. A másik ok, hogy az előadások egy része néhány kiválasztott betegség, kórkép, így a vesebetegségek, gastrointestinalis kórképek, autoimmun betegségek esetében a kivizsgálásra alkalmazott algoritmussal, ezen belül az újabb diagnosztikus tesztek helyével és szerepével kíván foglalkozni. Szó lesz néhány olyan speciális problémáról, amivel a gyakorló orvosok – és a munkájukat támogató laboratóriumi szakemberek – a gyermekek ellátása során szembesülnek. Népegészségügyi szerepük, valamint a preanalitikai hibák fokozott kockázata miatt kitüntetett szerepet kapnak a hemosztázissal kapcsolatos kérdések is.

A szakvizsga megújításához szükséges és előírt kötelező szinten tartó továbbképző tanfolyamot idén Budapesten a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet koordinálja. Az Intézet megalapítása óta eltelt kevesebb mint egy év alatt több területen is minőségi változás következett be az egyetemen végzett laboratóriumi diagnosztikus munka és a laboratóriumi medicina oktatása terén. A graduális képzés keretében sor került egyetemi jegyzet elkészítésére, illetve a Laboratóriumi medicina tárgy oktatására is. A posztgraduális képzés része a jelen továbbképző előadás is.

Az előadások rövid összefoglalója az „Orvosképzés” folyóiratban is megjelenik (mely a Semmelweis Kiadó honlapjáról is letölthető: [www.semmelweiskiado.hu/folyoiratok](http://www.semmelweiskiado.hu/folyoiratok)) ; a vetített ábraanyag várhatóan a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság (MLDT) honlapján ([www.mldt.hu](http://www.mldt.hu)) is hozzáférhető lesz. Reméljük, hogy az összefoglalók az olvasók számára hasznosak lesznek és segítik további munkájukat, szakmai tájékozottságukat.

Tisztelettel:

### BESZKENNELT ALÁÍRÁST KÉREK

*Dr. Vásárhelyi Barna*  
tudományos főmunkatárs  
a tanfolyam titkára

*Dr. Szabó Antal*  
egyetemi tanár  
a tanfolyam elnöke



## ORVOSKÉPZÉS folyóirat szerzői útmutatója

**A folyóirat célja:** Az 1911 óta megjelenő Orvosképzés legfontosabb célja a hazai orvoskollégák folyamatos graduális és posztgraduális képzésének támogatása. A lap elsősorban olyan munkák közlését tartja feladatának, amelyek az orvostudomány egy-egy ágának újabb és leszárt eredményeit foglalják össze magas színvonalon úgy, hogy azok a gyakorló orvoshoz, szakorvoshoz, klinikushoz és elméleti orvoshoz egyaránt szóljanak. Emellett lehetőség van eredeti közlemények és esetismertetések benyújtására, és az újság a Semmelweis Egyetem szakmai kötelező szinten tartó tanfolyamok előadási összefoglalóinak is teret ad. Az eredeti közlemények a rendszeres lapszámokban, vagy a témához kapcsolódó tematikus lapszámokban kapnak helyet. Fontos feladatunknak tartjuk, hogy rezidens kollégák tollából származó esetismertetéseket is közöljünk, melyeket mentori ajánlással kérünk benyújtani. A beadott dolgozatokat a szerkesztőbizottság előzetes bírálatra adja ki, és a kézirat közlésére a bírálat eredményének függvényében kerül sor. Tudományos dolgozat benyújtására az alábbiak szerint van lehetőség:

- Esetismertetés (case report)
- Fiatal doktorok (PhD) tudományos beszámolója, új eredményeinek összefoglalása (nem tézisek vagy doktori értekezések)
- Klasszikus összefoglaló közlemény az elméleti és klinikai orvostudomány bármely területéről, a legújabb irodalmi eredmények felhasználásával
- „Update” jellegű közlemény, azaz nem egy téma kidolgozása, hanem adott szakterület legújabb tudományos eredményeinek összefoglalása
- Előadási összefoglaló (a tanfolyamszervezők felkérése alapján)

**A kézirat:** A tudományos közleményeket elektronikusan, Word dokumentum formátumban kérjük eljuttatni a szerkesztőségbe. Az illusztrációkat, ábrákat és táblázatokat külön file-ként kérjük elküldeni. Az ábrák címeit és az ábramagyarázatokat a Word dokumentumban külön oldalon kell feltüntetni, az ábra/táblázat számának egyértelmű megjelölésével. A digitális képeket minimum 300 dpi felbontásban kérjük, elfogadunk tif, eps, illetve cdr kiterjesztésű file-okat. A kézirat elfogadása esetén az ábrákat a szerkesztőség nyomtatott formában is kéri elküldeni. Az orvosi szavak helyesírásában az Akadémia állásfoglalásának megfelelően, a latinus írásmód következetes alkalmazását tekintjük elfogadottnak. Magyarosan kérjük írni a tudományágak és szakterületek, a technikai eljárások, műszerek, a kémiai vegyületek neveit. A szerkesztők fenntartják maguknak a stílisis javítás jogát. A mértékegységeket SI mértékrendszerben kérjük megadni.

**A kézirat felépítése** a következő: (1) címlap, (2) magyar összefoglalás, kulcsszavakkal, (3) angol összefoglalás (angol címmel), angol kulcsszavakkal, (sorrendben): magyar cím, angol cím, (4) rövidítések jegyzéke (ha van), (5) szöveg, (6) irodalomjegyzék, (7) ábrajegyzék, (8) táblázatok, (9) ábrák. Az oldalszámozást a címlaptól kezdve kell megadni és az egyes felsorolt tételeket külön lapon kell kezdeni. (1) A *címlapon* sorrendben a következők szerepeljenek: a kézirat címe, a szerzők neve, valamint a szerzők munkahelye, a kapcsolattartó szerző pontos elektronikus és postai címének megjelölésével. (2–3) Az *összefoglalást* magyar és angol nyelven kell beküldeni, külön oldalon, a következő szerkezet szerint: „Bevezetés” („Introduction”), „Célkitűzés” („Aim”), „Módszer” („Methods”), „Eredmények” („Results”) és „Következtetések” („Conclusions”) lényegre törő megfogalmazása történjék. A magyar és az angol összefoglalások terjedelme – külön-külön – ne haladja meg a 200 szót (kulcsszavak nélkül). A témához kapcsolódó, maximum 5 kulcsszót az összefoglalók oldalán, azokat követően kérjük feltüntetni magyar és angol nyelven. (4) A kéziratban előforduló, nem általánosan elfogadott *rövidítésekről* külön jegyzéket kell készíteni abc-sorrendben. (5) A szövegtörzs szerkezete világos és az olvasó számára átlátható legyen. Eredeti közlemények esetén a „Bevezető”-ben röviden meg kell jelölni a problémafelvetést, és az irodalmi hivatkozásokat a legújabb eredeti

közleményekre és összefoglalókra kell szűkíteni. A „Módszer” részben világosan és pontosan kell leírni azokat a módszereket, amelyek alapján a közölt eredmények születtek. Korábban közölt módszereket esetén csak a metodika alapelveit kell megjelölni, megfelelő irodalmi hivatkozással. Klinikai vizsgálatoknál a kézirathoz csatolni kell az illetékes etikai bizottság állásfoglalását. Állatkísérletek esetén a Magyar Tudományos Akadémia – Egészségügyi Tudományos Tanács – állatkísérletekre vonatkozó etikai kódexe érvényes, melyre a metodikai részben utalni kell. A statisztikai módszereket és azok irodalmát is meg kell adni. Az „Eredmények” és a „Megbeszélés” részeket világosan kell megszerkeszteni. *Referáló közlemények* benyújtása esetén a szövegtörzs altémákra osztható, melyeket alcímek vezessenek be. *Összefoglaló referátumoknál* a szövegtörzs terjedelme ne haladja meg a 30 000 karaktert (szóközzel), *eredeti közleménynél* (klinikai, vagy kísérletes) ne haladja meg a 20 000 karaktert (szóközzel), *esetismertetésnél* ne haladja meg a 10 000 karaktert (szóközzel), *előadási összefoglaló* esetén pedig ne haladja meg a 8000 karaktert (szóközzel).

*Irodalom:* a hivatkozásokat (maximum 50, előadási összefoglalónál maximum 10) a szövegben való megjelenés sorrendjében tüntessék fel. A szövegben a hivatkozást a sorszáma jelöli.

*Hivatkozás címre:* sorrendben: szerzők neve (6 szerző felett et al./és mtsai), cikk címe, folyóirat neve (Index Medicus szerint rövidítve), év; kötetszám:első-utolsó oldal. Példa: 1. Kelly PJ, Eisman JA, Sambrook PN. Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. Osteoporosis Int 1990; 1:56-60. *Hivatkozás könyvfejezetre,* sorrendben: a fejezet szerzői. A fejezet címe. In: szerkesztők (editors). A könyv címe. A kiadás helye, kiadó, megjelenés éve; fejezet első-utolsó oldala. Példa: 2. Delange FM, Ermans AM. Iodide deficiency. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid. 7th ed. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1996; 296-316.

*Ábrajegyzék:* a megjelenés sorrendjében, arab számmal sorszámozva egymás alatt tartalmazza az ábra címét és alatta rövid és lényegre törő ábramagyarázatot

*Táblázatok:* külön-külön lapokon kérjük, címmel ellátva és arab számmal sorszámozva. Törekedjenek arra, hogy a táblázat könnyen áttekinthető legyen, ne tartalmazzon zavaróan sok adatot.

*Ábrák:* külön-külön lapokon kérjük. Csak reprodukálható minőségű ábrákat, fényképek küldését kérjük (min. 300 dpi felbontásban), a korábban megjelölt file formátumokban. A kézirat elfogadása esetén a nyomtatott ábrát kérjük beküldeni a szerkesztőségbe és az ábra hátoldalán puha ceruzával kérjük jelölni a szerző nevét, arab számmal az ábra sorszámát és a vertikális irányát.

A formai hiányossággal beküldött kéziratokat nem tudjuk elfogadni. A gyors lektori és korrektúrafordulók érdekében kérjük a legbiztosabb levelezési, illetve e-mail címet, telefon- és faxszámot megadni. Elfogadás esetén külön levélben kérjük jelezni, hogy a szerzők a közleménnyel egyetértenek (és ezt aláírásukkal igazolják), valamint lemondanak a folyóirat javára a kiadási jogról. Írásbeli engedélyt kérünk mellékelni a már közölt adat/ábra felhasználása, felismerhető személy ábrázolása, szerzőnek nem minősülő személy nevének említése/feltüntetése esetén. A szerkesztőség az általa felkért szakértők személyét titkossággal kezeli. A kézirat tulajdonjoga a megjelenésig a szerzőt illeti meg, a megjelenés napján tulajdonjoga a kiadóra száll. A megjelent kéziratok megőrzésére szerkesztőségünk nem tud vállalkozni.

A kéziratok benyújtását a következő címre várjuk:

Dr. Széld Zsolt szerkesztőségi titkár  
Semmelweis Egyetem, Kardiológiai Központ  
1122 Budapest, Városmajor u. 68  
Tel: (06-1) 458-6810  
E-mail: orvoskepzes@kardio.sote.hu

## A Tanfolyam programja / Tartalom / Contents

2011. ÁPRILIS 18, HÉTFŐ

09:00 – 09:45	<i>Dr. Szabó Antal</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet szabant@gyer1.sote.hu	Speciális feladatok gyermekek laboratóriumi vizsgálatánál <i>Special tasks of pediatric laboratory investigation</i>	251. oldal
09:55 – 10:40	<i>Dr. Vásárhelyi Barna</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet vasbar@gyer1.sote.hu	Mintavételi technikák; preanalitikai megfontolások gyermekkorban <i>Sampling techniques in pediatrics; preanalytical issues</i>	253 oldal
10:45 – 11:30	<i>Dr. Halász Zita</i> Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika halasz@gyer1.sote.hu	Hormonvizsgálatok eredményeinek értékelése a csecsemő- és gyermekkorban <i>Interpreting hormone results in infancy and childhood</i>	254. oldal
11:30 – 12:30 Szünet			
12:30 – 13:15	<i>Dr. Szabó Miklós</i> Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika szabmik@gyer1.sote.hu	Ágymelletti laboratóriumi vizsgálatok (POCT) a neonatológiai osztályokon <i>POCT in neonatal intensive care</i>	256. oldal
13:25 – 14:10	<i>Dr. Takáts Zoltán</i> Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika takats@gyer1.sote.hu	Anyagcsere-betegségek szűrése és diagnosztikája <i>Screening and diagnostics of metabolic diseases</i>	257. oldal
14:15 – 15:00	<i>Dr. Takáts Zoltán</i> Semmelweis Egyetem, I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika takats@gyer1.sote.hu	Tömegspektrometria a klinikai laboratóriumi diagnosztikában <i>Mass spectrometry in laboratory diagnostics</i>	258. oldal

2011. ÁPRILIS 19., KEDD

09:00 – 09:45	<i>Dr. Satori Anna</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) annasatori@bel1.sote.hu	Preanalitika a speciális hemosztázisban <i>Preanalytics in special hemostasis</i>	260. oldal
09:55 – 10:40	<i>Dr. Várnai Katalin</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) varnai@bel1.sote.hu	Feladatok a hemosztázis alapesztek kóros eredménye esetén <i>Tasks in case of abnormal results of haemostatic screening tests</i>	262. oldal
10:45 – 11:30	<i>Dr. Domján Gyula, Dr. Gadó Klára</i> Semmelweis Egyetem, I. Sz. Belgyógyászati Klinika domjany@se-etk.hu	A thromboshajlam vizsgálati algoritmus <b>ANGOL CÍM</b>	263. oldal
11:30 – 12:30 Szünet			
12:30 – 13:15	<i>Dr. Nemes László</i> Országos Haemophilia Központ és Haemostasis Szakrendelés, Honvédkórház – Állami egészségügyi Központ, Budapest lnemes@t-online.hu	A veleszületett vérzékenység vizsgálati algoritmus <i>Evaluation of congenital bleeding disorders</i>	265. oldal
13:25 – 14:10	<i>Dr. Várnai Katalin</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) varnai@bel1.sote.hu	Új speciális hemosztázis tesztek <i>New special tests of hemostasis</i>	267. oldal
14:15 – 15:00	<i>Dr. Prohászka Zoltán</i> Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium prohoz@kut.sote.hu	A komplementrendszer laboratóriumi vizsgálatának indikációi <i>Indications to perform laboratory tests of complement system</i>	269. oldal

**LABORÁTORIUMI MEDICINA KÖTELEZŐ SZINTEN TARTÓ TANFOLYAM / TARTALOM / CONTENTS**
**2011. ÁPRILIS 20., SZERDA**

09:00 – 09:45	<i>Dr. Kocsis Ibolya</i> Semmelweis Egyetem, Labormedicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) kocsis@bel1.sote.hu	Újabb labor diagnosztikai paraméterek szerepe a vesefunkció vizsgálatában <i>Diagnostical role of new biomarkers in monitoring of renal function</i>	271. oldal
09:55 – 10:40	<i>Dr. Hamar Péter</i> Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézet hampet@net.sote.hu	A tápcsatorna betegségeinek laboratóriumi diagnosztikája <i>Laboratory diagnostics of gastrointestinal diseases</i>	272. oldal
10:45 – 11:30	<i>Dr. Patócs Attila</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet patatt@bel2.sote.hu	Neuroendokrin daganatok diagnosztikája <i>Laboratory diagnosis of neuroendocrine tumors</i>	274. oldal
11:30 – 12:30 Szünet			
12:30 – 13:15	<i>Dr. Gergely Péter</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Immunológiai Laboratórium gergely@immun.sote.hu	Autoimmun betegségek laboratóriumi diagnosztikája <i>Laboratory Diagnosis of Autoimmune Diseases</i>	275. oldal
13:25 – 14:10	<i>Dr. Bekő Gabriella</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) bekgab@bel1.sote.hu	Citokinszintmérések <i>Cytokine level measurements</i>	277. oldal
14:15 – 15:00	<i>Dr. Vásárhelyi Barna, Dr. Mészáros Gergő</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet	Áramlási citométerek klinikai alkalmazása <i>Clinical application of flow cytometry</i>	278. oldal
15:15 – 16:00	<i>Dr. Bekő Gabriella</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest) bekgab@bel1.sote.hu	Újabb típusú hematológiai automaták <i>New series of hematology analyzers</i>	279. oldal

**2011. ÁPRILIS 21., CSÜTÖRTÖK**

09:00 – 09:45	<i>Dr. Patócs Attila</i> Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet patatt@bel2.sote.hu	Molekuláris biológiai módszerek I. Mintavétel, PCR technikák, polimorfizmus-detektálás <i>Molecular biological methods I. Sampling, PCR techniques, detection of polymorphisms</i>	281. oldal
09:55 – 10:40	<i>Dr. Tordai Attila</i> OVSZ Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium tordai@kkk.org.hu	Molekuláris biológiai módszerek II. Közvetlen szekvenanciaanalízis, hibridizációs technikák <i>Molecular biological methods II. Direct sequencing, hybridization techniques</i>	283. oldal
10:45 – 11:30	<i>Dr. Tordai Attila</i> OVSZ Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium tordai@kkk.org.hu	Molekuláris diagnosztika örökletes betegségekben <i>Molecular diagnostics of inherited disorders</i>	284. oldal
11:30 – 12:30 Szünet			
12:30 – 13:15	<i>Dr. Andrikovics Hajnalka</i> Országos Vérellátó Szolgálat, Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium andrikovics@kkk.org.hu	Genetikai kockázati tényezők rosszindulatú hematológiai kórképekben <i>Genetic risk factors in hematological malignancies</i>	286. oldal
13:25 – 14:10	<i>Dr. Szőnyi László</i> Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika szolasz@gyer1.sote.hu	Örökítő anyagcsere-betegségek diagnosztikája gyermekkorban <i>Diagnosis of inborn error of metabolism in childhood</i>	287. oldal
14:15 – 15:00	<i>Dr. Inczedy-Farkas Gabriella, Dr. Molnár Mária Judit</i> Semmelweis Egyetem, Molekuláris Neurológiai Klinikai és Kutatási Központ molnarmj@gmail.com	A biobankok <i>Biobanks</i>	289. oldal

## Speciális feladatok gyermekek laboratóriumi vizsgálatánál

*Special tasks of pediatric laboratory investigation*

### Dr. Szabó Antal

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

*Kulcsszavak:* pediátriai laboratórium sajátosságai, referencia tartományok

*Key-words:* peculiarities of laboratory diagnostics in pediatrics, reference ranges

### A címben jelölt továbbképző előadás aktualitása

Magyarországon körülbelül 3 millió gyermek él.

Számos esetben a felnőttektől eltérő betegségekkel, megjelenési formákkal lehet találkozni, azonban az általános kórházi és rendelőintézeti laboratóriumok ritkán felkészültek a sajátos csecsemő- és gyermekgyógyászati igényekre és feladatokra.

Felnőttektől különbözik a folyadékterek megoszlása, mások a referenciatartományok, különösen újszülött- és csecsemőkorban.

### Referenciatartományok kérdése

Első közelítésben, a mintegy 50–70 fféle „általános” laboratóriumi paraméterek harmadában az életkorfüggést nem szükséges külön figyelembe venni, a születést követő 1–2 hét után közel azonos értékűek a felnőttek referenciatartományával. Ilyen, az életkorral nem változó laboratóriumi paraméter a szérumszén-dioxid szint, kloridszint, ozmolalitás, karbamidszint, ammóniaszint, trombocytaszám. A laboratóriumi vizsgálatok másik harmadában az életkorral a laboratóriumi paraméter értéke szignifikánsan nő vagy csökken.

A hematológiai paraméterek esetében szintén dinamikusan változnak a referencia tartományok az életkortól függően.

Több esetben komoly félreértésre ad okot az immunglobulinok értékelése. Gyermekeknél különösen 1–3 év között, a felnőttekhez viszonyítva jelentősen alacsonyabb az immunglobulinok szintje a szérumban: IgA 0,3–1,0 g/l, IgG 4–9 g/l, IgM 0,6–1,8 g/l. A laboratóriumi analizátor, illetve annak programja általában a felnőttkori értékhez hasonlít, így szinte minden kisgyermektől vett minta esetén, a leleten megjelölt referencia tartományhoz képest eltérést észlel az orvos és a szülő. Ezért alaptalanul arra gondolnak, hogy a gyermek immunhiányos és további, felesleges vizsgálatot indikálnak.

### Néhány példa olyan laboratóriumi vizsgálatokra, melyek jelentősége újszülött- és csecsemőkorban kiemelkedő

#### Újszülöttkori icterus vizsgálata

Fiziológiai icterus figyelhető meg az újszülöttek mintegy 50%-ánál a születést követő 48 óraban. Okai: a fetális-hemoglobin-tartalmú vörösvérsejtek csökkent élettartalma, lassabb a máj bilirubin felvétele és kisebb a glükuroniltranszferáz enzimaktivitás. A szérumszén-dioxid koncentráció többnyire 200 µmol/l alatt van és érett újszülötteknél a 10–14. napon normalizálódik (<20 µmol/l). A direkt (konjugált) bilirubin frakció szintje minimális: <10%-a az összes bilirubinszintnek.

#### 1. táblázat

*Példák az életkorral jelentősen változó referencia tartományokra*

PARAMÉTER	ÚJSZÜLÖTT	CSECSEMŐ	GYERMEK	FELNŐTT
<i>Életkorral növekvő laboratóriumi értékek (példák)</i>				
Szérumszén-dioxid szint g/l	45–55	50–70	60–80	60–80
Szérum-albuminszint g/l	30–40	32–45	35–50	35–55
Fibrinogénszint g/l	1,0–3,0	1,5–4,0	2,0–4,5	2,0–4,5
Szérum-koleszterinszint mmol/l	1,5–3,0	2,0–4,0	3,0–5,0	4,0–6,0
Szérum-trigliceridszint mmol/l	0,2–0,6	0,5–1,5	0,6–1,8	1,0–2,0
Vizelet-kreatininürítés mmol/nap	0,16–0,40	0,50–3,0	3,0–5,0	5,0–10,0
Vizelet-adrenalinürítés nmol/nap	1–10	5–22	10–60	15–80
<i>Életkorral csökkenő laboratóriumi értékek (példák)</i>				
Szérum-AP U/l	100–960	100–960	100–960	50–400
Szérum-LDH U/l	200–800	200–600	200–400	150–300
Szérum-ferritinszint mg/l	200–600	50–200	10–140	10–140
Szérum-bilirubinszint µmol/l	5–100	3–20	3–17	3–17
Szérum-káliumszint mmol/l	4,0–6,0	3,8–5,5	3,5–5,5	3,5–5,0
Szérum-foszfátszint mmol/l	1,4–2,9	1,4–2,4	1,2–2,0	1,0–1,2
Szérum-TSH mU/l	0,6–12	0,5–7	0,4–5	0,3–4

A laboratóriumban a szérumbilirubin- és hematokritérték 2–3 csapp vérmintából elvégezhető kapilláris bilirubin mérővel. A klinikusok különböző táblázatokat, formulákat használnak a fototerápia / vércsere indikáció eldöntéséhez.

Amikor a sárgaság a születést követően 15–20 napon át elhúzódó és egyéb tünetek (láz, görcsök, bágyadtság, nagyobb máj, szintelen széklet) is jelentkeznek, a patológiás icterus gyakoribb okainak kizárására – infekció, szepepszis, epeút-atresia, anyagcsere-betegség (galactosaemia, tyrosinaemia, karbamidciklus zavarai, glükóz-6-P-dehidrogenáz-defektus stb.) – kiegészítő laboratóriumi vizsgálatok szükségesek. Kiemelendő a vércukorszint, az ammóniaszint, a májenzimek (GOT, GPT,  $\gamma$ -GT), a vérkép, az akut fázis fehérjék, a TORCH- és a hepatitisz szerológia.

### Vércukor, glükóz vizsgálata

A hypoglykaemia (szérumbilirubin-glükózszint  $<2$  mmol/l) gyakori oka újszülöttnél: anyai diabetes, galactosaemia, aminosav, szervessav-anyagcserezavarok, hormonhiányok (congenitalis glukagonhiány, congenitalis adrenális hyperplasia), Gierke-kór (glukagontárolási betegség). Alapvető a vizelet ketontestek vizsgálata is! Pozitív vizelet ketontesteknél kiegészítő teszt a kortizolszint, a TSH-analízis és az aminosav-vizsgálat. Ha a vizeletben nincs ketontest, hyperinsulinaemia gyanúja merül fel – szükséges az anyában és a csecsemőben az inzulinszint mérése.

Hyperglykaemia és a diabeteses ketoacidosis esetén a gyakori vércukorszint-ellenőrzés mellett nélkülözhetetlen a vér-pH, a szérumelektrolitok és ha lehet, az ozmolalitás mérése az intenzív kezelés folyamán.

### A szérumbilirubin- és sav-bázis háztartás vizsgálata

Erről külön előadás szól.

### Vér-ammóniaszint mérése

Az ammóniaszint az endogén és exogén májkóma (hepatitis, mérgezők, daganatok) igen jó indikátora. 100–150  $\mu$ mol/l koncentráció felett súlyos idegrendszeri tünetek lépnek fel: görcsrohamok, aluszékonyosság, eszméletvesztés. A fulmináns májelégtelenség és a hepatikus encefalopathia kezelésének monitorozásához elengedhetetlen a vér ammóniakoncentrációjának ismételt mérése. Hatféle anyagcserezavar ismert az urea-cikluson belül. A definitív diagnózist gyakran az enzimvizsgálat adja meg májbiopsiás mintából. Néhány szervessav-anyagcserebetegség jelentős ammóniaszint-emel-

kedéssel jár (200–500  $\mu$ mol/l). Ilyen esetekben a sav-bázis státus és a vizelet-szervessavanalízis kiemelt fontosságú.

### Örökletes anyagcsere-betegségek gyanúja esetén elsődleges laboratóriumi vizsgálatok

A klinikai tüneteket a vérben, a sejtekben, a szövetekben, a szervekben felhalmozódó anyagok (ammónia, fenilalanin, galaktóz stb.), sokszor a vizelettel ürülő szubsztrátok (mukopoliszacharidok, cisztein stb.), máskor a végtermék hiánya (tiroxin, tirozin stb.) okozzák. Energiahiány, szintézis-, transzport- és tárolási zavarok jelentkeznek különböző súlyossággal. Neurológiai tünetek (görcsrohamok, ataxia, kóros EEG), szervrendszerek (légzés, keringés, máj, vese) működésének zavara, jellegzetes testváladék, vizelet szag (aceton, jávorfaszörp, káposzta), sápadtság, aluszékonyosság, hányás, a szem, vázrendszer, nemi szervek rendellenességei, bőrelváltozások figyelhetők meg (2. táblázat).

Amikor a klinikai kép, családi anamnézis és elsődleges laboratóriumi vizsgálatok felhívják a figyelmet anyagcsere-betegség fennállására, a következő, egymást megerősítő, vizsgálati stratégiát alkalmazzák:

1. Az enzimblokk előtt felszaporodott anyagok mérése, vagy végtermékhiány elemzése.
  2. Enzimdiagnosztika biopsziás anyagokból.
  3. Génmutációk, DNS vizsgálatok.
- Ezeket külön előadások mutatják be.

### Laboratóriumi vizsgálatok görcstevékenység, kóma esetén

Neurológiai tüneteket számos kórkép (központi idegrendszeri betegségek, sérülés, belgyógyászati kórképek, gyógyszer) okozhat. Az akut ügyeleti ellátás kapcsán sokszor a laboratóriumi vizsgálat alapján lehet a tudatzavar, az eszméletvesztés kiváltó okát azonosítani a 3. táblázatban jelölt séma szerint.

### Alapvizsgálatok gyermekkori mérgezések esetén

Kisdedkorban gyógyszerek, tisztítószer, rovarirtó szerek, mérgező növények, festékek, későbbi életkorban kábítószerek és/vagy alkohol okozhat mérgezést. Az 1‰ alkoholszint 21 mmol/l etilalkohol koncentrációnak felel meg, ez  $\approx 21$  mOsmol/kg-nyi ozmolalításemelkedést okoz a vérplazmában. Speciális, enzimatis mérési elven alapuló laboratóriumi teszt is rendelkezésre áll a véralkoholszint vizsgálatára. Sürgős, általános laboratóriumi feladatok mérgezése esetén:

2. táblázat

Legfontosabb eltérések örökletes anyagcsere-betegségek esetén

ELSŐDLEGES LABORATÓRIUMI LELET	LEHETSÉGES KÓRKÉP
Alacsony szérumbilirubin-glükózszint	Szénhidrát-anyagcsere zavarai, galactosaemia, fruktóztolerancia, glycogenosisok, piruvátanyagcsere-defektusok, tyrosinaemia, karnitinhiány
Metabolikus acidosis	Aminoaciduriák, organikus aciduriák
Emelkedett szérumbilirubinszint és magas GOT-, GPT-értékek	Karbamid-ciklus zavarai, glycogenosisok, fruktóztolerancia, galactosaemia
Magas vér ammóniaszint	Karbamidciklus zavarai, karboxilázdefektusok, karnitindefektus, hyperlysaemia
Thrombocytopenia, anaemia	Organikus aciduria, tyrosinaemia, metilmalonsav-acidaemia
Redukáló összetevők a vizeletben, ketonuria	Oligoszacharidák lebontási zavara, aminoaciduria, nonketotikus hyperglycinaemia
Alacsony szérumbilirubin-nátriumionkoncentráció	Congenitalis adrenal hyperplasia



3. táblázat

A kóma főbb típusaiban végzendő sürgősségi laboratóriumi vizsgálatok

	LEHETSÉGES KÓRKÉPEK	LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK
Fokális neurológiai tünetekkel nem járó kóma	Metabolikus encephalopathia, diabeteses kóma, máj- vagy veseelégtelenség, mérgezés (gyógyszer, kábítószer, alkohol), hypoxia (szívmegeállás, fulladás)	Vércukorszint, szérumelektrolitok, ozmolalítás, sav-bázis elemzés, ammónia-, laktát-, kreatininszint. Amikor nem egyértelmű az ok, toxikológiai vizsgálat is szükséges
Meningitiszindróma	Központi idegrendszeri fertőzés	CSF vizsgálata, vérkép és akut fázis fehérjék elemzése
Focalis tünetekkel járó kórképek	Trauma, stroke, epilepsia	Általában nincs specifikus laboratóriumi eltérés

vérgázanalízis, vérkép és methemoglobinszint, vércukor, szérum ionok, ozmolalítás, pszeudokolinészteráz aktivitás, máj- és vesefunkció vizsgálata, valamint drug gyorsteszt. A későbbi igazságügyi toxikológiai vizsgálatokhoz szakszerű mintatárolás szükséges.

bi igazságügyi toxikológiai vizsgálatokhoz szakszerű mintatárolás szükséges.

## Mintavételi technikák; preanalitikai megfontolások gyermekkorban

*Sampling techniques in pediatrics; preanalytical issues*

### Dr. Vásárhelyi Barna

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

*Kulcsszavak:* vérvétel, fiziológiai változás, preanalitika, kapilláris vérminta

*Key-words:* blood sampling, physiological change, preanalytics, capillary blood sample

Az Egyesült Államokban becslések szerint az egészségügyi ellátás hibájából évente 50–100 ezer haláleset következik be: ez a nyolcadik leggyakoribb halálok. Több az áldozata, mint a közúti vagy egyéb baleseteknek összesen. Az esetek jelentős hányadában ennek hátterében diagnosztikus hibák állnak. A diagnózis felállítása érdekében végzett vizsgálatok 70%-a laboratóriumi teszt. A hibás eredmény gyakorisága a laboratóriumi vizsgálatokon belül 1,5–3 ezrelék. A hibák túlnyomó többsége (egyes felmérések szerint 84%-a) a preanalitikai szakban következik be.

A preanalitikai hibákért számos tényező a felelős, melyek jelentős hányada újszülötteknél/gyermekeknél még kifejezettebben van jelen. (Erre vonatkozóan felmérés nem történt, de valószínűleg nagyobb arányban kell számolni velük, mint felnőtteknél).

Vérminták esetében az eredményt befolyásoló preanalitikai tényezők közül a legfontosabbak:

#### 1. Vizsgált személyek esetében fennálló fiziológiai különbségek / változó körülmények.

- ▶ Számos paraméter egészséges referenciaértéke *életkortól* függ.
- ▶ *Nem* (elsősorban a hormonszintek, illetve a nemi hormonok által szabályozott paraméterek).
- ▶ *Vérvétel megelőző fizikai aktivitás.* Anyagcsere fokozott. Erőteljes fizikai aktivitás esetén szérum káliumszint, CK-érték emelkedik. (Ha a gyermek általános állapota nem rossz, ezzel fokozottan kell számolni.) Húgsav szintje jó. Katekolamin glükagon kortizol növekedési-hormon-szintek emelkednek, inzuliné csökken.
- ▶ *Testhelyzet.* Ülő testhelyzetű betegnél a legtöbb nagy molekula és a sejt komponensek szintje nő; gyógyszerek,

hormonok kötött frakciója is emelkedik. Szabad gyógyszer-szintek nem változnak. Csökkent plazmavolumen esetében kifejezetten nagy a hatás (újszülöttek, gyermekek esetében a vízterek gyors változása, dehidráció miatt számolni kell vele).

