

**Egyes endokrin paraméterek immunanalitikai módszerrel
mért értékeinek klinikai validitását befolyásoló preanalitikai
tényezők**

Doktori értekezés

dr. Lőcsei Zoltán

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Rácz Károly, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Toldy Erzsébet, egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kőszegi Tamás, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Takács István, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lakatos Péter, egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Alföldi Sándor, főorvos, Ph.D.

Budapest

2013

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS	6
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
II.1. Thyreoglobulin (Tg)	9
II.2. Renin, illetve az aldosteron/renin hányados	19
II.2.1. Primer hiperaldosteronizmus (PA)	22
II.2.2. Renin meghatározás laboratóriumi módszerei.....	27
III. CÉLKITŰZÉSEK	30
III.1. A thyreoglobulin (Tg) és Tg-antitest (Tgab) meghatározásokat befolyásoló egyes in vitro és in vivo preanalitikai körülmények vizsgálata	30
III.2. A primer aldosteronizmus diagnosztikájában alapvető markerek vizsgálata	30
IV. ANYAG ÉS MÓDSZER	32
IV.1. Vizsgált személyek és szérum-minták a preanalitikai körülményeket elemző tanulmányok kivitelezéséhez.	32
IV.1.1. A Tg és a Tgab molekulák stabilitásának és a módszerek funkcionális szenzitivitásának vizsgálata.....	32
IV.1.2. Tgab szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo.....	37
IV.1.3. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására.....	40
IV.1.4. A PRA és a renin koncentráció (REN) értékekből számított aldosteron/renin hányadosok összehasonlítása	42
IV. 2 Analitikai módszerek	44
IV.3. Az eredmények statisztikai feldolgozása	47
V. EREDMÉNYEK	49
V.1. A Tg és a Tgab molekulák stabilitásának és funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.	49
V.1.1. Rövidtávú tárolás.....	49
V.1.2. Hosszú távú tárolás.....	50
V.1.3. Tgab szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo	51
V.2. A primer aldosteronizmus biomarkereinek vizsgálata.....	62
V.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására.....	62
V.2.2. Két renin módszerrel nyert aldosteron/renin hányadosok összehasonlítása	65
V.2.3. A két renin módszer közötti korreláció	66
V.2.4. A két módszerrel nyert saját klinikai tapasztalatok	67

V.2.5. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikoncipiensek (OAC) hatása az aldoszteron és renin szintekre, ill. hányadosukra.....	72
VI. MEGBESZÉLÉS.....	77
VI.1.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.	77
VI.1.2. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo.....	78
VI.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására.....	80
VI.2.2. Két módszerrel mért aldoszteron/renin hányados összehasonlítása	81
VI.2.3. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikoncipiensek (OAC) hatása az aldoszteron és renin szintekre, ill. hányadosukra.....	83
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	85
VII.1.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.	85
VII.1.2. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo	85
VII.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a direkt renin (REN) meghatározására.	85
VII.2.2. Két módszerrel mért aldoszteron/renin hányados összehasonlítása	86
VII.2.3. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikoncipiensek (OAC) hatása az aldoszteron és renin szintekre, ill. hányadosukra.....	86
VIII. ÖSSZEFOGLALÓ.....	88
IX. SUMMARY.....	89
X. IRODALOMJEGYZÉK.....	90
XI. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	101
XI.1. Az értekezéssel kapcsolatos saját in extenso közlemények	101
XI.2. Az értekezéssel kapcsolatos könyvfejezetek:.....	102
XI.3. Az értekezéssel kapcsolatos nyomtatásban megjelent citálható előadás-kivonatok	102
XII. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	104
XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	108

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

„on thyroxin”: thyroxin kezelés alatt álló beteg

OAC : orális antikoncipiens

ACE : angiotenzin-konvertáz enzim

ACE-b = angiotenzin I konvertáló enzim blokkoló

ACTH: adrenocortikotrop hormon

ANOVA: Variancia analízis (parametrikus)

ARB : angiotenzin II receptor blokkoló

ARR: aldosteron/renin hányados

BCR-EU: Community Bureau of Reference of the European Union

Béta-B: béta-adrenerg receptor blokkoló

Ca csatorna-B: kalcium-csatorna blokkoló

CLMA: kemiluminometrikus assay

CRM: Certified Reference Material, by Commission of European Union

CV% : variációs koefficiens%

DTC: differenciált pajzsmirigy karcinóma

ECLIA: elektro-kemilumineszcens immunoassay (kompetitív elvű)

ECLMA: elektro-kemiluminometrikus assay

FS/RFAH hányados: funkcionális szenzitivitás/ referencia tartomány alsó határa

FS: funkcionális szenzitivitás

ILMA: immuno-luminometrikus assay

IMA: immunometrikus assay (szendvics technika)

IMA: szendvics technikák

IRMA: immuno-radiometrikus assay

IRP: International Reference preparation

KSH: Központi Statisztikai Hivatal

KW ANOVA: Kruskal Wallis-ANOVA

NACB: National Academy of Clinical Biochemistry

NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control

PA: primer hyperaldoszteronizmus

pm.: pajzsmirigy

PRA: plazma renin aktivitás

RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

REN : plazma aktiv renin koncentráció

RFAH: referencia tartomány alsó határa

RIA: radioimmuno-assay

T3: trijódthyronin

T4: thyroxin

Tg: thyreoglobulin

TgAb: Thyreoglobulin antitest

TSH: thyreoidea stimuláló hormon

I. BEVEZETÉS

Az endokrin betegek kivizsgálásában alapvető fontosságúak a laboratóriumi vizsgálatok. A klinikai endokrinológiai gyakorlat sikere nagymértékben függ a pontos laboratóriumi mérési eredményektől, mivel a hormonszintekben bekövetkező kicsiny változások a betegség felismerésében és a kezelés hatásának le mérésében sokkal specifikusabbak és szenzitívebbek, mint az anamnézis vagy a fizikálisan is tapasztalható jelek. Ugyanakkor egy laboratóriumi lelet, amennyire fontos, annyira félrevezető is lehet, ha téves adatot nyújt, aminek birtokában azután helytelen döntéseket hozhatunk. Minden beteget ellátó orvos visszaemlékezhet töprengéseire: mennyire hihet a kapott leletnek, hogyan értékelje a cut-off értéket minimálisan meghaladó szintet, mikor hozzon a beteget érintő döntést, mikor ismételtesse meg a mérést? A klinikai endokrinológiában jelenleg az antitestkötésen alapuló módszerek a leggyakrabban alkalmazott vizsgálati eljárások. Annak ellenére, hogy szenzitív és specifikus módszerek, az általuk szolgáltatott eredmény értékelése nagyobb körültekintést igényel, mint a rutin kémiai módszereké. A laboratóriumi diagnosztikai folyamat összetettsége miatt a mintavételtől a lelet kiadásig a teljes folyamatnak csak 25%-át teszi ki az analitikai fázis, míg a preanalitikai faktorok 61%-ban, a posztanalitikai faktorok 14%-ban érvényesülnek (Guder és mtsai 2009).



1. ábra

A preanalitikai fázis a diagnosztikus folyamatban

Az 1. ábra szemlélteti a laboratóriumi diagnosztika folyamat összetettségét. A preanalitikai folyamatok javára történő arányeltolódásnak oka az, hogy napjainkban az analitikai folyamat többnyire automatizált, így nemcsak az analízis idő csökkent le jelentősen, hanem az ember által elkövethető hibák is mérséklődtek a mérések során. (Guder és mtsai 2009). A preanalitikai folyamatban óhatatlanul több az emberi tényező, kezdve a beteg előkészítésétől (pl. bizonyos gyógyszerek, vagy ételek megvonása a mintavétel előtt), a mintavételi, -szállítási és -tárolási körülményekig. A laboratóriumok teljes robotizációja (preanalitikai modulok beiktatása) sem képes az ember által óhatatlanul is elkövethető hibákat kiküszöbölni, ezért belátható, hogy az analitikai fázist megelőző folyamatban több a hibalehetőség, amelynek közel 1/3-át a minta laboratóriumba érkezése előtt követhetik el (Guder és mtsai 2009).

Az 1. táblázat rendszerezi mindazokat az *in vivo* és *in vitro* preanalitikai faktorokat, amelyek a klinikai laboratóriumi gyakorlatban felmerülnek és téves eredményszolgáltatáshoz, illetve leletértelmezéshez vezethetnek. Az *in vivo* faktorok esetében helyesebb preanalitikai körülményekről, mintsem preanalitikai hibáról beszélni, mert ezek mindegyike a betegnek a mintavételkor érvényes individuális, biológiai állapotából adódik, még akkor is, ha a mintában lévő zavaró szubsztancia csak az analitika során okoz interakciót. Ezek egy része rejtett hibaként jelenik meg, míg a többi *in vivo* preanalitikai körülmény uralható, ha figyelünk rá (Toldy és mtsai. 2010).

Az eredményt befolyásoló *in vitro* preanalitikai tényezők inkább hibának tekinthetők. Ezek függetlenek a beteg mintájának adottságaitól, így biztonságosabban kiküszöbölhetjük, illetve minimalizálhatjuk a gyakorlatban a pontosan definiált munkautasítások betartásával. Az immunoassay jellegzetességei (antitest keresztreakciók, specificitás, mérés technikával összefüggő szenzitivitási értékek, mátrix effektus) miatt a leleten közölt adat néha téves következtetést engedhet meg, tényleg terelheti a diagnosztikát, a terápia nyomon követését. Az eredmény több esetben nemcsak a meghatározni kívánt molekula szintjét, hanem annak szérumkörnyezetét is tükrözi. Különösen fontos e tényezők ismerete, amikor az eredmények a beteget terhelő és drága további vizsgálatok elvégzéséről döntenek, téves értékük meghatározhatja a beteg további sorsát. A fenti gondolatokból kiindulva jelen disszertáció hat endokrin markert (thyreoglobulin, thyreoglobulin ellenes antitest, plazma renin aktivitás, kvantitatív renin, aldosteron/renin

hányadosok) vizsgált, azzal a szándékkal, hogy növelje a differenciált pajzsmirigy (pm.) karcinómák és a primer aldosteronizmus laboratóriumi diagnosztikájának megbízhatóságát.