- ▶ *Napszak.* Kortizol nappali ingadozása miatt akut fázis fehérjék egy része (proinflammatorikus citokinszintek) fluktuálnak. (A napszaki ritmus kora- és újszülöttek esetében még nem alakul ki.) Napszaki ritmust mutatnak még: csontmarkerek, kálium, vas, TSH, növekedési hormon szintek.
- ▶ *Korábbi étkezés időpontja.* Testtömegtől függő hatás; gyermekeknél nem várható el, hogy éhombra menjenek vérvételre; lehetőleg zsírmentes, nem cukros folyadékot igyanak. Szoptatott csecsemőt próbáljanak teáztatni, egyébként ilyenkor különösen gyakori a lipaemiás savó.
- ▶ *Stressz.* Hormonszintek, fehérvérsejtszám átmeneti emelkedése (kisgyermeknél különösen fontos)
- ▶ *Láz.* Kortizolszint emelkedése, diurnális változás megszűnhet. Átmeneti hypoglykaemia.

#### 2. Vérvételt érintő problémák.

A preanalitikai hibák döntő hányadéért ez a felelős.

Kórházban bentfekvő betegek esetében akár tízszer nagyobb a vérvételt érintő preanalitikai hiba gyakorisága a járóbetegekhez képest; ennek oka, hogy járóbetegektől általában gyakorlottság asszisztens veszi le a mintát.

Leggyakoribb hibák:

- ▶ Hosszú ideig tartó érleszorítás. Egy percnél hosszabb ideig tartó érleszorítás esetén nagymolekulák szintje nő; koleszterin-, kálium-, laktát-, ionizált kalcium- és magnéziumszintek emelkednek, piruvát szintje csökken. (Gyermekek esetében vérvételi nehézségek gyakoribbak a ko-

operáció hiánya és az anatómiai sajátosságok miatt.) Hemolízis is gyakoribb!

- ▶ Infúzióhoz közeli (ill. attól proximalisan) vett vérminták.
- ▶ Nem megfelelő arányban tartalmazza az antikoagulánst a minta (vérvételi nehézségek esetén gyakoribb a vér-rög-képződés).
- ▶ Túlságosan erősen rázzák össze a mintát az adalékanyag-gal; centrifugálási problémák (kis mennyiségeknél különösen nagy a hatás).
- ▶ Hemolizált vérminta. (Probléma: sokszor nincs makroszkópos hemolízis).
- ▶ Interferencia léphet fel az adalékanyag és egyes tesztek esetében (amennyiben nincs elég vérminta és pl. plazmából szeretnének mérni egyébként szérumból mért analitot).
- ▶ Nem a megfelelő sorrendben történik a vérvétel (véna vérminta esetén: vér hemokultúra csövek (ha van anaerob palack is, akkor abba vegyünk előbb); natív cső ; citrátos cső véralvadás vizsgálatához; heparin; EDTA; egyéb adalékanyagot tartalmazó csövek). (A hemokultúra vételénél nagyon kell figyelni a megfelelő és megfelelő ideig tartó bőrfertőtlenítésre.)

### 3. Betegazonosítás

A betegazonosítás elmaradása a felelős a preanalitikai hibák 10–15%-áért.

- ▶ A beteget / hozzátartozót mindig azonosítani kell. Egyes helyeken ennek a tényét is dokumentálják. Gyermekek, újszülöttek esetében hozzátartozót kell megkérdezni.
- ▶ Csöveket jelölni kell; a mikrocsövek / kapillárisok jelölése gondot okozhat.

Kora- és újszülöttek esetében külön problémát jelent, hogy a keringő vérmennyiség kicsi (80 ml/ttkg); emiatt mikromódszereket kell alkalmazni a laboratóriumi vizsgálatok során, illetve, hogy a vénás vérvételre nincs mindig lehetőség. Ezekben az esetekben kapilláris vérminta vételére kerülhet sor, amit sokszor POCT kapcsán elemeznek. (Fontos: bizonyos analitok, pl. glükóz szintje magasabb; kálium, összfehérje, kalcium szintje alacsonyabb a kapilláris vérben).

#### Kapilláris vérvétel

Két típusa: szúrás és metszés. Utóbbira zárt vérvételi rendszereket fejlesztettek ki. Metszés előnyei: fájdalom a szúrásához képest kisebb, gyorsabban nagyobb mennyiségű vér nyerhető, nincs hemolízis. Hátránya a nagyobb invazivitás.

Kapilláris vérvételnél fontos figyelembe venni:

1. Csecsemő / kisgyermek megnyugtatója. A vérvételt megelőzően glükóz / szacharóz oldat itatása vagy a szopótatás nyugtató hatású. A kisgyermek lehetőleg a szülő ölében legyen (ha a szülő is ezt kívánja és alkalmas rá).
2. A kapilláris vérvétel helye csecsemőknél a talp oldala (NEM az ujj vagy a sarok oldala). 1 éves kor felett a középső vagy a gyűrűs ujj (kerülendő: a hüvelyk, a mutató és a kisujj!). Véraláfutásos, ödémás területet kerülni kell. Újszülöttnél a vérvétel során nem szabad az eszközt erősen a bőrre nyomni, mivel súlyos sérülést okozhat (vékonyak a szöveteik).
3. A terület maximum melegítése (különösen magas hematokritértékek esetén hasznos); 38 °C-os vízzel néhány percig. Területet izopropil-alkohollal kell fertőtleníteni; az alkohol károsíthatja csecsemőknél a bőrt. Ha a vérvétel előtt nem szárad fel a fertőtlenítőszer, csipő érzés léphet fel, illetve hemolizálhat a minta.
4. A vérminta vétele során nem szabad masszírozni a szöveteket, mivel szövetközi folyadék kerülhet a mintába (hemolízis léphet fel).
5. A vérvételhez használt testrészt a szív szintje alatt legyen, gyorsabban jön le a vér.
6. Kapilláris vérminta esetén a vérvétel sorrendje: EDTA-t tartalmazó csövek; egyéb adalékanyagot tartalmazó csövek; szérumvizsgálatok. Többnyire 10%-os eltérés a csövön jelzett értékhez képest elfogadható. Alvadásgátolt minták esetében a levett vérmintát 5–10-szer át kell forgatni. Ha bealvadt, ismételni kell az eljárást.
7. A beteg jelenlétében kell jelölni a csöveket (előre felcímkézés kerülendő).
8. Laboratóriumba transzport vagy POCT mérés.
9. A mintaszállítás körülményei és időtartama nagyon fontos.

*Preanalitikai hibák megelőzése érdekében javasolt: vérvételi körülmények standardizálása, eltérések dokumentálása, a vérvételt végző (többnyire nem laboratóriumi) személyzet képzése és a munkafolyamat ellenőrzése.*

## Hormonvizsgálatok eredményeinek értékelése a csecsemő- és gyermekkorban

*Interpreting hormone results in infancy and childhood*

### Dr. Halász Zita

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* hormon, referencia tartomány, szekvenciális mintavétel

*Key-words:* hormone, reference range, sequential hormone measurement

A hormonális diszfunkciók diagnosztizálásának fontos eszköze a szervezet pillanatnyi állapotát tükröző hormonvizsgálatok elvégzése. A napjainkban alkalmazott módszerek érzékenysége nagy,  $10^6$ – $10^{18}$  mol/l.

Legfontosabb módszerek:

- ▶ fehérjekötésen alapuló eljárások

- ▶ kromatográfiai módszerek
- ▶ tömegspektrometriai módszerek
- ▶ molekuláris biológiai módszerek.

A hormonmeghatározások kivitelezésénél fontos a megfelelő mintavételi körülmények biztosítása, mivel ezek befo-

lyásolhatják az eredményt. Általánosan éhomi mintavétel javasolt.

Az alimentáris állapot ismerete különösen fontos pl. az inzulin, C peptid, GH (növekedési hormon) szintek értékelésénél. A folyadék- és sóbevitelt az aldosteron, PRA (plazma-reninaktivitás), renin, ACTH (adrenokortikotrop hormon) eredmények értékelésénél kell figyelembe venni.

A laboratóriumi vizsgálati eredményeket a mintavételkor fennálló stresszreakció jelentősen befolyásolja. Törekedni kell a fizikai és pszichés stressz hatás lehetőség szerinti mérséklésére, különösen ACTH-, TSH- (thyreoidestimuláló hormon), kortizol-, prolaktin-, aldosteron-, vazopresszin-meghatározások során. Sok esetben ismételni kell a méréseket a megfelelő információ érdekében.

A hormonszintek meghatározásra leggyakrabban szérumból vagy plazmából kerül sor. Az újszülöttkori kötelező szűrővizsgálat kapcsán a mintavétel speciális szűrőpapírra történik. A szűrőpapír alkalmas egyes hormonok napszaki profil vizsgálatára is (17OH-progeszteron).

A kortizol szabad frakciójának meghatározása 24 órás gyűjtött vizeletből a hypercortisolismus elfogadott szűrő-módszerévé vált (vizeletvizsgálat esetén fontos a megfelelően hidratált állapot biztosítása és az ürített kreatininre történő korrigálás). Az éjszakai nyálmintából meghatározott kortizolszint a Cushing-szindróma diagnosztikájának könnyű mintavételt biztosító és hasznos módszere. A vizsgálatokat az intraindividuális változások miatt minden esetben ismételt mintából is el kell végezni!

A klinikai tünetek hátterében álló hormonális diszfunkció vizsgálata kapcsán értékelhető információt a szabad hormonszintek meghatározása biztosíthatna. A pajzsmirigyfunkció napjainkban általánosan a TSH, szüksége esetén a szabad tri- és tetrajódthyronin értékek alapján ítéljük meg. (A TSH-szint mérését használjuk a hypothyreosis szűrésére is). A fehérjékötésen alapuló metodikák esetén számolni kell azzal, hogy a meghatározás nem feltétlenül a biológiailag aktív, a klinikai tünetekkel arányos hormontermelést tükrözi, hanem arra a hormontermelésre utal, ami reakcióba lép az immunanalitikán alapuló teszttel (pl. LH, prolaktin), Ugyancsak ellentmondást eredményez az úgynevezett „high-dose-hook” effektus. A mért szérumban annak ellenére, hogy a vizsgált hormon szintje nagyon emelkedett, az eredmény normális vagy csökkent hormonszintre utal. A jelenség oka, hogy a mintában jelen lévő nagy mennyiségű antigén nemcsak az első, hanem a második, a jelet adó antitestet is telíti. A jelenség esetenként magyarázatot adhat a klinikai tünetek és a laboratóriumi eredmény közötti ellentmondásra. Hígított mintából ismételt vizsgálat a jelenség igazolható.

Csecsemő és gyermekkorban a hormonvizsgálatok eredményeinek értékelésénél elsőként kell említeni az életkor és nem szerinti referenciaértékek használatát. A referenciaértékek metodikától is függenek. Vigyázni kell arra, hogy a módszerek metodika leírása kapcsán megadott referenciaértékek sok esetben igen kis esetszámra vonatkoznak csak (pl. újszülöttkori, csecsemőkori normáltartomány megadásánál).

A megszületést követő napokban jelentős változás figyelhető meg szinte valamennyi trophormon és perifériás hormon szekréciója vonatkozásában. Külön körütekintést igényel a koraszülöttek és a gesztációs korukhoz képest kis súllyal és hosszal született gyermekek vizsgálati eredményeinek értékelése. Ezekben az esetekben gyakran észlelhetjük a megszületést követő élettani hormonális változás időbeli eltolódását és a hormonszekréció változását. Jelentős az endokrin rendszer funkciójának változása a pubertás során. Egyes vizsgálati

eredmények értékelésénél a Tanner-stádiumok figyelembevétele is szükséges.

Az endokrin funkciók megítélése céljából a bazális hormonszintek nem mindig biztosítanak megfelelő információt. Jellemző példa a növekedési hormonszekréció megítélése. Egyszeri mintavételből történő GH-szint-meghatározás nem alkalmas a GH-hiány diagnózisának felállítására vagy kizárására. Ezekben az esetekben dinamikus tesztek elvégzése során, úgynevezett szekvenciális minták eredményei alapján kapunk képet az endokrin rendszer funkciók kapacitásáról. Legjellemzőbb példa a növekedési hormon termelés megítélése céljából végzett stimulációs próbák, például argininteszt, l-DOPA-teszt, inzulin hypoglykaemiás teszt, a hypothalamo-hypophysis-gonad tengely aktiválódását jelző GnRH-próba, a mellékvesekéreg szekréciós kapacitását igazoló ACTH-teszt. A 12–24 órán át megfelelő időközökkel (pl. GH esetében 20 percenként) vett mintavétel és hormon meghatározás alkalmas a szekréció pontosabb megítélésére, azonban a technikai nehézség és a módszer költségessége miatt inkább elméleti jelentőségű. Szuppressziós próbák elvégzésére a gyermekendokrinológiában ritkábban kerül sor (hypercortisolismus esetén dexamethason szuppressziós próba).

A hormoneredmények értékelése a beteg állapotának fényében történhet. A kritikus állapotban lévő beteg esetében külön körütekintésre van szükség. Ilyenkor az endokrin rendszert érintő változások a releasing hormonok és a periféria szintjén is megnyilvánulnak. Megváltozik a releasing és trophormon-szekréció jellege (így a pulzatilitás, diurnális ritmus) és mértéke is. Módosul a perifériás hormontermelés mértéke, a kötött és szabad frakciók aránya, a receptorszám, a hormon-receptor kötés és hormon metabolizmus is. A kritikus állapot két fázisában, az akut és krónikus fázisban a hormonális változások különböznek. Az akut fázisra elsősorban a reguláció, adaptáció jellemző (így a stresszhormonok fokozott termelése, a GH-, az ACTH-, a kortizol- és a prolaktinszint emelkedése, relatív GH-rezisztencia, emelkedett TSH-, fT<sub>4</sub>-szint). A krónikus fázis diszregulációs mechanizmusnak tekinthető, melyet a stresszhormon csökkent termelése jellemmez (csökkent GH-, ACTH-, kortizol-, prolaktinszint, a GH-rezisztencia megszűnése, alacsony szérumban TSH-, fT<sub>4</sub>-szint). Az intenzív ellátás kapcsán alkalmazott gyógyszerek az endokrin rendszer vizsgálatát jelentősen korlátozhatják. Általános szempontnak kell tekinteni, hogy az intenzív ellátást igénylő állapotokban elvégzett hormonvizsgálatok a pillanatnyi helyzetet jellemzik, definitív diagnózis felállítására nem alkalmasak. A vizsgálatok ismételt elvégzése egyensúlyi állapotban feltétlenül szükséges!

A szervezet hormonháztartásának vizsgálata kapcsán figyelembe kell venni a hormonok, neuropeptidek, neurotranszmitterek élettani változásait. Pulzatilis jellegű termelés jellemzi az LH- (pubertás stádiumától függően), a prolaktin-, GH-szekréciót. A kortizol-, ACTH-, csontanyagcseremarkerek, 17OH-progeszteron-szint meghatározásánál a diurnális ritmust kell figyelembe venni.

Az alvás és az ébrenléti állapot a prolaktin-, GH-szekréciót módosítja. Aldosteron-, PRA-, renin-, normetanefrin-meghatározás értékelésénél a testhelyás ismerete fontos, a különböző testhelyzetekben végzett mintavételi eredmények a rendszer működésére vonatkozóan további ismerete nyújtanak. Ismeretes a prolaktin, DHEA-S, tesztoszteron termelés szezonális változása is, bár ennek mértéke az eredményeket általában klinikailag releváns mértékben nem befolyásolja.

A hormonháztartás megítélése, az endokrin rendszer vizsgálata kapcsán nyert laboratóriumi eredmények értékelése fokozott körültekintést és mérlegelést kíván a klinikus részéről. Az eredményt közlő leleteken megadott értékelés csak tájékoztató jellegű és erre a tényre a szülő figyelmét is fontos felhívni. A téves diagnózisok elkerülése érdekében elenged-

hetetlenül fontos a beteg alapos vizsgálata, valamennyi klinikai körülmény (társbetegségek, gyógyszerelés, képalkotó vizsgálatok stb.) figyelembe vétele, és nem utolsó sorban a beteg kezelését végző orvos és a laboratóriumi meghatározással foglalkozó szakemberek szoros együttműködése.

## Ágyemelletti laboratóriumi vizsgálatok (POCT) a neonatológiai osztályokon

*POCT in neonatal intensive care*

**Dr. Szabó Miklós**

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* POCT, koraszülött, preanalitikai hiba

*Key-words:* POCT, preterm infant, preanalytical errors

A magyarországi gyermekgyógyászati gyakorlatban tradíciója van a POCT-vizsgálatoknak.

A gyermekosztályokon korábban jellemzően elterjedt volt az ún. „kislabor”, amelyben a klinikus gyermekgyógyász saját kezűleg végzett kvalitatív vérkép, vizelet üledék vagy liquor vizsgálatot. A neonatológiai intenzív ellátás az a klinikai szakterület, ahol talán a legerősebb motiváció jelenik meg az ágy melletti laboratóriumi „POCT”-vizsgálatok iránt. A klinikai probléma – diagnózis – laboratóriumi vizsgálat – vizsgálati eredmény – terápiás döntéshozatal folyamat lerövidítésén túl a neonatológiában különös hangsúly esik a vizsgálatokhoz szükséges vérminta minimalizálására, amely igényt a mikrometodikát alkalmazó POCT-rendszerek többsége általában jó közelítéssel teljesíti. A mintamennyiség redukciója azért is különösen fontos, mert szoros egyenes arányosság áll fenn egy kis súlyú koraszülött transzfúziós igénye és a laboratóriumi vizsgálatok céljára levett vérmennyiség között. Jelenleg a POCT-vizsgálatok iránti lelkesedés annak ellenére növekvőben van a neonatológiai intenzív osztályokon (NIC), hogy a betegellátó személyzetnek újabb és újabb vizsgálati műszerek használatát kell begyakorolnia. Ugyanakkor a vizsgálatok ellenőrzöttsége, az eredmények validálása, dokumentációja továbbra sem megoldott.

A neonatológiai osztályokon leggyakoribb vérvizsgálatok a vércukorszint-, a szérum- (vér-) bilirubin-, vérgázok, vitális ionok, laktát-, Htk- vagy Hgb-meghatározás. Egyes neonatológiai osztályokon ma már elérhető egyes gyulladássos fehérjék POCT-rendszerben történő kimutatása, mint a CRP, IL6 vagy prokalcitonin.

A vércukorszint kóros ingadozása az egyik legjelentősebb neonatológiai morbiditási tényező, amely maradandó idegrendszeri károsodást okozhat. A vércukorszint gyakori és precíz meghatározása ezért elengedhetetlen a neonatológiai osztályokon. A neonatológiában a vércukorszint meghatározását nehezíti, hogy változó, olykor nagyon magas a hematokrit értéke és a normoglykaemia határai szűkeek, az alacsony vércukortartományban történő mérés pontossága iránti igény magas. A különböző gyártmányú POCT-eszközök változóképpen teljesítenek a NIC kívánalmak közepet-

te. A napi rutin vizsgálatokra való alkalmazás bevezetése előtt a referencialaborban mért értékekkel történő egybevetés „bevizsgálás”, a limitációk feltárása feltétlenül szükséges.

Az összbilirubin-meghatározás a vércukorszintméréshez képest valamivel ritkábban, kisebb sürgősséggel és kisebb vitális jelentőséggel történik NIC-osztályokon, ugyanakkor egészséges újszülöttek körében nagy számban van szükség a vizsgálatra. Egyre gyakoribb a vérgáz analízatorokba integrált bilirubin meghatározási opció. A bilirubin POCT-eszközök precizitása sok kívánni valót hagy maga után. A meghatározást befolyásolja az épen alkalmazott fototerápia. Éppen ezért a komolyabb klinikai döntéseket (pl. vércserekezelés) kizárólag referencialaboratóriumban történt vizsgálatokra lehet csak alapozni.

A vérgázvizsgálatok tradicionálisan és kizárólag POCT-rendszerben történnek. A vérgázvizsgálatokkal kapcsolatban a preanalitikai hibák eliminálása rendszeres továbbképzést tesz szükségessé. Ezek kapilláris minta esetén a mintavétel és a mintabehelyezés során a gázbuborék szennyeződés, és a vérérvadék kontamináció elkerülése. Artériás vagy vénás mintavétel esetén az infúziós vagy flush oldattal történő keveredés a leggyakoribb hiba.

Vérgáz-meghatározáshoz kapcsoltnak leggyakrabban a Na-, K-, Ca-ionok szintjét mérik. Újszülöttek esetében a leggyakrabban előforduló probléma a kifejezetten alacsony Na- és magas K-szintek mérése. A preanalitikai hibák szerepe rendkívül nagy, elsősorban a kapillárisminták esetén. A jellemző preanalitikai probléma a rossz perifériás keringés, a végtag, előmelegítésének elmaradása, préselése a mintavétel során.

Az elmúlt évtizedben a POCT-meghatározások bővülő lehetősége miatt a laboratóriumi vizsgálatok száma és a költségek folyamatosan nőtt a közelmúltig. Mivel azonban egyre szélesebb körben ismerik fel, hogy a (diagnosztikus célú) vérvétel miatt bekövetkező) vérvesztés, a mintavétellel járó stressz, valamint a nozokomiális fertőzés kockázat csökkentése rendkívül fontos, napjainkban törekednek arra, hogy a POCT-vizsgálatokat racionálisan és megfelelő indikáció alapján végezzék.

## Anyagcsere-betegségek szűrése és diagnosztikája

*Screening and diagnostics of metabolic diseases*

**Dr. Takáts Zoltán**

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* .....

*Key-words:* inborn errors of metabolism, population screening, mass spectrometry, targeted diagnostics

A tandem tömegspektrometriát az anyagcsere-betegségek diagnosztikájában mintegy 20 éve alkalmazzák, aminosavak és acilkarnitinek kimutatására szárított vércsepp (DBS) mintából. A módszer technikai előnyei, a jó automatizálhatóság, illetve, hogy a vérben előforduló különböző metabolitok egyidejű detektálására ad lehetőséget, miáltal az anyagcsere-rendellenességek párhuzamosan, egyszerűen és gyorsan kimutathatók. A technológia a megjelenése forradalmasította a szűrési eljárást, megnőtt a diagnosztizálható betegségek száma (mintegy 30–40 betegség kimutatható a módszerrel). Világszerte létesültek szűrést végző laborok és számos újszülött életét menti meg az újszülött kori anyagcsere-betegségek szűrése.

Az újszülöttkori anyagcsere-betegségek vizsgálata során több tömegspektrometriásan vizsgálható vegyületcsoportot különíthetünk el: acilkarnitineket, aminosavakat, szénhidrátokat, szerves savakat, zsírsavakat, szteroidokat.

Az első két csoport vegyületeinek rutinszerű analizisében ma a tandem tömegspektrometriát alkalmazzák. Az acilkarnitinek és aminosavak kimutatása DBS mintából történik. A mintaelőkészítés első lépése a szárított vércsepp extrakciója, melyhez szerves oldószert alkalmaznak, elkerülve így a fehérjék és sók beoldódását a vizsgálandó mintába, melyek zavarják a tömegspektrometriás mérési folyamatot. A szerves oldószert tartalmazza a stabil izotópjelzett acilkarnitin, illetve aminosav vegyületeket, melyek belső standardként szolgálnak a vizsgálandó metabolitok kvantitatív meghatározásához. A szerves extraktumhoz ezután származékképző reagenst adnak, sósavas butanolt, melynek segítségével a vegyületekből butil-észter-származékokat képeznek. A származékképzés szerepe a tömegspektrometriás kimutatás érzékenységének és specifikusságának növelése. A mintaelőkészítés utolsó lépése az oldószercsere, melynek során a vizsgálandó mintát olyan oldószertben veszik fel, amely megfelelő az elektropray ionizáció megvalósításához.

A tömegspektrometriás analízis a legtöbb szűrést végző laboratóriumban úgynevezett *triple quadrupol típusú tömegspektrométerrel* valósul meg. Ebben a készüléktípusban a mintát alkotó összes metabolit egyidejű fragmentációja (collision induced dissociation – CID) és a molekulaszpecifikus fragmensek detektálása ideálisan megvalósítható. A stabil izotópjelzett belső standard vegyületek segítségével pedig a metabolitok lényegében szemikvantitatív meghatározása történik. A mért koncentráció érték segítségével megbízható, de előzetes diagnózis felállítására nyílik lehetőség. Amennyiben egy minta pozitív eredményt ad a tandem szűrés során, további vizsgálatok szükségesek a végső diagnózishoz.

Az aminosavak meghatározása tandem tömegspektrometriásan úgynevezett *neutral loss detektálási technikával* történik, melynek során az alfa-aminosavak fragmentációjakor keletkező 102 molekulatömegű semleges butil-formiát vesztés intenzitását mérik. A cisztein és homocisztein kivéte-

lével az összes aminosav meghatározása megvalósítható ezzel az eljárással. Azoknak a betegségeknek a jelentős részében, melyeket a cisztein, illetve homocisztein koncentrációjának rendellenes értéke jellemez, egyéb, ilyen módon mérhető vegyület szintje is megváltozik. Például a jávorfaszörp-betegség vagy a homocystinuria kimutatható a metionin megnövekedett koncentráció értékének segítségével is.

Az acilkarnitinek meghatározása párhuzamosan, ugyanabból a mintából történik, mint az aminosavaké, azonban eltérő detektálási technikával. Az acilkarnitinek esetén az úgynevezett prekursor-ion scan technikát alkalmazzák, mivel a fragmentáció során az összes különböző oldalláncot tartalmazó acilkarnitin ugyanazt az egyszerűen töltött, 85 molekulatömegű iont adja.

*Tandem tömegspektrometriás* vizsgálattal történik a szukcinilaceton nevű vegyület meghatározása is (laboratóriumtól függően minden mintából vagy csak a pozitív mintákból, másodlagos tesztként). Ennek a metabolitnak I-es típusú thyrosinaemia esetén nő meg a koncentrációja a vérben. A galaktóz-1-foszfát és a konjugált epesavak meghatározásához is különböző *ESI-MS/MS módszereket* alkalmaznak, melyeket másodlagos (second-tier) tesztként végeznek a laboratóriumokban.

A szerves savak anyagcserejének a zavarát vagy más néven organikus acidaemiákat mitokondriális enzimek defektusai okozzák, melyek az elágazó láncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin) katabolizmusáért és mitokondriális zsírsavak oxidációjáért felelősek. Az organikus acidaemiák közé több mint 20 betegség tartozik, melyek esetében különböző típusú acil-koenzim-A-észterek halmozódnak fel a mitokondriumban. Ezekben a rendellenességekben kulcsszerepet játszik az L-karnitin, amely lebontja a toxikus hatású acil-koenzim-A-észtereket, így acil-karnitin-észterek képződnek, felszabadul a koenzim-A és visszaáll a mitokondriális homeosztázis. Ez a folyamat tehát az acilkarnitinek keringésbeli koncentrációjának növekedését, illetve a vizeletbe történő nagyobb mennyiségű kiválasztódását és a karnitin másodlagos hiányát okozza. Tehát a szabad karnitin és a különböző acilkarnitinek koncentrációjának meghatározása akár plazmából, szárított vércsepp mintából vagy vizeletből, közvetlenül ugyan, de specifikus és hatékony módszer az organikus acidaemiák kimutatására.

A rutin szűrővizsgálat vagyis a tandem tömegspektrometria mellett fontos szerepet töltenek be a kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszerek is az anyagcsere-betegségek diagnosztikájában: a gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS, illetve GC-MS/MS) és a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia tömegspektrometria (HPLC-MS, illetve HPLC-MS/MS). Rendkívül összetett és viszonylag kis tömegű molekulákat tartalmazó minták esetén, mint amilyen például egy vérminta is, a mai napig a GC-MS módszer az ideális analitikai eszköz. A szerves sav, zsírsav és

szteroidprofil meghatározása vizelet-, szérums- vagy liquor-mintákból GC-MS módszerrel történik a szűrőlaborokban. Ezt a vizsgálatot azonban csak akkor végzik el, ha a tandem szűrés eredménye valamilyen rendellenességre utal. A módszer hátránya ugyanis, hogy a megfelelő szelektivitás, szeparáció érdekében egy minta analízise nagyjából 30 percig tart, ellentétben a tandem vizsgálattal, amely 1–2 percet vesz igénybe. Ráadásul a mintaelőkészítés során szintén szükséges származékképzés (általában trialkilszililezés) alkalmazása, hogy a vizsgálandó vegyületek illékonyasága megfelelő legyen az analízishez. A módszer alkalmazásával azonban több mint 200 metabolit párhuzamos, kvantitatív meghatározására van lehetőség.

A HPLC-MS és a HPLC-MS/MS technika alkalmazási köre fokozatosan növekszik az anyagcsere-betegségek diagnosztikájában, noha a módszer szelektivitása még mindig nem tudta elérni a GC-MS által nyújtott szintet. Azonban a

technika alkalmazása az analízisidő jelentős csökkenését jelenti a legtöbb esetben a GC-MS-hez képest, valamint lehetőséget nyújt kevésbé illékony vegyületek analízisére is. A technika alkalmazási területe ma tipikusan a pontos, megbízható kvantitatív meghatározás, melyet másodlagos vizsgálatként végeznek el különböző vegyületekre, a pozitív minták esetében. Ilyen típusú mérések az aminosav-kromatográfia, az acilkarnitin-kromatográfia, a cisztein és homocisztein meghatározása szérums-, vizelet- vagy liquor-mintából, illetve az enzim-assay módszerek. Ezek lényege, hogy a fehérjéhez kötődni képes szubsztráttal való inkubálás után a szubsztrát vagy a termék visszamérése történik HPLC-MS módszerrel. Az anyagcsere-betegségek diagnosztikájában alkalmazott enzim-assay módszerek között szerepelnek például a különböző zsírsav oxidációs zavarokat okozó enzimek, a biotindáz, a gamma-glutamil-transzpeptidáz (GGT), valamint galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz vizsgálatai.

## Tömegspektrometria a klinikai laboratóriumi diagnosztikában

*Mass spectrometry in laboratory diagnostics*

**Dr. Takáts Zoltán**

Semmelweis Egyetem, I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* tömegspektrométer, kromatográfia, terápiás gyógyszer-szint-monitorozás, szteroid hormonok, proteomika  
*Key-words:* mass spectrometry, chromatography, therapeutic drug monitoring, steroid hormones, proteomics

A tömegspektrometria olyan analitikai módszer, mellyel ionokat lehet elválasztása és detektálása valósítható meg  $m/z$ , azaz molekulatömeg/töltés alapján. Ehhez az eljárásához gázfázisú ionok létrehozására van szükség. Mivel a vizsgálandó anyagok leggyakrabban kondenzált formában fordulnak elő, ezért a tömegspektrometriás analízis első lépése a gázfázisú ionok előállítás. Ez a folyamat az úgynevezett ionizáció, mely tipikusan proton vagy elektron addíciójával vagy absztrakciójával valósul meg.

Kis molekulák esetében a  $z$  értéke általában 1, nagyobb molekulák esetében többszörösen töltött ionok is előfordulnak. Az ionizáció során létrejött ionpopulációt a tömeganalízis során választjuk szét. A tömeganalízis célja, hogy a detektort egy időpillanatban csak egy bizonyos  $m/z$  értékkel bíró ion érje el. A tömegspektrumot ilyen módon általában időfüggvényében vesszük fel, periodikusan. A periódus idő az úgynevezett scan time. Sok ionizációs módszer esetében a molekulákból csak egyféle molekulaion keletkezik. Mivel számos különböző vegyületnek lehet ugyanaz a molekulatömege, ezért a molekulaion detektálása nem elég szelektív. Ezen olyan módon lehet segíteni, hogy a molekulaiont semleges gázmolekulákkal történő ütköztetés során fragmentáljuk (tandem tömegspektrometria). A fragmens ionok  $m/z$  értékei és eloszlásuk szerkezeti információt hordoz, így egy adott molekulaionból keletkező adott fragmens monitorálása már megfelelően szelektív detektálást biztosít. Ismeretlen molekulák esetén a tandem tömegspektrum felhasználható a molekula szerkezetének felderítésére is.

A tömegspektrometriát alapvetően szerkezetkutatásra és analitikára használjuk. Az első esetben egy ismeretlen szerkezetű molekula szerkezetének a felderítése a feladat. Ehhez általában nem elégséges a tömegspektrometria használata,

hanem szükséges egyéb spektroszkópiai módszerek alkalmazása is (NMR, IR). Fontos megjegyezni ennél az alkalmazásnál, hogy az ionok pontos tömegéből egyértelműen lehet az összegképletükre következtetni, így a nagy felbontású tömegspektrometria kiváltja az elemanalízist. A tömegspektrometria különösen alkalmas analitikai meghatározásokra, ugyanis a kapott jel arányos a készülékbe bevitt anyagmennyiséggel, valamint a módszer érzékenysége nagyságrendekkel meghaladja egyéb spektroszkópiai módszerek érzékenységét. Bár tömegspektrometriásan lényegében bármilyen molekuláris szerkezetű anyag vizsgálható, a készülék ionforrásába csak megfelelően előkészített mintát tudunk beereszteni, így a mintaelőkészítés az egyik legkritikusabb része a tömegspektrometrián alapuló analitikai sémáknak. A tömegspektrometria szempontjából előkészítésnek számít minden folyamat az extrakciótól az oldószercserén át a kromatográfias vagy elektroforetikus módszerekig.

A tömegspektrometriás módszereket az ionizáció típusa szerint oszthatjuk három nagy csoportra: a hagyományos (elektronütközéses ionizáció, illetve kémiai ionizáció), a deszorpciós, illetve a spray ionizációs módszerekre. A hagyományos módszerek esetében az elpárologtatás megelőzi az ionizációt, azaz a módszerek csak gázfázisban levő molekulák ionizációjára alkalmasak. Ezek a módszerek ideálisak tehát gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS) csatlós esetében.

A GC-MS alkalmazási területe ma már viszonylag szűk, a módszer időigényessége miatt fokozatosan átveszi a helyét a HPLC-MS technika. Néhány vegyületcsoport esetén azonban még ma is jellemző a GC-MS használata, például egyes szteroidoknál, lipid jellegű komponenseknél. A doppinganalitika máig is elterjedten alkalmazott eszköze.

A *deszorpciós ionizációs technikák* lényege, hogy a vizsgálandó molekulákat valamilyen analitikai nyaláb (lézer, ion, atom) segítségével kiszakítjuk a kondenzált felületről. A folyamat során egy lépésben történik a molekulák ionizációja és gázfázisba vitele. Így tehát elkerülhető a minták gáz- vagy folyadékfázisba vitele, és ilyen módon a keresztszennyeződés is, mivel a minták nem haladnak át ugyanazon a térrészen. A deszorpciós technikák tehát kiválóan alkalmasak nagy sebességű analitikai meghatározásokra, mivel a keresztszennyeződés kiküszöbölése által megszűnik a várakozási idő, míg az előző minta kiürül a rendszerből.

A *MALDI (mátrixszal segített lézer-deszorpciós ionizáció)* a legelterjedtebben alkalmazott deszorpciós ionizációs technika. A mintákat ebben az esetben elkeverjük az úgynevezett mátrix oldatával, és ezt a keveréket szárítjuk a felületre. A felületet ezután lézer-deszorpciós eljárással vizsgáljuk. A technika megvalósítható atmoszférikus nyomáson is és vákuumban is. Előnyei közé tartozik a gyorsaság, automatizálhatóság, valamint az, hogy az analízisnek nincs felső tömeghatára. Hátránya, hogy egyszeresen töltött ionokat eredményez, amelyek nem adnak minden esetben megfelelő MS/MS spektrumot. A módszert elsősorban a bottom-up proteomikában alkalmazzák, de intakt fehérjék vizsgálatában is egyre elterjedtebben használt technika.

A spray ionizációs módszerek esetében a folyadék halmozállapotú mintában oldott analit-molekulákat ionizáljuk egy lépésben. Két fő formája van, az elektro-spray (ESI) és az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI). Az elektro-spray alkalmas minden olyan speciesz ionizálására, amely oldatfázisban legalábbis részlegesen ionokat képez. Tipikus példák az aminok pozitív ion módban és a karbonsavak negatív ion módban. Ionosan disszociáló csoportot nem tartalmazó molekulák is ionizálhatóak esetenként, amennyiben pl. stabil fémion komplexet képeznek. Ilyenek pl. a szénhidrátok alkálifémion komplexei. Ionosan nem disszociáló vegyületeket *APCI ionizációval tudunk ionizálni*, azonban ennek előfeltétele valamilyen szintű termikus stabilitás. APCI-ban az amiodoktól az aromás szénhidrogénekig sok különböző típusú molekula ionizálható. Ezt a két módszert (ESI és APCI) alkalmazzák HPLC-MS csatolásnál. A gyakran használt módszerek mellett számos kevésbé használt, egzotikus ionizációs módszer is létezik.

A *HPLC-MS* módszert széles körben alkalmazzák a klinikai kémiában, általában kis molekulák (MW < 5 kDa) meghatározására. A kimutatási módszerek kidolgozásában a minta-előkészítés megtervezése fontos szerepet játszik. A minta-előkészítés célja tehát, hogy megszabaduljunk azoktól a komponensektől, amelyek zavarják az analitikai meghatározást, illetve hogy az analitmolekula átkerüljön olyan oldószerrendszerbe, amely injektálható a HPLC-re. A legfontosabb zavaró tényezők a fehérjék és a lipidek. A fehérjék ugyanis kicsapódnak az oszlopon és eltömítik, továbbá mind ESI, mind APCI esetén zavarják az ionizációs folyamatot. A lipidek irreverzibilisen kötődnek a leggyakrabban alkalmazott C18-as HPLC állófázison, megváltoztatva így az elválasztási folyamatot. A leggyakrabban alkalmazott mintatisztítási eljárások a kicsapás (fehérjék eltávolítására), a szilárd fázisú extrakció, illetve a folyadék (vagy oldószeres) extrakció.

A HPLC-MS egyik legfontosabb alkalmazási területe a gyógyszeranalitika, ezen belül is két területet különíthetünk el, az *ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion)*, illetve a *terápiás gyógyszer szint meghatározásokat (therapeutic drug monitoring)*. Mindkét esetben a hatóanyag kvantitatív meghatározására van szükség, melyben

kulcsszerepet kap a kalibrációs folyamat. Általában az analitikai módszerek esetében két különböző típusú kalibrációt lehet végezni a kvantitatív meghatározásokhoz. Külső kalibrációnak nevezik, amikor hígítási sort készítenek a mérendő komponensből az eredeti mátrixban, majd a mintákkal azonos minta-előkészítés után végzik a méréseket. A másik kalibrációs módszer a belső standard alkalmazása. A belső standard a mérendő molekulához kémiaiilag hasonló vegyület, ideálisan stabil izotóp (<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N stb.) jelzett originális vegyület, melyet ismert mennyiségben adunk hozzá a mérendő mintához. Kvantitatív meghatározás esetén mindkét módszer alkalmazása szükséges, tehát minden esetben el kell végezni a külső kalibrációt, valamint a belső standard vegyületet a minta-előkészítés során hozzá kell adni a vizsgálandó anyag oldatához. A gyógyszer-molekulák mennyiségi meghatározása HPLC-MS módszerrel történhet szérum, teljes vér, vizelet, illetve liquor mintából is. Különösen fontos ennek az érzékeny és megbízható kimutatási módszernek az alkalmazása olyan gyógyszer-molekuláknál, ahol a toxikus és a hatékony dózis közel van egymáshoz. Mivel számos gyógyszer-molekula toxikus már a terápiás tartományban is, ezért cél a dózis minimalizálása. Ehhez szükséges tudni, hogy az egyén esetében adott dózis milyen plazmaszintet eredményez, így optimalizálható a dózis.

Izolált, ismeretlen fehérjék azonosítására napjainkban szinte kizárólag tömegspektrometriás technikákat használnak. Bár az intakt fehérjemolekulák közvetlen tömegspektrometriás vizsgálata már megoldott, a rutinszerű módszerek általában tripszinnel emésztett fehérjék vizsgálatán alapulnak. A tripszines emésztés során ugyanis olyan peptidek keletkeznek, amelyek mindegyike tartalmaz legalább egy könnyen ionizálható csoportot, így a triptikus peptidek vizsgálatával elméletben csaknem teljes szekvenciafedettség érhető el. A triptikus fragmensek aminosav-sorrendje MS/MS módban felderíthető, így akár a fehérjék teljes szekvencia analízise is elvégezhető. Az intakt fehérje tömegspektrometria információt ad a fehérje molekulatömegéről, valamint elektro-spray ionizációt használva, a megjelenő többszörösen töltött ionok eloszlásából lehet következtetni a fehérje térszerkezetére.

Proteomikai alkalmazások esetében két alapvető megközelítés létezik. Az úgynevezett bottom-up megközelítés esetében a fehérjét tripszinnel emésztjük, majd a triptikus emésztményt vizsgáljuk tömegspektrometrián. A módszer általában tartalmaz valamilyen elválasztástechnikát is, az emésztést megelőzően vagy az követően. Hagyományosan a 2D elektroforézissel elválasztott fehérjéket extraháljuk ki a gélből, emésztjük, és peptideket vizsgáljuk MALDI (esetleg ESI) MS-sel. A közelmúltban azonban megjelentek olyan módszerek is, amelyeknél egy fehérjeelegyet emésztünk, majd az így keletkező triptikus fragmenselegyet választjuk el 2D HPLC-vel és a peptideket nanoelektrospray-MS/MS módszerrel azonosítjuk. Az úgynevezett top-down megközelítés esetében az izolált fehérjét intakt állapotban ionizáljuk, majd a sokszorosan töltött fehérjeionokat fragmentáljuk elektronbefogásos, elektrontranszfer vagy egyéb disszociációs módszerrel, és a keletkező fragmensekből következtetünk a fehérje aminosav-szekvenciájára.

Az úgynevezett enzim-assay módszerek olyan speciális fehérjevizsgálati módszerek, melyekkel a fehérjék funkcionális elemzése végezhető el, ezt leggyakrabban enzimek esetében alkalmazzák. A fehérjéhez kötődni képes szubsztráttal való inkubálás után a szubsztrát vagy a termék visszamérése történik HPLC-MS módszerrel.

## Preanalitika a speciális hemosztázisban

*Preanalytics in special hemostasis*

**Dr. Sántori Anna**

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

*Kulcsszavak:* centrifugálás, citrát, mintagyűjtés, mintaszállítás, mintatárolás

*Key-words:* centrifugation, citrate, sample collection, sample storage, sample transport

A hemosztázis diagnosztikájában általában plazmát használunk. Ez alól kivételt képez az antifoszfolipid antitestek vizsgálata (szérum) és a genetikai vizsgálatok, PFA-100 (teljes vér).

A mintavétel ennek megfelelően különböző csőtípusokba történik: citrátos (világoskék kupakos cső); EDTA-s (lila kupakos cső); natív (piros kupakos cső).

A véralvadás vizsgálatára használt mintavételi csövek antikoagulánsként 3,2%-os Na-citrát-oldatot tartalmaznak. Egyéb véralvadásgátló nem elfogadható. A citrátos vérmintából centrifugálás által jutunk citrátos plazmához.

- ▶ *Thrombocytadús plazma (PRP):* (Plt >10 G/l): 37 °C-on 800 rpm, 5 perc centrifugálással nyerjük, thrombocytafunkciós mérésekhez használjuk.
- ▶ *Thrombocytaszegény plazma (PPP):* (Plt <10 G/l): szobahőmérsékleten 3000 rpm, 10–15 perc centrifugálással kapjuk, a rutin hemosztázisvizsgálatokhoz ezt használjuk.
- ▶ *Thrombocytamentes plazma (PFP):* 4000 rpm, 20–30 perc centrifugálással nyerjük, és a PPP-hez hasonlóan használhatjuk. Különösen alkalmas olyan tesztekhez, ahol a vérlemezkék zavarhatják a meghatározást (thrombocytafaktorok, heparinmonitorozás, LA, egyéb antifoszfolipid antitestek, fibrinolízis elemei). Felhasználásig fagyaszta tárolandó.

### A beteg előkészítése a vizsgálathoz

Thrombophylia kivizsgálásakor a vérvételt megelőzően az esetleges kumarin terápiát fel kell függeszteni, és ha az antikoagulálás nem hagyható el, a beteget alacsony molekula-tömegű heparinra át kell állítani. Ennek az az oka, hogy a kumarin a K-vitamin-függő protein-S és -C aktivitás megítélhetőségét zavarja.

Vérvételi vizsgálatokhoz történő vérvétel előtt könnyű, alacsony kalóriatartalmú reggeli fogyasztható, valamint a beteg igyon bőven folyadékot. Annak érdekében, hogy összehasonlítható eredményeket kapjunk, a vérmintákat adott beteg-től mindig ugyanabban a testhelyzetben vegyük le. (Egészséges egyéneknél egyes értékek akár 20%-kal alacsonyabbak fekvő helyzetben, mint függőlegesben, ödémásokban ez az arány még nagyobb lehet).

### Vérvételi technika

*Vérvétel helye:* valamely perifériás véna, többnyire a vena cubitalis.

Nem megengedett a vérvétel heparinnal átmosott állandó kanülből. Ilyen esetben a mintavétel a másik kar vénájából történjen, vagy a kanül fiziológiás sóval történő átmosását és az első 5 ml vér leengedését követően.

*Kompresszió:* vérvétel során ne tartson tovább 1 percnél, és csak az éppen szükséges erejű legyen. A túl sokáig/túl nagy

erővel történő véna okklúzió a fibrinolízis lokális aktivációjához, megnövekedett faktorkoncentrációkhoz/-aktivitáshoz vezet. 3 percnél tovább tartó leszorítás esetén a PI, APTI és TI megrövidül, míg az AT, fibrinogén-szint kb. 10%-kal növekszik.

*Vérvétel sorrendje:* a véralvadásra szánt vérminta soha ne közvetlenül a szűrés utáni első minta legyen. Abban az esetben, ha csak koagulációs tesztek végzésére van szükség, a citrátos minta előtt EDTA-s vér vétele történjen, ugyanis a szűrés után nyert első mintában levő szöveti trombolasztin téves eredményeket okozhat. Bármely (indokolatlanul) kóros eredmény esetén, új mintavétel javasolt és a vizsgálatot meg kell ismételni.

Fontos, hogy a vér zavartalanul (örvénylést okozó megtérés nélkül), rövid idő alatt a mintavételi csőbe jusson. Túl gyors áramlás esetén a thrombocyták/vörösvértestek károsodhatnak. Túl lassú áramlás esetén pedig a vérminta alvadása beindul, akár látható formában alvadékképződéssel, akár láthatatlanul, az alvadási faktorok aktivációjával. Figyelni kell, hogy elegendő vér kerüljön a csőbe (jel!), a helyes citrát:vér arány (1:10) elérése érdekében. Ha a vérmennyiség kevesebb a szükségesnél, a plazma magas citrát-koncentrációja megnyúlt alvadási időket (főként APTI) okoz. A jelenleg használatos vákuumos csövekben a vákuum biztosítja a megfelelő citrát:vér arány elérését. (*Megjegyzés:* a fenti aránytól kb. 10%-os eltérés még elfogadható.)

*Összefogatás:* a minta levétele után a csövet azonnal, legalább négyszer, lassú és könnyed mozdulattal forgassuk össze. Rázogatás kerülendő, mert hemolízishez és/vagy thrombocytaktívációhoz vezethet, ezzel téves eredményeket okozva. Ha túl későn vagy nem eléggé forgatjuk össze a mintát, alvadékképződés indulhat meg.

### Mintakezelés

Az általános laboratóriumi szabályok (csövek jelölése a beteg jelenlétében, mintavételkor, legalább két különböző azonosítóval) betartása mellett a minták gondos ellenőrzése a további feldolgozás előtt rendkívül fontos ahhoz, hogy a durva hibákat kiküszöböljük. Melyek lehetnek ezek a hibák?

*Nem megfelelő vérvételi cső:* Na-citrát oldat helyett másféle antikoagulánst (pl. EDTA, heparin) tartalmaz.

*Nem megfelelő citrát:vér arány:* a szükségesnél kevesebb vérmintát látunk a csőben.

*Alvadékos minta:* a vérmintát óvatosan összefogatva ellenőrizzük, hogy nincs-e benne alvadék. Alvadékképződés esetén, annak nagyságától függően, a koagulációs idők fals megrövidülése, normalizációja, illetve megnyúlása észlelhető.

*Hemolízis:* a minta álló helyzetben, hosszú ideig tartó tárolása után, vagy még inkább centrifugálás után figyelhető meg. Ha a hemolízis in vivo is fennáll (ezt megerősíthetjük ismételt vérvétellel), a mintát vizsgáljuk a hemosztazeológiai



állapot felmérése céljából. Ha a hemolízis helytelen vérvételi technika eredménye (pl. excesszív aspiráció, erős rázogató), a mintát nem szabad hemosztázis-vizsgálatra felhasználni.

#### Mintaszállítás

Álló helyzetű, lezárt csövekben történik. Kerülendő a minták rázatása (hemolízis, alvadás aktiváció megelőzése). Centrifugálatlan minták szállítása 15–20 °C-on történjék.

#### Mintatárolás

Szobahőmérsékleten a PI stabilabb, mint az APTI, de a hőfok emelkedésével mindkettő értéke kifejezetten csökken (%), illetve nő (sec). Ezen változások az alvadási faktorok csökkent aktivitása miatt alakulnak ki. A leglabilisabb faktor a FVIII.

**Hőmérséklet.** Ha a minta pár órán belül lemérésre kerül, tárolható szobahőn (15–25 °C). Ebben az esetben nincs szükség a plazmát a sejtes elemektől a centrifugálást követően elválogatni.

A magas hőmérséklet (beleértve direkt napfény) mindenkör kerülendő. Hűtőszekrényben (2–8 °C) tárolás nem ajánlott, mivel ez a FVII, valamint FXI, XII hidegaktivációjához, ezáltal a megfelelő szűrőtesztet rövidült alvadási idejéhez vezet.

Ha a minta csak a későbbiekben kerül felhasználásra, a thrombocytamentes plazmát (PFP) a vérvétel után 1 órán belül külön választjuk a sejtes elemekről és zárt csövekben fagyaszttva tároljuk. Rövid ideig tartó (<2 hét) tárolásra elegendő a –20 °C, de hosszabb idő esetén (<6 hónap) legalább –70 °C a megfelelő tárolási hőmérséklet. A fagyaszttott mintákat 37 °C-os vízfürdőben engedjük fel, majd alaposan összekeverjük. Ezután azonnal megkezdjük a mérést, mivel számtalan faktor stabilitása csökken felolvasztás után. Az újrafagyasztás és –felengedés kerülendő.

**A tárolás időtartama.** PI esetén 24, egyéb vizsgálatok esetén pedig 4 órán belül végre kell hajtani a méréseket. Ha a minták csak a későbbiekben kerülnek felhasználásra, a plazmákat le kell fagyasztanunk.

Thrombocytafunkciós vizsgálatok esetén a mintavételt követően azonnal meg kell kezdeni a mérést és két órán belül be kell fejezni.

#### Hematokrit és a véralvadási vizsgálatok

A hematokrit 0,25–0,55 (25–55%) tartományban nem befolyásolja a véralvadási szűrőtesztet eredményét, így értékét többnyire nem is kell számításba vennünk. Alacsony, illetve magas hematokrit esetén viszont téves alvadási eredményeket kapunk.

Ha a hematokrit >0,55 (55%): fiziológiás újszülöttekben, illetve előfordul olyan betegségekben, ahol a vörösvértest-szám nő (polycithaemia vera, szívbetegségek), és így a plazma aránya csökken. Ilyenkor nyitott, hagyományos vérvétel esetén a szokásos citrát:vér arányt módosíthatjuk. A vénás vér megfelelő mennyisége kiszámítható a következő képlet alapján:

$$\text{vér (ml)} = 9 \times \text{Na-citrát-oldat (ml)} \times 0,55 / (1,00 - \text{hematokrit})$$

Ha a hematokrit <0,25 (25%): a fenti formula alapján módosítandó a helyes arány.

#### Cirkadián ritmus

A véralvadási faktorok is mutatnak napszaki változásokat. A legalacsonyabb értékeket többnyire a kora éjjeli órák-

ban figyelhetjük meg; a PAI-I aktivitása viszont a kora délutáni órákban minimális, hajnali 2 és 6 óra között maximális.

Számos esetben azonban nem figyelhető meg valódi cirkadián ritmus (pl. antitrombin).

Annak tekintetében, hogy a napszaki változások esetlegesen befolyásolhatják a kapott eredményeket, a véralvadási vizsgálatokhoz szükséges vérvétel reggel 7 és 9 óra között történjék.

#### Stressz

A fizikai és mentális stressz változásokhoz vezet a hemostatikus rendszerben, melyek nagyban függenek a terhelés nagyságától és időtartamától, valamint a beteg állóképességétől. Stressz esetén hiperkoagulabilitás (APTI rövidül, vWF:Ag nő), illetve hiperfibrinolízis (kóros fibrinolitikus szűrőteszt-eredmények) egyaránt bekövetkezhetnek.

#### Étkezés, stimulánsok

A véralvadás folyamatait a szélsőségektől mentes, kiegyensúlyozott étrend nem befolyásolja. Így a vérvételnek nem szükséges éhgyomorra történnie, könnyű (alacsony zsírtartalmú) reggeli elfogyasztható előtte.

Néhány megfigyelés:

1. Magas állati zsiradék tartalmú étrend a fibrinolitikus aktivitás csökkenéséhez vezet.
2. Nagy mennyiségű gyümölcs és zöldség fogyasztása fokozza a fibrinolízist, a PAI-szint csökkenésén keresztül.
3. Haldiéta (makréla) csökkenti a vérlemezke számot és alacsonyabb fibrinogén-szintet mérhetünk a következő pár hétben. A thrombocyták aggregációja csökken a halolajban levő többszörösen telítetlen zsírsavak miatt.
4. Nagy mennyiségű C-, E-vitamin, gyömbér, hagyma fogyasztása zavarja a thrombocytáaggregációt.
5. K-vitamin: csak abban az esetben érinti a véralvadást, ha az étrend szélsőséges vagy egyik napról a másikra lényegesen megváltozik.
6. Krónikus alkoholizmus csökkent thrombocytaszámhoz és aggregációhoz vezet.
7. Dohányzás: fokozza a thrombocytáaggregációt és adhéziót, növeli a fibrinogén szintjét.

#### Gyógyszerek

A véralvadás terápiás céllal történő befolyásolására adnak antikoagulánsokat és thrombocytagátló szereket. Számos más gyógyszer mellékhatásaik révén hat a hemosztázisra.

Utóbbira néhány példa:

1. NSAID: az acetilszalicilsav irreverzibilisen gátolja a COX enzimet, ezzel csökkenti/megszünteti a thrombocytáaggregációt.
2. Orális fogamzásgátlók: hatásukra a legtöbb alvadási faktor aktivitása nő, fokozódik a thrombocytáaggregáció, míg az AT és PS szintje csökken.
3. Valproát: thrombocytopenia, fibrinogén-szint csökkenés.
4. Aszparagináz: fibrinogén, AT, PC, PS, plazminogén, K-vitamin-függő alvadási faktorok szintje csökken.
5. Széles spektrumú antibiotikumok K-vitamin-hiányt okozhatnak a bélflóra károsítása által.

A korrekt eredményekhez elengedhetetlen feltétel a hemosztázisvizsgálatok során a preanalitikai szak kontrollálása.

## Feladatok a hemosztázis alaptesztek kóros eredménye esetén

*Tasks in case of abnormal results of haemostatic screening tests*

### Dr. Várnai Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

*Kulcsszavak:* PI, APTI, TI, fibrinogén, vérzékenység, thrombosis-készség

*Key-words:* PT, APTT, TT, fibrinogen, haemorrhagic diathesis, thrombophilia

A hemosztázis bonyolult szabályozott rendszer, amelyben az érfal, a trombocyták, a véralvadás és a fibrinolízis komponenseinek összehangolt működésével egyensúlyi állapot valósul meg. A fiziológiás és a patológiás állapotok megértésére több teória született, kezdve a klasszikustól, a „vízesés” elméleten át a legátfogóbb képet adó, sejt alapú modell kialakításáig (Hoffmann 1998). A „vízesés” elmélet a diagnosztikában még mindig nagyon jó eligazodást nyújt. Ennek az elméletnek az alaptételei:

- ▶ az alvadási faktorok a plazmában inaktív formában keringenek;
- ▶ az aktiváció két úton indul: az intrinsic és extrinsic úton;
- ▶ a faktorok egymást követő proteolízissel aktiválódnak kötött sorrendben, és az exponenciálisan növekvő számú faktor trombin generációhoz vezet, amely hatására a folyékony fibrinogén gél állapotú fibrinné alakul. A rutin véralvadási vizsgálatok általában ennél a lépésnél végződnek.

A finoman hangolt egyensúly megbomlása vérzékenységhez (*hipokoaguláció*) vagy fokozott thrombosis-készséghez (*hiperkoaguláció*) vezet. Bármely irányú eltérés kivizsgálása a rutin alaptesztekkel indul (zárójelben az alapteszt neve):

- ▶ trombocytaszám (vérkép, kenet),
- ▶ protrombinidő (PI),
- ▶ aktivált parciális tromboplastinidő (APTI),
- ▶ trombinidő (TI),
- ▶ fibrinogén (Clauss-módszer).

A kóros értékek további vizsgálatokat indikálnak, amely az eltérés irányától függően a hipo- vagy hiperkoaguláció kivizsgálását jelenti.

A beteg anamnézisének, klinikai tüneteinek és az alkalmazott terápiának az ismerete lényeges segítséget nyújt a további vizsgálatok sorrendjében.

### Vérzékenység vizsgálata

#### Thrombocytaszám

Mérsékelt csökkenett trombocytaszám (50–100 G/l) és klinikai tünetek megléte esetén trombocytafunkciós tesztek végezhetők:

- ▶ PFA100 (vérzési idő standardizált változata) (Collagen/Epinephrine és Collagen/ADP cartridge)
- ▶ Hagyományos aggregométer (optikai elven alapuló).

Heparinterápia mellett (5–14. nap) fellépő trombocytopenia (<100 G/l vagy a kiindulási érték felére csökkenése) esetén HIT-II szűrő teszt beállítása indokolt.

Alacsony trombocytaszám esetén ajánlott a kenet megtekintése, mikroaggregátumok vagy fragmentocyták (DIC)

felismerésére. Az alvadásgátló (EDTA) okozta pseudothrombocytopenia kizárása fontos, hogy elkerüljük a felesleges vizsgálatokat.

#### Koagulációs vizsgálatok

Az alvadási szűrőtesztek az aktiváció egy-egy fázisán belüli eltérést jelzik az alvadási és fibrinolízis folyamatában. Az alaptesztek együttes elvégzése segít a további vizsgálatok kijelölésében.

Megnyúlt PI vagy APTI esetén az első lépés a korrekciós vizsgálat elvégzése:

- ▶ beteg plazma és normál plazma 1:1 arányú keveréke.

Ha a megismételt mérés értéke a normáléval megegyező, az egyes alvadási faktorokat kell meghatározni. Ha kóros marad, gátlótest irányába (lupusz antikoaguláns, LA vagy alvadási faktor ellenes gátló) végzünk meghatározásokat.

*Korrekciót követő eljárások:*

- ▶ *Korrigálható PI és normál APTI* esetén a VII. faktort,
- ▶ *korrigálható APTI és normál PI* esetén VIII, IX, XI és XII faktorokat (ha a betegnél nincs vérzés, a mérést a XII. faktortal kezdjük) határozzuk meg.
- ▶ Csökkent VIII. faktor esetén von Willebrand-betegség gyanúja is felmerülhet. A kivizsgálási algoritmus a von Willebrand-faktor (vWF) funkcionális és antigén mérést, a kollagén- és a VIII. faktor-kötőhely meghatározását, a multimerek analízist, esetenként trombocytá-aggregációs mérést foglal magába.
- ▶ *Korrigálható PI, APTI és normál TI* mellett a közös aktivációs út faktorait határozzuk meg (II., V., VII. és X. faktorok). Ha májbetegség áll a megnyúlt értékek hátterében, az alvadási faktorok egyenkénti meghatározása felesleges. Kivételt képez a máj transzplantációja (V. faktor).
- ▶ *Megnyúlt PI, APTI, és TI* esetén a faktor meghatározások előtt a fibrinogén szintjének ellenőrzése szükséges, mert az alacsony fibrinogénszint (0,3 g/l) vagy az elégtelen funkció valamennyi mérést befolyásolja. Dysfibrinogenemia elkülönítésére a fibrinogén funkcionális meghatározása mellett a kvantitatív meghatározás is szükséges.
- ▶ *Megnyúlt TI-nél* a nyomokban jelen lévő heparin kizárására reptilázidőt (RI) mérünk. A reptiláz fibrinogén hasítási pontja eltér a trombin támadáspontjától, és ezt nem gátolja a heparin.

Valamennyi szűrőteszt kórossá válhat DIC-ben, primer hiperfibrinolízisben; ilyenkor ismételt vizsgálatokkal követhető a folyamat, kiegészítve D-dimer, fibrin/fibrinogén degradációs produktum (fdp), fibrin monomer (FM) meghatározással.

*Sikertelen korrekció, gátlótest meghatározás:*

- ▶ Faktorelles gátlótest esetén az inhibitor mennyiségi meghatározására a Bethesda-módszert alkalmazzuk. A

beteg plazmájának tovaftató hígítási sorát ismert VIII. faktor koncentrációjú plazmával mérjük össze, mindegyik hígításból VIII. faktor aktivitást mérünk azonnal és két órással, 37 °C-on történő inkubálás után (azonnali, illetve progresszív gátlótest elkülönítése). 1 Bethesda egység (BU) az a gátlás, amely az ismert VIII. faktor aktivitást a felére csökkenti. Amelyik hígítási lépésnél találjuk az 50%-os csökkenést, annak a hígításnak a reciproka értéke adja a beteg gátlótest titerét.

- ▶ LA-pozitivitás foszfolipid-protein ellenes antitest, amely kimutatásához az antigén heterogenitása miatt két, különböző összetételű szűrőtesztet kell alkalmazni. Leggyakrabban használt módszerek: a hígított Russell vipera méreggel végzett koaguláció és a lupuszérkeny APTI.

Pozitív eredménynél a bizonyító tesztet is be kell állítani (hígítatlan Russell vipera méreg, illetve hexagonális foszfolipid).

Vérzékenység körébe tartozhat a XIII. faktor defektusa, amelyet azonban a rutin tesztek nem érzékelnek.

## Thrombosis-készség vizsgálata

### Thrombocytaszám

Magas, néha extrém thrombocytaszám (>1000 G/l, pl. mieloproliferatív kórképek) járhat fokozott funkcióval, de gyakrabban inkább csökkent működést jelent. Vizsgálatokra csak a hagyományos aggregométer ad lehetőséget, mivel a PFA 100 <500 G/l használható.

### Koagulációs vizsgálatok

Rövidült PI, APTI, TI, emelkedett fibrinogénszint thrombosis-készségre hívhatják fel a figyelmet. Ennek kivizsgálási menete:

- ▶ Természetes inhibitorok: antitrombin (AT), protein C (PC), protein S (PS) funkcionális meghatározása. Ha kóros, az antigén meghatározás is szükségessé válik az I. (mennyiségi) és II. (minőségi) típusú defektus elkülönítésére.

- ▶ APC rezisztencia az V. faktor Leiden-mutációjának funkcionális meghatározása, de a jelenség mutáció nélkül, szerzetten is felléphet.
- ▶ Valamennyi alvadási faktor magas szintje (> 200%) thrombosisrizikót jelenthet, így a faktormeghatározások (elsősorban VIII. faktor) is részei a kivizsgálásnak.
- ▶ Az akut fázis proteinek (fibrinogén, VIII. faktor, von Willebrand Faktor) magas szintjét csak gyulladási paraméter (CRP) egyidejű meghatározásával lehet értékelni.
- ▶ A D-dimer az alvadási és fibrinolitikus rendszer aktiválódását egyaránt jelzi.
- ▶ Protrombin G20210A polimorfizmusra csak molekuláris biológiai módszer áll rendelkezésre.

A thrombosis-készség kivizsgálása azonban nem alapulhat kizárólag a szűrőteszt pozitivitásán. Szükséges a beteg anamnézisének, a családi anamnézis, valamint a klinikai tünetek ismerete.

1. *A kivizsgálást el kell indítani*, ha: fiatal (<50 év) a beteg; ismeretlen okból, szokatlan helyen, vagy ismétlődő thrombosis alakul ki; 2 vagy több spontán magzatvesztés az anamnézisben.
2. *Az előbb felsoroltakhoz ismert rizikók társulnak*: trauma; műtét; terhesség, gyermekágy; immobilizáció; ösztrogénterápia.

Ha a thrombosis csak a második csoportban felsoroltakkal fordulnak elő, nem indokolt a részletes kivizsgálás. Egészséges egyént, ahol a családban fiatalkori, halmozott thrombosis fordult elő, gyermekvállalás, illetve fogamzásgátló szedése előtt javasolt kivizsgálni.

A hemosztázis szűrőtesztjei általában sejtmentes plazmában mérik a fibrin képződést, és csak korlátozott információt adnak a hemosztázis egészének működéséről. A sejt elemeket tartalmazó *globális tesztek*, mint a trombin generációs teszt (endogén trombin potenciál) és a trombelasztográfia, közelebb visznek az in vivo folyamatokhoz. Nagyobb érzékenységet mutatnak mind hipo- mind hiperkoaguláció irányában. A standardizáció javításával, minőségellenőrzési kontrollokba való bevonással helyük lehet a hemosztázis vizsgálatában.

## A thrombosis hajlam vizsgálati algoritmus

???????????????

**Dr. Domján Gyula, Dr. Gadó Klára**

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Belgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* thrombosis, thromboembolia, thrombophilia, antifoszfolipid szindróma  
*Key-words:* thrombosis, thromboembolia, thrombophilia, antiphospholipid syndrome

### Bevezetés

A vénás thromboembliás megbetegedések Magyarországon az egyik vezető morbiditási és mortalitási tényezőnek számítanak annak ellenére, hogy hatékony eszközökkel rendelkezünk mind a megelőzés, mind a diagnosztika, mind a kezelés területén. Ezért különösen fontos, hogy érvényt szerez-

zünk a rendelkezésre álló szakmai irányelveknek, amelyek jelenleg is jól meghatározzák a diagnosztikus és terápiás teendőket. A gyors diagnózis alapján megkezdett hatékony terápia segít megelőzni a sokszor halálos vagy súlyos életminőség-romlást okozó szövődmények kialakulását.

### Fokozott thrombosishajlammal járó állapotok

A fokozott thrombosishajlammal járó állapotok többféle oka ismert. A veleszületett thrombophilák heterogén csoportot alkotnak, amelyek különböző mértékben fokozzák a thrombosis-készséget és gyakran megtalálhatók a fiataloknál kialakuló thrombosisok hátterében (1., 2., 3. táblázat).