1. táblázat

Az endokrin lelet értékelésénél figyelembeveendő preanalitikai körülmények

TÍPUSA	EREDMÉNYT BEFOLYÁSOLÓ PREANALITIKAI TÉNYEZŐK
<u>In vivo</u>	vérvételi körülmények: időpont, testhelyzet, vérvételt megelőző mozgás, fizikai terhelés, alimentáris állapot, stressz
	általános élettani állapot: terhesség, súlyos betegség
	gyógyszerhatások: a szer hatásából adódóan változtatja meg a hormonszinteket az exogén hormont (pl. inzulin, l-thyroxin, kortizol, GH) a módszer beméri
	a biológiai minta rendkívüli adottsága, amely rejtett hibaként jelenik meg: - az antigén-antitest komplex kialakulását zavaró gyógyszerek jelenléte - a módszert zavaró endogén immunglobulinok jelenléte - a mérni kívánt marker rendkívül magas szintje - magas, vagy alacsony transzportfehérjék
<u>In vitro</u>	vérvételi cső típusa
	biológiai minta: teljes vér, plazma, szérum, vizelet, nyál
	minta azonosítása: a vérvétel helyén és a laboratóriumban
	mintaszállítási idő és hőmérséklet
	centrifugálás: fordulatszám, idő és hőmérséklet
mintatárolás a vérvétel helyén és a laboratóriumban: idő és hőmérséklet	

II. Irodalmi áttekintés

II.1. *Thyreoglobulin (Tg)*

A Tg 768 aminosavból álló pajzsmirigy (pm.) specifikus glykoprotein (660 kDa), amely a pm. sejtekben termelődik, és a folliculus lumen kolloidjában tárolódik. A Tg nem homogén molekula, több izoformja létezik. Posztranszlációs átalakulása (glükóziláció, jodínáció, szulfatáció. stb.) során a molekula konformáció változása további epitop keletkezésével, vagy vesztéssel jár. A szövethez kötött formák eltérnek a plazmában keringő molekuláktól, az utóbbiak 10%-a glikozilált, 0,1-2%-a jodált formában kering. Varianciája tovább fokozódik azáltal, hogy az egyes izoformák koncentráció viszonyai eltérőek az egészséges populációban, és az autoimmun, valamint a malignus pm. betegségekben. Pajzsmirigy karcinómában dominánsabb a glükozilált izoforma, míg a jodált alacsonyabb koncentrációban fordul elő. Biológiai felezési ideje szíálsav tartalmától függ, így néhány órától 6 nap is lehet, átlagosan a klinikai gyakorlatban 3 nappal számolunk (*Spencer 2010*).

Normális funkció mellett a Tg szint jól korrelál a pm. szövet méretével. A Tg a pm. hormonok (T4, T3) prohormonja és tároló molekulája. A thyreoidea stimuláló hormon (TSH) a pm. sejtek számának növelésén túl fokozza a proteolízist, amelynek során a mirigyből szabaddá válik a pm. hormon és a Tg is. Így a keringésbe jutó Tg mennyisége mindenkor függ a TSH szinttől. A fokozott pm. hormon kibocsátás (hyperthyreosis) is megemeli a Tg szintet. A pm. szövetet ért bármely történés - pl. műtét, biopszia, radiojód kezelés, gyulladás, - szintén növeli a Tg kibocsátását a szövetből. Ezért Tg meghatározásra mintavételt csak beavatkozás után 4-6 héttel érdemes végezni.

Az egészséges populációban a Tg referencia tartománya függ a jódeállatottságtól. Megfelelő jódeállatosság mellett, módszerfüggően 2-70 ng/ml, jódehiányos területen a jódehiány fokának megfelelően növekszik a pajzsmirigy méretének megfelelően (*Knudsen és mtsai. 2001*). Stabil TSH szint mellett 4 hónapos periódusban vizsgálva a Tg szint változása azonos egyénben kb. $\pm 15\%$ -ra tehető (*Spencer 2010*). Az átlagos populációban mért Tg szintekhez képest magasabb értékek fordulnak elő a fokozott metabolikus aktivitás miatt koraszülöttekben, gyermekekben és terhes nőkben.

Thyreoidectomián átesett betegekben a „normál tartomány” fogalma érvényét veszíti. Ekkor a megmaradt pm. szövet mennyisége és a TSH szint együttesen határozza meg a referencia tartományokat. Általában 1 g pm. szövet normális TSH mellett 1 ng/ml, illetve szupprimált TSH mellett 0,5 ng/ml Tg szintet hoz létre a szérumban (*Mazzaferrri és mtsai. 2003*).

Az értékek az immunanalitikai módszerekben használt eltérő antitestek és jelölési technikák miatt csak hozzávetőlegesek. Viszont a teljes thyreoidectomián és a sikeres radiojód ablation átesett betegek esetében, amikor elméletileg nincs jelen pm. sejt, a Tg módszertől függetlenül nem jelenhet meg a keringésben. Ennek a ténynek egyértelmű bizonyítása az analitikában nagy kihívást jelent (*Demers és Spencer 2003*).

A Tg meghatározás jelentősége nem daganatos betegekben meglehetősen csekély, csak két ritka kórkép esetén nyújt differenciál-diagnosztikai segítséget: 1.) elkülöníti a thyreotoxicosis facticiát a valódi hyperthyreosistól, az előbbiben normális, míg az utóbbiban magas értékek a jellemzőek. 2.) A congenitális hypothyreosis aetiológiájának vizsgálatakor a nem detektálható Tg szint erősíti meg a pajzsmirigy hiányát (*Demers és Spencer 2003*).

A malignus megbetegedések között a pm karcinóma ritka (<1%), de az endokrin rosszindulatú daganatok között a leggyakoribb. Incidenciája mindkét nemnél világszerte növekszik, megfelelő jódekkészletű területen a differenciált karcinómák tekintetében, míg az anaplasztikus forma ott ritkábban fordul elő (*Pacini és deGroot 2009*). Az elmúltévtizedben a növekedés nagyobb, mint 5%, szerencsére a halálozás növekedése nem kíséri. (*Pacini és mtsai. 2009*). A differenciált pajzsmirigy karcinóma (DTC) az összes pajzsmirigy karcinóma 80%-a, a papilláris forma 4-5-ször gyakoribb a follikulárisnál, nők körében közel háromszor gyakoribb, mint férfiakban. A hazai új esetek száma évenként 500 körüli (*Konrády 2011*).

A pajzsmirigyrákos beteg egész életén át gondozásra szorul, s a recidíva, metasztázis időben történő felismerése alapvető a beteg további sorsát illetően. Amíg a diagnosztizáláskor a vérből kimutatható Tg szinteknek nincs jelentősége, addig a nyomonkövetésben alapvető a szerepe. Totális thyreoidectomiát és I-131 ablatív terápiát követően az emelkedett Tg szint a recidívát korán képes jelezni, ha az alkalmazott

módszer érzékenysége lehetővé teszi a nagyon alacsony szintek biztonságos mérését. A jelenleg érvényben lévő szakmai ajánlások egybehangzóak abban, hogy a DTC-ben szenvedő betegek gondozásában a Tg szintek ismerete nélkülözhetetlen (*Pacini és mtsai 2009*). Ugyanakkor a Tg meghatározásához alkalmazott immunanalitikai módszer több ponton kétségessé teszi az eredmények megbízhatóságát (*Spencer és Lopresti 2008*).

A Tg szintek klinikai értékét befolyásoló analitikai korlátok:

Eltérő standardizáció, a módszerek közötti és módszeren belüli torzítások: Ugyanazon mintának különböző módszerekkel mért Tg szintjei egymással nem vehetők össze. (*Spencer és munkatársai, 2005*) tanulmányukban 4 radio-immunoassay (RIA) és 10 immunometrikus (IMA) Tg módszert vizsgáltak meg 110 euthyreoid esetben. A módszerek közötti variációs koefficiens 47% volt, és az eltérés még akkor is nagy (37%) maradt, ha csak azokat a módszereket vették figyelembe, melyeket a CRM-457 (Certified Reference Material, by Commission of European Union) jelű referens preparátumra kalibrálták. A módszerek közötti variabilitás mindenkor nagyobb volt, mint a biológiai (14%). DTC-ben szenvedő betegek esetében a Tg szint nyomon követése szerencsére hosszú évtizedeken keresztül szükséges, és már kicsiny koncentrációváltozásoknak is lehet klinikai jelentősége. Ezért döntő fontosságú a módszerek szenzitivitásának pontos ismerete, valamint az, hogy a méréseket következetesen ugyanazon módszerrel végezzük (*Spencer 2010*).

A módszerek nem megfelelő funkcionális szenzitivitása: A különböző assay-k szenzitivitása az immunkémiai elvtől függően nagyságrendekkel is eltérhet egymástól. Általában elmondható, hogy a telítő szendvics technikák (IMA) sokkal (közel 10x) szenzitívebbek, mint a kompetitív elven működő. RIA módszerek. A klinikai gyakorlat számára a funkcionális szenzitivitás (FS) ismerete a döntő. Ez azt a legkisebb Tg szintet (kimutathatósági határt) jelenti, amelyet a laboratórium hosszabb távon (ugyanazon módszer alkalmazásával, különböző időpontokban) 20%-ot meg nem haladó varianciával, biztosan mérni tud. Ennek meghatározását minden laboratóriumnak el kellene végeznie szigorúan definiált protokoll szerint (*Demers és Spencer 2003, Spencer 2010*). Azimmunanalitika tulajdonságából adódóan az eltérő időpontokban történő meghatározások miatt, különösen az alacsony tartományban adódhatnak olyan magas inter-assay variációs koefficienssek, amelyek a biológiai variabilitást meghaladják. Ezért egy

módszerrel, de különböző időpontokban mért ugyanazon szérum mérésének a klinikailag releváns időtartam során – ez DTC esetében 6-12 hónap – mért variabilitását ismertté kell tenni a leletet értelmező klinikus előtt. Az FS ismeretében dönthetünk, hogy stabil TSH szint esetén melyik az az alacsony méréstartományban kimutatható Tg szint, amelyre hagyatkozhatunk <20%-os hiba mellett (*Spencer 2010*). Az esetleges reklamációk megvitatása érdekében a laboratóriumnak meg kellene őrizni hosszabb (pl. 6 hónap) ideig azt a szérum mintát, amelyből a Tg meghatározása történt. Hazánkban gyakrabban használt Tg módszerek funkcionális szenzitivitását és a DTC-ben a gyártó által javasolt döntéshozatali határértékét a **2. táblázat** mutatja be.