Számos olyan állapot (terhesség, szülés, gyermekágy időszaka, időskor), illetve betegség ismert, amely szintén fokozza a thrombosishajlammal. Az utóbbiak közé tartozik az obesitas, diabetes, malignus betegségek, nephrosis szindróma, gyulladási kórképek, varicositás, szívelégtelenség, a vér

1. táblázat

#### Veleszületett thrombophilák

##### GYAKORIBB ELTÉRÉSEK

- ▶ V. faktor heterozigóta Leiden-mutációja
- ▶ aktivált protein-C rezisztencia
- ▶ protrombin gén G20210A heterozigóta mutációja
- ▶ hyperhomocysteinaemia
- ▶ emelkedett VIII. faktor szint

##### RITKÁBB ELTÉRÉSEK

- ▶ antitrombin III defektus
- ▶ a protein-C és protein-S defektus
- ▶ az V. faktor homozigóta Leiden-mutációja
- ▶ homozigóta protrombin gén G20210A mutáció

##### EGYÉB ELTÉRÉSEK

- ▶ emelkedett XI, IX, VII faktor szint
- ▶ csökkent FXII, plazminogén
- ▶ dysfibrinogenaemia
- ▶ „sticky platelet” szindróma

2. táblázat

#### Az egyes genetikai tényezők által okozott thrombosiszirikó-fokozódás

Heterozigóta FV Leiden	7x
Homozigóta FV Leiden	80x
Heterozigóta protein C deficiencia	10–15x
Homozigóta FII G20210A	↑↑
Heterozigóta FII G20210A	3–6x
AT-hiány	20x
Homozigóta AT	↑↑↑

(↑↑↑ = nagyon jelentős mértékben fokozza a thrombosiszirikót, gyakran csecsemő-gyermekkorban halálhoz vezet  
 ↑↑ = igen jelentős mértékben fokozza a thrombosiszirikót)

3. táblázat

#### A veleszületett thrombophilák klinikai jellegzetességei

- ▶ fiatal betegeken kialakuló thromboembolia
- ▶ szokatlan helyen (felső végtagi mélyvénás thrombosis, Budd–Chiari-szindróma)
- ▶ enyhe provokáló tényező hatására kialakuló thromboembolia
- ▶ recidiváló thrombosis

viszkozitásának fokozódásával járó megbetegedések. Jelentősége miatt külön említjük az antifoszfolipid szindrómát, amely az egyik legfontosabb thromboemboliás hajlammal járó megbetegedés, és hatása mind az artériás, mind a vénás rendszerben kifejezésre jut.

Egyes gyógyszerek (ösztrogén tartalmú gyógyszerek, daganatellenes szerek), a vénás kanülök, tartós immobilitás szintén thrombosis kockázat növelő tényező.

A különböző veleszületett és szerzett tényezők egyidejű jelenléte egymás hatását sokszorosára erősítheti. Igen gyakran előfordul, hogy egyes tényezők önmagukban még nem okoznak klinikai tüneteket, a thromboembolia manifesztálásához egy újabb tényező megjelenése vezet.

A sebészeti beavatkozás, a posztoperatív időszak önmagában is jelentős thrombosishajlam fokozódással jár.

A belgyógyászati és műtéti osztályokon kezelt betegek jelentős aránya a fokozott thrombosishajlam miatt megelőző kezelésre szorul.

### A kivizsgálás elve

A thromboembolia kialakulásának megelőzésében nyújt segítséget a fenti tényezők ismerete. Ennek gyakorlati vonatkozása, hogy a fokozott thrombosishajlammal járó állapotok fennállásának észlelése esetén tromboprofilaxisban részesítjük a beteget.

A már kialakult thrombosis esetén a lehetséges okok számbavétele, a szükséges vizsgálatok elvégzése ahhoz segítenek hozzá, hogy meghatározhassuk a megfelelő terápiát, annak fajtáját, alkalmazásának időtartamát. Fontos gyakorlati szempont, hogy a kivizsgálás a thromboticus eseményt követően minimálisan három hónap elteltével történhet. A K vitamin antagonisták alkalmazása közben az alvadási vizsgálatok nem végezhetőek el.

Számos laboratóriumi vizsgálat áll rendelkezésre a fokozott thrombosishajlam igazolására, azonban ezek elvégzését több körülmény befolyásolja. Célunk, hogy a vizsgálatok száma és fajtája kellően informatív, racionális és finanszírozható legyen (4. táblázat).

4. táblázat

#### Thrombophilia szűrővizsgálat javallatai

##### THROMBOPHILIA SCREENING AJÁNLOTT

- ▶ recidív thrombosis
- ▶ thrombosis <50 év
- ▶ thrombosis kiváltó ok nélkül, bármely életkorban
- ▶ thrombosis szokatlan helyen (felkar, agy, mesenterium, portalis, máj)
- ▶ thrombosis terhesség, gyermekágy, orális antikoncepció szedése közben
- ▶ habituális vetélés

##### THROMBOPHILIA VIZSGÁLHATÓ

- ▶ Ismert thrombophilias tünetmentes családtagja
- ▶ Ismert thrombophilias tünetmentes női családtagja, terhességvállalást vagy orális antikoncepció szedését megelőzően

##### THROMBOPHILIA VIZSGÁLAT NEM AJÁNLOTT

- ▶ általános populáció szűrés
- ▶ orális antikoncepció terápia indítás előtt vagy alatta
- ▶ prenatális, újszülött vagy aszimptomás prepubertás rutin teszt

## A veleszületett vérzékenység vizsgálati algoritmus

*Evaluation of congenital bleeding disorders*

### Dr. Nemes László

Országos Haemophilia Központ és Haemostasis Szakrendelés, Honvédkórház – Állami egészségügyi Központ, Budapest

**Kulcsszavak:** von Willebrand-betegség, haemophilia A és B

**Key-words:** von Willebrand disease, haemophilia A and B

Veleszületett vérzékenység gyanúja esetén a következő szűrővizsgálatok elvégzését tartjuk indokoltnak:

- ▶ Vérzési idő (Ivy módszere szerint, lehetőleg standard eszközzel, pl. Simplate I-II) vagy PFA 100 záródási idő,
- ▶ Globális véralvadási tesztek: aktivált parciális tromboplastinidő (aPTI), protrombinidő (PI), trombin idő (TI),
- ▶ plazma-fibrinogénkoncentráció meghatározása

A vérzési idő megnyúlása esetén a vizsgálatok a thrombocytafunkciós mérésekkel is kiegészítendőek.

Az aktivált parciális tromboplastinidő (aPTI) a véralvadás intrinszik és közös útjának vizsgáló módszere. Izolált megnyúlása esetén az esetleges inhibitorok (pl. heparin, antifoszfolipid ellenanyag, lupus antikoaguláns, specifikus faktorelles autoantitestek) keverési tesztekkel történő kizárása után individuális faktorszint-mérések végzendők: haemophilia A és B, XI-es faktor hiány, és a klinikai vérzékenységgel nem járó XII-es (Hagemann-) faktor deficiencia lehetősége jön szóba.

A protrombinidő (PI) a véralvadás extrinsic és közös útjának vizsgálatára alkalmas. Izolált megnyúlása esetén a VII-es faktor hiányának lehetősége vetődik fel, ezért FVII:C mérés indokolt.

Együttes aPTI és PI megnyúlás esetén, az inhibitorok keverési tesztekkel való kizárása után elsősorban a véralvadás közös útja („common pathway”) faktorainak (X, V, II, fibrinogén) defektusára kell gondolnunk. A vérzékeny állapotok differenciáldiagnosztikáját az 1. táblázat foglalja össze.

### Haemophiliák laboratóriumi diagnosztikája

A haemophilia-A a VIII alvadási faktor X kromoszómára lokalizálódó génjében bekövetkező mutáció következtében létrejövő veleszületett vérzékenység. A IX faktor génje ugyancsak az X kromoszómán helyezkedik el, mutációi okozzák az ún. B típusú haemophiliát. A VIII- (IX-) faktor gén heterogén genetikai eltérései csökkent faktor-termeléssel vagy diszfunkcionális faktor képződésével járnak.

1. táblázat

A vérzékeny állapotok differenciáldiagnosztikája

ÁLLAPOT	THROMBOCYTASZÁM	PI	aPTI	TI	VÉRZÉSI IDŐ	VIIIF:C	IXF:C	ANTI-VIIIF-ELLENANYAG
Vasopathia	→	→	→	→	↑(→)	→	→	N
Thrombopenia	↓↓	→(↑)	→(↑)	→	↑↑	→	→	N
Thrombopathia	→(↓)	→	→	→	↑↑	→	→	N
vWillebrand-szindróma	→(↓)	→	→(→)	→	↑	↓	→	N
Afibrinogenaemia	→	↑	↑	↑↑	↑	→	→	N
Szerzett haemophilia	→	→	↑↑	→	→	↓↓	→	P
Májbetegség	↓(→)	↑	↑	→(↑)	↑	↓(→)	↓	N
DIC	↓↓	↑	↑	↑↑	↑	↓(→)	↓	N/P
Masszív transfúzió	↓	↑	↑	→	↑	↓(→)	↓(→)	N
Kumarinterápia	→	↑↑	↑	→	→	→	↓	N
UF-heparin	→(↓)	→(↑)	↑↑	↑↑	→(↑)	→	→	N
FII, FV, FX def.	→	↑↑	↑↑	→	→	→	→	N
Haemophilia-A	→	→	↑↑	→	→	↓↓	→	N/P
Haemophilia B	→	→	↑↑	→	→	→	↓↓	N/(P)
LA	↓(→)	→(↓)	↑	→	→	→(↓)	→(↓)	N/(P)
Trombolitikus kezelés	→	↑	↑↑	↑↑	→↑	↓	↓	n

**Rövidítések:** N: normál, P: pozitív, PI: protrombin idő/ aPTI: aktivált tromboplastin idő/ TI: trombin idő/ VIIIF:C: VIII faktor aktivitás/ IXF:C: IX faktor aktivitás/ LA: lupus antikoaguláns/ anti-VIIIF-ellenanyag: VIIIF ellen ható inhibitor mennyisége Bethesda Egységben (BE)

A klinikumban a jellegzetes öröklésment valamint vérzéses manifesztációk (családi és egyéni anamnézis) alapján vetődik fel a haemophilia lehetősége. A megerősítéshez (verifikálás), valamint a típus és súlyosság meghatározásához (a betegség klasszifikációja) speciális véralvadási laboratóriumi vizsgálatok szükségesek. A legfontosabb, szűrő jellegű „globális” koagulációs vizsgálatok, a thrombocytaszám és a vérzési idő mérésével kiegészítve általában elegendőek a megfelelő differenciáldiagnosztikához, a „csoportdiagnózis” meghatározásához.

Az A és B haemophiliát az intrinsic út egyéb, ún. „kontakt” faktor deficienciáitól (pl. XII-es faktor, Fletcher- és Fitzgerald-faktor, HMW kininogén, prekallikrein, XI-es faktor) a specifikus faktormeghatározásokkal lehet elkülöníteni. Vérzékenység szempontjából ezek közül egyedül a XI-es faktor hiány bír jelentőséggel. Az A haemophiliát ezen kívül még a ritka VIII-as faktor elleni kóros autoantitest termelődésen alapuló, ún. szerzett, gátlótestes haemophiliától (APTI keverési tesztek és az inhibitor Bethesda-méréssel való meghatározása) és a gyakori von Willebrand-betegségtől kell elkülöníteni. Más jellegű inhibitor hatások, mint például heparin jelenléte vagy lupus antikoaguláns fals pozitív (csökkent) VIII-as faktor aktivitás (VIII:F:C) értéket okozhatnak, különösen az egylépcsős meghatározás során. A VIII-as faktor fiziológiás carrier fehérjéje a von Willebrand-faktor (vWF), amely stabilizálja a keringésben, és megvédi a korai proteolízistől. Így érthető, hogy a vWF hiányában a VIII:F:C is csökken. A ritka, súlyos, 3-as típusú von Willebrand-betegségben, amire a vWF teljes hiánya jellemző, a VIII-as faktor aktivitás is jelentősen csökken – általában 3% alatt van – és típusosan haemophiliás vérzéses manifesztációk, pl. haemarthrosok, izomközi haematómák is előfordulhatnak a megfelelő mozgásszervi következményekkel.

A von Willebrand-betegség ugyancsak ritka 2N (Normandy-) variánsát különösen nehéz elkülöníteni a mérsékelt A haemophiliától. Ebben a variánsban a klasszikus vWF-paraméterek (Ristocetin Cofactor aktivitás – RiCof, Ristocetin Indukálta Platelet Aggregáció – RIPA, Collagen Binding Aktivitás – CBA, standard Ivy vérzési idő, Platelet Function Analyzer – PFA 100 idő, von Willebrand Faktor Antigen – vWF:Ag, vWF multimer mintázat) mind normáli-

sak, és csupán a specifikus vWF VIII-as faktor kötőképességét vizsgáló teszttel lehet a diagnózishoz eljutni. A differenciáldiagnózis elsősorban a genetikai tanácsadás számára lehet fontos.

A B típusú haemophilia differenciáldiagnosztikájában a IX-es faktor csökkenés szerzett okait kell elsősorban figyelembe vennünk: K-vitamin-hiány, kumarin és indandion kezelés, májbetegséghez kapcsolódó komplex coagulopathia, DIC-jellegű állapotok, dilúciós coagulopathia, antifoszfolipid szindróma és a rendkívül ritka IX-es faktor elleni autoantitest. A protrombinidő mérése, a többi K-vitamin-dependens véralvadási faktor szintjének specifikus meghatározása, APTI korrekciós és Bethesda inhibitor teszt alkalmazása lehet szükséges a korrekt diagnózis felállításához.

### Von Willebrand-betegség laboratóriumi diagnosztikája

A von Willebrand-betegség (von Willebrand disease – vWD) a veleszületett vérzékenység leggyakoribb formája, prevalenciája világszerte kb. 0,8–1,3%. Altípusait a 2. táblázat mutatja.

Patofiziológiai alapja a von Willebrand faktor (vWF) hiánya vagy defektusa. A vWF plazmafehérje, melynek legfontosabb szerepe a véralvadásban a thrombocyták adhéziójának és aggregációjának biztosítása. A vWF ezen kívül a VIII-as véralvadási faktor (FVIII) carrier molekulája is a vérkeringésben, azaz a FVIII a vérpályában “FVIII:vWF komplex” formájában kering; a hordozó molekula hiányában, vagy működészavara esetén a szabad FVIII katabolizmusa fokozódik, koncentrációja csökken.

A szűrővizsgálati tesztek pozitivitása esetén verifikációs tesztként minden esetben el kell végeznünk a vWF mérését funkcionális (vWF aktivitás – RiCof vagy Collagénkötő Aktivitás – CBA) és immunológiai (vWF antigén – vWF:Ag) módszerrel, valamint a VIII-as faktor aktivitás (FVIII:C) és a risztocetin indukálta thrombocyt- (platelet) aggregáció (RIPA) mérését. Az altípusok meghatározása terápiás konzekvenciával jár, ezért a vWF multimer meghatározása SDS elektroforézissel szintén ajánlott.

2. táblázat

#### A von Willebrand-betegség felosztása

ALTÍPUS	ELŐFORDULÁS	ÖRÖKLŐDÉS	DIAGNOSZTIKA
1-es	70%	Autoszomális domináns, inkomplett penetrancia (60%)	Csökkent vWF: Ag, RiCof és FVIII:C (20–50%), normális multimér-megoszlás
2A	10–15%	Autoszomális domináns, ritkán recesszív	Csökkent vWF:Ag, RiCof és FVIII:C, csökkent nagy és közepes molekulatömegű multimérek
2B	<5%	Autoszomális domináns	Csökkent vWF: Ag, RiCof és FVIII:C; nagy molekulatömegű multimérek hiánya, fokozott RIPA, thrombopenia
2M	ritka	Autoszomális domináns	Csökkent vWF: Ag, RiCof és FVIII:C; normális multimér-összetétel
2N	ritka	Autoszomális recesszív	Változó vWF:Ag és RiCof; csökkent FVIII:C; csökkent FVIII-kötő képesség
3-as	1–5:106	Autoszomális recesszív	Mérhetetlen vWF: Ag, RiCof, FVIII: C < 10%

Rövidítések: vWF:Ag : von Willebrand faktor antigén, RiCof : von Willebrand faktor aktivitás, FVIII:C : VIII-as faktor aktivitás, RIPA : risztocetin-indukálta thrombocyt- (platelet) agglutináció

## Új speciális hemosztázis tesztek

*New special tests of hemostasis*

### Dr. Várnai Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

**Kulcsszavak:** trombin generációs teszt (TGT), endogén trombin potenciál (ETP), trombelasztográfia (TEG), rotációs trombelasztometriá (ROTEM), mikropartikulák (MPs), thrombocytá eredetű mikropartikulák (PMP)

**Key-words:** endogenous thrombin potential (ETP), thrombin generation assay (TGA), thrombelastography (TEG), rotational thrombelastometry (ROTEM), microparticles (MPs), platelet-derived MP (PMP)

A hemosztázis rutin tesztjei a diagnosztikus lépések alapjait képezik. A vizsgálatok azonban thrombocytaszegény (PPP) vagy thrombocytamentes plazma (PFP) felhasználásával történnek, a hemosztázis elemeinek komplex hálózatát nem érzékelik. Ezt az igényt közelítik a globális tesztek, mint a trombin generációs teszt (TGT) és a trombelasztográfia (TEG), illetve az utóbbi módosított változata, a rotációs trombelasztometriá (ROTEM). Prokoaguláns aktivitásuk miatt a keringő mikropartikuláknak is egyre nagyobb a szerepe a diagnosztikában.

### Trombin generációs teszt (TGT)

A hemosztázis kitüntetett faktora a trombin, keletkezésének és gátlásának szabályozása kulcskérdés. Az endogén trombin potenciál (ETP) a pro- és antikoagulációs folyamatokat tükrözi, így alkalmas a hipo- és hiperkoagulabilitás kimutatására. Helye van a diagnosztikában, terápia követésében és alkalmazható a hemosztázist érintő genetikai eltérések (új variánsok, a thrombosis rizikó- vagy védőfaktorainak) felismerésében.

A TGT első metodikáját 1953-ban közölték le. A módszer manuális és időigényes volta miatt azonban nem terjedt el. Számítógép vezérelte kromogén szubsztátos változata nagy előrelépést jelentett a nyolcvanas években. Fluorogén szubsztát bevezetésével a trombin generáció fibrinogén/fibrin tartalmú plazmában és thrombocytadús plazmában (PRP) is mérhetővé vált. A módszer pontosságát fokozta az automaták alkalmazása, de a standardizálás, az eredmények normalizálása napjainkban is zajlik.

A trombinkepződés kinetikáját sok tényező befolyásolja, így az alvadási faktorok és inhibitorok mennyisége, jellege; a szöveti faktor és egyéb stimulánsok; valamint a thrombocyták mennyisége és funkcionális tulajdonságai.

Az automatizált metodika (Calibrated Automated Thrombogram, CAT) trombinszubsztát kinetikáját méri a felszabaduló kromofór vagy fluoreszcens jel alapján, és szoftver program segítségével számítja ki a trombin aktivitását. Az aktivációs görbe, a kromogén/fluorogén szubsztát folyamatos hasításából keletkező növekvő abszorpció (mA) az eltelt idő (min) függvényében ábrázolva, magában foglalja a szubsztátnak a szabad trombin mellett a trombin- $\alpha_2$ -makroglobulin komplex általi hasítását is, amelyet a számítógépes program matematikai algoritmus alkalmazásával korrigál. Az így származtatott görbe deriváltja adja a trombin generáció görbét, melynek jellemzői:

- ▶ *lag* fázis ( $t_{lag}$ ): a plazma alvadási idejével egyezik,
- ▶ trombin csúcs ( $C_{max}$ ), csúcsg eltelt idő ( $t_{max}$ ): az alvadási folyamat kiterjesztését jelenti,

- ▶ görbe alatti terület (AUC), az endogén trombin potenciál: a trombinaktivitás ideje alatt képződött teljes trombin mennyiségét fejezi ki.

A TGT több variációja ismert, amelyek a reakcióban részt vevő komponensektől függően eltérő érzékenységet mutatnak az alvadási faktorok, inhibitorok, thrombocyták működésére. Fibrinolízisre szenzitív reakcióelegy kialakítása még várat magára.

### Klinikai alkalmazási lehetőségek:

1. *Antikoaguláns terápia követése.* A különböző támadáspontú antikoagulálás közös pontja a trombin generáció csökkentése. A K-vitamin antagonisták a protrombin-trombin átalakulást fékezik. A frakcionálatlan heparin az antitrombin-trombin gátlást fokozza több nagyságrenddel. A direkt trombin gátlók az aktív centrumot gátolják, a direkt anti-Xa-szerek pedig a tenáz komplexben levő faktort blokkolják. A TGT globális teszttel ezek a különböző támadáspontú hatások egy rendszerben követhetők.
2. *Hiperkoagulabilitás meghatározása.* Ha a TGT a szöveti faktort (TF) alacsony vagy magas koncentrációban tartalmazza, és trombomodullinnal (TM) vagy aktivált protein C-vel (APC) egészíti ki, a rendszer alkalmassá válik fokozott alvadási készség kimutatására.
3. *Fokozott vérékenység kimutatása.* A teszt érzékeny a csökkent alvadási kapacitás kimutatására, így alkalmas lehet szerzett hígulós alvadászavar (műtéti hemodilúció) vagy öröklött vérékenység faktorpótlásának meghatározásában.

### Trombelasztográfia (TEG)

A *Hartert* (1948) által feltalált műszerrel a teljes vér viszkoelasztikus tulajdonságai, az alvadék képződésének, stabilitásának és oldékonyságának dinamikája követhetővé váltak. A vérben alacsony, a vénás áramlást imitáló nyírófeszültség mellett zajlik az alvadás az indukciótól a fibrinolízis bekövetkeztéig. Az akár órákig is eltartó folyamat mérése ilyen formában nem tudott a diagnosztika fegyvertárába bekerülni. A technikai változtatások eredményeként ma már a point-of-care diagnosztika részévé vált. A TEG fejlesztett változata a rotációs trombelasztometriá (ROTEM). Teljes vér (natív vagy citrátos) vagy plazma kerül az egyszer használatos küvetta, amelybe egy függőleges tengely körül rotációs mozgást végző henger merül. Az alvadék képződése a rotációs mozgást lefékezi. A mozgás változását a műszer matematikai transzformációval alvadék erősséggé számolja (amplitúdó/mm) és az idő (s) függvényében ábrázolja. A szoftver gra-

fikusan és számérték szerint is elemzi a trombelasztogramot és az alábbi paramétereket adja meg:

- R** Indítástól az alapvonaltól 2 mm eltérésig eltelt idő (alvadási idő, CT; alvadási faktorok és inhibitorok egyensúlya)
- K** Alapvonalától (2 mm) 20 mm-ig eltelt idő (alvadék képződési idő, CFT)
- A** TEG kezdeti mereedsége (2 mm-nél levő merekség; az alvadék keletkezésének sebessége)
- MA** Maximális amplitúdó (MCF, az alvadék erőssége, stábiltsága: thrombocyt-fibrinogén interakció, fibrin polimerizáció)
- G** Az alvadék rugalmassága (MCE)
- CL30** Az alvadék lízise adott időben.
- TTL** A fibrinolízis elindulásához szükséges idő (MA-tól 2 mm; fibrinolízis aktivitás, FXIII).

A natív mintát 3 percen belül kell mérni, a citrátos minta négy óráig stabil. Aktivátor nélküli mérés 30–60 percig, míg aktivátorral kb. 10 percen keresztül tart.

A ROTEM nemcsak globális képet ad a beteg hemosztatis állapotáról, hanem differenciáldiagnosztikai eszközként is használható a tesztek módosításával.

Az EXTEM alapeszt, amelyben rekombináns TF indítja az alvadást. A maximális alvadék erőssége (MCF<sub>EXTEM</sub>) főként a thrombocyták működésétől és a fibrinogénszinttől függ, és ha a küvetta thrombocytagátlót (cytochalasin D) tartalmaz, szerepük szétválasztható. MCF<sub>FIBTEM</sub> méri a fibrinogén hatását az alvadék erősségében. Az MCF kritikus értéke 15 perc, e fölött fibrinogén koncentrációjának adása jön szóba. Normál MCF<sub>FIBTEM</sub> (>12 mm) és alacsony MCF<sub>EXTEM</sub> (<5 mm) thrombocytapótlást indikál.

CT<sub>EXTEM</sub> jelzi a csökkent alvadékonyságot is, a faktorpótlás (FFP, PCC) küszöbértéke 100 s.

Az EXTEM alapeszt és fibrinolízis gátló (aprotinin) tartalmú teszt (APTEM) együttes meghatározásával kismértékű hiperfibrinolízis is kideríthető, ha a két méréssel kapott értékek hányadosa <0,8 (CT<sub>APTEM</sub>/CT<sub>EXTEM</sub>).

Egyéb speciális mérési lehetőségek: INTEM (APTI-hez hasonló kontakt aktiváció) általános alvadási státusz megítélésére, HEPTEM heparináz tartalommal heparin hatás, ecarinnal pedig speciális antikoaguláns mérésre (hirudin) alkalmas.

A ROTEM masszív vérzéséknél segítséget jelenthet a döntések meghozatalában, terápia indításában. Sebészeti vérzésnél elsőként az EXTEM és a FIBTEM szimultán végzése ajánlott. Az INTEM és a HEPTEM meghatározás elsőként heparinizált betegnél indokolt, második lépésként pedig bármely sebészeti betegnél, ahol a heparinizáció a vérzéshez hozzájárulhat.

A TEG alkalmassá tehető a thrombocytablokkolókra (aszpirin, clopidogrel) non-responder vagy hiper-responder egyedek kiszűrésére. A trombin a legerősebb thrombocyt agonista, és ha gátoljuk, a többi agonista hatása megítélhetővé válik. A mérőrendszerben a heparin gátolja a trombint, a hozzáadott reptiláz és FXIIIa fibrinhálót képes kialakítani a thrombocytákkal együttműködve. Arachidonsav vagy ADP hozzáadásával az MA közel normális lesz, kivéve azoknál, akik aszpirinre vagy clopidogrelre megfelelően reagálnak.

### Mikropartikulák

A plazmában jelen lévő mikropartikulák (MPs) évtizedek óta ismertek. Megfigyelték, hogy nagy fordulatszámú centrifugálás után a plazma alvadási ideje megnyúlik, tehát a centri-

fugálásal prokoaguláns részecskék távolítódhatnak el a plazmából.

Az utóbbi években ráirányult a figyelem a sejtekből leváló mikropartikulák hemosztázisban játszott szerepére. Források sokféle: a keringésben levő elemek közül elsősorban a thrombocyták (70–90%), illetve a vörösvértestek, fehérvérsejtek, a helyhez kötöttekből pedig az endotél.

A thrombocytákból származó MPs (PMPs) keletkezhetnek a thrombocytáaktiváció során, a megakariocytákból a megakariopoiesis során, vagy a vérlemezkék apoptózisa esetén. Egyéb sejtekből szintén aktiváció, interakció vagy apoptózis eredményez MPs-képződést. A részecskék lefűződött membrándarabok, foszfolipid-tartalmú vezikulák, a forrásuknak megfelelő sejtmarkereket hordoznak, ezért kínálják magukat a kutatás és a diagnosztika számára. Méretük 0,1–1 µm. Főbb összetevőjük fehérje, foszfolipid, de emellett mRNS-t és priort is hordozhatnak.

Egyensúlyi állapotban a membrán-foszfolipidek aszimmetrikus elrendeződést mutatnak, ez három enzim működéséhez kötődik: flipáz, flopáz és szkrabláz. A flipáz a foszfátidil-szerint (PS) és foszfatidil-etanolamint (PE) kívülről beforgatja, a flopáz foszfolipideket mozgat kifelé. A szkrabláz foszfolipid transzportot végez a membrán két monolayer között, egyensúlyi állapotban inaktív.

MPs feltételezett képződési mechanizmusa a sejt aktiválódásakor vagy apoptóziskor: a felszabaduló Ca<sup>2+</sup> enzimeket aktivál, melyek membrán átrendeződést okoznak. Emellett aktiválja a kalpain enzimet, amely a fehérjék és a citoskeleton közötti kapcsolat megszűnéséhez, ezáltal a membránból MPs lefűződéséhez vezet.

A MPs foszfolipid-tartalmának nagy százalékát általában PS és PE adja, kivéve, ha endothelsejtből apoptózissal keletkeznek, ekkor az annexin V tartalom magas.

A MPs fehérje tartalma is változhat, pl. a PMPs trombin vagy kollagén aktiváció után GP IIb/IIIa komplexet tartalmaz, míg komplement aktiváció után nem.

Több módszert használnak a MPs meghatározására. Mérésére csak módosított impedancia FlowCytometer használható. Másik lehetőség szolid-fázishoz kötődésen alapszik (annexin/antitest), ahol a mennyiség mellett a prokoaguláns aktivitás mérhető, de ez nem alkalmazható minden esetben.

A PMPs prokoaguláns aktivitása 50–100-szorosa az ugyanakkora méretű aktivált thrombocytafelszínnek. Ennek magyarázata a TF jelenléte. A sérülés helyén az aktivált endothelsejtből és thrombocytából egy protein-diszulfid-izomeráz szabadul fel, amely konformáció változást okoz a szöveti faktorban, így felgyorsul a komplexképződés a TF-FVIIa-FXa között.

A TF-MPs monocytákból is származhat (MMPs), amelyek P-szelektin ligandot (PSL-1) is hordoznak.

A keringő MPs mennyisége emelkedhet különböző patológias állapotokban:

1. thrombosis (VTE, HIT-II, TTP, PNH, sarlósejtes betegség);
2. cardiovascularis betegség (hypertensio, hyperlipidaemia, atherosclerosis, akut coronariaszindróma);
3. infekció (sepsis, HIV, prion-betegség).

Az MPs patológiai szerepe miatt szükséges keletkezésük, aktivitásuk behatóbb ismerete, és a metodikák standardizálása.



## A komplementrendszer laboratóriumi vizsgálatának indikációi

Indications to perform laboratory tests of complement system

### Dr. Prohászka Zoltán

Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium

**Kulcsszavak:** komplement, immundeficiencia, HANO, atípusos HUS, autoimmun betegség  
**Key-words:** complement, immunodeficiency, HAE, atypical HUS, autoimmune disease

A *komplementrendszert* a vérplazmában és más testnedvekben található glikoproteinek alkotják. A rendszer alapvető jellemzője a gyulladást előmozdító és a kórokozók ellen védelmet nyújtó hatás.

A komplementrendszer felfedezése a 19. sz. végére tehető, amikor felismerték, hogy a kórokozók ellen termelt antitestek sejtölő hatásához szükség van friss szérumra. A rendszer elnevezése is erre a jelenségre utal: eredetileg azt a szérumösszetevőt definiálták komplementként (komplementerként), ami kiegészítette az antitestek védő hatását. A fehérjekémiai, immunológiai és molekuláris biológiai technikák fejlődésével nyilvánvalóvá vált, hogy egy összetett enzimrendszer képezi a komplementrendszert, mely működésében leginkább a véralvadás folyamatára emlékeztet. A komplement inaktív, egymást láncreakciószerűen aktiváló enzimek és szabályozó faktorok összessége.

A rendszer működésének alapvető célja az *immunhomeosztázis fenntartása*, melynek során a káros és veszélyes idegen valamint a megváltozott saját struktúráktól óvja, védi a gazdaszervezetet. A komplement aktiválódása nem antigénspecifikus. A védő hatást a rendszer három módon fejti ki, melyekkel alapvetően járul hozzá a hatásos immunválasz kialakulásához:

1. képes sejteket feloldani (*lízis*),
2. képes felületeket komplementfehérjékkel kovalens módon megjelölni és ezáltal a fagocitózis számára kijelölni (*opszonizáció*),
3. képes a károsodás helyszínére gyulladással toborozni és azokat aktiválni (*gyulladásos reakció*).

A komplementrendszer a *veleszületett immunitás része*, működését antitestek és T-sejtek nélkül is képes kifejteni. Filogenetikai értelemben ősi rendszer, egyes elemei messze korábban megjelentek, mint az immunoglobulin molekulák ősei. A komplement aktiválódása a veszélyes struktúrák megjelenésekor azonnal bekövetkezik, és így ilyen a természetes immunitás humorális (testfolyadékokban oldott formában talál-

ható) ágának legfőbb végrehajtó rendszerét jelenti. A komplement gyors aktiválódását az teszi lehetővé, hogy a rendszer elemei inaktív formában a keringésben, egyéb testfolyadékokban és nyálkahártyákon nagy mennyiségben jelen vannak. Az aktiválódást beindító struktúra megjelenésére a rendszer *kaszkádszerű reakcióval* válaszol. A kaszkádreakció során egymást csupán egy peptidkötésnél hasítva (*limitált proteolízis*), megszabott sorrendben aktiválódó proteáz enzimek keletkeznek. A reakció eredményeként az aktivációt beindító felszínen pórus keletkezik, melyet kovalensen kötődött komplementfehérjék és a környezetbe diffundáló gyulladást keltő molekulák vesznek körül. A rendszer szabályozott működését az aktivált termékek gátlószereinek (*komplement regulátor fehérjék*) jelenléte biztosítja.

Az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy a komplementrendszer a kórokozókkal szemben nyújtott hasznos (direkt és indirekt) védelmen túl számos más folyamatban is részt vesz.

### A komplementrendszer kóros működésével jellemezhető klinikai állapotok

A komplementrendszer vizsgálatának a klinikai gyakorlatban alapvetően két indikációs területe van. Bármely komplementfehérje szerzett vagy öröklött *hiánya* esetén a rendszer egésze vagy jellegzetes része károsodhat (kaszkádszerű működés), ezt leggyakrabban a fertőzések iránti fokozott fogékonyság (terminális komponensek hiánya esetén tokos baktériumokkal történő infekciók, gyakran meningitis) és ritka körkék (pl. CD59 hiánya esetén paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria) kialakulásával kapcsolatban tapasztalhatjuk.