2. táblázat

Néhány, hazánkban forgalmazott Tg módszer funkcionális szenzitivitása

Módszer	Tg módszer automata	FS (funkcionális szenzitivitás)* (ng/ml)	Referencia tartomány alsó cutoff értéke (ng/ml)	Gyártó
RIA	RIA	Nincs adat, csak analitikai szenzitivitás: 0,8	7	Diagnostic Systems Laboratories Inc. Texas, USA
IMA 1. generáció	ELISA-hTg (IRMA)	1	1	Schering-Cis- Bio, International Gif-surYvette, France
	Cobas, Elecsys (ECLMA)	<1	1,4	Roche, Mannheim
	LIASON (ILMA)	0,5	0,2	Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA
	DYNOtest Tg-plus (IRMA)	0,2	2	BRAHMS, Henningsdorf, Berlin
	Immulite (CLMA)	0,9	1,6	Siemens, Los Angeles, CA
IMA 2. generáció	Access (CLMA)	0,05	1	Beckman Coulter, Fullerton, CA

*Gyártók által deklarált adat (IRMA: immuno-radiometrikus assay, ECLMA: elektrokemiluminometrikus assay, CLMA: kemiluminometrikus assay, RIA: radio immuno-assay)

Mivel a Tg keringő formái rendkívül heterogének, emiatt a molekula immunreaktivitása megváltozik. Ha két különböző antitestet alkalmazó módszer között azonos standardizáció mellett kétszeres a különbség, akkor úgy a FS, mind a referencia tartomány alsó határa (RFAH) között is kétszeres kell, hogy legyen az eltérés, hogy a két módszer azonosnak tekinthessük klinikai szempontból. A forgalomban lévő Tg módszerek, néhányat kivéve (*Morgenthaler és mtsai 2002*) alig képesek különbséget tenni a RFAH és a FS között. Az FS abszolút értékének ismerete nem elégséges ahhoz, hogy összehasonlítsuk a különböző módszerek klinikai szenzitivitását, még akkor sem, ha azt a szigorú előírásoknak megfelelően határozták meg (*Demers és Spencer 2003*).

A módszerek közötti differenciálásra sokkal inkább lehetőséget nyújt, ha az FS és a RFAH közötti eltérést vizsgáljuk meg, mivel ez jobban jelzi a módszer klinikai hatásfokát, így a generációkba való besorolást az FS/RFAH hányados érték alapján javasolja Spencer. Ezt az értéket a RIA módszernél <10; a 1. generációs IMA esetében >10 és a 2. generációs IMA esetében >100-ban adja meg (*Spencer 2010*).

Mivel a DTC-ben szenvedő betegek követésekor a Tg jelenlétének hiányát kell bizonyítani, így a döntéshozatali cutoff, azonos legyen a módszer FS értékével. Minél alacsonyabb a detektálhatósági határ, annál megbízhatóbb és klinikailag hasznosabb a Tg módszer feltéve, ha a TgAb interakciót kizártuk. Így, a RIA és az 1. generációs IMA módszerek alkalmatlanok a korai recidíva kimutatására, különösen akkor, ha a beteg TSH szuppressziós terápiában részesül (*Spencer 2010, Grebe 2009*). *Schlumberger és mtsai. (2007)* hét különböző funkcionális szenzitivitású (0,02-0,9 ng/ml) Tg módszert hasonlítottak össze 944 totál thyreoidectomián és ¹³¹I ablation átesett beteg gondozása során. Tg meghatározásokat végeztek TSH szuppressziós terápia mellett és TSH stimulációban is. Ha a döntéshozatali cut off értéket 0,9 ng/ml-ben állapították meg, akkor T4-szuppresszióban 19-41% szenzitivitást kaptak 92-97% specificitás mellett. Míg ha a két alacsonyabb FS-t igazoló (0,02-0,11 ng/ml) módszert alkalmazták, akkor thyroxin szuppresszióban a szenzitivitás 81% és 78% lett, amihez 42% és 63%-os specificitás tartozott. Viszont, ha egy optimalizált (módszer és műszer specifikus, saját maguk által meghatározott) FS-t (0,22-0,27) használtak, akkor 65%-os szenzitivitás mellett 87%-os specificitást kaptak. Eredményeik egyértelműen bizonyítják, hogy a nagyon alacsony

FS-el rendelkező Tgmódszerrel már thyroxin szuppresszió mellett is közel 20-25%-al javítható a klinikai szenzitivitás és a specificitás (*Schlumberger és mtsai 2007*).

Spencer, Fatemi és munkatársai (2010) egy érzékeny Tg assay (FS: 0,05 ng/ml) használatával igazolták 894 TgAb negatív DTC-ben szenvedő betegben, hogy <0,1 ng/ml Tg szint „on thyroxin”, kiválóan jelzi előre a negatív rhTSH stimulációs teszt eredményt.

Antitest interakciók, thyreoglobulin antitest (TgAb) jelenléte a beteg mintájában

A 40 domaint tartalmazó Tg több epitopja ellen képződhetnek elsősorban IgG típusú autoantitestek, amelyek jelentős interferenciát okoznak az immunanalitika során. Ezek az antitestek a DTC-ben szenvedők körében akár 20-30% gyakorisággal is megjelenhetnek. Túlélést befolyásoló hatásuk nincs. A DTC-ben és autoimmun pm. betegségben előforduló antitestek eltérhetnek egymástól. (*Okosieme és mtsai. 2003, Spencer és mtsai. 1998*). A Tg mérés irracionális, ha nem ismerjük a TgAb szinteket. Több szerző beszámolt arról, hogy kiújult DTC-ben szenvedő betegben nem találtak Tg-szint emelkedést, és ezt csakis a TgAb zavaró hatásával tudták magyarázni (*Spencer 2010, Spencer és mtsai. 2005, Spencer és mtsai. 1998, Spencer és Lopresti 2008, Nascimento és mtsai. 2011*). Általában elmondható, hogy az IMA módszerek TgAb jelenlétében alulmérlik a valós Tg szintet, míg a kompetitív módszerek (RIA) általában a valósnál magasabb értéket mérnek. Éppen ezért az endogén TgAb interferencia kiszűrésének egyik módja, ha ugyanannak a mintának a Tg szintjét megmérjük IMA és RIA módszerrel is, mert a két eredmény közötti ellentmondásos eredmény rámutat a TgAb interferenciára (*Spencer 2010, Vincze és mtsai. 2004, Spencer és Lopresti 2008*). Az endogén TgAb kiszűrésének másik módja a Tg-visszanyerési teszt, de nem elég hatékony, mert a magas Tg visszanyerési százalék nem igazolja mindig az antitestek hiányát. Ugyanakkor az alacsony visszanyerési százalék nem jár mindig együtt TgAb pozitivitással. A jelenlegi konszenzus az, hogy nincs értelme Tg visszanyerési %-ot meghatározni, hanem szenzitív, kvantitatív TgAb módszert kell alkalmazni (*Pacini és mtsai. 2009, Spencer 2010, Vincze és mtsai. 2004*). Az így nyert TgAb szintek jelenléte vagy hiánya szabja meg a Tg lelet értelmezését. (*Stockigt 2005, Stanojević és mtsai. 2009*). Ezért fontos mindkét módszer (Tg és TgAb) korlátaival tisztában lennünk, azok egymáshoz való viszonyát tisztáznunk.

A TgAb szintek klinikai értéke

A TgAb nem köt komplementet, átlagos térszerkezettel rendelkezik. Alacsony titerben jelen van egészséges, euthyreoid emberek vérében is. A szakmai irányelvek szerint a mintákban Tg mérés előtt TgAb mérést kell végezni szenzitív módszerrel, de nincs hozzá megadva egy olyan antitest döntéshozatali cutoff érték, amely kizárná az alkalmazott Tg teszt TgAb interferenciáját (*Spencer 2010, Cubero és mtsai 2003, Rosario és mtsai 2004*). A magas antitestszintű (antitest pozitív) DTC-s esetekben a TgAb szolgálhat kiegészítő tumormarkerként is (*Pacini és mtsai. 2009, Spencer 2010, Spencer és Lopresti 2008*).

A TgAb, mint Tg-t helyettesítő tumormarker

A TgAb, indirekt tumormarkerként alkalmazása a TgAb pozitív DTC-s betegeknél logikus megfontolás, ha arra gondolunk, hogy a Tg antigén jelenléte fenntartja az antitestképzést, míg az antigén prezentáció hiánya esetén az antitestképzés hosszabb távon csökken, majd kialszik normális immunitású személyben. A TgAb szintek típusosan magasabbak papilláris karcinómában összehasonlítva a follicularis karcinómával. Egyes szerzők arra is rámutattak, hogy magas TgAb szintek esetében gyakrabban tapasztaltak nyirokcsomó metasztázist (*Pacini és mtsai. 2009, Spencer 2010, Spencer és Lopresti 2008, Kim és mtsai. 2008 Görge és mtsai. 2005*).

A műtét után a TgAb szintek csökkennek, majd remisszióban eltűnnek a keringésből. Azonban hosszú biológiai felezési idővel kell számolnunk: a Tg-al komplexet alkotva elhúzódóan perzisztálnak a keringésben, az antigén prezentáció hiányának ellenére a memóriasejtek még sokáig fenntarthatják a képződésüket. Betegségmentes állapotban a Tg és a TgAb teljes eliminációja között eltelt idő 2-3 év is lehet. Ha újra megjelennek, vagy ha szintjük emelkedik, akkor az a tumor kiújulását jelezheti. Ugyanakkor az izotópkezelés következtében bekövetkező sejtszétesés (radioautolysis), a kiáramló antigen stimulus okozhat átmeneti TgAb emelkedést az immunrendszer válaszaként a kezelést követő 6 hónap folyamán, recidíva nélkül is (*Spencer és mtsai. 2005*). Ezen kívül, heterophyl hatásra, emelkedő TgAb szintet észlelhetünk aspecifikus módon a szervezet ért egyéb bakteriális vagy vírus okozta infekciót követően. Mivel a betegek immunválasz készsége, így antitestképző képessége az évek során változhat, a DTC bete-

gek terápia-monitorozásakor a már ismert TgAb státuszt a Tg mellett mindenkor meg kell határozni (*Spencer 2010, Vincze és mtsai. 2004*).

TgAb szintek meghatározásának korlátai

Eltérő standardizáció, a módszerek közötti és módszeren belüli torzítások

Mint ahogy már a Tg kapcsán említettem a nagy molekulatömegű Tg több epitopja ellen képződhetnek autoantitestek, így az ellenük keletkezett antitestek is heterogének. A különbségek a tesztek specificitásában is eltérést okozhatnak (*Spencer 2010*). Mivel az antigén (Tg) szerkezete rendkívül komplex, így nem meglepő, hogy lehetetlen minden betegségtípusnak megfelelő TgAb módszert kifejleszteni, hisz annak specificitását és szenzitivitását a módszerben *in vitro* alkalmazott Tg epitop térképe határozza meg (*Demers és Spencer 2003*). A TgAb módszerek közötti nagyfokú eltérés (2. *táblázat*) fő oka, magának a cirkuláló TgAb-nek a heterogenitása, mely különösen DTC-ben jellemző, míg az autoimmun pm. betegségekben kisebb mértékű így jobban definiálható. (*Spencer 2010, Demers és Spencer 2003, Spencer és mtsai. 2005*). Az eltérő konformációjú antitestek más-más antigénkötő affinitásúak és specificitásúak. Ez magyarázza az eltérő antitest szinteket, valamint a módszerek között tapasztalható – néha nagyságrendbeli különbséget. A módszerek közötti nagy variabilitás jól tükrözi mind a tisztaságát, mind az epitop specificitását a kitben használt Tg-protein reagensnek, valamint a különböző betegbőlszármazó, mintában jelenlévő TgAb heterogenitást. Az antitest szintek abszolút értékében tapasztalt eltérések azzal is magyarázhatóak, hogy néhány módszerben az alkalmazott antigén csak az IgG-t, míg mások az IgG és IgM izotípust együttesen mérik. Ezen túl koncentrációfüggő interakciót okozhat a mintában jelenlévő Tg is (*Spencer és mtsai. 2005*). A TgAb módszerek interassay variációs koefficiense közel kétszer magasabb a Tg szinteket mérő módszerekhez képest. Spencer és mtsai. 42 TgAb pozitív szérumot vizsgáltak 12-féle kvantitatív TgAb módszerrel és azt tapasztalták, hogy a minták 10%-ában volt csak az antitest kimutatható mindegyik módszerrel. Viszont egyetlen módszerrel a minták 1/3-ában igazolódott csupán TgAb pozitivitás. Eredményeik azt támasztják alá, hogy TgAb interferencia nem mindig bizonyítható a kvantitatív antitest módszerekkel sem (*Spencer és mtsai. 2005*).

A módszerek eltérő (0,3-115 U/ml) referencia tartományának (3. táblázat) legfőbb oka a nagyon szélsőséges epitop felismerő készség, még akkor is, ha a standardizáció a jelenleg még érvényes nemzetközileg hitelesített preparátumra (MRC 65/93) történt. Az alkalmazott antigén humán Tg referens készítmény, vagy rekombináns antigén. A standardizáláshoz az új referens preparátum, amelyre a laboratóriumi szakmának nagy szüksége lenne jelenleg még kifejlesztés alatt áll(*Spencer 2010*).

3. táblázat

Néhány, hazánkban alkalmazott TgAb módszer szenzitivitása és referencia tartománya

TgAb módszer (analizátor)	szenzitivitás*		TgAb negativitás határértéke* U/ml	Gyártó
	Analitikai U/ml	Funkcionális U/ml		
RIA	5,5	20	<60	BRAHMS, Berlin
ECLIA (Elecsys)	10	<30	<115	Roche, Mannheim
CLMA (Architect)	0,07	<2	<4,1	Abbott, Wiesbaden
ILMA (Liaison)	5	-	<5	DiaSorin, Italy
CLIA (ACS)	10	30	<60	HealthCare LLC, Bayer, New York, USA
RIA	6	15	<30	CisBio, Italy
IRMA	6	-	<100	DiaSorin, Italy
CLIA (Immulite)	2,2	10	<40	Siemens, Los Angeles, CA

*gyártó által deklarált adat

A TgAb módszerek funkcionális szenzitivitása (FS)

Sajnos a gyártók jelentős része a TgAb módszeréhez csak az analitikai szenzitivitást definiálja. A **3. táblázat** néhány hazai forgalomban is lévő módszer adatait összegzi, amelyből kitűnik, hogy széles tartományban eltérnek a szenzitivitási értékek. Mivel a szakmai protokollok szerint a megfelelően szenzitív TgAb módszer fontos kiegészítője a Tg eredmények értékelésének, ezért a FS ismerete elengedhetetlen a TgAb pozitív esetek terápia monitorozásához. Ismerete nélkül nem lehet tanulmányozni az alacsony, de még normális TgAb szintek és a Tg módszerek közötti interakciót, amire az irodalmi állásfoglalások még nem egyértelműek. Néhány szerző vizsgálta már különböző módszerrel, hogy melyik az a TgAb titer, amely zavarja a Tg szint mérését, de általános következtetés nem vonható le, mert eltérő bizonyítási módszerekkel és más-más immunanalitikai Tg és TgAb módszerrel dolgoztak (*Demers és Spencer 2003. Preissner és mtsai. 2003, Rosario és mtsai. 2004*).

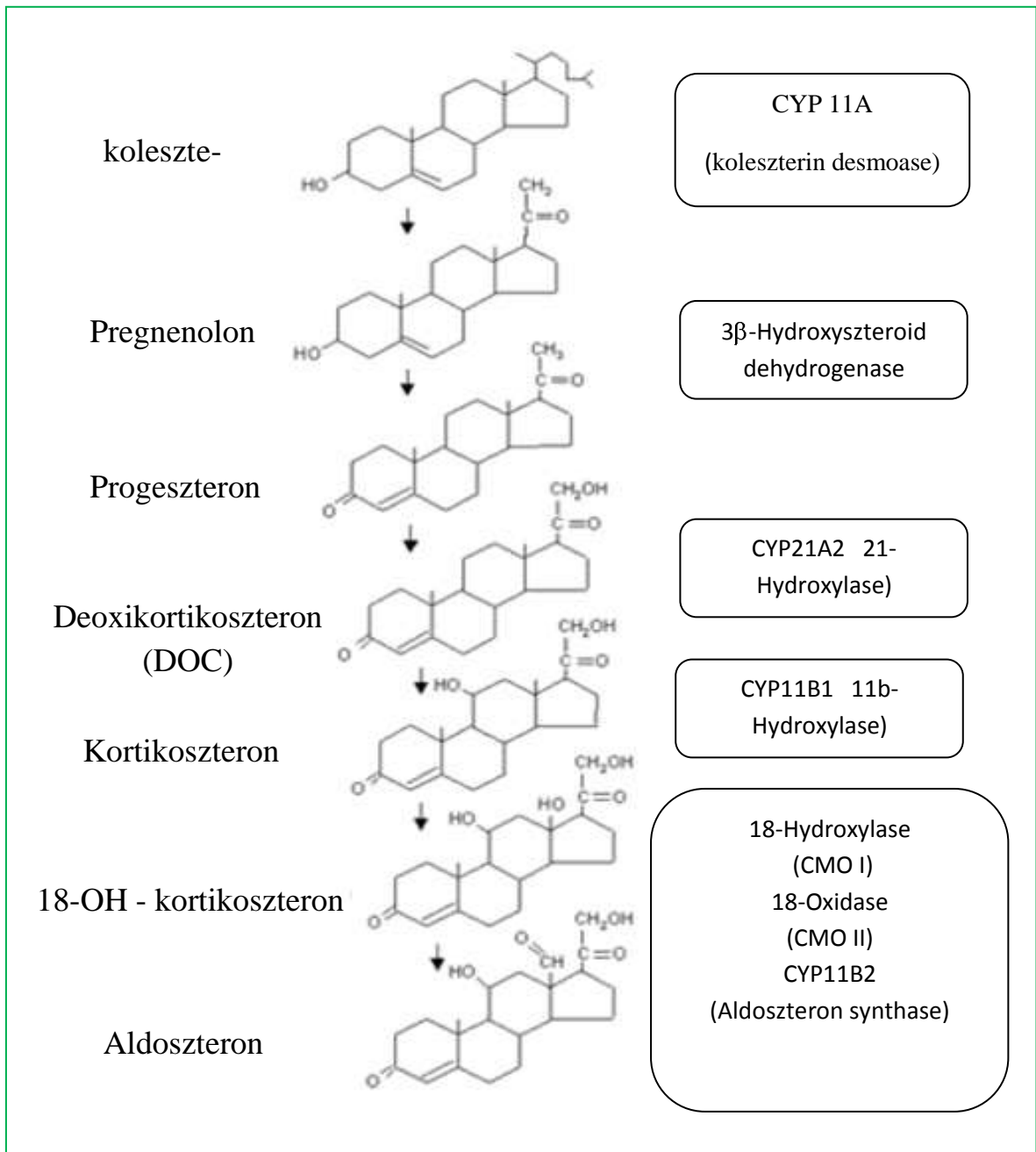
Fontos lenne, hogy a TgAb sorozatos meghatározását ugyanazon módszerrel végezzük, mert DTC-ben szenvedő totál thyreoidectomián átesett betegek TgAb referencia tartománya nem ismert. Ezért információt csupán ugyanazon betegben egymást követően, ugyanazon módszerrel mért antitest titerek összehasonlítása nyújthat csak (*Görges és mtsai. 2005*).

Jelenleg a DTC-s beteg gondozása során a szakmai ajánlásoknak megfelelően, ha TSH stimulációban 1 ng/ml-nél kisebb Tg szintet mérünk, a beteget komplett remisszióban lévőnek tekintjük, és nem végzünk pl. egész test scintigráfiát vagy ultrahangon kívül más képalkotást a nyomon követésben. Más szerző 2.0 ng/ml-nél húzta meg saját döntési határértékét. (*Mallick és mtsai. 2012*). Ugyanakkor emelkedő Tg érték akár a daganat kimutatása nélkül is indikálhat újabb I 131 terápiát. A beteg számára alapvetően fontos, Tg mérésre alapozott döntések és a mérés pontosságát fent részletezett módon zavaró tényezők nyilvánvalóan szükségessé teszik a Tg mérés megbízhatóságának további kutatását, amelyet a disszertáció egyik alapvető feladatának tekintem, a célkitűzésekben foglaltaknak megfelelően.