A komplementrendszer vizsgálatára a differenciáldiagnosztika céljára vagy a *betegségaktivitás* felmérésére elsősorban szisztémás autoimmun betegségekben (immunkomplexbetegségek, úm. SLE, antifoszfolipid szindróma és vasculiti-

#### 1. táblázat

A komplementhiányok detektálhatósága funkcionális ELISA rendszerrel

A CSÖKKENT MŰKÖDÉSŰ VAGY HIÁNYZÓ KOMPONENSEK	A FUNKCIONÁLIS TESZTBEN MÉRT AKTIVITÁS		
	KLASSZIKUS	LEKTIN	ALTERNATÍV
C1q, C1r, C1s	Alacsony	Normál	Normál
C4, C2	Alacsony	Alacsony	Normál
MBL, MASP2	Normál	Alacsony	Normál
B, D, P	Normál	Normál	Alacsony
C3, C5, C6, C7, C8, C9	Alacsony	Alacsony	Alacsony

sek) vagy infektív kórképekben (pl. sepsis) kerül sor. A C3 komplement szintje az akut fázis reakció kezdetén emelkedést, annak tartós fennállása vagy súlyos mértéke esetén kóros csökkenést mutat. Sepsist kísérően (gyakran az alvadási rendszer fehérjével párhuzamosan) csökkenhet a C3 szintje. Ez utóbbi állapotokban jellegzetes, hogy a túlzott mértékű komplementaktivációt a rendszer funkcionális hiánya, konsumpciója követi csökkent hemolitikus aktivitással, alacsony faktorszintekkel.

### A komplementrendszer vizsgálata az orvosi laboratóriumi gyakorlatban

A rendszer orvosi vizsgálatára több lehetőség is adódik: *funkcionális tesztekkel* (melyek vörösvértest-lízist [CH50, vagy „összkomplement”] vagy a litikus komplex kialakulását mérik [funkcionális ELISA]) általános benyomást nyerhetünk a rendszer aktiválhatóságáról és az esetleges hiányzó komponensről (funkcionális teszt hiányplazmákkal), összefoglalva lásd *I. táblázat*.

A komplementrendszer vizsgálatára további lehetőség az egyes fehérjék mérése turbidimetriával, nefelometriával vagy

specifikus immunassay-vel. A napi gyakorlatban a C3, a C4 és a C1-inhibitor mérése terjedt el, a további mérések specializált laborok feladatát jelentik. A komplementdeficienciák közül a C1-inhibitor hiány (örökletes angioödémás állapot, HANO) és a defektív komplement-reguláció (H faktor, I faktor hiány, hemolitikus uraemiás szindrómában) fordul elő gyakran. Aktív SLE vagy más szisztémás autoimmun betegségben a C3 szintjének csökkenése alakul ki, amelyet gyakran a C1q és a C4 hiánya is kísér. A típusos és gyakori leleteket (komplement-profil) a *2. táblázat* foglalja össze.

Ismerünk olyan klinikai állapotokat is, amelyekben valamely komplementfehérje ellen kialakuló (funkcionális gátlást okozó) antitestek jelentik a kórokat. Anti-C1-inhibitor antitest esetén az angioödémás állapot szerzett formája, míg anti-H faktor autoantitest mellett az atípusos HUS szerzett, autoimmun formája áll fenn. SLE-ben gyakran figyelhető meg anti-C1q autoantitest, ami gyakran aktív lupus nephritisszel jár együtt.

### Appendix

A komplementdiagnosztikai laboratóriumban elérhető vizsgálatok listája és mintaküldés: [www.kutlab.hu](http://www.kutlab.hu)

2. táblázat

Típusos eltérések a komplementrendszer elemeiben

KLINIKAI ÁLLAPOT	C3 (0,7–1,8 g/l)	C4 (0,15–0,55 g/l)	CH50 (48–103 CH50/ml)	C1-INHIBITOR- SZINT (64–160%)	C1-INHIBITOR AKTIVITÁS (70–130%)	EGYÉB
SLE (aktív)	Csökkent	Csökkent	Csökkent	Normál	Normál	APR nem magas
HANO I	Normál/csökkent	Csökkent	Csökkent	Csökkent	Csökkent	
HANO II	Normál/csökkent	Csökkent	Csökkent	Normál	Csökkent	
HUS	Csökkent	Normál	Normál/csökkent	-	-	I-, B- vagy H faktor eltérés
Akut gyulladás	Emelkedett	Normál	Normál	Emelkedett	-	APR emelkedett
Daganatos betegség	Jelentősen emelkedett	-	Jelentősen emelkedett	-	-	

HANO I: öröklött C1-INH hiány I-es típus, a mutáns fehérje nem jelenik meg a keringésben; HANO II: öröklött C1-INH hiány II-es típus, a mutáns fehérje megjelenik a keringésben, de hibás; HUS: hemolitikus uraemiás szindróma; APR: akut-fázis reaktáns

## Újabb labordiagnosztikai paraméterek szerepe a vesefunkció vizsgálatában

*Diagnostical role of new biomarkers in monitoring of renal function*

### Dr. Kocsis Ibolya

Semmelweis Egyetem, Labormedicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

**Kulcsszavak:** akut veseelégtelenség, neutrofil gelatináz-asszociált lipokalin (NGAL), N-acetil-beta-D-glukózaminidáz (NAG), praerenalis azotaemia, tubularis károsodás

**Key-words:** acute kidney injury, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), N-acetyl beta-D- glucoseaminidase (NAG), prerenal azotaemia, tubular injury

Évtizedek óta kitartóan kutatnak olyan specifikus és megfelelően érzékeny markereket, amelyek segíthetik a vesebetegségek korai diagnózisát. A veseműködést jellemző standard klinikai kémiai vizsgálatok (szérumkreatinin, -karbamid) azonban nem elég érzékenyek és specifikusak a vesebetegségek, különösen az akut veseelégtelenség korai diagnózisának felállításához. A biológiai mintákban (szérum, vizelet) mérhető koncentrációik változása a vesefunkció változását csak jelentős mértékű késéssel követi, ez nagymértékben hátráltatja a megfelelő vesevédő terápia azonnali megkezdését. Ezért nagy az igény érzékenyebb, a veseműködés kóros elváltozására gyorsabban reagáló paraméterekre, biomarkerekre. Segítségükkel egyrészt elkülöníthetővé válhatna a korai akut tubularis nekrosis az akut veseelégtelenség egyéb formáitól (praerenalis vesekárosodás, akut glomerularis, vascularis és intestinalis vesekárosodások és obstruktív nephropathiák), másrészt könnyebbek lennének a dialízis alkalmazásával kapcsolatos döntések, előre jelezhető lenne a vesevédő terápia hosszú távú eredményessége vagy a betegség prognózisa, monitorozható a nefrotoxikus szerek mellékhatása.

Az utóbbi évtizedben több kis molekulású, a vizeletben megjelenő fehérjemolekula szerepét vizsgálták abból a szempontból, hogy segítheti-e az akut veseelégtelenség korai diagnózisát.

#### Cisztatin-C

A 13 kDa molekulású fehérje, ami a glomerulusokban szabadon filtrálódik, a tubulusokban reabszorbeálódik, katabolizálódik. Szérumszintje független az életkortól, a beteg nemétől vagy az izomzat tömegétől. Klinikai vizsgálatok során emelkedett volt a vizeletben a cisztatin-C szintje ismert tubuluskárosodás esetén. Az elmúlt évtizedben végzett vizsgálatok igazolták, hogy a cisztatin-C segíthet a glomerularis filtrációs ráta (GFR) megítélésében, valamint bizonyították, hogy kreatininnal jobban lehet segítségével előre jelezni idős betegeknél a halálozást vagy valamely cardiovascularis eseményt.

#### N-acetyl-β-glukózaminidáz (NAG)

A proximális tubulusok lizoszómális enzime. Az utóbbi években végzett vizsgálatok igazolták a paraméter jelentőségét és kellő érzékenységét a tubularis károsodás korai felismerésében.

#### Béta2-mikroglobulin

Kis molekulású fehérje, az MHC I molekulák könnyű láncú komponense, valamennyi maggal rendelkező sejt felszínén megtalálható. A glomerulusokban filtrálódik, majd a proximális tubulusokban részben reabszorbeálódik. Vérszint-

je myeloma multiplexben, CLL-ben megemelkedik. A tubuluskárosodás lehetséges korai markere.

#### Alfa-1-mikroglobulin

A 27–33 kDa molekulású fehérjét a máj szintetizálja. A vérben 50%-ban az IgA-hoz kapcsolódik. A szabadon keringő molekulák a glomerulusokban filtrálódnak, a proximális tubulusokban szívódnak vissza. A vizelettel ürülő fehérje stabilitását a pH nem befolyásolja (szemben a béta-2-mikroglobullinnal), ezért megbízhatóbban mérhető klinikai laboratóriumi módszerekkel. Diagnosztikus értékét igazolták a proximális tubulusok károsodásának korai felismerésében, a károsodás azon fázisában, amikor hisztológiai vizsgálatokban az elváltozások még nem láthatóak. A fehérjeszintet immunkémiai módszerekkel mérik, azonban ezeket nemzetközi szinten nem standardizálták.

#### Neutrofil gelatináz-asszociált lipokalin (NGAL)

A neutrofil granulocytákban azonosították, 25 kDa molekulású protein. Képződése nemcsak a neutrofilekhez köthető a csontvelőben, hanem epithelsejteknél, így a vesében a Henle-kacs vastag felszálló ágában és a gyűjtőcsatornák epithelájában is indukálódhat gyulladásos vagy egyéb malignus folyamatok hatására.

Az NGAL-t úgy azonosították, hogy az ezt kódoló gén expressziója az akut tubularis vesekárosodás állatmodelljében tízszeresére nőtt. Gyermekeken, cardiopulmonalis bypass műtét után, a vizeletben az NGAL szintje jelentősen és már a korai fázisban nőtt, 1–3 nappal korábban, mint a szérum-kreatininszint. Több vizsgálat igazolta korai diagnosztikus szerepét akut veseelégtelenség esetén, a vizeletben mért koncentrációi jól korreláltak a veseszövet károsodásának mértékével. Jelentős a prediktív értéke az alkalmazandó dialízis terápia szükségességének megítélésében, segítségével megítélhető veseműködés adott szinten történő regenerálódását elősegítő klinikai terápia sikeressége. További vizsgálatok igazolták, hogy az NGAL vizeletben mérhető koncentrációi jól tükrözték a szöveti károsodás mértékét és súlyosságának fokát olyan krónikus vesebetegségekben is, mint az egyes autoimmun betegségekhez társuló vesebetegségek, glomerularis károsodások, valamint autoszómális, dominánsan öröklődő polycystás vesebetegségek.

#### Interleukin-18

Gyulladásos akut fázis reakcióban részt vevő citokin. A vesében a proximális tubulusokban nagy mennyiségben képződhet. Vizeletben mérhető koncentrációja 6–12 órával a veseszövet akut károsodása után éri el maximumát. Akut ischaemia esetén 24 órával megelőzi a szérum-kreatininszint jelentős emelkedését. Differenciáldiagnosztikai jelentősége,

hogy krónikus vesebetegségben, valamint praerenalis azotemiában koncentrációja nem változik szignifikánsan.

#### KIM-1 („vesekárosodást jelző molekula-1”)

A molekula egy I. típusú sejtmembrán glikoprotein. Általános értelemben, PCR vizsgálatokkal sikerült fokozott mértékű képződését igazolni, ischaemia/reperfúzió után regenerálódó veseszövetben. Ischaemiás károsodásban bizonyítható volt korai diagnosztikus jelzőértéke, amely jelentősen megelőzte a hagyományos paraméterek esetében mérhető koncentrációemelkedést. Segítségével sikerült elkülöníteni a szöveti károsodással járó akut vesebetegségeket a prerenális azotemiától és a krónikus veseelégtelenségtől. Akut veseelégtelenségben a KIM-1 fehérje szintje 12 órával a károsodás után emelkedett meg. Segít előre jelezni a dialízis-igényt.

#### Retinokötő fehérje (RBP)

Ez a 21 kDa súlyú, az A-vitamin transzportjéért felelős fehérje a májban szintetizálódik. A vesében a glomerulusokban szabadon filtrálódik, majd a proximális tubulusokban reabszorbeálódik, lebomlik. Különböző eredetű akut veseelégtelenségben szenvedőknél igazolták, hogy a fehérje vizeletben mért koncentrációja segít megítélni a renalis tubularis diszfunkciót, egyes vizsgálatok bizonyították korai jelzőértékét, mely megelőzte a NAG enzim mérhető, diagnosztikus értékű aktivitásváltozását.

A fenti eredmények jelzik, hogy a rutin klinikai laboratóriumi diagnosztikában a vesefunkció vizsgálatára számos új paraméter megjelenése várható. Ezek diagnosztikus értékének a felméréséhez azonban további széleskörű, jól megtervezett prospektív klinikai vizsgálatok szükségesek.

## A tápcsatorna betegségeinek laboratóriumi diagnosztikája

*Laboratory diagnostics of gastrointestinal diseases*

### Dr. Hamar Péter

Semmelweis Egyetem, Kórleltani Intézet

*Kulcsszavak:* kilégzési tesztek, széklet vizsgálatok, tápcsatorna malignitások, *Helicobacter pylori*

*Key-words:* breath tests, stool examinations, gastrointestinal malignant diseases, *Helicobacter pylori*

### Kilégzési tesztek

A tápcsatorna működési zavarainak vizsgálatára funkcionális tesztek (kilégzési tesztek) alkalmasak; ezek csak POCT történhetnek (szakrendelőben, betegágy mellett).

#### Szénizotóp vizsgálat

A *H. pylori* fertőzés diagnosztizálására a legelterjedtebb nem-invazív vizsgálat.  $^{13}\text{C}$ -, illetve  $^{14}\text{C}$ -izotóppal jelzett urea (urea kilégzési tesztek (urea breath test: UBT) fogyasztás (p.o.) után a gyomorban *H. pylori* az ureából ureáz enzim aktivitása révén jelzett szén-dioxidot szabadít fel, ami a kilélegzett levegőben detektálható.

A radioaktív  $^{14}\text{C}$ -izotópot szcintillációs ( $\beta$ -)számlálóval lehet kimutatni. A radioaktív  $^{14}\text{C}$ -gyel jelzett ureát a beteg kapszulában lenyeli. A pozitívitás esetén a  $^{14}\text{C}$ -szén-dioxid 15 percen belül megjelenik a kilélegzett levegőben, és kis célkészsülékkel a helyszínen kimutatható: a páciens egy kis tasakba (légzési kártya) fújja ki a levegőt, amíg a teszten látható színjelzés meg nem változik. Ezt követően a légzési kártyát a mérőkészülékbe helyezzzük, mely megméri a kilélegzett levegő  $^{14}\text{CO}_2$ -izotóp aktivitását. A radioaktív ( $^{14}\text{C}$ ) vizsgálat sugárterhelése jelentéktelen (1 Ci). Előnye, hogy a kimutatás olcsóbb technológiát igényel, ami szélesebb körű alkalmazást tesz lehetővé.

A nem sugárzó  $^{13}\text{C}$ -izotópot tömegspektrofotométerrel lehet kimutatni a kilélegzett levegőben. Az eredmények alapján megadható a kilélegzett levegő  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  aránya, vagy a  $^{13}\text{C}$  elfogyasztása előtt és után kilélegzett levegőmintában  $^{13}\text{CO}_2$ -tartalmának különbsége. A  $^{13}\text{C}$ -izotóp-detektálás másik módja speciális infravörös spektrofotométer (nem diszperzív infravörös spektrofotométer – NDIR), melyben izotópszelektív módon nyelődik el az infravörös fény. A szén  $^{13}\text{C}$ -izotóp detektációjának ezen egyszerűsödésével alkalmazása terjed.

Az izotópvizsgálatok során az urea mellett egyéb jelölt tesztanyagokat is lehet alkalmazni. A leggyakrabban vizsgált betegségek: laktóztolerancia (jelölt anyag: laktóz); krónikus pancreatitis (jelölt anyag: zsír; triolein); felszívódási zavar (jelölt anyag: glükóz); gyomorürülés zavara (jelölt anyag: acetát).

#### Egyéb izotópos vizsgálatok

Szelén-homokólsav taurin konjugátuma (Seleno-homocholic acid-taurin conjugate – *SeHCAT*) scan: epe-malabsorptio vizsgálat. Radioaktív szelénrel jelölt szintetikus epesavat fogyaszt a beteg intesztinosolvens kapszulában. A malabsorptio kimutatására a legpontosabb vizsgálóeljárás.

$^{51}\text{Cr-EDTA}$ : bélfal permeabilitás vizsgálata: radioaktív krómmal jelzett EDTA-t fogyaszt a beteg per os, majd vizsgálják a 24 órán át gyűjtött vizelet radioaktivitását.

*Hidrogénkilégzési teszt.* A laktóztolerancia esetén a laktáz enzim örökletes, részleges vagy teljes hiánya van jelen. Ebben az esetben az elfogyasztott laktóz a vastagbélbe kerül, ott a baktériumok bontják – ennek eredményeként  $\text{H}_2$  keletkezik. Egészséges szervezetben nincs a kilélegzett levegőben  $\text{H}_2$ . Megjelenése laktóztartalmú táplálék (pl. anyatej) fogyasztása után a diszacharid bakteriális fermentációját jelzi. A hidrogénkilégzési teszt során a betegnél kilélegzett levegőben vizsgálják tesztanyag fogyasztása után a  $\text{H}_2$ -szint értékét.

### Laboratóriumi tesztek

#### Székletvizsgálatok

#### Vérzés kimutatása

A gastrointestinalis vérzés mindig kivizsgálást igényel. A székletben a vér kimutatására használt laboratóriumi módszerek kétféle elven alapulnak:

1. „Hagyományos” katalizált színreakciók. A reagensben alkalmazott speciális festékszerű vegyületet (guajak gyanta, benzidin stb.) a hidrogén-peroxid igen lassan oxidálja, azonban vér jelenlétében a hem katalizálja a reakciót, és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadását követően 1 percen belül intenzív színes termék keletkezik. Az eljárások szenzitívek, de aspecifikusak. Álpozitivitást okoz: állati véres hús vagy más oxidáló anyagok: peroxidáztartalmú ételek, mint torma, retek, répafélék, gyógyszerek, különösen redoxi tulajdonságú aszkorbinsav, vas és réz készítmények stb. fogyasztása. Pozitív teszteredmény esetén el kell végezni az immunkémiai tesztet is.
2. *Immunkémiai tesztek.* Monoklonális ellenanyag-festék konjugátumot tartalmaznak a humán hemoglobin specifikus immunológiai-módszerrel történő kimutatására (hemoquant). Nem a hem, hanem a globin immunológiai kimutatásán alapszik, ezért álpozitivitással nem kell számolni. Ezeknél a teszteknel (immunkromatográfias kivitelben) a kis mennyiségű széklet vizes, vagy pufferes extraktumát használják mintaként, és színreakció, illetve színes kromatográfias sáv jelzi a pozitivitást.

#### Steatorrhoea vizsgálata

*Steatorrhoea:* a széklet zsírtartalma >7 g/nap. Legtöbbször fehérje és szénhidrát emésztési zavarok is kísérik. Az emésztetlen fehérje a vastagbélben bakteriálisan fermentálódik, aminek következtében a steatorrhoeás széklet bűzös.

*Kimutatás.* A széklet zsírtalmának laboratóriumi meghatározását kevés intézetben végzik. A széklettel ürített napi zsírmennyiség meghatározására általában 72 órás gyűjtött székletminta tömegét és zsírkoncentrációját lehet meghatározni. Még pontosabb, ha két szín indikátor (pl. kárminfesték) szájon történő fogyasztását követően, a színek székletben történő megjelenésével jelöljük a széklet-mintagyűjtés kezdetét és végét.

1. *Szemikvantitatív mikroszkópos vizsgálat:* a széklet sudan festését követően a látóterenkénti zsírcseppek számának meghatározása.
2. *Kvantitatív meghatározások:* a gyűjtött széklet tömegét megméri, majd egy kisebb részletét (5–10 gramm) szerves oldószerrel extrahálják, az oldószer elpárologtatása után gravimetriásan mérhető a kioldott zsír tömege. Egyéb eljárással az extrakcióval együtt savas hidrolízist végeznek és a keletkező zsírsavak mennyisége mérhető, például lúgos titráással, vagy fotometriásan.

Újabb, Magyarországon nem alkalmazott eljárás a szteatorkrit-érték meghatározása (0,5 g hígított székletet hematokritcsőben perklorásvval centrifugálva a szárazanyag tartalom és a zsír elválik: százalékos arány meghatározható a hematokrithez hasonlóan), illetve az infravörös-közeli spektrometriás analízis (near infrared spectrometric analysis – NIRA): a székletminta felszínéről visszaverődő fény hullámhossza függ a széklet összetételétől.

#### Egyéb székletvizsgálatok

Mikrobiológia vizsgálatok végezhetőek virális, bakteriális vagy parazita eredetű bélfertőzés gyanúja esetén.

Gyulladást kísérő jelenségek a székletben, gastroenteritisekben, autoimmun folyamatokban, tumor esetén: fehérvérsétek: *lymphocyták, granulocyták* kimutatása a székletből. Továbbá kimutathatók a székletből *albumin*, granulocytatermékek: *laktoferrin, calprotectin*, melyek alkalmasak a gyulladással járó bélbetegségek (IBD) diagnosztizálására, monitorozására.

Colorectalis carcinoma kimutatásában új labor diagnosztika a tumor metabolizmusban részt vevő fehérje: piruvátkináz M2 (M2–PK) kimutatása székletből ELISA-val.

#### Vér- és vizeletvizsgálat

##### Gastrointestinalis enzimek, hormonok

*Elasztáz.* A hasnyálmirigy exokrin enzimek megemésztődnek a béltraktusban, csak kis hányadék ürül a széklettel. Kivétel a pancreaticus elasztáz: a többi hasnyálmirigy enzimmel azonos mennyiségben termelődik, székletből enzimimmunoassay (EIA)-vel mérhető mennyisége a hasnyálmirigy exokrin funkciójának jó mutatója. Az exokrin hasnyálmirigy-enzimek (lipáz, amiláz) megjelenése a vérben hasnyálmirigykárosodásra (akut pancreatitis) utal.

*Gasztrin.* Enyhén emelkedett szintje antrum G-sejt hyperplasiára, magasabb szint paraneoplasiás gasztrintermelésre utal. Amennyiben a szérum-gasztrinszint magas, *szekretin tesztet* lehet végezni: a szekretin egészségesekben és antrum G-sejt-hyperplasiában gátolja az antrum G-sejtek gasztrin elválasztását, míg Zollinger–Ellison-szindrómában (pancreas gastrinomában) a gasztrin-elválasztás fokozódik (paradox válasz).

##### Autoimmun betegségek, anémia perniciososa, gyulladással járó bélbetegség és coeliakia

Feniek kimutatását külön előadás mutatja be.

##### Tumormarkerek

Számos gastrointestinalis tumormarker (CEA, CA 19–9, TPA) ismert, azonban alacsony szenzitivitásuk és specifikitásuk miatt elsősorban kezelt pozitív tumorok utánkövetéses vizsgálatában alkalmazhatóak, szűrésre kevésbé.

Egyre több genetikai markert használnak a rizikóbecslésére (APC-teszt).

##### Felszívódási tesztek

*A cukorfelszívódási tesztek* előnye, hogy nincs radioaktív terhelés. Általában egy mono- és egy diszacharid kombinációját adják (mannitol/laktóz vagy szacharóz) szájon át és vizelettel történő ürítést vizsgálják.

*D-xilóz teszt:* A xilóz növényi cukor, pentóz monoszacharid, anyagcsereje hormonálisan nem szabályozott, jejunumból szívódik fel emésztés nélkül. A tesztanyag (5 gramm 100–200 ml vízben oldva) elfogyasztása után 1 órával mérik koncentrációját a vérben, esetenként 5 óra múlva a vizeletben. Normálisan a vér D-xilóz koncentrációja 1 óra múlva >1,3–1,5 mmol/l (30–35 mg/dl), vizeletben 5 óra múlva >7 mmol/l. Ennél kisebb mértékű koncentráció felszívódási zavarra utal, aminek a hátterében súlyos coeliakia és malabsorptiót okozó proximális vékonybél-rendellenességek állnak.

## Neuroendokrin daganatok diagnosztikája

*Laboratory diagnosis of neuroendocrine tumors*

**Dr. Patócs Attila**

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

**Kulcsszavak:** neuroendokrin daganat, hormontermelés, chromogranin A

**Key-words:** neuroendocrine tumor, hormone secretion, chromogranin A

A neuroendokrin daganatok ritka, többnyire jóindulatú elváltozások, amelyeknek a morbiditása a tumorsejtek által termelt hormonok fokozott elválasztásához köthető. Klasszikus értelemben neuroendokrin daganatok az enterochromaffin sejtekből kiinduló tumorok, a carcinoidok és a mellékvesevelő chromaffin sejteiből kiinduló pheochromocytoma. Tágabb értelemben a szervezet más szöveteiben található neuroendokrin sejtekből kiinduló daganatok (a medulláris pajzsmirigy carcinóma, mellékpajzsmirigy adenoma, hypophys adenoma, neuroblastoma) és más hormontermelő daganatok (a kissejtes tüdőrák, prosztatarák, emlődaganatok és a pancreas szigetsejt tumorok) is ebbe a csoportba tartoznak.

Közös jellemzőjük, hogy intracitoplazmatikus (szekretoros) granulumokat tartalmaznak, különböző biogén aminosavakat, peptideket termelnek. A daganatok gyakran tünetmentesek, mások carcinoid vagy egyéb endokrin szindrómák képében jelentkeznek. Felismerésük sokszor nehéz, a pontos diagnózis felállításához a klinikai megjelenés, a laboratóriumi, a képalkotó és újabban a molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeinek együttes értékelése alapján lehetséges.

A laboratóriumi diagnosztikában egyre nagyobb szerepet kap a *chromogranin-A* (CgA). A CgA a chromogranin/secrogranin család tagja a mellékvesevelőben, valamint a gastrointestinalis rendszer és a pancreas endokrin sejteiben képződik. Fiziológiai szerepe kevésbé ismert enzimatiszázásával egy aktív peptid, a pancreastatin képződik. A CgA-ból származó pancreastatin állatkísérletben hyperglykaemiát okoz, gátolja a glükóz indukált inzulinfelszabadulást a pancreas béta-sejteiből. Szintén a CgA hasításából származó *vasostatinnak* vasoconstrictiót gátló hatása van. Klinikai jelentőség szempontjából a legjelentősebb lehet a *catestatin*, amely a sympathicoadrenalis rendszer katecholaminelválasztásának egyik szabályozója, és egyes adatok szerint az alacsony catestatinszint összefügg a növekedett adrenalinintermeléssel, ami hypertenziához vezethet.

A szöveti és szérumszint CgA vizsgálatára alkalmas új laboratóriumi módszereknek köszönhetően a szöveti és szérumszint CgA-szint a carcinoid tumorok specifikus általános markerévé vált. Az 5-HIAA-vizsgálattal szemben előnye, hogy míg az 5-HIAA-vizsgálat a középbél, ritkábban az előbél eredetű carcinoid daganatok biokémiai kimutatására alkalmas, a szérumszint CgA-koncentráció az elő-, közép- és utóbél eredetű daganatos betegekben egyaránt emelkedett. A CgA-meghatározás klinikai indikációi közé tartozik a neuroendokrin daganatok diagnosztikája és a betegek nyomonkövetése. Rosszulátú áttétes daganatok esetében extrém CgA-értékeket igazolhatunk. A vizeletből mérhető 5-hidroxi-indolecetsavval (5-HIAA) szemben jelentős előnye, hogy a hormonálisan inaktív daganatok esetében is emelkedett lehet a szintje; a szérumszint CgA érzékenysége felülmúlja a vizelet-5-HIAA vizsgálat érzékenységét, különösen előbél és utóbél eredetű carcinoid tumorokban, melyek ritkán vagy nem okoznak fokozott 5-HIAA-ürítést. Carcinoid tumoros betegekben a szé-

rum-CgA-szint növekedésének mértéke a tumoros folyamat kiterjedtségét is jelezheti. A szérumszint CgA-értékelésekor ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy a carcinoid tumorokon kívül egyéb neuroendokrin daganatok, pheochromocytoma, illetve mellékvesekéreg-carcinoma esetén is magas szérumszint CgA-koncentráció mérhető. A neuroendokrin daganatok mellett szerepe a prosztatarák diagnosztikájában és alkalmazható és akár normális *prostatspecifikus antigén* (PSA) szint esetén is jelezhet. Emlőrák esetében alkalmazhatóságáról az eredmények ellentmondásosak. Az endokrin mirigy daganatai közül mellekpajzsmirigy hyperplasia, a pajzsmirigy C-sejtes hyperplasiája is CgA növekedést okozhat. Emelkedett értékeket találhatunk veseelégtelenségben, májelégtelenség és súlyos szívélégtelenségben is.

Fontos megjegyezni, hogy egyes neuroendokrin daganatokban a CgA-t hasító enzim hiánya miatt a CgA-ból nem képződik pancreastatin, ezért a szérumszint pancreastatin kimutatásán alapuló vizsgálatok érzékenysége kisebb lehet. A carcinoid tumorok diagnózisára a többi újabb marker, mint pl. a *szérum neuronspecifikus enoláz* (NSE) vagy a *tumor M2-piruvát-kináz izoenzim* (TM2-PK) diagnosztikus értéke is alulmarad a szérumszint CgA-vizsgálat értékéhez képes.

A hypaciditás, atrophias gastritis, valamint a savszekréció-gátlás (pl. protonpumpagátló kezelés) során a másodlagos hypergastrinaemia és a gyomor enterochromaffin-szerű sejteinek aktivációja miatt nő a szérumszint CgA-szint. A CgA-szint mérése előtt gyógyszerterápiától függően legalább három felezési idő hosszúig az ilyen kezelés felfüggesztése javasolt. Az étrendi tényezők kevésbé befolyásolják szérumszintjét, tehát olyan az megszorításoktól, mint amilyeneket a vizelet 5-HIAA vagy a vizelet-katecholamin meghatározásakor érvényesítünk, a CgA-méréskor eltekinthetünk.

A CgA-meghatározás 2009-ig kizárólag radioimmunoassay-vel történt, jelenleg a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően a CisBio cég kettős, monoklonális antitestet használó reagenseivel is végezhető. Ez ugyanazokat az antitesteket használja, mint amelyeket a RIA is használt, a két módszer között mind érzékenységben, mind pedig a referenciartomány vonatkozásában is nagyfokú a hasonlóság.

A CgA-szint mérése mellett továbbra is fontos a gyűjtött vizelet *5-HIAA-szint* meghatározása neuroendokrin daganat gyanúja esetén. Az 5-HIAA a szerotoninle bomlás végterméke, szerotonint termelő daganatok esetén a specificitása rendkívül magas (100%), de az érzékenysége valamivel kisebb (73%). Sajnos a hormonálisan inaktív daganatok során értéke normális is lehet. Hangsúlyozzuk, hogy a szerotoninnak is van napszaki ritmusa, ezért mindenképpen javasolt a 24 órás vizeletgyűjtés. Fals emelkedést coeliakia, Whipple-kór és bizonyos ételek (banán, kiwi, földimogyoró, kakaó, avokádó), gyógyszerek (acetaminophen, naproxen) tapasztalhatunk.

Neuroendokrin daganatok tumormarkere a *neuronspecifikus enoláz*, ami a neuroectodermális eredetű sejtekre jellemző. Elsődlegesen a neuroblastoma diagnosztikájában használ-

ják, de kissejtes tüdőrákban, prosztatrákban és pajzsmirigy-rák esetén is fontos diagnosztikus eszköz.

A neuroendokrin daganatok sejtspecificitása miatt a gastrinomák vagy a vazóaktív intestinalis peptidet (VIPoma) termelő daganatok diagnosztikájában fokozott jelentősége van a *gasztrin*-, illetve a *VIP-koncentráció* meghatározásának. A gasztrin a gyomor, duodenum és hasnyálmirigyben termelődő peptidhormon, amely a gyomorsav-elválasztást stimulálja. Emelkedett értékeket Zollinger–Elison-szindrómában, multiplex endokrin neoplasia 1-es típusához (MEN1) társult gastrinoma, esetében, G-sejtes hyperplasia, súlyos

májbetegség, cirrhosis, veseelégtelenség, rövid bél-szindróma, pylorusstenosis, vagotomia utáni állapot, autoimmun gastritis, savcsökkentő szerek adása során mérhetünk.

A neuroendokrin daganatok közül számos, öröklődő endokrin tumorszindróma részeként léphet fel. Ezek közé tartozik a MEN1 mellett a de Carney-komplex, von Hippel–Lindau-szindróma és MEN2, amelyeknél szintén is előfordulhatnak neuroendokrin daganatok. Ezeknek a szindrómáknak jól ismert a genetikai háttere, molekuláris genetikai eljárásokkal a felelős génelterések beazonosíthatóak. A mutációszűrésnek jelentősége van a még tünetmentes, de mutációt hordozó egyének a korai diagnózisa során.

## Autoimmun betegségek laboratóriumi diagnosztikája

Laboratory Diagnosis of Autoimmune Diseases

### Dr. Gergely Péter

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Immunológiai Laboratórium

*Kulcsszavak:* autoimmun betegségek, laboratórium, diagnózis, autoantitest, komplement

*Key-words:* autoimmune disease, laboratory, diagnosis, autoantibody, complement

### Az autoimmun betegség klinikai diagnózis

Nincs általában vett autoimmunítást igazoló laboratóriumi vizsgálat vagy vizsgálati panel. A kezelőorvosnak a betegség tünete alapján munkadiagnózist kell felállítani, s ennek megerősítését vagy kizárását szolgáló laboratóriumi tesztek kell kérnie. A legfontosabb tesztek e tekintetben az autoantitest-vizsgálatok.