II.2. Renin, illetve az aldosteron/renin hányados

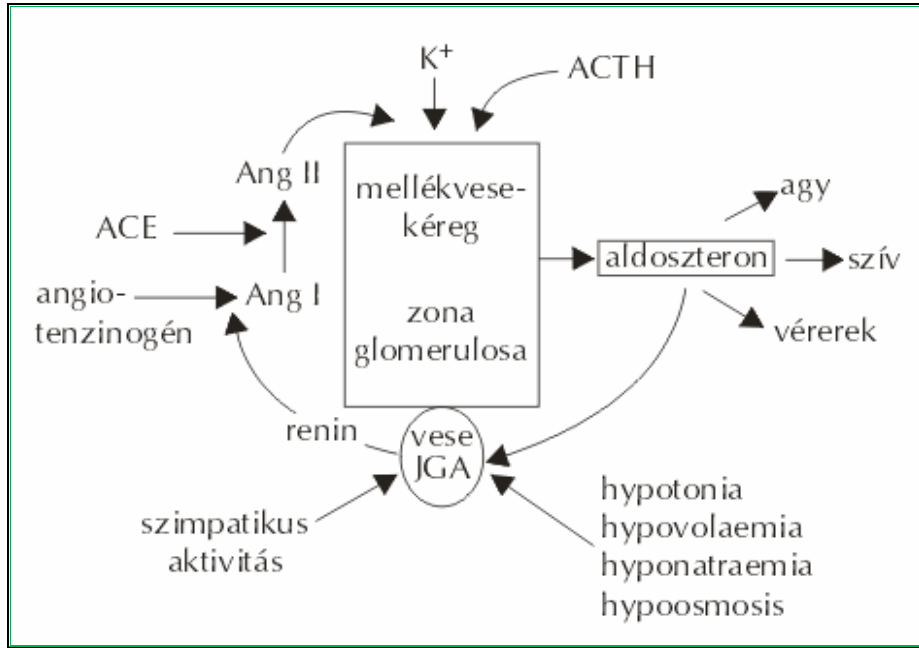
A só- vízháztartás szabályozásában jelentős hormon az aldosteron, melynek túltermelődése – legyen az elsődleges, vagy másodlagos – gyakori, és jelentős oka a morbiditásnak és mortalitásnak. Az aldosteron szintézist (**2. ábra**) elsősorban a nátrium egyensúly és a keringő vértérfogat határozza meg a renin-angiotenzin rendszeren keresztül. A renin proteolitikus enzim, amely a vese juxtaglomeruláris apparatusában a proreninből keletkezik és az angiotenzinogén→angiotenzin I átalakulását katalizálja. Az angiotenzin I további átalakítását az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) végzi angiotenzin II-vé. Az angiotenzin II a mellékvese zona glomerulosa sejtjein lévő angiotenzin 2 receptoron hatva stimulálja az aldosteron termelést. Az ACTH ugyancsak hat az aldosteron szekréciójára, de tartós ACTH stimulus esetén az emelkedő aldosteron szint újra normalizálódik. Ebben az escape mechanizmusban egyéb faktorok, például a dopamin és az atriális natriureticus peptid is szerepet játszanak csökkentve az aldosteron termelését. A renin szekréció az angiotenzin II tónusos gátló hatása alatt áll (*Rác 2011.*)

A renin-angiotenzin-aldosteron rendszer (RAAS) jelentős szereppel bír a só- és vízháztartás, valamint az artériás nyomás, azaz a vérnyomás szabályozásában (3.-4. ábra). Az aldosteron túltermelés kiváltotta magas vérnyomás önmagában káros kardiovaszkuláris hatásokkal jár, de az angiotenzin II és az aldosteron közvetlen toxikus hatással is lehet a kardiovaszkuláris rendszerre (myocardiumra, endothelre). A mellékvese aetiológiájú primer hiperaldosteronizmuson kívül a hiperaldosteronizmus másodlagos formái is gyakoriak. Primer hiperaldosteronizmusban a plazma renin szint alacsony, az aldosteron-renin arány (ARR) magas. Másodlagos hiperaldosteronizmust a renin-angiotenzin rendszer aktivációja (renin túlprodukció) okoz: magas aldosteron szint mellett normális vagy magas renin szint mérhető, ugyanakkor a vérnyomás lehet normális és magas is. A két állapot elkülönítése fontos, hiszen háttérükben eltérő okok állnak, amelyek eltérő kezelést igényelnek.



2. ábra

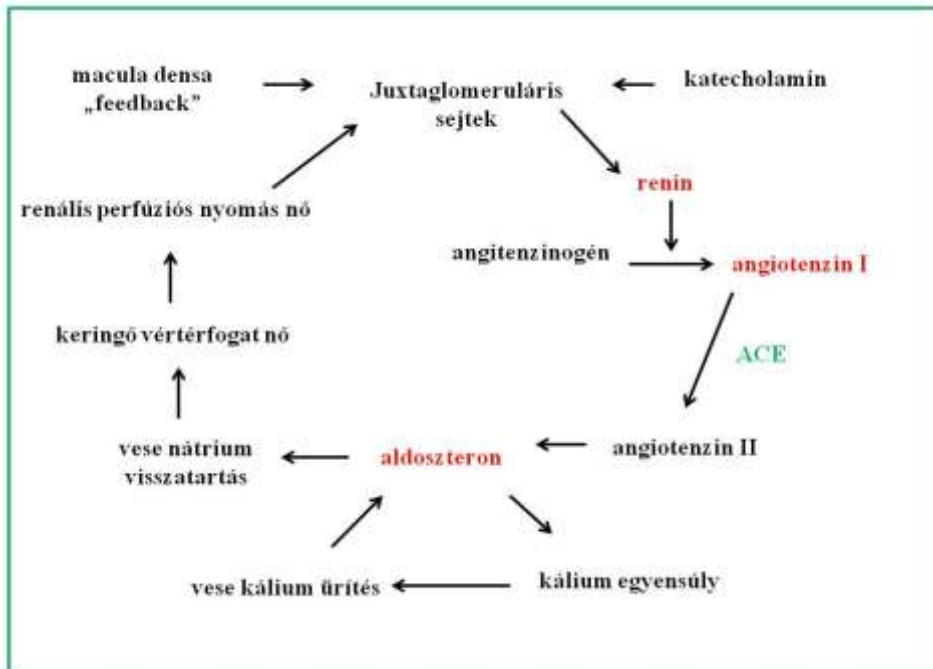
Az aldoszteron bioszintézise (Arai és mtsai. 2010)



3. ábra

Az aldoszteron szekréció szabályozásában résztvevő serkentő tényezők
(Gláz és mtsai. 2005)

Jelmagyarázat: JGA: juxtaglomeruláris apparátus, Ang I: angiotenzin I. Ang II: angiotenzin II



4. ábra

Renin-angiotenzin-aldoszteron és kálium-aldoszteron negatív feedback körök
(Williams és mtsa. 1998)

II.2.1. Primer hiperaldoszteronizmus (PA)

1954-ben Conn írta le először a mellékvese adenóma okozta aldoszteron túltermelés következményeit. A hipertóniából, hypokalaemiából és metabolikus alkalózisból álló klinikai tünetegyüttest Conn-szindrómának nevezzük. Mostanában azonban a primer hiperaldoszteronizmus normokalaemiás formáit is egyre gyakrabban diagnosztizáljuk. Az utóbbi öt évben végzett felmérések szerint az összes hipertóniás beteg 5-13%-ában a PA tehető felelőssé a vérnyomás emelkedéséért. (Mulatero és mtsai. 2006, Hood és mtsai. 2005, Stowasser és mtsai. 2003, 2004).

2003-as statisztikai adatok szerint Magyarországon 1000 lakosból 211 volt hipertóniás (KSH). Így ma Magyarországon több mint 210 000 hiperaldoszteronizmusban szenvedő beteggel kell számolnunk, a gyakorlatban azonban ennek csak töredékét diagnosztizáljuk. (Bajnok 2009) A PA felismerésének fontosságát nem csak gyakorisága magyarázza, hanem az is, hogy a PA-ban szenvedő betegek kardiovaszkuláris mortalitása magasabb az azonos korú, nemű és ugyanolyan mértékű vérnyomás-emelkedéssel rendelkező betegekhez képest (Milliez és mtsai. 2005, Mahmud és mtsai. 2005). Ezen kívül fontos azt is hangsúlyozni, hogy a hagyományos hipertónia kezeléstől eltérő terápia szükséges PA-ban.

Az ajánlások szerint PA irányú vizsgálat célcsoportjai:

Közepesen és súlyosan hipertóniás egyének (szisztolés vérnyomás >160 Hgmm és/vagy diasztolés vérnyomás >100 Hgmm)

Terápia rezisztens hipertónia (háromas antihipertenzív kombináció ellenére a vérnyomás >140/90 Hgmm).

Spontán vagy diuretikum-indukált hypokalaemia hipertóniás betegekben.

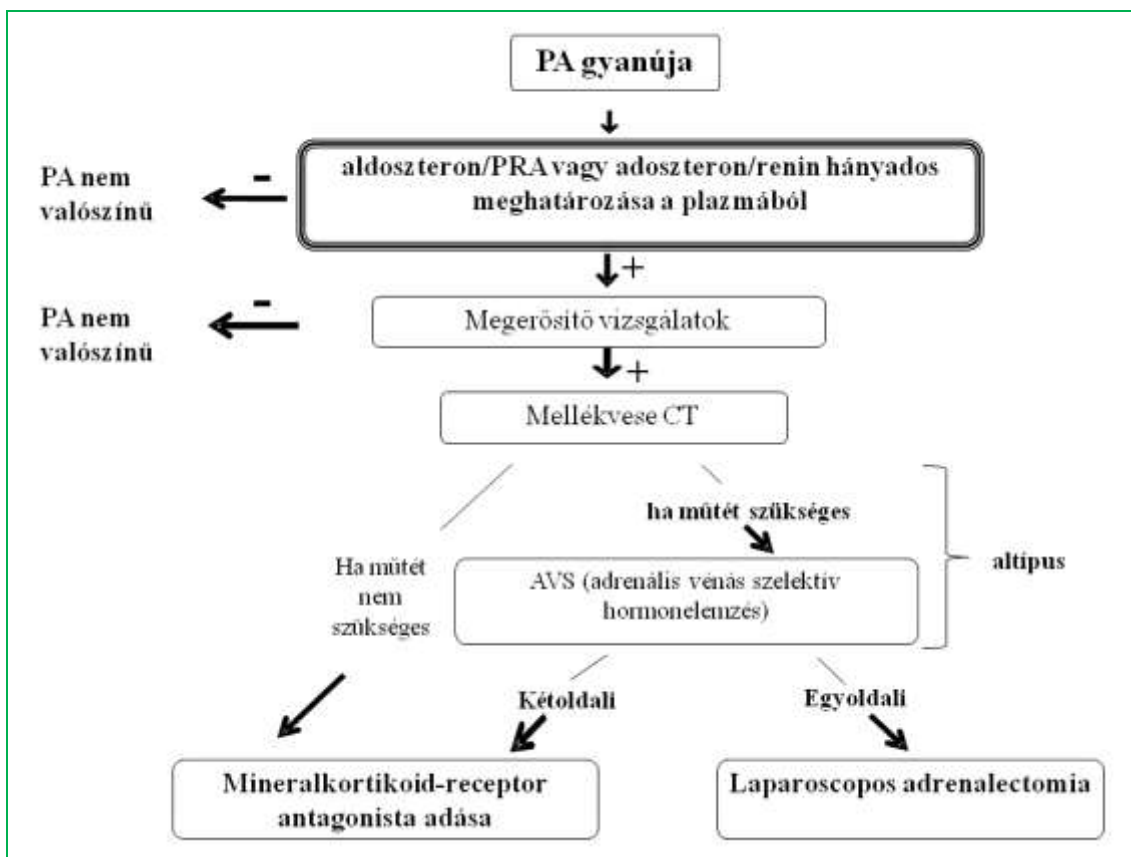
Incidentálisan felfedezett mellékvese-adenoma, ha a beteg hipertóniás.