### Antinukleáris antitest (ANA)

Az antinukleáris antitest (ANA) gyűjtőfogalom, mely nagyon sokféle specificitású antitestet jelent. Az ANA „screen” a legtöbb szisztémás (és nem szisztémás) autoimmun betegségben, de tumorokban, gyulladásokban is pozitív lehet. A pozitív lelet további diagnosztikai lépéseket indokol. Az ANA-vizsgálat elvégzendő szisztémás autoimmun betegségek, systemás lupus erythematosus (SLE) és rokon kórképek, illetve autoimmun hepatitis gyanúja esetén, valamint juvenilis idiopathiás arthritis (JIA) diagnózisa esetén differenciáldiagnosztikai és prognosztikai céllal. Az ANA számos különböző antitestet foglal magába:

1. *Centromer antitest:* elsősorban limitált cutan scleroderma-ban, ritkábban primer biliaris cirrhosisban (PBC) fordul elő. Diagnosztikai jelentősége: scleroderma gyanúja, differenciáldiagnózisa, Raynaud-szindróma differenciáldiagnózisa – a pozitívítás a scleroderma későbbi kialakulását jelzi, illetve PBC prognosztikája – a pozitív lelet a scleroderma egyidejű fennállására utal.
2. *ENA (extrahálható nukleáris antigének elleni antitestek):* szintén gyűjtőnév. Az Sm, majd U1–RNP, SS-A és SS-B, később a PCNA, Scl-70, Ku, Mi-2, Jo-1 és PM-1 antitesteket szokás ebbe a csoportba sorolni. A fentiek közül az alábbiakat vizsgáljuk:
  - a) *SS-A (Ro) és SS-B (La) antitestek:* diagnosztikai jelentősége primer vagy szekunder Sjögren-szindróma (SS), SLE, subacut cutan lupus (SCLE), valamint neonatalis lupus gyanúja, illetve diagnózisa esetén van. Az SS-A és B nagyon gyakran együtt fordul elő.
  - b) *Scl-70 antitest:* (a DNS topoizomeráz I elleni antitest) diffúz scleroderma-ban (PSS-ben) fordul elő, és rossz

prognózisra utal. A Raynaud-betegek egy része pozitív, ezekben a PSS kockázata nagy.

- c) *Jo-1 (aminoacil-tRNS-szintetáz) antitest:* polymyositis/dermatomyositisben (annak is egy alcsoportjában, az anti-szintetáz szindrómában) fordul elő. Diagnosztikai jelentősége: polymyositis-dermatomyositis diagnózisa/differenciáldiagnosztikája, ismeretlen eredetű fibrotizáló alveolitis differenciáldiagnosztikája.
  - d) *(U1)-RNP antitest:* Kevert kötőszöveti betegségben (MCTD-ben) diagnosztikai kritérium, SLE-ben gyakran pozitív és elsősorban a bőr-nyálkahártya laesiokkal függ össze, diffúz scleroderma-ban kevésbé gyakori és a tüdőfibrosissal kapcsolatos.
  - e) *Sm antitest:* SLE-ben diagnosztikai kritérium. Más autoimmun betegségben nem észlelhető.
3. *Hisztón antitest:* nagyon sok szisztémás autoimmun betegségben (SLE, gyógyszerindukált lupus, RA, JIA, PSS stb.), előfordul. Diagnosztikai jelentősége a ritka gyógyszerindukált lupus diagnózisa (ilyenkor ANA és hisztón antitest pozitívítást észlelünk, de a DNS antitest negatív).
  4. *Anti-(natív) DNS antitest:* az SLE diagnózisához szükséges, de a betegség monitorozására is alkalmas. Negatívítása gyakorlatilag kizárja az aktív SLE-t. A jelentősen magasabb érték nagyon nagy valószínűséggel SLE-t jelez. A növekvő érték betegségaktivitás mellett szól.

### Szervspecifikus antitestek

1. *Antimitokondriális antitest (AMA)* – pozitívítása primer biliaris cirrhosisban diagnosztikus értékű, de ritkán a teszt pozitív lehet egyéb autoimmun (ún. overlap) hepatitisben is.
2. *A szimaizom elleni antitest (SMA)* primer biliaris cirrhosisban, autoimmun hepatitisben szinte mindig pozitív, de számos (vírusos, alkoholos) májbetegségben is lehet pozitív, ezért diagnosztikus értéke csekély. Az ANA-val együtt az autoimmun hepatitis osztályozására használható: az 1. típusban pozitív.

3. *Az antimikroszomális antitest (LKM-1)* krónikus hepatitiszben fordul elő, a 2. típusú autoimmun hepatitisre jellemző.
4. *A májspecifikus proteinek (LSP) elleni antitestek* a 2. típusú autoimmun hepatitisre jellemzők.
5. *Coeliakia (gluténszenzitivitás) diagnosztika:* ezek az antitestek a coeliakia és a vele rokon bőrbetegségek (dermatitis herpetiformis) diagnosztikájára szolgálnak. Az *antiretikulin antitest* elsősorban szűrővizsgálatra alkalmas, szenzitivitása kicsi. A *gliadin, endomysium és szöveti transz-glutamináz (tTG) elleni antitestek* közül az utóbbiak a leginkább specifikusak, de csak az IgA típusú tTG antitestnek van diagnosztikus jelentősége (az IgG csak definitív IgA hiány esetén!).
6. *A parietalis sejt elleni antitestek* autoimmun eredetű krónikus atrophias gastritisre (illetve idiopathias anaemia perniciosára) jellemzőek.
7. *A pajzsmirigy elleni antitestek: az antithyreoglobulin és antimikroszomális antitestek (más néven antiperoxidáz, TPO antitestek)* autoimmun pajzsmirigy betegségekben (Hashimoto-thyreoiditisben és idiopathias myxoedemában) diagnosztikus értékűek. Gyakran pozitívak, habár mennyiségük kisebb Graves-kórban és néha pajzsmirigyadenocarcinómában is.
8. *A mellékvese (kéreg) elleni antitestek* autoimmun (idiopathias) Addison-kórban mutathatók ki. A diagnosztizhoz nem szükségesek, csak a betegség kórereditére utalnak.
9. *Az antiglomerularis basalis membrán (GBM) antitest* Goodpasture-szindrómában (illetve anti-GBM nephritisekben) pozitív és egyben diagnosztikus értékű.
10. *Acetilkinin-receptor elleni antitestek:* myasthenia gravisban, illetve Lambert–Eaton-szindrómában és néha májbetegségekben is pozitív eredményt kaphatunk.
11. *Hámantigének elleni antitestek:* A desmosoma (desmoglein-1 és -3) elleni antitestek pemphigus vulgarisban és foliaceusban fordulnak elő. Az epidermalis basalis membrán elleni antitestek bullosus pemphigoidban és a vele rokon betegségekben (pl. dermatitis herpetiformisban) észlelhetők.
12. *Diabetesre jellemző antitestek:* autoimmun diabetesben – alcsoporttól függően – több autoantitest is kimutatható: inzulin-, glutaminsav-dehidrogenáz (GAD), protein tirozin-foszfataz IA-2 (IA-2Ab), illetve egyéb antitestek – diagnosztikus jelentőségük csekély.
13. *Saccharomyces cerevisiae (SA) antitest:* az IgG és IgA osztályba tartozó SA antitest a gyulladásoos bélbetegségekre, ezen belül is a Crohn-betegségekre jellemző (szenzitivitása >90%), s bár diagnosztikai haszna (még az egyidejűleg végzett p-ANCA teszttel is, mely viszont inkább colitis ulcerosában pozitív) nem túl nagy, az SA-pozitivitás rosszabb prognózist jelent.
14. *Gangliozid, aszialogangliozid antitestek (GQ 1b, GD1b és GM1 elleni antitestek):* autoimmun eredetű perifériás neuropathiákban fordulnak elő.
15. *Antineutrofil citoplazma antitestek (ANCA):* neutrofilek citoplazmájában lévő antigének („antineutrofil citoplazma antitest”) gyűjtőneve. Fontosabb formái: proteináz-3 (PR3), mieloperoxidáz (MPO), elasztáz, laktoferrin, baktericid permeabilitást fokozó protein (BPI). A festődés mintázata háromféle: citoplazma (c), perinuclearis (p) és atípusos lehet. A c-ANCA mintázat leggyakrabban a PR3 és BPI, a p-ANCA mintázat pedig leggyakrabban a MPO jelenlétére utal, de ilyet ad az elasztáz és laktoferrin is. A BPI gyakran atípusos festődést ad. Az ANCA screen indi-

- kációi: ANCA pozitív vasculitisek (Wegener-granulomatosis, mikroszkopikus polyangiitis) gyanúja, nephritisek differenciáldiagnosztikája, krónikus gyulladásoos bélbetegség (IBD) gyanúja, primer sclerotizáló cholangitis gyanúja, vérzésoos alveolitis differenciáldiagnosztikája.
16. *Proteináz-3 (PR3) antitest:* nagyon specifikus Wegener-granulomatosisra (>95%), még az atípusos formákra (pl. izolált perifériás neuritis, idiopathias necrotizáló nephritis stb.) is. Előfordul még egyéb vasculitisekben is.
17. *Myeloperoxidáz (MPO) antitest:* Előfordulás: mikroszkopikus polyangiitisben (60–80%), egyéb eredetű focalis nekrotizáló glomerulonephritisben, gyors progressziójú glomerulonephritisekben, ritkán Wegener-granulomatosisban, Churg–Strauss-szindrómában. Goodpasture-szindrómában (30–40%), illetve a szisztémás autoimmun betegségekre, pl. RA, SLE bizonyos százaléokban.

#### Antifoszfolipid antitestek

Szintén gyűjtőfogalom, különféle anionos és neutrális foszfolipidek, illetve az ezeket kötő különféle glikoproteinek elleni antitestek tartoznak ide. Legfontosabb formái: a kardiolipin (ACA), illetve a foszfatidilszerin elleni antitestek, valamint a  $\beta$ 2-glikoprotein I ( $\beta$ 2GPI) és a protrombin elleni antitestek – melyeket enzim immunoassay-vel (EIA) mérünk, illetve a lupus anticoagulans (LA), valamint a hexagonális foszfolipid-teszt, melyeket funkcionális teszttel mérünk.

Az antitestek a primer és szekunder antifoszfolipid szindrómában (APS) fordulnak elő. A teszt (ACA és  $\beta$ 2GPI EIA + LA) elvégzendő: primer vagy szekunder APS gyanúja esetén, SLE-ben a thrombosisveszély rizikójának felmérésére, valamint ismeretlen thrombocytopeniában, SLE gyanúja esetén (diagnosztikai kritérium), illetve az APS kezelés monitorozására.

#### Rheumatoid faktor (RF)

A rheumatoid faktor (RF) pozitív rheumatoid arthritisben (RA-ban) (pontosabban a betegek nagyobb részében), és egyúttal az RA-ban diagnosztikai kritérium is. Igen gyakran pozitív Sjögren-szindrómában és esszenciális kevert cryoglobulinaemiában, azonban nem szenzitív. Az RF számos betegségben (autoimmun betegségekre, infekciókban stb.) lehet pozitív, specifikitása nagyon alacsony.

#### Ciklikus citrullinált protein elleni antitest (anti-CCP)

A citrullinált protein antitestek (ACPA) közül a ciklikus citrullinált protein elleni antitest (anti-CCP) vizsgálata terjedt el. Ez sokkal specifikusabb az RA-ra, mint az RF. Korai stádiumban már gyakran kimutatható és rossz prognosztikai tényező. A RA új klasszifikációs kritériumrendszerében már szerepel.

Az autoantitestek mellett a komplementrendszer és a gyulladást jelző akut fázisfehérjék vizsgálata is fontos része az autoimmun betegségekre vizsgálatának.

#### C-reaktív protein (CRP)

A mindennapi gyakorlatban az akut fázis reakció mértékét a C-reaktív protein (CRP) szintjével jellemezzük. Bár a legtöbb autoimmun betegségben az SLE kivételével a betegség aktivitása és a CRP-szint között szoros a kapcsolat, a CRP-szintet elsősorban a RA aktivitásának megítélésére használjuk. A CRP-szint mérése (a SLE kivételével) a betegségekre fennálló gyulladás monitorozására alkalmas.



## Citokinszintmérések

*Cytokine level measurements*

### Dr. Bekő Gabriella

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

**Kulcsszavak:** áramlási citometria, ELISA, elektrokemilumineszcens immuneszt, biochip, bioplex

**Key-words:** flow cytometry, ELISA, elektrochemilumineszcens immunoassay, biochip, bioplex

Az immunrendszer sejtjei között a kommunikáció citokineken, kis, 8–40 kDa nagyságú fehérjemolekulákon keresztül valósul meg. A legtöbb citokint egészséges körülmények között nem termelik a sejtek, csak speciális hatásokra, melyek gyakorlatilag azonosak a „sejt stresszorokkal” (például UV fény, hőhatás, hiperozmolalitás vagy az idegen felszín). A szintézis után a citokinek azonnal kiválasztódnak a sejtből, ezáltal biztosítva a gyors hatás kialakulását.

A citokinek fokozzák vagy gátolják az immunkompetens sejtek aktiválását, proliferációját és differenciálódását, ezáltal szabályozzák az immunfolyamatokat, az immunválasz intenzitását, tartamát, az ellenanyagok szintézisét és további citokinek termelését. Valamennyi immunsejt képes citokinek termelésére, illetve rendelkezik citokinreceptorokkal. Immunmoduláló hatásuk autokrin, parakrin, pleiotrop és ritkán endokrin. Autokrin hatásuk révén maga a termelő sejt a célpont. Parakrin módon közvetlen környezetükben található sejteket készítetik citokin termelésre. Az endokrin hatás pedig távoli sejtszövetek aktiválását is eredményezheti. Pleiotrop sajátosságuk következtében egyszerre sokféle hatást válthatnak ki a különböző targetsejteken. Ugyanakkor redundanciák is, mert többféle citokin képes azonos választ kiváltani. Ismert a citokinek közötti szinergista és antagonistá kölcsönhatás is.

### Citokinszint-mérési módszerek

A citokinek élettani folyamatokban és betegségekben játszott szerepére vonatkozóan több mint két évtizede gyűlnek az adatok. Ezek azonban sokszor nem egyértelműek vagy elmentmondásosak, amiben a metodikai problémák kulcsszerepet játszanak.

A citokinszintek és növekedési faktorok meghatározását több tényező nehezíti. A legfontosabbak:

1. Az ugyanolyan néven, jellel jelzett citokin a szervezetben monomer és polimer formában is jelen lehet; többféle alegységből áll, melynél az egyes alegységeket külön sejtípusok termelik; illetve kémiaiilag sem mindig jól karakterizáltak. Mivel fehérjéről van szó, amelyek sokszor több epitóppal rendelkeznek, a szintek mérése során alkalmazott immunanalitikai módszerek szenzitivitását és specifikitását, de a referenciatartományt is alapvetően meghatározza a gyártás technológiája, a vegyszer sorozatszám.
2. Nyugalmi állapotban a citokinszintek a plazmában igen alacsony (pmol/l) koncentrációban vannak jelen, azaz jelentős hányaduk nem is detektálható.
3. Stimulus hatására a citokinszint többszörösére emelkedik, de ez a változás átmeneti, citokinenként különböző kinetikát mutat.
4. Mivel a citokinek hatásukat egy komplex rendszer részeként fejtik ki, sok esetben az 1–1 citokin klinikai jelentőségére korlátozó mérés eredménye nem informatív.

A fenti problémák figyelembevételével mellett az alábbi mérési technikák terjedtek el.

### Intracelluláris citokinek és kemokinek kimutatása áramlási citometriával

A T-lymphocyták aktivációját követően a citokinek/kemokinek a citoplazmában feldúsulnak, és csak ezután választódnak ki. Az intracelluláris citokinek a citoplazmában fluoreszcens festékekkel jelzett specifikus ellenanyagokkal, áramlási citofluorimetriával, immunhisztokémiai módszerekkel vagy immunfluoreszcens mikroszkópos technikákkal vizsgálhatók. A sejt felszíni markerek egyidejű kimutatásával az adott citokintermelő sejt típusa is azonosítható, és a citokint termelő sejtek aránya is megadható. A mikroszkópos elemzés a sejten belüli lokalizáció meghatározására alkalmas.

### ELISA módszer

A citokinek klasszikus ELISA-val való kimutatásakor a kettős szendvics módszert alkalmazzák, melynek fajlagossága igen nagy. Ezzel a módszerrel a citokinek mennyisége a biológiai aktivitásuktól függetlenül mérhető, ezért – főként a rövid életű fehérjék esetében – az eredmény nem mindig jelzi a tényleges biológiai aktivitást. A mérést az is befolyásolhatja, hogy a különböző citokinek oldott formájú receptorokhoz vagy inhibitorokhoz kötött formában is előfordulhatnak.

Az utóbbi években immunkémiai automatákra is fejlesztettek citokin teszteket. Az „ECLIA” (elektrokemilumineszcens immunoassay) Elecsys és Cobas E immunológiai analízátorokon alkalmazható módszer. Ezt leginkább interleukin-6 (IL6) mérésére használják, ami az akut gyulladás korai indikátora, koraszülött és újszülöttkori szepszisben jól használható marker. Immunolyte automatára IL6, IL8 és TNF $\alpha$  teszteket fejlesztettek. Ezek a proinflammatorikus citokinek akut gyulladásban, sepsisben segíthetik a korai diagnózist. Az automatákon mért citokinszinteknek óriási előnye, hogy egy-két órán belül, ügyeleti időben is elkészül az eredmény.

### Biochip és bioplex módszerek

A citokinfunkciók komplexek, így egy citokinprofil nagyon értékes információt jelenthet egy adott immunválaszban. Nagy előrelépést jelentett a citokin biochip panelek és a mikrogöngyökhöz kötött citokin antitestek, a BioPlex panelek megjelenése, amikor egyszerre tudunk 12 vagy akár 27 citokint, növekedési faktort vizsgálni.

**Biochip technika citokinek, kemokinek és növekedési faktorok kimutatására.** Ez a protein array a nagyon kis koncentráció (pg/ml), és a zavaró tényezők kizárása végett háromféle immunoassay-t alkalmaz egyszerre:

1. kompetitív immunoassay (enzimmel jelölt analitot használ)

2. sandwich immunoassay (enzimmel jelölt antitestet használ)
3. antibody capture immunoassay

Radox Biochip módszert (Radox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom) használva a kemilumineszcens jeleket egyszerre méri egy készülék egy hűtött CCD kamerával és standard kalibrációs görbékhez hasonlítva kiértékeli egy speciális programmal a teljes arrayn. Egy chip mérete, melyre a beteg 100 µl mintáját pipettázzuk, mindössze 9 mm × 9 mm. Ezzel a módszerrel 3–4 óra alatt 42 beteg 12 pro- és anti-inflammatorikus citokinjét és növekedési faktorát (háromszintű kontrollálást használva) tudjuk lemérni. A Radox teljes automata (EVIDENCE) készülékkel is rendelkezik a biocipek méréséhez. Ebben a rendszerben egy chip felületére maximum 23 analit (antitest) köthető. A citokinek mellett számos panelt fejlesztettek ki.

**Bio-Plex technika citokinek, kemokinek és növekedési faktorok kimutatására.** A Bio-Plex technika az xMAP (x(number) Multi – Analyte Profiling/Multiplexing) technológián alapul, melyet a Luminex (Luminex Corporation; Austin, USA) multiplex assay-vé fejlesztett az elmúlt néhány évben. A megoldás a chiptechnikán (szendvics és kompetitív immunoassayt használva) és a flowcytometrián alapul.

Mikrogyöngyöket (5 µm átmérőjű, poliszitirén) vörös és infravörös festékekkel színezik. A két festék aránya 100 különböző gyöngytípust eredményez, így egy plexen egyszerre elméletileg százféle vizsgálat is mérhető. A gyöngyökhöz különböző monoklonális antitesteket kötnek, melyek összekeverhetők és a microplate lyukaiból a chiphez hasonlóan egyszerre mérhetők. A szendvics ELISA utolsó lépéseként fluoreszcens jelölést használnak. A készülék kapillárisán áthaladó valamennyi gyöngyöt 2 színű lézer világítja meg. A piros

fény a gyöngy típusát érzékeli, a zöld, pedig a fluoreszcens jel intenzitását méri. A speciális software összerendezi a jeleket, és a standard görbékhez hasonlítva kiírja a plexben mért citokinek értékeit. A módszer szenzitivitása és érzékenysége az ELISA tesztekhez hasonló. A dinamikus range citokineknel lényegesen szélesebb (1,95–32 000 pg/ml), mint az ELISA és a Biochip mérések esetén.

A módszer előnyei közül ki kell emelni a flexibilitást. Citokinek esetén ez azt jelenti, hogy egy plexen tetszőleges válogatásban és számban (akár 27 féle) citokin, kemokin, növekedési faktor mérhető (biochip módszernél mindig ugyanazt a 12 félélet mérjük). A minta a szérumon, plazmán és szöveti felülzónán kívül, bármely testnedv vagy szöveti homogenizátum lehet. A szükséges mintamennyiség 50 µl. A vizsgálatok költsége harmada az ELISA módszerrel mért tesztekének, ráadásul minél több tesztet mérünk egy plexben, a fajlagos költség annál kisebb.

A flexibilis multiplexek nemcsak a citokinek mérésénél nyújtanak segítséget, hanem más fehérje és génexpressziós profilok, autoimmun betegségek, genetikai betegségek és HLA vizsgálatok terén is gyors, pontos, átfogó eredményekhez juthatunk.

A labordiagnosztika mai színvonala tehát lehetővé teszi azt, hogy ne izoláltan, egy-két citokinre vonatkozóan lehessen adatokat gyűjteni, hanem meg lehessen határozni az egy adott betegre, betegségeire jellemző citokinprofilot. Az eredmények értékelését azonban megnehezíti az a tény, hogy

1. nem ismert, hogy a különböző multiplex rendszerek által mért adatok mennyire állnak összhangban;
2. kevés az arra vonatkozó adat, hogy az egy adott multiplex rendszerben mért értékek mennyire reprodukálhatóak;
3. a nagyszámú adat feldolgozása, az egy adott betegből ismételt végzett mérések eredményének az értékelése új statisztikai megközelítéseket indokolnak.

## Áramlási citométerek klinikai alkalmazása

*Clinical application of flow cytometry*

**Dr. Vásárhelyi Barna, Dr. Mészáros Gergő**

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

*Kulcsszavak:* fluoreszcencia, sejtfelszíni antigén, festék, antitest  
*Key-words:* fluorescence, surface antigen, dye, antibody

Az áramlási citométerek (FCM) lézerefény által gerjesztett szórt- és fluoreszcens fényjelek alapján azonosítják a kívánt sejtet, fehérjét.

### Preanalitika

Klinikai minták (vérsejtek vizsgálata) esetén optimális a heparinnal alvadástól vérminta használata. A vérmintát feldolgozásig szobahőmérsékleten kell tartani. Az izolált sejtek a mérésig fagyaszthatóak, a fagyasztás protokollja alapvetően befolyásolja a későbbi mérés minőségét. Szérumban oldott antigének (pl. citokinek) esetében tárolási hőmérséklet meghatározza a reprodukálhatóságot.

### Mérés elve

Az FCM sejt- vagy mikrogyöngy-szuspenzióból folyamatosan vesz ki mintát, majd egy-egy sejtisélességű folyadékoszlopot alakít ki. A folyadékoszlop lézerefényen keresztül halad át. A lézer hullámhossza különböző lehet, leggyakrabban kék (488 nm-es) és vörös (633 nm-es) lézert használnak. Amikor a vizsgálandó 0,2–150 mikron méretű részecske a lézerefény fókuszpontjába ér, a ráeső fény oldalirányba (side scatter) és előrefelé (forward scatter) szóródik. Az előre szóródó fény a sejt (részecske) méretéről ad információt, és további módosítás nélkül külön csatornán (FSC) detektálható. Az oldalra szóródó fény a sejt granuláltságának, méretének, morfológiai tulajdonságainak detektálására szolgál (side

scatter, SCC). E két paraméter segítségével például az egyes fehérvérsejtcsoportok elkülöníthetők.

A szórt fényjelek mellett az FCM a lézérfényvel való gerjesztés hatására kialakuló fluoreszcens fényt is detektálni tudja meghatározott hullámhosszokon. Ezt a lehetőséget használják ki akkor, amikor fluorokróm festékekkel, pl. jelzett antitesttel megjelölt sejteket vagy részecskéket vizsgálnak.

A fluoreszcens jeleket a készülék optikai szűrők segítségével elkülöníti egymástól, és fotoelektron-sokszorozók és erősítők segítségével felerősíti azokat. A különböző hullámhosszúságú fényjeleknek megfelelő csatornák segítségével az egyes fluorokrómok által kibocsátott jelek elkülöníthetők és külön értékelhetők. (A fluorokrómok spektrumai részben átfedhetik egymást. Ez ahhoz vezethet, hogy két fluorokróm egyidejű alkalmazása esetén az egyik fluorokróm fluoreszcens jele hozzáadódik a másik jeléhez. A mérések beállításakor a kompenzáció során ezt figyelembe veszik és így csökkentik ezt a hatást.)

A szórt fényből és a fluoreszcens fényből kapott jelek különböző kombinációit használva lehet információt kapni arra vonatkozóan, hogy az egyes fluorokrómok az adott sejten / részecskén milyen mértékben vannak jelen.

A mérési eredmények ábrázolása dot-plot és hisztogram segítségével történik. A dot-ploton az egyes sejtekről/részecskékről kapott fényjelek ábrázolhatóak intenzitásuk függvényében. A hisztogram egy paraméter jelintenzitása alapján mutatja a sejtek megoszlását. A készülék lehetőséget ad arra, hogy a megfelelő fluoreszcencia-intenzitás értékek alapján az egyes sejt/részecske populációkat ki lehessen válogatni (kapuzás vagy „gate”-elés) és arányukat az összes sejt/részecske populációhoz viszonyítva meg lehessen adni. Ezen túl egyes műszerek kapcsán a meghatározott intenzitást mutató sejtek kiválogathatóak („sorting”).

#### Alkalmazási területek

Az FCM-t kutatási célra és a diagnosztikában egyaránt széles körben alkalmazzák. FCM-mel vizsgálhatóak az alábbi paraméterek:

1. sejt morfológia;
2. sejt ciklus;
3. apoptózis (DNS-degradáció, mitokondrium membrán potenciál, kaspáz aktivitás);
4. kromoszómaszám;

5. fehérje-expresszió és -lokalizáció;
6. transzgen modellekben a transzfekció eredményessége;
7. sejt felszíni antigének (cluster of differentiation (CD) markerek);
8. intracelluláris antigének (különböző citokinek, másodlagos jelátvivők);
9. sejt mag antigének (transzkripció faktorok);
10. sejt funkciók (ionizált kalciumszint, membrán potenciál, membrán fluiditás);
11. oxidatív burst;
12. mikropartikulum-vizsgálatok.

A klinikai munkában már alkalmazzák:

- ▶ leukaemia és lymphoma immunfenotipizálása;
- ▶ immundeficiencia (immunsejtek prevalenciájának a monitorozása);
- ▶ RNS-tartalom (retikulocita-szám);
- ▶ multiplex citokinszint-mérés mikrogyöngyökkel;
- ▶ multidrog-rezisztencia vizsgálat (rák kemoterápia); sejtek túlélésének vizsgálata;
- ▶ anyai vérben magzati vörösvérsejtek kimutatása;
- ▶ vérkészítmények minőségellenőrzése;
- ▶ HLA-tipizálás;
- ▶ őssejtek prevalenciájának a meghatározása;
- ▶ transzplantációt megelőzően: a grafitban *ex vivo* T-sejt depléció mérése;
- ▶ transzplantáció után: immunfolyamatok monitorozása;
- ▶ mikrobiológiai vizsgálatok: kórokozók identifikálása, az antimikrobiális érzékenység mérése;
- ▶ IVF esetén spermiumok kiválogatása.

Az FCM *előnye* a nagy sebesség (másodpercenként akár 70 ezer esemény detekciója); egyedi sejtek vizsgálata rendkívül nagy számban; ugyanazon sejt esetében többféle paraméter egyidejű elemzése. A nagy eseményszámnak köszönhetően kis sejt populációkat (ritka eseményeket) is lehet detektálni. Egyes, a sejtek életképességét nem befolyásoló festékeket alkalmazó mérések során (pl. az intracelluláris kalciumszint vizsgálatok) egyidejűleg többféle sejtben lehet a bekövetkező időbeli változásokat nyomon követni.

Az FCM *hátránya* az ára; az intracelluláris struktúrák általában nem vizualizálhatóak vele; szövetek esetében a sejtek szolubilizálni kell (szöveti szerkezet elveszik).

## Újabb típusú hematológiai automaták

*New series of hematology analyzers*

### Dr. Bekő Gabriella

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Központi Laboratórium (Pest)

*Kulcsszavak:* automaták működési elve, festési módszer, NRBC, MCVr, Chr, IRF, FRBC, IPF

*Key-words:* principles of operation and staining of automated analyzers, NRBC, MCVr, Chr, IRF, FRBC, IPF

A vérsejtek automatával történő számolása alig több mint 50 éves múltra tekint vissza. A módszer harmonizációja, standardizációja, a számolt paraméterek elfogadása az 1990-es évek végén történt. A XXI. század modern komputer és network technikái hozzájárultak a mechanikai és algoritmusokon alapuló kontrol rendszerek kifejlesztéséhez. Így a he-

matológiai automaták napjainkban már képesek részletekbe menő, pontos eredményközlésre.

#### Hematológiai automaták

A hematológiai automaták teljesen *megbízható értékeket* adnak: fehérvérsejtszám, vörösvérsejtszám, hemoglobin kon-

centráció és MCV (mean cell volume) tekintetében. Ezek a mérések referens módszere visszavezetők, a készülékek kalibrációjánál az elsődleges vagy másodlagos kalibrátort használják a gyártó cégek.

*Nagyobb odafigyelést kíván* a kvalitatív fehérvérsejt-eloszlás és thrombocytaszám (főként az alacsony thrombocytaszám vagy az óriás thrombocyták jelenlétekor). A hematológiai automata működési elvétől függ a szétválasztás lehetősége és a thrombocytaszámlálás módja.

A standardizáció hiánya miatt a készülék típusától függ az RDW (RBC distribution width), az MPV (mean platelet volume) és a PDW (platelet distribution width) referenciaértéke.

A hematológiai automata mérési elvéből és a készülék által használt festésből adódó különbségek a következők.

▶ *Advia 120, 2120* típusú hematológiai automaták

A Magyarországon jelentős számban használt automaták kis és nagyszögű lézertektorral, valamint mieloperoxidáz festéssel dolgoznak. A monocyták citoplazmáját a peroxidáz narancssárgára festi, a neutrophil sejtek granuluma szürkére festődnek, míg az eosinophil punktátumok feketék. Ha a fehérvérsejt peroxidáz aktivitása csökken, akkor a készülékkel számolt kvalitatív vérvék nem értékelhető. Erre az eltérésre a készülék egy hibajelzessel, „flag”-gel (MPO index) is figyelmeztet. Ezen automatával való mérésnél egy hatodik part. differential is megjelenik, a LUCs (large unstained cells). Ezek a nagy nem festődő sejtek lehetnek aktivált lymphocyták, plazmasejtek, hajas sejtek, gyermekkori nagy lymphocyták, mieloperoxidáz negatív blastok vagy mieloperoxidáz negatív neutrophil granulocyták. Így ezek a készülékek segítenek az infekciók differenciáldiagnosztikájában, a vírusbetegségek esetén az aktivált lymphociták megszorodásával a nagy nem festődő sejtek száma 10–20%-ot is elérhet. Továbbá felhívhatják a figyelmet blastok jelenlétére, ilyenkor erre BLASTS morfológiai flag is figyelmeztet.

▶ *A Sysmex automaták (XE-2100, XT-2000i, XT-2100d, XE-5000, XT-4000i)*

Fluoreszcens festést használnak. A sejtek emelkedett nukleinsav (DNS vagy RNS) tartalmával arányos a fluoreszcens jel nagysága. Ezért ezeken a készülékeken az éretlen granulocytákat különíthetjük el. A metamyelocyták, a myelocyták és a promyelocyták kerülnek az IG (Immature granulocytes) frakcióba. A legújabb típusú készülékeken már nemcsak szemikvantitatív jelzést (+, ++, +++), hanem számszerűen %-ban megkapjuk ezt az ún. 6. part. differentialt.

*Az éretlen granulocyták száma emelkedhet:* bakteriális infekció; akut gyulladás; tumor (csontvelő metastasis); szöveti necrosis; akut transzplantátum rejekció; sebészeti, ortopédiai trauma; mieloproliferatív betegség; szteroidkezelés; terhesség (harmadik trimeszter). Nagyobb a jelentősége akkor, ha idősek, újszülöttek, koraszülöttek akut infekciójakor a fehérvérsejt- vagy granulocytaszám változás nem jellegzetes (ilyen esetben ez lesz az első balratolódásra utaló jel a vérképben). Fontos lehet myeloszuppresszált betegek akut infekciójakor, vagy neutropeniával járó szepszis esetén is.

▶ *Beckman Coulter DXH-800-as automata*

Ezen a fehérvérsejt differenciálás festés nélkül történik. A sejteken, a sejtek magjain és granulumaiban szóródott lézer fényt 7 detektor segítségével szedi össze, és egy számítógépes program háromdimenziós felhődiagramot készít. Ezen láthatóak az éretlen granulocyták, lymphocyták és monocyták is.