40 évnél fiatalabb életkorban fellépő hipertónia és/vagy cerebrovasculáris betegség

Primer hyperaldoszteronizmusban szenvedő betegek első fokú, hipertóniás rokonai (Rácz 2010, Stowasser és mtsai. 2003).

II.2.1.1 A primer hiperaldoszteronizmus diagnosztikája (5. ábra):

A jelenlegi irányelvek a PA szűrésére a plazma aldoszteron-renin arány (ARR) meghatározását javasolják első lépésben. Számos tanulmány igazolta, hogy az ARR arány mérése sokkal hasznosabb, mint a káliumé vagy aldoszteroné (alacsony szenzitivitás), vagy önmagában a reniné (alacsony specificitás) (Stowasser és mtsai. 2003, Stowasser és mtsai. 2004, Mulatero és mtsai. 2005). A kivizsgálási stratégia szerint az ARR emelkedett értéke a beteget terhelő és költséges további vizsgálatokat von maga után. Ezért is elengedhetetlen, hogy az ARR meghatározás nagyon pontos és megbízható legyen. A renin meghatározás nagyon szigorú mintavételi és preanalitikai körülményeket igényel. A beteg állapotának standardizálása (testhelyzet, normokalaemia) meghatározó az ARR eredmény értékelésekor. Járó beteg esetében a vérvételt a reggeli órákban, 2 óras fennléttel követően, 10-15 perc nyugodt ülő testhelyzet után kell végezni.



5. ábra

A PA kivizsgálásának algoritmus

Az ARR leletek értelmezéséhez fontos figyelembe venni a betegek által szedett gyógyszerek hatását is, amelyeket a **4. táblázat** foglal össze. Így a vizsgálat előtt a diuretikumokat minimum négy héttel, az aldoszteron antagonistákat legalább 8 héttel, a béta-blokkolókat, centrális alfa-2-receptor agonistákat, nem szteroid gyulladásgátlókat az ACE-gátlókat, angiotenzin-receptor-blokkolókat és a dihidropiridin kalcium antagonistákat legalább 2 héttel kell kihagyni. Ha feltétlenül szükséges antihipertenzív szer adása, akkor alfa-receptor blokkoló, verapamil vagy diltiazem, illetve hydralazin adása jöhet szóba. Az orális anticoncipiens szedés tényét rögzíteni kell, de a készítmény kihagyása nem feltétlenül szükséges előfeltétele a vizsgálatnak (*Funder és mtsai. 2008*). Más protokollok főleg súlyos hypertóniás betegnél az aldoszteron antagonistákon és kálium visszatartó diureticumon kívül nem hagynak ki gyógyszert, ilyenkor az ARR döntési határértéke azonban sokkal magasabbra kerül (*Mulatero és mtsai. 2008*).

Az ajánlások szerint a plazma aldoszteron és renin szint mérést –ha az lehetséges és a beteget nem veszélyezteti– az antihipertenzív szerek kihagyása után (**5. táblázat**) kell elvégezni.

4. táblázat

Gyógyszerek hatása az aldoszteron és renin szintekre valamint hányadosaikra

Gyógyszer	Aldoszteron szintre való hatás	Renin szintre való hatás	Aldoszteron-renin hányadosra való hatás
Béta-blokkoló	↓	↓↓	álpozitív
Centrális α -2-antagonista	↓	↓↓	
Nem szteroid gyulladáscsökkentő	↓	↓↓	
Kálium ürítést fokozó diuretikum	→↑	↑↑	álnegatív
Kálium spóroló diuretikum -amilorid triamteren -aldoszteron antagonisták (spironolakton, epleronon)	↑	↑↑	
ACE gátló	↓	↑↑	
ARB	↓	↑↑	
Kalcium antagonisták (dihidropiridin)	→↑	↑	
Ösztrogén	↑	↑↑	

5. táblázat

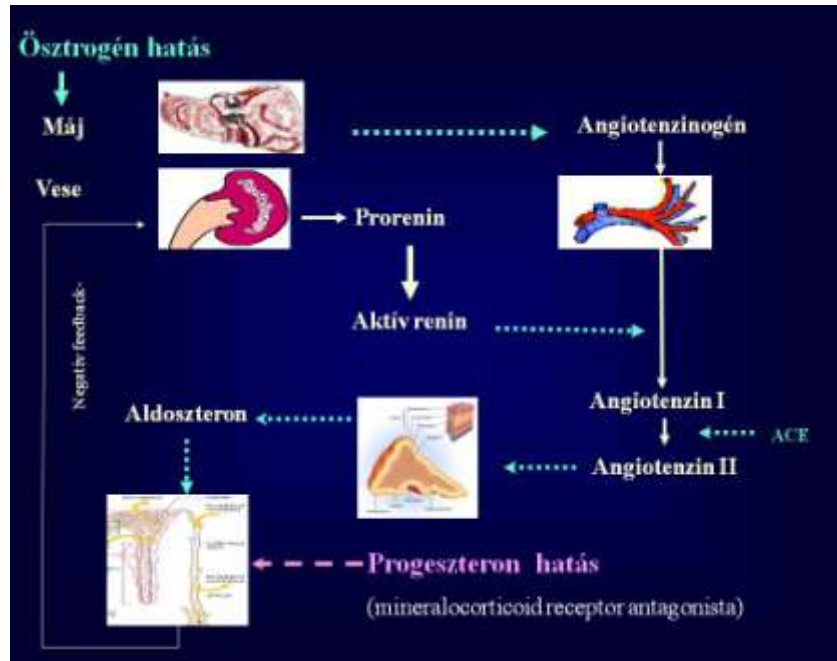
Aldoszteron/plazma renin aktivitás hányados vizsgálat előtt a gyógyszerek elhagyásának javasolt időtartama (Rácz 2010)

2 hét elhagyás javasolt
Béta-adrenerg receptorblokkolók Centrális alfa-2-receptor antagonisták Nem szteroid gyulladáscsökkentők Angiotenzin-konvertáló enzim-gátlók Angiotenzin II receptorblokkolók Dihidropiridinkalciumcsatorna-blokkolók
4 hét elhagyás javasolt
Diuretikumok
8 hét elhagyás javasolt
Spironolacton Eplerenon egyéb aldoszteron antagonisták

Kevésbé vizsgált terület napjainkig a női hormonkészítmények hatása az aldoszteron-renin szintre, holott a gyakorlatban nem ritkán találkozunk olyan hipertóniában szenvedő nőbeteggel, aki hosszantartóan orális antikoncipienst szed. Az antikoncipienstek ösztrogén és gesztagén komponenseinek farmakológiai hatásából eredő in vivo preanalitikai effektus mechanizmusát a **6. ábra** szemlélteti.

Jól ismert, hogy a plazma angiotenzinogén koncentráció ösztrogén hatására növekedik, ami az angiotenzin II emelkedéséhez vezet, amelynek tartósan magasabb szintje gátolja a renin szekréciót (*Ahmed és mtsai. 2011, Stowasser és mtsai. 2010*). A progeszteronnak viszont erős natriuretikus hatása van a mineralcorticoid receptoron kifejtett aldoszteron-antagonista effektus miatt. Régóta ismert, hogy a progeszteron tartós adása hosszú távon csökkenti a nátrium mennyiségét, ami a renin és az aldoszteron emelkedéséhez vezet (*Sundsford 1971, Goldhaber és mtsai. 1984*). A drospirenon – hasonlóan, mint az endogén progeszteron – a mineralcorticoid receptoron erős antagonista hatást fejt ki, szemben más szintetikus progeszteron készítmények gyenge vagy hiányzó aldoszteron antagonista hatásával. (*Ahmed és mtsai. 2011*).Több szerző szerint a nem

aldoszteron-antagonista hatóanyagú gesztagénnel kombinált fogamzásgátló tabletták nem befolyásolják a renin és aldoszteron szinteket (*deLeo és mtsai. 2001*).



6. ábra

Az antikonciptensek hatóanyagainak hatása a renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszerre

A hazánkban gyakrabban alkalmazott orális antikonciptensek gesztagén komponenseinek –az eredeti hatáson túli - fontosabb élettani hatásait a **6. táblázat** foglalja össze.

6. táblázat

A gesztagén komponensek csoportosítása

Csoport	Élettani hatás(ok)	Gesztagén komponensek
Drospirenon	Antimineralokortikoid	Drospirenon
Gestoden	Gyenge androgén és gyenge anti-mineralokortikoid	Gestoden Noretiszteron-acetát
Cyproteron-acetát	Antiandrogén	Cyproteron-acetát Klórmdinon Dienogest
Dezogestrel	Gyenge androgén	Dezogestrel Levonorgestrel

II.2.2. Renin meghatározás laboratóriumi módszerei

Hagyományos módon a renin meghatározás plazma renin aktivitás (PRA) mérésével, RIA módszerrel történik. Az utóbbi években széles körűen elérhetővé vált a kvantitatív renin (REN) (plazma renin koncentráció, direkt renin) meghatározás. A két módszer közötti különbséget a **7.ábra** szemlélteti.