▶ *Coulter és a Sysmex automaták, Advia 2120-as automata*  
A mai modern hematológiai automaták a magvas vörösvérsejteket is képesek abszolút számban és 100 fehérvérsejtre vonatkoztatva százalékban is megadni. Így a *Coulter és a Sysmex* automaták ezt külön csatornán mérik.

Az *Advia 2120-as* automata egy szoftvert segítségével, a fehérvérsejt (perox és baso) csatornákon kapott információkból adja meg az abszolút és számolja a %-os értéket. Mindhárom típusú automata a fehérvérsejtszámban korrekciót is végez, ha a perifériás vérben emelkedett arányban talál magvas vörösvérsejtet.

Magvas vörösvérsejtek aránya nagyobb:

1. Újszülöttkorban (nagyértékben emelkedett magvas vörösvérsejt szám): koraszülöttek, újszülöttek (pár %), újszülöttkori hemolitikus betegség; hipoxiás károsodás esetén.
2. Felölttkorban: thalassémia; mieloproliferatív betegség (myelofibrosis); solid tumor csontvelői metasztázissal; extramedullaris haematopoiesis; haematopoieticus stressz (septikaemia, masszív haemorrhagia, súlyos hypoxia) alkalmával.

A klinikai gyakorlatban, a következő esetekben ajánlott vizsgálata: hematológiai betegségek diagnosztikája; súlyos kardiothoracalis műtéten átesett, egyéb sebészet intenzív ellátást igénylő nem hematológiai betegségben, csontvelő transzplantáció utáni prognózis megítélésben, thalasszémia szindrómában transzfúziós terápia hatékonyságának monitorozására.

▶ *A XE-2100 Sysmex automata*

IMI (Immature Myeloid Information) csatornáján a hematopoietikus progenitor sejtek (CD 34+) száma is meghatározható a perifériás vérben.

Nagy dóziszú, kolóniastimuláló-faktor (CSF) előkezelés hatására a csontvelőből nagy mennyiségű őssejt és korai vérképző elődsejt kerül a perifériás vérbe. A alkalmas őssejtek gyűjtése a kezelést követően a keringő vérből történik. A gyűjtéskor nagyon fontos tudni, hogy hol tart a stimuláció, mikor kerül ki a perifériára annyi őssejt, amit már érdemes levenni. Ehhez a monitorozáshoz nyújthat segítséget a Sysmex automata, ahol a flowcytometer-en történő CD34+ sejt meghatározásnál egyszerűbben és olcsóbban lehet a progenitor sejtek számát megadni.

**Újabb hematológiai paraméterek**

- ▶ *Az MCVr (Mean reticulocyte volume)* paraméter a következő klinikai helyzetekben lehet fontos: vashiányos erythropoesis; táplálkozással kapcsolatos anémiák esetén a terápia korai hatásának monitorozása; csontvelő-transzplantáció után az erythropoesis helyreállításának követése; sportolóknál az erythropoetin használatának észlelése.
- ▶ *CHr (mean reticulocyte hemoglobin content) (Advia automaták); Ret-He (reticulocyte hemoglobin equivalent) (Sysmex automaták); RSf (Red blood cell size factor) (Coulter automaták)*; a leggyakrabban használt reticulocytá paraméter: abszolút vagy funkcionális vashiányos eritropoesis diagnózisára (vashiány korai kimutatása gyermekekben); orális és intravénás vasterápia monitorozására; dialízis alatt az erythropoetin terápia monitorozására.
- ▶ *IRF-M+H-t (a közepes és nagy abszorbanációjú éretlen reticulocyták aránya %-ban) vagy röviden IRF (Immature reticulocyte fraction)*: anaemiák differenciáldiagnosztikájára; táplálkozással kapcsolatos anémiák terápia-

jának monitorozására; csontvelő-regeneráció korai monitorozására (csontvelő-transzplantáció vagy kemoterápia után); aplasztikus anaemia verifikálására; csontvelősejtek gyűjtésének időzítésére, leukaemiák differenciáldiagnosztikájának segítésére.

- ▶ *A fragmentált vörösvérsejtek, FRBC (fragmented RBC)* a microangiopathiák diagnosztikája és monitorozása esetén szinte nélkülözhetetlen. A mérés negatív prediktív értéke közel 100%. Mindhárom típusú automata méri.
- ▶ A thrombocyták számolt paraméterei közül az *IPF (immature platelet fraction)*, azaz a retikulált thrombocytafrakció érdemel említést: ezt a paramétert csak a Sysmex automaták tudják szolgáltatni. A következő ese-

tekben hasznos: thrombocytopenia differenciáldiagnosztikája; kemoterápia és csontvelőátültetés után a thrombocytatermelés helyreállításának jelzője; thrombocytosisban a thrombosis rizikóindexe; profilaktikus thrombocytatranszfúzió szükségének megítélése; thrombocytaturnover becslése.

Az automatával történő véresejtszámolás lehetővé tette, hogy standardizált módon, napi kontrollalással, korrekt mért és számolt paraméterek segítsék a gyors diagnózist vagy a beteg monitorozását. De a modern technika mögött ott kell állni a laboratóriumi szakembernek és a laboratóriumi eredményt jól értelmező klinikusnak is.

## Molekuláris biológiai módszerek I. Mintavétel, PCR technikák, polimorfizmus-detektálás

*Molecular biological methods I. Sampling, PCR techniques, detection of polymorphisms*

**Dr. Patócs Attila**

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

*Kulcsszavak:* gén, mutáció, mutáció szűrés, PCR

*Key-words:* gene, mutation, mutation screening, PCR

A genetikai vizsgálat során DNS-re van szükség. Amennyiben csirasejtes mutációt kívánunk azonosítani, a DNS nyerésre legalkalmasabb az alvadésgátolt vér (leggyakrabban citráttal vagy EDTA-val). Szomatikus mutációk azonosításához szükséges az adott szövetből DNS-t izolálni. Mindkét esetben többféle DNS-izoláló kit áll rendelkezésre. Mintaforrástól függetlenül a DNS vizsgálata előtt ellenőrizni kell az izolált DNS mennyiségét és minőségét. A DNS kvalitatív tulajdonságait agaróz-gélelektroforézissel ellenőrizzük. A DNS kvantitatív meghatározása spektrofotométerrel, az optikai denzitás alapján történik.

A molekuláris biológiai vizsgáló módszerek alapját a *polimeráz láncreakció (PCR)* jelenti. PCR során a hőstabil DNS-polimeráz segítségével a vizsgálni kívánt DNS mennyiségének sokszorozása történik. Kivitelezése során a reakcióelegyben jelen van a felsokszorozandó DNS (templát), a kívánt DNS szakaszra specifikus primerek (a vizsgálni kívánt DNS-szakaszokra specifikus oligonukleotidok), DNS-polimeráz enzim (leggyakran Taq-polimeráz), a négy dezoxiribonukleozid-trifoszfát és puffer (vizes alapú, sókat és MgCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó oldat). A PCR reakciót alapvetően a templát DNS kvalitatív és kvantitatív tulajdonságai határozzák meg. Az optimális PCR reakciók feltétele az oligonukleotid primerek gondos megtervezése. Ezek a DNS két szála közé egymás felé a 3' végükkel kapcsolódnak, ezáltal biztosítják a közöttük levő szakasz felsokszorozódását. A primerek tervezése során számos tulajdonságukat kell figyelembe venni; ezek közül a legfontosabb a primerek olvadáspontja (melting hőmérséklete). Valós idejű kvantitatív PCR (RT-PCR, Q-PCR) során a képződött termék mennyiségét valós időben tudjuk nyomon követni, majd a reakció után az amplifikációs görbe lineáris szakaszán összehasonlító méréseket végezhetünk.

A PCR reakció során kapott terméket agaróz-gélelektroforézissel vizualizáljuk. A gélfestést a kettős szálú DNS-láncba interkaláló festékek (etidium-bromidot, újabban nem toxikus festékeket) használatával végezzük el. Vizualizálás után ellenőrizzük a PCR-termék méretét, az aspecifikus termékek, illetve amennyiben vannak, láthatóvá válhatnak a főlegben jelenlevő primerek és templát DNS. A termék további feldolgozásához (DNS-szekvenálás, klónozás) a PCR-termékek tisztítására van szükség, amely folyamat során a különböző főlegben levő reakciótermékeket (be nem épült nukleotidok, primerek) eltávolítjuk. A következő lépés a génmutációk/polimorfizmusok azonosítása. Számos molekuláris biológiai vizsgálómódszer használatos a különböző eltérések beazonosításához. Ezeket a módszereket két nagy csoportba oszthatjuk: az első csoportba tartoznak az ún. *szűrőmódszerek* (restrikciós fragment analízis – RFLP; egyláncú konformációs polimorfizmus analízis – single strand conformation analysis – SSCP; allélspecifikus PCR és Taqman allél diszkriminációs assay; denaturáló gradiens gélelektroforézis – DDGE; hőmérséklet gradiens gélelektroforézis – TTGE; denaturáló nagy felbontóképességű folyadék kromatográfia – DHPLC), míg a második csoportot a DNS-szekvenálással valósítunk meg.

A szűrőmódszerek közös jellemzője, hogy definitív eredmény ezek alapján (az alléldiszkriminációs assay és RFLP kivételével) nem adható ki, minden esetben szükséges az adott eltérés megerősítése egy másik módszerrel, ami a gyakorlatban a DNS-szekvenálást jelenti.

Az *RFLP* során restrikciós enzimeket használunk, melyek polinukleotidokban a foszfodiészter kötések bontják. Hatásuk helyétől függően kétféle típust különböztethetünk meg; az endonukleázokat, amelyek a láncon belüli kötések bontják, és az exonukleázokat, amelyek a láncevégi nukleotidokat bontják le. Ezek az enzimek speciális szekvenciákat

ismernek fel. Ezek olyan szekvenciák, amelyek egy pont körül kétszeres szimmetriát mutatnak, pl. AAG CTT / TTC GAA. Ezeket a szekvenciákat ún. *palidrom szerkezeteknek* nevezzük. Mivel ugyanaz a szekvencia (ellenkező irányban) mindkét szálon megtalálható ezek az enzimek mindkét láncot hasítják. A DNS eltérések vagy egy új restrikciós helyet hoznak létre, vagy pedig egy restrikciós hely elvesztéséhez vezetnek.

Ismert mutációk eseteiben a mutációknak megfelelő restrikciós enzimekkel történő emésztés után a mutáció megléte/vagy meg nem léte alapján különböző hosszúságú hasítási termékeket (fragmenteket) kapunk, amelyek elektroforézissel elkülöníthetők. A restrikciós enzimeket baktériumtörzsek-ből izolálják. Jelenleg több ezer ilyen restrikciós enzim közül válogathatunk, a különböző mutációknak, polimorfizmusoknak megfelelően egy templát vizsgálata során több DNS-eltérést is azonosíthatunk. Tömegszűrésre is bevezethető vizsgálati módszerről van szó, melynek segítségével ismert genetikai eltérések viszonylag olcsón kimutathatóak.

Az SSCP azon alapul, hogy egy nukleotideltérés is olyan konformációváltozást okoz, amely nem denaturáló poliakrilamid-gélben történő elektroforézis során a PCR-termékek futtatási mintázat eltérő. A futtatás során szükség van egy ismert szekvenciájú negatív kontrollra. Ugyanazt a futási mintázatot mutató minták szekvenciája megegyezik a kontrollszekvenciájával, míg az ettől eltérő futási mintázatot adó minták szekvenciája is eltérő. Az SSCP analízis nagyon érzékeny a futtatás során biztosított hőmérsékletre, ezért és a reprodukálhatóság érdekében olyan metodikákat dolgoznak ki, amelyek során a 4–6 °C-on történő elektroforézist részesítik előnyben. Jól beállított módszer esetén SSCP-vel az adott génszakaszon belül előforduló DNS variánsok 92–95%-a kimutatható. Az SSCP módszer kiválóan alkalmas egy-egy génszakasz szűrésére, azonban szenzitivitása nem 100%-os. Alkalmazási területét olyan ismert mutáció detektálása jelenti, amelyet már sikerült kimutatni és amihez pozitív és negatív kontrollok állnak rendelkezésre.

*Allélspecifikus PCR és Taqman allél diszkriminációs assay.* Az előbbieken ismertetett módszerekkel ellentétben allélspecifikus PCR esetén már a PCR reakció önmagában is a mutáció azonosítását biztosítja.

Azt a folyamatot, amelynek során egy mutáció vagy polimorfizmus azonosítása történik *genotipizálásnak* nevezzük. Ismert mutációk eseteiben a normál (vad) allélnak, valamint a mutációnak megfelelő (mutáns) primerekkel végzett PCR-módszerrel az ismert eltérést azonosíthatjuk, mivel mutáció esetén a mutáns allélokkel végzett PCR-ben, míg vad típus esetén csak a vad típusra specifikus primerekkel végzett reakcióban lesz termék. Hagyományos esetben a mutációnak megfelelően a két különböző primerrel végzett reakciót két külön csőben, de napjainkban real-time PCR esetén egyazon csőben, de különböző fluoreszcens festékkel jelölt próbákkal

(Taqman-assay) végzett PCR reakcióval a genotipizálás egyszerűen, gyorsan kivitelezhető. Az eredmények értékelését hagyományos PCR során agaróz-gélelektroforézis után, RT-PCR során az amplifikációs görbe vizsgálatával értékelhetjük. Hagyományos PCR esetén a reakcióelegynek tartalmaznia kell egy harmadik (ún. belső standard) primert, ami a génen belül a mutációtól eltérő helyen tapad, ezzel ellenőrizzük, hogy a PCR reakció végbement, és nem technikai hiba okozta a negatív eredményt.

*A denaturáló gradiens (DDGE) és a hőmérséklet gradiens gélelektroforézis (TTGE)* alapelve, hogy, a mutációt tartalmazó DNS olvadási profilja eltér a vad típusétól, denaturáló ágenst (urea, hőmérséklet) tartalmazó gélben történő elektroforézis során ezek egymástól jól elkülöníthetők. A TTGE és DDGE során használt PCR termékeket olyan primerekkel készítjük, melyek egy GC-gazdag (30 bázispár) véget tartalmaz. Azt, hogy ez a vég melyik primerre kerüljön a DNS-szekvencia olvadási profiljának számítógépes elemzése után állapítjuk meg. A denaturálást követő renaturálás során négyféle termék keletkezik; két vad típusú DNS-szál hibridizációjából normál homoduplexek, két mutáns szál összetapadásából mutáns homoduplexek képződnek, továbbá egy normál és egy mutáns DNS-szál kapcsolódásából heteroduplexek képződnek, melyek denaturálódása (a mutáció területén kialakuló mismatch miatt) korábban megkezdődik, mint a homoduplexeké. Elektroforézis során a minták a gélben először csak részlegesen, majd egyre nagyobb mértékben denaturálódnak. Mivel azonban a mesterséges GC-vég nem válik szét a futtatás alatt, a részleges „faagszerű” kettéválás meglassítja a minták futását. A homozigóta normál allélek egyetlen csík formájában ábrázolódnak a gélen, ez felel meg a normál homoduplexnek. A fentieknek megfelelően a gélen heterozigóta mutációk esetén kettőnél több csík jelenik meg. A gél előhívása ethidium-bromidos festéssel vagy ezüstözéssel történik.

A fent említett módszer automatizált változata a *denaturáló nagy felbontóképességű folyadékkromatográfia (DHPLC)*. A mutációk következtében bekövetkező olvadási pont megváltozását kihasználó automatizált mutáció detektáló rendszer alkalmas fluoreszcens jelölés nélküli PCR termékek hatékony elkülönítésére. Reverz fázisú HPLC során a denaturált PCR-termékét nagy nyomáson, egy, az elválasztást biztosító oszlopon áramoltatják át. Ehhez az oszlophoz a PCR a homo- és heteroduplexek különböző affinitással kötődnek, ami lehetővé teszi, hogy a folyamatos mosás mellett az oszlopról különböző időpontban leváló termékeket egy detektorral (leggyakrabban spektrofotométer) vizsgálják. A különböző minták kromatogramjait a kontrollmintákhoz hasonlítjuk. Ez a módszer a különösen nagy, több exonból álló gének (BRCA1, BRCA2, NF1) mutációszűrésére alkalmazható.

## Molekuláris biológiai módszerek II. Közvetlen szekvenanciaanalízis, hibridizációs technikák

*Molecular biological methods II. Direct sequencing, hybridization techniques*

**Dr. Tordai Attila**

OVSZ Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium

*Kulcsszavak: ??????????????????????*

*Key-words: ??????????????????????*

A DNS bázissorrend közvetlen meghatározásának, a *szekvenálásnak* az elve az amplifikációs módszerekhez köthető. Az 1975-ben leírt Sanger-féle *láncterminációs technika* lényege, hogy didezoxi-ribózt (a 3' helyzetben nem tartalmaz hidroxil [OH] csoportot) tartalmazó, jelölt nukleotidokat is adunk a korábban PCR-rel felsokszorozott, primerektől és dNTP-től megtisztított DNS mintához. Ezeket a nukleotidokat a DNS-polimeráz véletlenszerűen építi be a szintetizálódó DNS-lánc különböző pozícióiba, a kémiai módosítás miatt azonban a lánc ettől a ponttól nem hosszabbítható tovább, a szintézis megakad (termináció). Kezdetben radioaktív jelölést alkalmaztak, így négy különböző reakciót kellett párhuzamosan végezni az egyes bázisoknak megfelelő didezoxi-nukleotidokat külön-külön adva a reakciókhoz. A jelenleg elterjedt módszer már négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidot alkalmaz, ezért egy csőben hajtható végre. A végeredmény tehát különböző hosszúságú, az egyik végen a nukleotid típusának megfelelő színnel jelölt, didezoxi-nukleotidot tartalmazó oligonukleotid-keverékek keletkezése. A szekvenancia megismeréséhez a fragmentumok méretét kell meghatározni 1 bázispár pontossággal, hiszen az utolsó pozícióban levő nukleotid típusa a színből azonosítható. Az elválasztást korábban nagy felbontású poliakrilamid gélelektroforézissel, ma már automatizált kapilláris-elektroforézissel hajtják végre.

A DNS-hipermetiláció vizsgálatára alkalmas módszer a biszulfitos kezelés után végzett szekvenálás. A kezelés hatására a nem metilált citozin bázisok uracillá alakulnak, amelyek a biszulfitos kezelést követő PCR során timinként amplifikálódnak, a metilált citozinok változatlanok maradnak és a későbbi PCR során citozinként amplifikálódnak.

### Piro-szekvenálás

Az 1996-ban leírt *piro-szekvenálás* a Sanger-féle láncterminációs szekvenancia analízishez képest alternatív, második generációs (next generation sequencing – NGS) technológia. Lényege az immobilizált templáton megvalósuló DNS-polimeráz aktivitás kimutatása kemilumineszcenciával (a luciferáz enzim által katalizált luciferin-oxi-luciferin átalakulást kísérő fényjelenséggel), ahogy az enzim a komplementaritás elve alapján egyesével beépíti a megfelelő nukleotidokat a szintetizálódó DNS-láncba. Az elnevezés a bázis-beépítés során keletkező pirofoszfát vegyületre utal, ami a kimutatási reakciósorozat alapját képezi. A pirosekválás során egyszerre csak egy nukleotidot (dCTP, dGTP, dTTP, és dATP helyett dATP-alfaS) adnak a reakcióba, és érzékeny detektorral rögzítik, hogy történt-e nukleotidbeépülés, azaz keletkezett-e pirofoszfát, és ennek következtében fényjelenség. A be nem épült nukleotidokat a piráz enzim bontja, majd következik az újabb nukleotidot tartalmazó elegy hozzáadása. A keletkezett pirofoszfát, illetve fény mennyisége arányos a

beépült nukleotid mennyiségével, így ha egymást követően több azonos nukleotid épül be, az észlelt szignál az egy nukleotidnak megfelelő többszöröse lesz. A miniaturizáció és a nagyfokú automatizáció révén ugyanakkor hatalmas nyers szekvenancia-mennyiség (20–100 millió bázis) állítható elő a mintegy 6–7 órás folyamat alatt. További előny, hogy a technológia emulziós PCR technikát követően kifejezetten alkalmas kevert DNS-minták (mozaikosság, heterogén genetikai állományú daganatos minták) szekvenálására. Az emulziós PCR eljárás részét képező gyöngyös immobilizáció és az egy lyukban csak egy gyöngy jelenlétét lehetővé tevő méretviszonyok révén a szekvenálási eredmények egyetlen DNS-szálla vonatkozathatók, így szükségtelenné válik a fáradságos és időigényes klónozási eljárás. További NGS technikák között említendő a reverzibilis lánctermináció és a ligálásos szekvenálás.

### Hibridizáció

A nukleinsavak biokémiájának egyik legalapvetőbb jelensége a *hibridizáció*. Ezen azt a folyamatot értjük, amelynek során két egyszálú nukleinsav molekula egy kettős szálú molekulát hoz létre a bázis-komplementaritás (A-T illetve G-C) elve alapján. A hibridizáció fiziológiás körülmények között mindig létrejön. A folyamat megvalósulhat a DNS illetve az RNS molekulák bármilyen kombinációjában. A kettős szálú molekula stabilitását jelentősen befolyásolja a bázisösszetétel, hiszen a G-C bázisok között 3, az A-T bázisok között pedig csak 2 hidrogén kötés alakul ki. A kettős szálú molekula szétkapcsolása (*denaturáció*) történhet a hőmérséklet emelésével vagy az oldat összetételének változtatásával (pl. a só koncentráció csökkentésével illetve formamid hozzáadásával). Ha két nem jelölt DNS-lánc kapcsolódik a bázis-komplementaritás elve alapján *anellációról*, ha pedig egy jelölt lánc (szonda, az angol terminológiában „probe”) kapcsolódik egy nem jelölt molekulához, *hibridizációról* beszélünk. A hibridizáció bekövetkezését a jelölt szondától függően egyéb laboratóriumi módszerekhez hasonlóan radioaktív izotópos (autoradiográfia, szcintillációs számlálás), illetve nem izotópos módszerekkel (fluoreszcencia, kemilumineszcencia, kolorimetria) követhetjük. A hibridizáció lejátszódhat oldatban, vagy szilárd hordozón. A folyékony fázisú hibridizáció könnyen automatizálható, kvantitatív meghatározást tesz lehetővé, azonban a reakció során kimutatott DNS-szakasz mérete nem határozható meg, és viszonylag alacsony a módszer érzékenysége. A szilárd hordozón végzett hibridizáció jelenségén a nukleinsav-kimutatás számos alapvető módszere (Southern és Northern blotting, dot-blot, in situ hibridizáció, array/chip technológia) alapul.

A *Southern blot* (az azt elsőként 1975-ben leíró, EM Southern-ről elnevezve) a restrikciós endonukleázzal történő hasítás, az elektroforetikus elválasztás és a hibridizáció mód-

szerit kombinálja. A DNS-molekulát egy vagy több, előre megválasztott restriktív endonukleázzal emésztjük, és a keletkezett DNS-darabokat agaróz-gélelektroforézissel választjuk el méret szerint. Denaturálást követően, az egyszerű emésztett DNS-darabokat, a futási sorrendet megőrizve passzív diffúzióval (esetleg elektromos feszültség vagy vákuum transzfer segítségével) szilárd hordozóra (nylon vagy nitrocellulóz membránra) visszük át (blottoljuk), rögzítjük (hevítés, keresztkötés UV-fényben), és a membránhoz rögzített DNS-t hibridizáltatjuk egy olyan DNS-szondával („probe”), amely a vizsgálni kívánt szakaszra specifikus. A szonda radioaktív izotópos vagy nem radioaktív jelölést tartalmaz, így a kérdéses régiót tartalmazó DNS fragmentum(ok) megjeleníthető(ek), és méretük meghatározható.

Az RNS molekulák vizsgálatára szolgáló *Northern blot* elve hasonló. Mivel az mRNS szálak mérete megfelelő, nincs szükség restriktív hasításra. A méret szerinti elválasztást azonban denaturáló körülmények között végezzük, hogy a molekulák alakja ne befolyásolja a méret szerinti elválasztást. A blottolás előtt nem szükséges további denaturációs lépés, míg a hibridizálás és a detektálás módja hasonló.

A blottolási technika gyorsítható, ha kihagyjuk a méret szerinti szeparáció lépését és a nukleinsavakat közvetlenül a membránra cseppentjük fel. A felcseppentés alakjától függően *dot-blot*, illetve *slot-blot* technika ismert. A hibridizáció különböző jelölésű, génspecifikus szondával történhet. *Reverz dot-blot* eljárásnál génspecifikus szondákat rögzítünk szilárd hordozóhoz és jelölt teljes RNS/DNS-sel történik a hibridizáció.

Az utóbbi néhány évben igen látványos fejlődésen ment keresztül az *array/chip technológia*, és napjainkra elérhető

közelségbe került a módszer rutin diagnosztikai alkalmazása is. A magyarul egy szóval nehezen kifejezhető array alatt makromolekulák térben rendezett, kisméretű szilárd hordozóhoz (szilikon lapka, azaz „chip”) rögzített sorozatát értjük, amely eszközhöz különböző reagens-elegyeket hibridizáltatunk és a reakció létrejöttét, illetve intenzitását fluoreszcens festékek segítségével követjük. Macro-array esetén a nitrocellulóz membrán néhány száz, legfeljebb ezer gén-specifikus mintát tartalmaz, és a felcseppentett minták átmérője nagyobb, mint 300 µm. Micro-array esetén a felcseppentett minták mérete kisebb, mint 300 µm, és a felvitt mintaszám több ezer, akár több tízezer.

Mindehhez óriási technológiai fejlesztésekre volt szükség, amely a számítástechnikai eszközfejlesztés és miniatürizáció, a robottechnika, illetve a bioinformatika együttes eredményeinek köszönhető. A micro-array esetében a hordozó a számítástechnikai iparból átvett szilikon lapka, és a molekula-rögzítés, illetve szintézis különböző módszerei (mechanikus felcseppentés nagy precizitású cseppentőrobot segítségével, ink-jet technológiával, vagy *in situ* oligonukleotid-szintézis fotolitográfiai eljárással) szintén a számítástechnika területéről származnak. A chiphez rögzített anyag természete szerint megkülönböztetünk oligonukleotid array-eket és cDNS array-eket. Az oligonukleotidok vagy a felületen *in situ* készülnek el, vagy az előre megszintetizált oligonukleotidokat a cDNS-hez hasonlóan robot viszi fel. A fluoreszcens jel leolvasása nagy felbontású CCD-kamerával történik, amely mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz. A chip-technológia révén óriási adatmennyiséghez juthatunk viszonylag rövid időn belül, külön megoldandó feladat tehát ennek az információtömegnek az átalakítása klinikai, illetve kutatási szempontból hasznosítható információvá.

## Molekuláris diagnosztika örökletes betegségekben

*Molecular diagnostics of inherited disorders*

**Dr. Tordai Attila**

OVSZ Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium

*Kulcsszavak: ??????????????????*

*Key-words: ??????????????????*

Az örökletes betegségek, illetve kockázati tényezők kimutatására irányuló laboratóriumi diagnosztika hatalmas fejlődésen ment keresztül az utóbbi években, amelynek hátterében a területtel kapcsolatos kutatómunka (például a humán genom projekt) robbanásszerű forradalma áll. A vizsgálatok révén lehetővé válik egyre több ismert génmutáció/kockázati tényező jelenlétének *preszimptomatikus*, illetve *praenatalis* kimutatása, amely alapvető hatást gyakorol a rutin betegellátásra, és sok esetben erősíti a prevenció tevékenységeket. Igen gyakran új kihívást jelent azonban a genetikai tesztek eredményeinek értelmezése, hiszen sok esetben a rendelkezésre álló tudományos információ alapján csak egy vagy több kockázati tényező jelenléte mutatható ki, amely egy bizonyos betegség kialakulását valószínűsítheti. Ezt az információt igen körültekintően kell az érintett tudomására hozni, ami különleges felkészültséget és többlet idő ráfordítást igényel (genetikai tanácsadás). Ezért szoros kapcsolattartásra van szükség a laboratórium szakképzett személyzete és a vizsgálatot kérő klinikus között.

Gyorsan nő azon betegségek száma, amelyekben már ismert a molekuláris patomechanizmus, azaz ismert a DNS-eltérés (mutáció) természete, gyakorisága, és ismert a betegség hátterében álló gén által kódolt fehérje mennyiségi, illetve minőségi eltérése és az ebből következő funkciózavar. A mutáció típusaik szerint csoportosíthatók nagyméretű szerkezeti eltérésekre (deléciók, inszerciók, inverziók) illetve kis szerkezeti eltérésekre (aminosavcserével járó [missense] pontmutációk, stop-kodon kialakulásával járó [nonsense] pontmutációk, olvasási keret eltolódással [frameshift] járó deléciók vagy inszerciók). A kódoló régiók mellett a mutáció érintheti az mRNS érési (splicing) folyamatát befolyásoló szakaszokat, illetve az expresszió szabályozásáért felelős promotor régiókat is. Egyre fontosabbá válnak az egyének között mintegy 1000 bázispáronként kimutatható, egy nukleotidot érintő variánsok (single nucleotide polymorphisms – SNP), amelyek konkrét jelentősége intenzív kutatások tárgyát képezi.



Bizonyos esetekben az SNP-k örökletes kockázati tényező (pl. Leiden mutáció), illetve betegségkockázati mutációt (pl. sarlósejtes anaemia, Wilson-kór, örökletes haemochromatosis) is jelenthetnek. Ezeknek az SNP-knek a diagnosztikai kimutatása ma már rutin laboratóriumi feladat.

A már ismert SNP kimutatására gyakran alkalmazott módszerek:

- PCR-RFLP*: az ismert DNS-szakasz amplifikációja egyszerű PCR-rel, restriktions hasítás, és a vad típusú, illetve SNP-t hordozó allélek elkülönítése az emésztésből keletkező különböző fragmentumok alapján agaróz gélelektroforézissel;
- PCR-SSP* (szekvensspecifikus primerek, más néven allélspecifikus PCR): több párhuzamos PCR-reakció olyan primerekkel, amelyek 3' végeiken a vad típusú, illetve SNP-specifikus nukleotidokat tartalmazzák, és megfelelő körülmények mellett csak teljes egyezés esetén adnak PCR-terméket;
- valós idejű (real time) PCR*.

Monogénes betegség esetében, ha a mutáció nem ismert előre, nem minden esetben gazdaságos a közvetlen mutáció-azonosítás, sőt, korábban erre még lehetőség sem volt. Ezért *indirekt családvizsgálatot* alkalmaztak a hordozó, illetve érintett személyek azonosítására. Ennek lényege, hogy a betegséget okozó gén nem kódoló régióban (intra- vagy extragenikus) elhelyezkedő polimorf, kapcsolt markerek (di- tri- tetra-nukleotid ismétlődő szakaszok, mikroszatelliták) öröklésmenetét hasonlítják össze a betegségben szenvedő, az obligát hordozó és a vizsgálandó személy esetében. A módszer előnye, hogy nem kell jelentős erőfeszítéseket tenni a konkrét betegségkockázati mutáció kimutatására, hátránya, hogy több családtagtól kell mintát venni, illetve, hogy az eredmény itt is valószínűség jellegű, hiszen nem zárható ki a rekombináció lehetősége.

A közvetlen szekvencia-elemzés gépesítése és egyre csökkenő költségei hatására terjedőben van a *közvetlen mutációkimutatás* (szekvenálás), mivel definitív eredményt ad, és később az információ birtokában több családtag esetében már elegendő célzott elemzéseket végezni.

Ismert örökletes eltérések preszimptomatikusan is kimutathatók. Ez kezelhető/megelőzhető kórképeknél (pl. örökletes haemochromatosis) kifejezett előnyt jelenthet a tünetmentes állapotban elkezdett kezelés/gondozás révén. Súlyosabban a preszimptomatikus DNS-vizsgálatok következményei olyan esetben, amikor gyógyíthatatlan kórkép korai kimutatását teszik lehetővé, pl. Huntington-chorea, valamint az örökletes daganatos betegségek esetén, ahol gyakran a mutációk penetranciája nem teljes. Ezekben az esetekben kell a legnagyobb körültekintést tanúsítani és képzett genetikai tanácsadó orvos, esetenként pszichológus segítségét is bevonni az eredményközlés és interpretáció folyamatába.

Súlyos kórképek esetén indokolt örökletes eltérések *praenatalis diagnosztikáját* elvégezni. A magzati mintavételnek hagyományosan két főbb módja terjedt el:

- a 16. terhességi hét táján végzett amniocentézis során az amnion folyadékából centrifugált sejtek jelentik a magzati szövetet,
- chorionbiopsia (chorion villus sample – CVS), amikor a 10–12. terhességi héten a placenta magzati oldalából nyernek magzati szövetet.

Újabb lehetőség a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), amelynek során a mesterségesen megtermékenyített embrió egy-két sejtjének felhasználásával végeznek DNS-

vizsgálatot. Az eltávolított, igen kis mennyiségű anyagból PCR-technikával végeznek nemmeghatározást, keresnek egy gént érintő rendellenességeket, illetve FISH technikával keresnek kromoszóma-rendellenességeket. Az egy sejtben található genetikai anyagból kiinduló meghatározások azonban számos technikai nehézséget rejtenek, és jelentős előkészítést, illetve szakmai tapasztalatot igényelnek. A születés előtti genetikai diagnosztika legújabb, még minimálisan invazív lehetősége az anyai vérben keringő, kis mennyiségű magzati eredetű DNS felhasználása. A magzati és az anyai DNS a jelenlegi technikákkal nem választható el teljes mértékben, így a technika felhasználása azoknak a genetikai eltérések vizsgálatára korlátozódik, amelyek nem fordulnak elő az anyai genomban (pl. magzati nem meghatározás, magzati Rh vércsoport meghatározás Rh negatív anya esetén, apai génmutáció kimutatása).

A praenatalis diagnosztikával a terhesség korai szakában nagy biztonsággal állapítható meg, hogy a magzat hordozza-e a betegséget. A laboratóriumi eredményt ebben az esetben is részletes és szakszerű genetikai tanácsadás keretében kell az érintettel közölni, és minden információval el kell látni ahhoz, hogy felelős döntést hozhasson terhessége sorsáról.

Az örökletes nukleinsaveltérések vizsgálata felhasználható az egyén (illetve a minta) azonosítására is. E célból két különböző szakterületen kérhetnek a laboratóriumtól segítséget: (i) apasági vizsgálatok, (ii) bűnügyi alkalmazások. Bár a konkrét problémák esetenként igen eltérőek lehetnek, a laboratóriumi módszerek elvei sok hasonlóságot mutatnak. Tipikus esetben a kérdés az, hogy kizárható-e két minta (egy feltételezett apa és fiú vagy egy helyszíni emberi anyag és egy gyanúsítottól származó minta) közötti kapcsolat, illetve azonosság. Ehhez olyan polimorf tulajdonságok (markerek) vizsgálata használható fel, amelyek öröklésmenete a mendeli szabályokat követi, illetve amelyek nagy valószínűséggel véletlenszerű eltérést mutatnak az egyes személyek között. A korábban használt polimorf markerrendszereket (vércsoport antigének, HLA-szerotípusok, vörösvérsejt enzimek, szérumfehérjék) napjainkra jórészt kiszorították a DNS-alapú markerek. Ennek fő oka a DNS-markerek nagyfokú informativitása és a kényelmes anyagvétele, illetve feldolgozhatóság. DNS-markereknek olyan nem kódoló DNS-szakaszokat nevezünk, amelyek nagyfokú eltéréseket mutatnak egyes egyének között. Ezek a leggyakrabban ismétlődő szekvenciák (short tandem repeat – STR – vagy mikroszatelliták, ha az ismétlődő nukleotidok száma 2–9 bp; illetve variable number of tandem repeat – VNTR – ha 10–60 bp), amelyek az ismétlődések számától függő nagyságú PCR-terméket adnak, és több gyakori alléllal (variánszal) rendelkeznek.

Öröklésmenetük a mendeli szabályokat követi, azaz egy eltérő anyai és egy eltérő apai alléllal rendelkező személy heterozigóta mintázatot ad, és a szülők genotípusának ismeretében azonosítható egy adott marker öröklésmenete. A marker vizsgálatok során korábban radioaktívan jelölték a PCR-termékeket és nagy felbontású poliakrilamid gélelektroforézist, illetve autoradiográfiát végeztek. Ezt a módszert mára szinte teljes mértékben felváltotta a fluoreszcens jelölés és az automatizált kapilláris elektroforetikus elemzés. A használt markerek tekintetében is nemzetközi konszenzus kezd kialakulni és a reagens gyártók már 8–16 marker egyidejű elemzésére alkalmas, teljes reagens készleteket forgalmaznak. A DNS-markerekkel végzett egyénazonosítás rutin diagnosztikai alkalmazása a haematopoieticus őssejt-transzplantációt követő donor-recipiens kimérizmus nyomon követése.

## Genetikai kockázati tényezők rosszindulatú hematológiai kórképekben

*Genetic risk factors in hematological malignancies*

**Dr. Andrikovics Hajnalka**

Országos Vérellátó Szolgálat, Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium

*Kulcsszavak:* BCR-ABL, 2-es típusú Janus kináz V617F, core binding factor, nucleophosmin, FLT3, immunoglobulin nehéz lánc  
*Key-words:* BCR-ABL, Janus kinase 2 V617F, core binding factor, nucleophosmin, FLT3 immunoglobulin heavy chain

Jelenlegi ismereteink szerint a testi sejtek rosszindulatú daganatsejtté váló átalakulásában a sejtfunciókat irányító genetikai állományban bekövetkező mutációk sorozata tehető felelőssé. A rosszindulatú hematológiai betegségekben szenvedő betegek individuális genetikai hátterének felderítése napjainkban már nemcsak tudományos jelentőségű, és a betegség elméleti hátterét segít feltárni, hanem a szerzett mutációk kimutatása a diagnosztikai rutineljárások közé tartozik. A genetikai információ diagnosztikai vagy prognosztikai szereppel bírhat; célzott, egyénre szabott terápiás lehetőségeket biztosíthat; valamint a betegség követése során a diagnóziskor vagy a relapszuskor azonosított genetikai eltérés minimális reziduális betegség (MRD) követési markerként szolgálhat. Az onkohematológiai genetikai diagnosztikában alkalmazott laboratóriumi módszerek palettája széles, citogenetikai (kariotípus-vizsgálat, fluoreszcencia in situ hibridizáció), valamint DNS és RNS alapú molekuláris genetikai vizsgálatokra oszthatóak. A molekuláris genetikai módszerek közül a reverz transzkripció (RT), a polimeráz láncreakció (PCR) különböző típusai (allélspecifikus, multiplex, nested, valós-idejű mennyiségi PCR) és a szekvenálás terjedtek el. A PCR termék agaróz gél-, ill. kapilláris-elektroforézissel vagy különböző fluoreszcens jelölési technikákkal (hibridizációs vagy hidrolízis szondával) vizsgálható. A megfelelő detektálási módszer kiválasztásával akár  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  szintű érzékenység is elérhető molekuláris genetikai módszerekkel az MRD kimutatásakor. Mutációs forrópont hiányában, a direkt szekvencia analízis előtt egyre elterjedtebben használják az ún. mutációszűrő módszereket (pl. a denaturáló, nagyfelbontású folyadék-kromatográfiát – dHPLC – vagy a nagyfelbontású olvadási görbe analízist – HRM). Egyes onkohematológiai betegségek genetikai háttere annyira heterogén, hogy a molekuláris markerhasználat eszköztárába a különböző array és következő generációs szekvenálási technikák is bevonultak.

A *krónikus myeloid leukaemia* (CML) egységes genetikai hátterű betegség. A Philadelphia (Ph) kromoszóma [a t(9;22) reciprok transzlokáció következtében megrövidült 22. kromoszóma] vagy a fúziós kromozómáról átíródó BCR-ABL transzkriptum kimutatása a betegség diagnosztikus kritériuma. A BCR-ABL fúzió szabályozatlan ABL tirozin-kináz-aktivitást eredményez, amely a proliferáció fokozódásához vezet. A célzott tirozin kináz inhibitorok (TKI) közül, a BCR-ABL specifikus imatinib jelenleg az első választandó kezelési mód CML-ben. A betegség követése során a TKI terápia megfelelő hatékonyságát kariotipizálással, valamint a BCR-ABL transzkriptum mennyiségi követésével (valós idejű, reverz transzkripciót követő PCR-rel) monitorozhatjuk. Terápiás kudarc esetén nagyobb hatásereőségű, második generációs TKI-ok, valamint a csontvelő transzplantációs kezelés közül lehet választani. A TKI terápia adott nem megfelelő terápiás válasz hátterében az esetek jelentős százalékában a BCR-ABL gén tirozin-kináz doménjében rezisztencia mutá-

ciók mutathatók ki szekvenálással, amely egy rutin molekuláris genetikai vizsgálat a második generációs TKI kiválasztása előtt.

A BCR-ABL negatív myeloproliferatív neoplasiák esetén a 2-es típusú Janus kináz (JAK2) aktiváló pontmutációja (a 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje, azaz V617F) a leggyakoribb genetikai eltérés. A JAK2 V617F polycythaemia verében a betegek >95%-nál, essentialis thrombocythaemiában és primer myelofibrosisban a betegek mintegy 50%-ánál mutatható ki. A JAK2 tirozin-kináz különböző receptorok (pl. interleukin-3, erythropoietin és thrombopoietin) liganddal történő kapcsolódásakor aktiválódik, és számos proliferációt közvetítő jelátviteli útvonalat aktivál. A JAK2 V617F pontmutáció jelenlétében ligand kapcsolódás hiányában is JAK2 aktiváció figyelhető meg. A JAK2 V617F kimutatására egyszerű allélspecifikus PCR módszerek terjedtek el a rutin diagnosztikában. A JAK2 inhibitorok forgalomba kerülésével párhuzamosan várható a valós idejű kvantitatív V617F mutáció kimutatási módszerekre történő váltás.

Az *akut myeloid leukaemia* (AML) nemcsak morfológiai, hanem genetikai háttér tekintetében is heterogén: eddig több száz, ismétlődő kromoszómaeltérést és számos szubmikroszkópikus méretű, csak molekuláris genetikai módszerekkel azonosítható DNS/RNS szintű eltérést mutattak ki a kórkép hátterében. A klinikai, illetve a morfológiai kép mellett a citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések fontos prognosztikai tényezőknek bizonyultak. Az AML fenotípusának megjelenéséhez több mutáció egyidejű jelenléte szükséges az érintett sejtklónban. Az összeget érintő mutációk egyik csoportja a differenciálódás gátlásához, míg a másik csoportja a daganatos sejtek proliferációs előnyéhez vezet. Az első csoportba a haematopoiesist szabályozó, transzkripciós faktorok többnyire inaktíváló, szabályozást módosító mutációi, míg a második csoportba a növekedési faktor receptorok, valamint az azokból kiinduló jelátviteli mechanizmusok molekuláinak aktiváló mutációi tartoznak. Az azonos csoportba tartozó mutációk egy AML klónban egyidejűleg nem vagy alig fordulnak elő és a különböző kooperáló mutációk sem társulnak véletlenszerűen.

A core binding faktor (CBF) két alegységből álló transzkripciós faktor komplex. Az alegységet a hematopoietikus sejtvonalonban a RUNX1, a alegységet a CBFβ gének kódolják. AML-ben a két gén érintettsége közel 30%-ra tehető: a funkcióvesztéses mutációk lehetnek kiegyensúlyozott kromoszómaátrendeződések következtében létrejövő fúziós gének [t(8;21) esetén az RUNX1–RUNX1T1, t(16;16) vagy inv(16) esetén a CBFβ–MYH11 gének fúziója], vagy szerzett RUNX1 gént érintő pontmutációk. A CBF leukaemiák prognózisa kedvező, célzott terápiájuk nem ismert. Az akut promyelocytás leukaemia (APL, AML-M3) jellemző genetikai eltérése a retinsavreceptor (RARA) gén (17q12) transzlokációi, amelyek közül a promyelocytás leukaemia (PML) gén

érintettségével járó t(15;17) transzlokáció a leggyakoribb. A molekuláris háttér felfedezése vezetett a hatékony célzott terápia kialakításához. A csupa-transz-retinsav hozzáadása a kemoterápiás protokollhoz a kedvező prognosztikai csoportba helyezte a korábban rossz prognózisú APL-t. A NPM1 gén 12. exonjában található, 4 bázispár inszercióval járó mutációi jelenlétében a fehérje kóros citoplazmatikus lokalizációja észlelhető. A mutáció gyakorisága a teljes AML populációban 25–35%, normál karyotípusú AML-ben viszont 45–60%, így jelenlegi ismeretek szerint az egyik leggyakoribb genetikai eltérés AML-ban. A NPM1 mutáció kedvező prognosztikai faktor.

Az FLT3 (fms-szerű tirozin kináz 3) receptor tirozin-kináz ligandjával történő kapcsolódása a progenitor sejtek proliferációját fokozza. Az FLT3 gén két különböző típusú aktiváló mutációja ligandfüggetlen receptordimerizációt és számos sejten belüli jelátviteli útvonal aktiválódását eredményezi. Az FLT3 juxtamembrán domén különböző méretű és elhelyezkedésű, de az olvasási keretet mindig megtartó ún. internal tandem duplikációi (ITD) a betegek 10–40%-ánál, a tirozin kináz domén (TKD) 835. kodon pontmutációk pedig a betegek 5–10%-ánál mutathatók ki. Az FLT3 mutációk leggyakrabban a normális karyotípusú, NPM1 mutációt hordozó (40%), valamint a PML-RARA (40%) transzlokációt hordozó betegeknél fordulnak elő. Az FLT3 mutációk emelkedett relapszus-aránnyal és csökkent átlagos túléléssel társulnak. Jelenleg számos FLT3-specifikus kis molekulású tirozin-kináz inhibitor (TKI) vegyület van a klinikai kipróbálás fázisában, de önálló kezelésként a CML blastos fázisában alkalmazott imatinib kezeléshez hasonlóan a hatásuk átmeneti. A KIT receptor tirozin kináz aktiváló pontmutációi CBF

leukaemiában szenvedő AML betegek 10–40%-ánál fordulnak elő és rossz prognózissal járnak. TKI kezelés kemoterápiával kombinálva célzott terápiás protokollok részét képezheti KIT mutációk esetén. A RAS proteinek membrán-asszociált GTP-kötő fehérjék. Működőképességük eléréséhez számos poszt-transzlációs módosításon kell átesniük. A RAS fehérjéket számos citokin receptor (FLT3, KIT) aktiválja a megfelelő liganddal történő kapcsolódást követően. Onkogén hatású NRAS illetve KRAS mutációk az AML-ben szenvedő betegek mintegy 25%-ánál mutathatók ki. A RAS mutációknak nincs prognosztikai jelentősége AML-ben, viszont a fokozott aktivitású RAS blokkolása a farnesyl transzferáz inhibitorokkal logikus terápiás célpont.

Az AML molekuláris genetikai diagnosztikája magába foglalja a transzlokációk reverz transzkripciót követő minőségi és mennyiségi PCR-rel történő vizsgálatát, az inszercióval járó NPM és FLT3 mutációk PCR követő kapilláris-elektroforetikus kimutatását diagnóziskor és remisszióban MRD követésére. Az érzékeny molekuláris genetikai módszerekkel a relapszus gyakran a klinikai tünetek előtt kimutatható.

Lymphoproliferatív kórképek esetén az immunglobulin nehéz lánc (IgH) és a T-sejt-receptorok génátrendeződés vizsgálatával elkülöníthető a mono-, illetve poliklonális lymphoid sejtsszaporulat. Krónikus lymphoid leukaemiában az átrendeződött IgH gén hipermutációs státusza a legjobb prognosztikai marker. ALL-ben a BCR-ABL kimutatása diagnosztikus és prognosztikus. A gyermekkori ALL MRD követésében elterjedt módszer az érintett daganatos sejtklón IgH génátrendeződésre specifikus egyéni sonda tervezése.

## Öröklődő anyagcsere-betegségek diagnosztikája gyermekkorban

*Diagnosis of inborn error of metabolism in childhood*

**Dr. Szőnyi László**

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

*Kulcsszavak:* öröklődő anyagcsere-betegség

*Key-words:* inborn error of metabolism

Az öröklődő anyagcsere-betegségek a genetikai kórképek csoportjába tartoznak; háttérükben egy gén mutációja áll. Az egy gén hibájából eredő betegségek (single gene disorders) számát 4000–5000-re becsülik, ezek 15%-a tartozik az öröklődő anyagcsere-betegségek közé. Az öröklődő anyagcsere-betegségek számát 600–1000 körülnek tartják, de ez a szám a tudomány fejlődésével folyamatosan nő. Ezek a betegségek becslések szerint minden 1500–4000. újszülöttet érintik, azaz Magyarországon évente 25 és 70 közötti esettel kell számolni. Az újszülöttkori görcsállapotok 30%-át, a nyilvánvaló ok nélkül kialakult újszülöttkori sepsisek 20%-át, a bölcsőhalál 10%-át öröklődő anyagcsere-betegségek okozhatják.

A betegek anamnézisében jellemző lehet a szülők rokonházassága testvér korai; ismeretlen okú halála; spontán abortusz; a gyermekáldás éveig tartó várakozási idő után érkeznek; lombikbébi programban való részvétel.

A kórképek diagnosztikájának négy különböző szintje van: a kórkép fenotípusa (klinikai tünetek), metaboliteltérés, enzimaktivitás és molekuláris genetikai eltérés kimutatása.

A kórképek döntő többségében mérgező vagy a normális anyagcsere-funkciót megváltoztató metabolitok akkumulálódnak vagy alapvetően fontos molekulák szintézisét, lebontását módosítják kóros irányba.

A betegségek bármely életkorban jelentkezhetnek. Ennek oka részben az érintett enzim „maradék” aktivitásának mértéke, valamint a betegséget okozó mutáció (genotípus-fenotípus összefüggés). A maradék enzim aktivitás a kórképek nagy részében 0%-nál nagyobb. Mégis, az öröklődő anyagcsere-betegségek (a dysmorphiával járó kórképek kivételével) többnyire akkor okoznak tüneteket, amikor a szervezetet valamilyen megterhelés éri. Ilyen az éhezés, fokozott táplálék felvétel, stresszhelyzet, újszülöttkor, szoptatás elhagyása, interkurrens betegség, első életév vége, pubertás.

A laboratóriumi eltérések lehetnek átmenetiek, ezért a normális laboratóriumi érték nem zárja ki anyagcsere-betegség létét. A tünetek jelentkezésekor, fennállásakor kell a vizsgálatokat elvégezni, mert az akkor levett minta diagnosztikus értéke nagy.

Klinikai tekintetben az öröklődő anyagcsere-betegségek 4 csoportba oszthatók: (1) akut vagy progresszív „intoxikáció” típusú betegségek, (2) energiatermelés vagy felhasználás zavarai, (3) komplex, nagy molekulák szintézisének vagy katabolizmusának zavarai, (4) egyéb kórképek.

### Akut vagy progresszív „intoxikáció” típusú betegségek

Ezek a kórképek életveszéllyel járó anyagcsere krízis állapottal jelentkezhetnek. A betegek megelőzően egészségesek, fejlődésük és gyarapodásuk koruknak megfelelő.

#### Klinikai jellemzők:

- ▶ tünetmentes időszakok,
- ▶ „mérgezésre” utaló akut tünetek (hányás, viselkedés megváltozása, kóma),
- ▶ „mérgezésre” utaló krónikus tünetek (progresszív fejlődésbeni elmaradás),
- ▶ gyakori laboratóriumi eltérések (acidosis, ketosis, hyperammonaemia, hypoglykaemia),
- ▶ gyakran késői kezdet, intermittáló jelleg,
- ▶ diagnózis alapja plazma- és vizelet-aminosav, -szervesav vizsgálata,
- ▶ a kórképek nagy része kezelhető, akut, krízis helyzetben a toxikus anyagok minél előbbi, gyors kivonása (vércsere, plazmaferezis), a fenntartó kezelés lényege elimináló diéta, hiány állapot kialakulásának megakadályozása.

#### Jellemző kórképek:

- ▶ aminosav-anyagcsere zavarai (tyrosinaemia I. típus, PKU, jávorfaszörp betegség),
- ▶ karbamid-ciklus zavarai,
- ▶ organikus aciduriák,
- ▶ cukorintoleranciák (galactosaemia, fructózintolerancia),
- ▶ rézanyagcsere zavarai (Wilson-kór).

Laboratóriumi diagnosztikájukban a következő eltérések jellemzők:

- ▶ **Metabolikus acidosis:** többnyire emelkedett plazma anion gap-pel jár.  $AG = [Na^+] + [K^+] - [Cl^-] - [HCO_3^-]$  (mmol/liter). Normálérték 8–16 mmol/liter. A kóros érték organikus aciduriákra jellemző. Rendszerint tachypnoe, hányás, bágyadság tüneteivel jár.
- ▶ **Hypoglykaemia:** (vércukor  $<3$  mmol/l) az újszülöttkortól eltekintve, ritka eltérés gyermekkorban csökkent enterális táplálékbevitel esetén is.
- ▶ **Hyperammonaemia.** Sajnos, számos laboratóriumban nem végzik az ammóniumszint mérését. A következő klinikai tünetek esetén kell gondolni rá: anorexia, hasfájás, fejfájás, irritabilitás, bágyadság, tachypnoe, hányás, görcs, kóma, halál. Újszülöttkorban a normálérték felső határa  $100 \mu\text{mol/l}$ , későbbi életkorokban ez  $50 \mu\text{mol/l}$ . Karbamidciklus zavaraiiban  $>1000 \mu\text{mol/l}$ , respiratorikus alkalosist okoz. Organikus aciduriák esetében csak ritkán  $>500 \mu\text{mol/l}$ . Zsír-sav-oxidáció zavaraiiban ez az érték rendszerint  $<250 \mu\text{mol/l}$ .

**Fontos kivételek:** (1) nonketotikus hyperglycaemia (görcs, kóma, hypotonia, apnoe) és a (2) piridoxinhiány (encephalopathia, görcsök).

### Energiatermelés vagy -felhasználás zavarai

#### Klinikai jellemzők:

- ▶ máj, myocardium, agy és izom érintett;
- ▶ hypoglykaemia, lactacidosis;
- ▶ generalizált izomhypotonia;
- ▶ fejlődési elmaradás;
- ▶ keringés összeomlása;
- ▶ bölsőhalál;
- ▶ a kórképek jelentős része kezelhető, amennyiben az éhezést kerüljük.

#### Jellemző kórképek:

- ▶ glycogenosisok
  - ▶ rövid távú éhezés (3–6 órán túl) alkalmával okoz tüneteket.
- ▶ zsírsavoxidáció zavarai
  - ▶ hosszú távú éhezés (12 órán túl) alkalmával okoz tüneteket.
- ▶ mitokondriális encephalopathiák
  - ▶ légzési lánc betegségek,
  - ▶ piruvátdehidrogenáz-hiány,
  - ▶ piruvátkarboxiláz-hiány.

A laboratóriumi diagnosztika során a következő vizsgálatok fontosak:

- ▶ vércukorszint (hypoglykaemia kimutatására),
- ▶ szérum-laktát- és piruvátszint,
- ▶ acilkarnitin-szint eltérés: szárított vércseppből.

### Komplex, nagy molekulák szintézisének vagy katabolizmusának zavarai

#### Klinikai jellemzők:

- ▶ táplálkozás, éhezés, heveny betegség nem befolyásolja;
- ▶ a tünetek állandóak és progresszívek;
- ▶ a központi idegrendszer sokszor érintett;
- ▶ társuló diszmorfiás jelek;
- ▶ a felnőttkorban diagnosztizált öröklődő anyagcsere-betegségek 25–30%-a tartozik ebbe a csoportba;
- ▶ fejlődési elmaradás;
- ▶ kezelésükben jelentős előrelépés.

#### Jellemző kórképek:

- ▶ lizoszomális raktározási betegségek,
- ▶ peroxisomális raktározási betegségek,
- ▶ gliokozláció öröklődő zavarai (változatos tünetekkel, bármely életkorban jelentkezhet. Szűrővizsgálatra alkalmas a transferrin vizsgálata);
- ▶ kreatin-bioszintézis zavarai,
- ▶ szterol-bioszintézis zavarai,
- ▶ purinanyagcsere zavarai.

Laboratóriumi diagnosztikában a következő vizsgálatok fontosak:

- ▶ Kóros metabolit kimutatása: mucopoliszaccharidosisok.
- ▶ Szöveti vizsgálat: raktározott anyag kimutatása.
- ▶ Enzimaktivitás mérés: lizoszomális betegségek diagnosztikája.

- ▶ Mutációanalízis.
- ▶ Transzferrin izoelektromos fókuszálás: glikoziláció zavarainál.

*Kezelésükben* jelentős előrelépés történt az utóbbi időben különösen enzimpótló (Fabry-betegség, Popme-kór, mucopolysaccharidosisok, Gauchre-kór) kezelés vonatkozásában. Figyelemreméltó eredmények szubsztrátredukció tekintetében (Niemann–Pick C típus, Gaucher-kór). Csontvelő-transzplantáció és enzimpótló kezelés kombinációja sikeresnek látszik.

### Egyéb kórképek

- Neurotranszmitterek betegségei.*
- ▶ Nonketotikus hyperglucinaemia.

- ▶ Biogén aminok metabolizmusának zavarai.
- ▶ GABA anyagcsere zavarai.
- ▶ Puridoxin/folsav adásra jól reagáló görcsök.
- ▶ Glükóztranszporter-hiány.

A kórképek időben történő felismerése az egyre több betegség esetében alkalmazható hatékony kezelés miatt nagyon lényeges. A pontos diagnosztikában a laboratóriumi vizsgálatoknak döntő és pótolhatatlan szerepe van.

Egy ország orvostudományának az öröklődő anyagcsere-betegségek terén szerzett tapasztalatainak mennyisége és minősége alapvetően a laboratóriumi diagnosztikát művelők új iránti érzékenységén és szakmai érdeklődésén múlik. Ezen a téren az öröklődő anyagcsere-betegségek 2007. október 1-től 26 kórképre történő kiterjesztése nagy előre lépést jelentett Magyarországon.

## A biobankok

### Biobanks

#### Dr. Inczédy-Farkas Gabriella, Dr. Molnár Mária Judit

Semmelweis Egyetem, Molekuláris Neurológiai Klinikai és Kutatási Központ

*Kulcsszavak:* biobank, adatbázis, személyre szabott orvoslás

*Key-words:* biobank, database, personalized medicine

A posztgenomiális érában az orvosi kutatások egyik nagy feladata a multifaktoriális betegségek etiológiájának vizsgálata, melyben megkerülhetetlen szerepet játszanak a biobankok. Ezek létrehozása során a legkülönbözőbb biológiai minták – vér, liquor, sejtek, szövetek, illetve az ezekből nyert DNS, RNS, fehérjék, metabolitok és egyéb makromolekulák – kerülnek nagyszámú klinikai (fenotípusos, szociodemográfiai, genetikai) adattal való összekötésre és hosszú távú tárolásra.

### A biobankok típusai

A biobankokat több szempont szerint csoportosíthatjuk. *Forrásukat* tekintve vannak klinikai, terápiás, kutatási és igazságügyi biobankok. A klinikai biobankok a klinikai diagnosztika és terápiás követés során összegyűlt mintagyűjteményeket foglalják magukba. A terápiás biobankok terapeutikumokat, például vérkészítményeket tartalmaznak. A kutatást szolgáló biobankok a klinikai gyógyszervizsgálatok, gyógyszerfejlesztések, célzott projektek mintáit foglalják magukba, az igazságügyi biobankok pedig az igazságügyi orvostan területén keletkező mintákat tárolják.

*Metodikájukat* tekintve a biobankok lehetnek populáció-, illetve a betegség alapú biobankok.

- ▶ *A betegség alapú biobankok* egy adott betegség egyes stádiumainak és a különböző kezelési formák hatásainak molekuláris szinten történő meghatározásával teszik lehetővé a biomarkerek azonosítását. A nemzetközileg legismertebb betegség alapú biobankok a deCODE Genetics (Izland) és a Wellcome Trust Case Control Consortium

(Egyesült Királyság). Hazai betegség alapú biobankra példa a schizopren betegek mintáit tároló SCHIZOBANK.

- ▶ *A populáció alapú biobankok* az átlagnépességéből véletlenszerűen kiválasztott egyének biológiai mintáinak és klinikai adatainak gyűjtőhelyei, melyek lehetőséget adnak a gyakori betegségek prevalenciájának és lefolyásának prospektív vizsgálatára, illetve a betegségek kialakulására prediktív biomarkerek azonosítására. Jelentőségük az epidemiológiai kutatásokban, illetve a preventív medicinában van. Európában nagy populáció alapú biobank a több mint 500 000 főt 30 éven át követő, 60 millió fontból megvalósuló UK Biobank ([www.ukbiobank.ac.uk](http://www.ukbiobank.ac.uk)). Ennél is nagyobb szabású a Danish Newborn Screening (NBS-) Biobank, melybe 1982 óta az összes dán újszülött rutinszűrésre levett mintáját gyűjtik: a mintaszám mára megközelítette a 2 milliót. A populáció alapú biobankok különleges alcsoportját jelentik az *ikerregiszterek*, melyeket az 1,6 millió mintát számláló GenomEUtwin (GEUT) projekt harmonizál ([www.genomeutwin.org](http://www.genomeutwin.org)).

### A biobankok felhasználása a kutatásban

A biobankokból végzett kutatások fő irányelvei az adott betegség molekuláris hátterének, rizikó faktorainak, a gén, illetve gén-környezet interakciók („genetikai epidemiológia”) felderítése, transzkriptomikai, metabolomikai és proteomikai vizsgálatok segítségével a betegség jelátvitel útjainak megismerése. A proteomikai kutatások során fehérjemintázat-változásokból következtethetünk az állapot kialakulásának a mechanizmusára, az állapotot indexáló biomarkerekre és egyes fehérjék szerepére a pathogenezis során. A kli-

nikailag validált genomikai, proteomikai és metabolomikai biomarkerek felhasználhatók a szűrésben, a diagnózis megalkotásában, a rizikó, a kezelésre adott válasz és a prognózis becslésében. A biobankok betegellátásban betöltött szerepe a diagnosztikai folyamat megkönnyítése, a leghatékonyabb, személyre szabott terápia kiválasztásának lehetővé tétele ugyanazon beteg különböző mintáinak, illetve több hasonló klinikai profilú beteg mintáinak összehasonlítása által. A biobankok tehát kulcsszereplői a személyre szabott orvoslás fejlődésének.

A személyre szabott orvoslás célja a megelőzés és a betegség korai felismerése, illetve célzott terápia, a fenotípus-alapú morfológiai diagnózis helyett a genotípuson, a betegség kialakulási útjainak molekuláris szintű megismerésén alapuló diagnosztizálás. A ma elterjedt generikus, részleges hatékonyságú és sok mellékhatást jelentő terápia helyett a farmakogenomika módszereivel a gyógyszerre adott válasz, illetve a mellékhatások kialakulásának valószínűsége előre bejósolható lesz. A biobankok lehetővé teszik a gyógyszerbiztonság és -hatásosság preklinikai fázisban való szövet-specifikus vizsgálatát, a farmakogenomikai kutatásokat. Ezáltal a biobankok fontos szerepet játszanak a gyógyszerfejlesztés hatékonyságának növelésében, illetve költségének csökkentésében is.

### A sikeres biobanképítés

A biobanképítés sikerességét meghatározó négy fő tényező az adatok biztonsága, a minták követhetősége, a folyamat integritása és a gyűjtemények harmonizálhatósága. Az adatbiztonság fő tényezője a személyes adatok bizalmas kezelése, melynek megléte meghatározó szerepet játszik a részvételi hajlandóság szempontjából is. A legtöbb biobank azonosító kódok által anonimizált mintákkal dolgozik. Számos országban született a biobankokat szabályozó törvény, Magyarországon ez a 2008. évi XXI. törvény a humán genetikai adatok védelméről, a humán genetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól. A minták követhetőségét befolyásolja a mintavétel módja, a minta feldolgozása, továbbküldése és tárolása. A minta hosszú távú stabilitása kulcsszerepet játszik a biobank érték megőrzése szempontjából. Nagy kihívás, hogy a jelen mintagyűjtési módszerei lehetővé tegyék a jövő kutatásainak elvégzését a gyűjteményen (például microRNS-vizsgálatok). A minta gyűjtésére és stabilizálására kidolgozott módszereket folyamatosan fejleszteni kell. A biobanképítés egységessége a kérdőívekre és a mintakezelésre vonatkozó protokollok megtervezését, standardizálását és ezek hasonló minőségi szintjét jelentik. A biobankok harmonizációja, összevonása az elemszám és ezáltal a kutatás hatékonysága növelésének legkézenfekvőbb módja.

### Biobankok koordinálása

Az utóbbi években ezért számos szervezet jött létre különböző országok biobankjainak összehangolása céljából. Az európai országok ilyen jellegű tevékenységét koordináló szervezet a *BBMRI (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure)*. Magyarországon a biológiai mintagyűjteményeket fenntartó intézmények számára az együttműködés és az információáramlás elősegítésére alakult meg a Nemzeti Biobank Hálózat ([www.biobanks.hu](http://www.biobanks.hu)). A *Genomikai Nemzeti Technológiai Platform (GNTP)* a biobankok rövid és hosszútávú stratégiájának kidolgozására önálló munkacsoportot hozott létre „Genomikai Kincs, Biobanking” néven. A GNTP tevékenységével egyidejűleg és ahhoz kapcsolódva indította el Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (NKTH) Nemzeti Kutatási Infrastruktúra Felmérés és Útiterv (NEKIFUT) projektjét, melynek célja átfogó nemzeti kutatási infrastruktúrafejlesztési stratégia megalkotása. Ennek keretén belül 19 hazai orvosi génbank szerveződött hálózatba.

### Szoftver

A biobankok webfelülete a közvélemény és a betegek tájékoztatásán kívül az adatok bevitelének helye. A biobank szoftver biztosítja a vizsgálatba bevont személyek adatainak és biológiai mintáinak nyomon követését a projekt teljes életciklusa alatt az adatgyűjtéstől, a minták feldolgozásától és tárolásától, a projekt során zajló kísérletek támogatásán keresztül az adatok analíziséig (adatbányászat). A biobank rendszer az adatok védelmében nagy megbízhatóságú és magas átteresztőképességű szerverszámítógépeket használ, amelyek védett szerverfarmon kerültek elhelyezésre.

### Ipari és akadémiai szereplők együttműködése

A biobankokban megvalósuló ipari és akadémiai együttműködés mindkét résztvevő fél számára előnyös; az ipar szereplői számára a klinikai gyógyszervizsgálatokénál jóval szélesebb betegpopuláció és módszertan érhető el, lehetővé válik a prompt feldolgozást igénylő mintákkal való munka, longitudinális kutatások segítségével pedig az adott betegség progressziójának nyomon követése. Az akadémiai szereplők számára pedig nagy mennyiségű adatot feldolgozó módszerek válnak elérhetővé (teljes genom asszociációs, illetve proteomikai vizsgálatok). Mindezek által közelebb kerülhetünk ahhoz a közös célhoz, hogy a beteg mintáját a betegség minél jobb megértése érdekében tudjuk felhasználni.