A REN módszer szendvics típusú immunoassay mely kvantitatíve méri a beteg plazmájában jelenlévő aktív renin koncentrációt az arra nézve specifikus, de a proreninre aspecifikus monoklonális antitest használatával. A plazmában keringő összes renin koncentrációjának 90%-át a prorenin teszi ki, az aktív renin csak 10%-ot. A prorenin renin átalakulás hűtés hatására krioaktiválódik, ez az oka annak, hogy a vérvételi csövek hűtését kerülni kell e módszer alkalmazásakor (*Pitaressi és mtsai. 1992*).

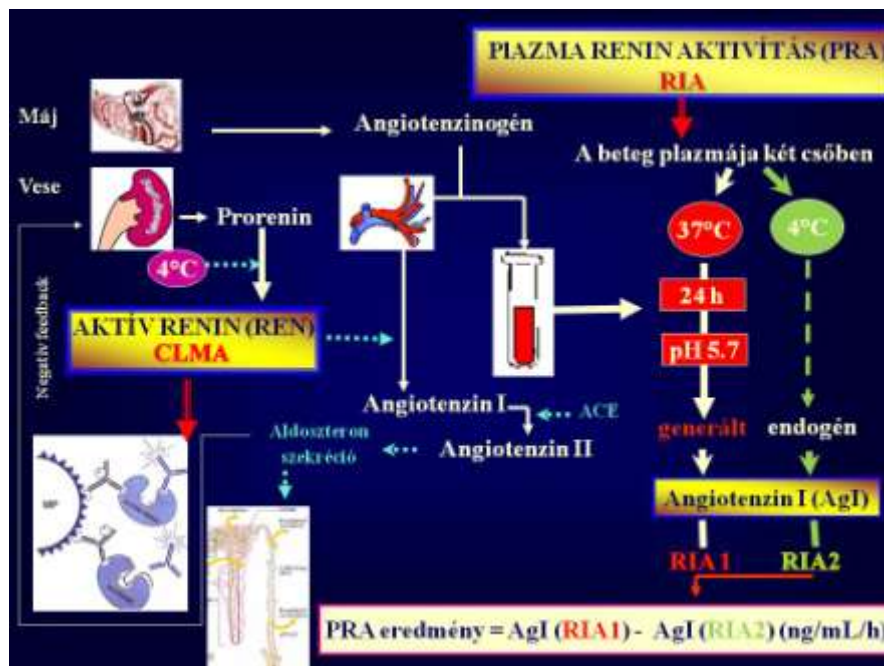
A már régóta alkalmazott PRA-módszer esetében a renin enzimaktivitását mérjük úgy, hogy a beteg hűtött plazmájának egyik részéből meghatározzuk az endogén angiotenzin-1 szintjét, másik részéből pedig a 37 °C-on, adott ideig a csőben in vitro generált angiotenzin I szintjét és ebből következtetünk a PRA-ra.

A módszerek elvi különbözőségéből is adódik, hogy még a legérzékenyebb immunoassay-k esetében is a tesztek szenzitivitása alacsony lehet azokban az esetekben, ha a renin termelés szupprimált, illetve az enzim aktivitása csekély. Irodalmi adatok szerint az enzimkinetikus radioimmunassay-vel történő renin (PRA) meghatározás a legérzékenyebb módszer, de alacsony PRA szintek (<1 ng/ml/h) csak akkor mérhetőek biztonsággal, ha megfelelően hosszú (18 h) inkubációs idő biztosított az angiotenzin-I in vitro generálásához (*Brossaud és mtsai. 2009*).

A REN meghatározás hátrányának tartják, hogy alacsony renin szintek esetén érzékenysége nem megfelelő, ezért PA esetén - a kórkép jellegéből adódóan – előfordulhat, hogy a mérendő renin szint alacsonyabb, mint az assay funkcionális szenzitivitása (*de Bruin és mtsai. 2004*).

A két módszer egyidejű használata a különböző intézményekben, nagyban megnehezíti az aldosteron/renin cut-off értékek egységes meghatározását. A PRA eredmény REN

eredménnyé való konvertálásához ugyan szorzószámokat megadtak, de ezek is függenek a mérésre használt módszertől (pl. $1 \text{ ng/m/h PRA} = 8,2 \text{ mU/l REN}$ -nel Nichols Institute Diagnostics vagy Bio-Rad PRA II RIA mérve, de Diasorin assay-k esetében ez az átváltási faktor 12 mU/l -nek felel meg) (Funder és mtsai. 2008). Ezen túl a különböző ARR interpretációját az eltérő mértékegységek használata is nehezíti (PRA-ra ng/ml/h ill. pmol/l/perc , REN-re mU/l vagy ng/l). További probléma, hogy a referenciatartományt általában egészséges populáción adják meg, míg a primer hyperaldoszteronizmus szűrése hipertóniás betegeknél történik.



7. ábra

Az aktív RENIN és a plazma renin aktivitás meghatározásának elve

Jelmagyarázat: a kék pontozott nyilak szimbolizálják a biokémiai folyamatra való fokozó hatást. CLMA: kemiluminometrikus assay, RIA: radioimmuno assay.

Összességében megállapítható, hogy az ARR pontos meghatározása rendkívül fontos eszköz a PA okozta hipertónia felderítésében. Viszont megbízható diagnosztikus értéket csakis a preanalitikai körülmények pontos definiálása, a klinikai állapot, illetve gyógyszerelés mérlegelése és a módszerspecifikus ARR cut-off értékek ismeretében várhatunk. Mindezek hiányában a beteget terhelő és drága, további fölösleges vizsgálatokat indikálhatunk (tévesen magas ARR), vagy éppen ellenkezőleg a PA felismerését az

elvégzett vizsgálat késlelteti. (tévesen alacsony ARR). Az ezt befolyásoló tényezők vizsgálatát tekintettem a disszertációban ismertett vizsgálataim másik alapvető feladatának.

III. CÉLKITŰZÉSEK

III.1. A thyreoglobulin (Tg) és Tg-antitest (Tgab) meghatározásokat befolyásoló egyes in vitro és in vivo preanalitikai körülmények vizsgálata

- Annak vizsgálata, hogy a betegtől vett szérum minták tárolási körülményei (hűtés, a mérésig eltelt idő), milyen mértékben befolyásolják a mérés pontosságát, megbízhatóságát.
- A Tg meghatározás TgAb érzékenységének vizsgálata in vitro körülmények között, elsősorban alacsonyabb, korábban klinikailag nem jelentősnek tekintett antitest titer esetén. Lehet-e jelentősége az alacsonyabb TgAb titernek a Tg mérésre DTC-ben szenvedő betegek gondozása során?

III.2. A primer aldosteronizmus diagnosztikájában alapvető markerek vizsgálata

- Az aldosteron és plazma renin aktivitás, illetve a kvantitatív renin meghatározás mért, valamint az aldosteron/renin hányadosok számított értékeit befolyásoló preanalitikai körülmények vizsgálata.
- Milyen módon befolyásolják a két különböző renin meghatározást a vérminták kezelési, tárolási módozatai? (a mintavételi protokoll pontos betartása, hűtési körülmények, a mérésig eltelt idő).
- A fenti molekulák mérési megbízhatóságának elemzése a rutin járóbeteg szakellátási gyakorlatban kivitelezhető mintavételi és mintaszállítási körülmények között (eltérő szállítási és tárolás idők, hőmérsékleti viszonyok). Ezek figyelembevételével miként változik az aldosteron/renin hányadosok értéke?
- A kétféle módszerrel mért aldosteron/renin hányadosok klinikai validitásának vizsgálata a belgyógyászati gyakorlatban előforduló hipertóniás betegek körében.
 - Hipertóniás, gyógyszert még nem szedő, valamint béta blokkolót, ACE gátlót, kalcium csatorna gátló gyógyszert szedő hipertóniás betegek esetében
 - incidentálisan talált mellékvese adenomás betegekben.
 Egészséges, normális vérnyomású önkéntesek eredményeiből az aldosteron/renin hányadosok döntéshozatali határértékeinek meghatározása, összehasonlítása a nemzetközi és a hazai szakmai irányelvekben meghatározott értékekkel.
- Eltérő gesztagén tartalmú orális antikonceptívumok (OAC) hatásának vizsgálata a mért az aldosteron és renin szintekre.

- Az eltérő farmakológiai hatású (antiandrogen, androgen, antimineralokortikoid) gesztagén tartalmú OAC-k miként hatnak a mért aldoszteron és PRA valamint REN szintekre?
- Mennyire változtatják meg az eltérő mennyiségű dietilösztadiolt és különböző gesztagén komponenset tartalmazó antikoncipiensek az aldoszteron/renin hányadost a kontrollként szolgáló, gyógyszert nem szedő egészséges véréadó nők értékeihez képest?
- Miként változnak a döntéshozatali határértékek a nem hipertóniás antikoncipientet szedő, és az azt nem alkalmazó reprodukzív életkorú nőket összehasonlítva.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

IV.1. Vizsgált személyek és szérum-minták a preanalitikai körülményeket elemző tanulmányok kivitelezéséhez.

In vitro vizsgálataim során összesen 161 egyéni illetve poolozott vérmintát (Tg-TgAb: 135; PRA-REN: 36) használtam a vizsgálni kívánt preanalitikai körülmények elemzéséhez, amelynek során összesen 399 mintán 954 mérés eredményét elemeztem. Az egészséges állapotú személyek száma, akik a kontroll csoportokat alkották összesen 149 volt a PRA-REN vizsgálatokhoz. A 112 pontosan definiált betegségben szenvedő páciens (Tg-TgAb 27, PRA-REN 85) elemzett mintáinak a száma a kontrollal együtt 466 volt, amelyekből az összes vizsgált paraméter méréseinek száma 1143 laboratóriumi meghatározást jelentett.

A Helsink Deklarációnak és a hazánkban érvényes szabályoknak megfelelően, minden vizsgálatunk a Szombathelyi Markusovszky Kórház Intézeti-Regionális Kutatás-Értékelési Bizottságának jóváhagyásával történt. Vizsgálataink jelentős részében a rutinszerűen kért meghatározások elvégzését követően megmaradt, felesleges vérmintákat használtuk. Az egészséges önkénteseket és a betegeket csupán csak egy plusz cső vérminta levételével terheltük, amelyhez írásos beleegyezésüket adták.

IV.1.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és a módszerek funkcionális szenzitivitásának vizsgálata.

Stabilitási vizsgálatok

Összesen 40 önkéntestől történt vérvétel natív vacutaineres csőbe, egyikük sem volt ismert pm. beteg. A vérmintákat 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk, majd a szérumot külön csőbe leválasztva, 1-2 órán belül megtörtént a tárolás előtti (0. óra) Tg és TgAb meghatározás. A rövid- és a hosszú távú tárolási körülményeket, mintaszámot a **7.táblázat** részletezi. Csak olyan mintákat használtam a Tg meghatározáshoz, amelyek-

ben a TgAb szint nem érte el a módszer funkcionális szenzitivitását, amelyet a saját méréseink alapján, metodika specifikusan (ld. később) határoztunk meg.

Tíz mintát használtam a TgAb rövid távú tárolása vizsgálatban (min. 11, max. 430 IU/ml), míg 7 mintát a TgAb hosszabb távú tárolása vizsgálatban (min. 11, max. 210 IU/ml). Mindkét vizsgálatban az analitek újramérésének időpontjait a 0. órától számítva, úgy választottam meg, hogy minél jobban szimuláljuk a laboratórium rutin munkame-
netét. Amennyiben a tárolás során a mérni kívánt analit mennyisége a módszer analiti-
kai szenzitivitását elérte egy mintában, azt a mintát a továbbiakban már nem vettem
figyelembe az eredmények kiértékelése során. Ezért az értékelt minták száma a tárolási
időtől függően csökkent. (az esetszámot az ábrákon feltüntettem).

7.táblázat

A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának vizsgálatához használt minták és tárolási körülményeik

Vizsgálatok	Egyedi mérések száma (N)	Analit szint a 0. órában ($\bar{X} \pm SD$)	Megfigyelési időpontok a kiindulási (0. óra) után	Tárolási hőmérséklet (°C)
Tg stabilitásának vizsgálata				
Rövid távú tárolás	N=13	2.50 ng/ml (15,7 ± 13,4)	4,8 óra	szobahő
			24, 28, 32, 48 óra	4 – 10 °C
Hosszú távú tárolás	N = 10	4,9 – 293 ng/ml (60,1 ± 91,8)	1.,2.,3.,4. hét	- 17 – 20 C
TgAb stabilitás vizsgálata				
Rövidtávú	N = 10	11 – 40 IU/ml (98 ± 15)	4,8 óra	szobahő
			24, 28, 32, 48 óra	4 – 10 °C
Hosszútávú	N = 7	11 – 210 IU/ml (62 ± 53)	1., 2., 3., 4. hét	- 17 – 20 C
Összesen	N = 40	mérések száma:	mérések száma: 88	Mérések száma összesen: 128

A **hosszabb távú tárolási** kísérletre szánt mintákat 5 részre osztottuk, hogy elkerüljük az ismételt felolvasztás-fagyasztásból származó hibát. Az első csőből még aznap meghatároztuk az analit szinteket (0. óra), míg a további négy mintatartó csövet parafinnal lezárt plastik csövekben mélyhűtőben tartottuk. Ezekből 4 hét alatt minden héten egy-egy mérés történt. A hűtők hőmérsékletét naponta ellenőriztük, azok minimum, maximum hőfokát szintén a **7. táblázat** tartalmazza.

Funkcionális szenzitivitás meghatározása

A Tg és TgAb módszerek funkcionális szenzitivitásához az analitikai szenzitivitás és a döntéshozatali alacsony cut-off érték közelébe eső szérumokat gyűjtöttük össze a laboratóriumba érkező minták maradékából. A meghatározásokhoz használt szérumok koncentrációit és a mérések kivitelezésének időtartamát és számát a **8. táblázat** foglalja össze.

A **Tg módszer esetében** összesen olyan 7 változó Tg koncentrációjú (minimum 0,24 maximum 14,4 ng/ml) mintát használtunk, amelyek TgAb szintje 20 IU/ml-nél kisebb volt. Az elektrokemilumineszcens immunoassay (**ECLIA**) **TgAb módszerhez** összesen 8 változó TgAb titerü (minimum 16 maximum 150 IU/ml) szérum pool-t használtunk. A kemiluminometrikus **TgAb módszer (CLMA)** funkcionális szenzitivitását 7 eltérő TgAb szintű (minimum: 0,36; maximum: 1,06 IU/ml) mintában határoztuk meg.

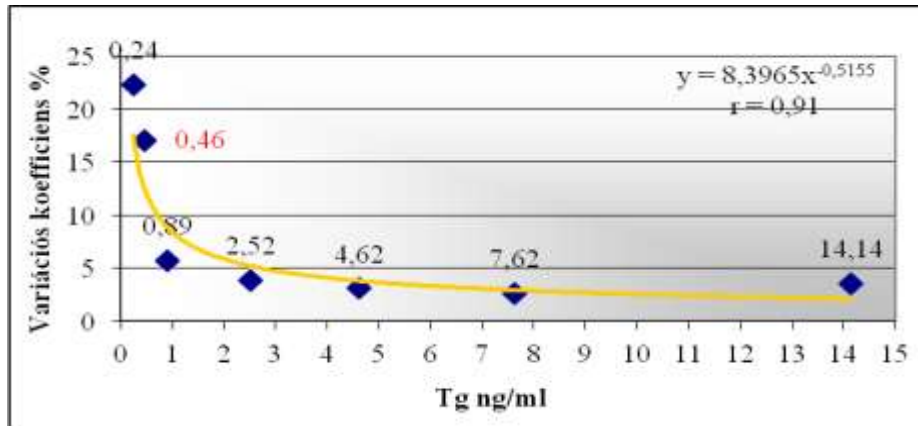
8. táblázat

A funkcionális szenzitivitás meghatározásához alkalmazott szérum poolok mérésének átlagértéke és variációs koefficiensei

Szérum poolok	6 alkalommal, hetente egyszer mért értékek átlaga	*CV%
Tg ECLMA módszer (Roche)	Tg (ng/ml)	
N=7 *TgAb szint<20 IU/ml	0,24	22,3
	0,46	17,1
	0,89	5,7
	2,52	3,9
	4,62	3,1
	7,62	2,6
	14, 40	3,6
Mérések száma: 42		
ECLIA módszer (Roche)	TgAb (IU/ml)	CV%
N=8	16	30
	18	24
	24	19
	29	14
	42	16
	86	7
	117	9
150	5	
Mérések száma: 48		
CLMA módszer (Abbott)	TgAb (IUU/ml)	CV%
N=7	0,36	19,2
	0,42	17,1
	0,51	13,7
	0,66	8,3
	0,84	5,9
	0,94	4,0
	1,06	4,3
Mérések száma: 42		

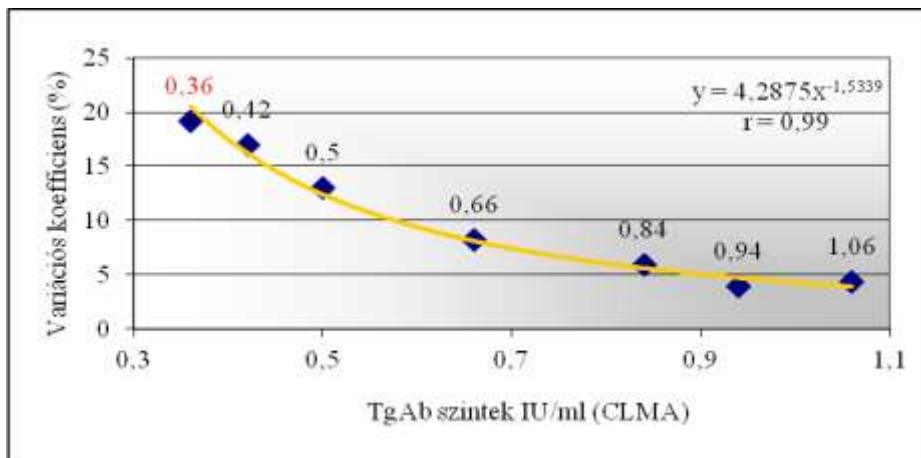
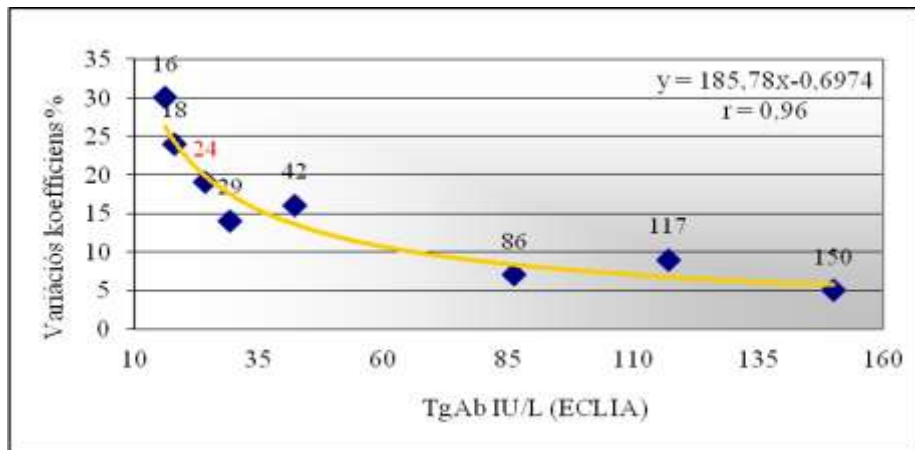
*ECLIA módszerrel mérve

Mindhárom módszer esetében a szérum poolokat 6 részre osztottuk, műanyag csőbe parafinnal lefedve -20 fokon tároltuk és 6 különböző napon (hetenként egy alkalommal) mértük meg az analitek koncentrációját. A hat mérés átlagából és szórásuk variációs koefficienseiből készítettük a módszerek alacsony mérési tartományára jellemző precíziós profil görbéket (8-9. ábra).



8. ábra

A Tg módszer (ECLMA) funkcionális szenzitivitásának precíziós profilja



9. ábra

A TgAb módszerek funkcionális szenzitivitásának precíziós profilja

Az ábrákon feltüntettük annak az egyenesnek az egyenletét, amely illesztéssel a legjobb korrelációs koefficiens (r) eredményezte és lehetővé tette a 20%-os variációs koefficienshez (CV%) tartozó pontos értékek kiszámítását. Mindhárom analit esetében a 20%-os CV értékhez alulról a legközelebb eső ténylegesen mért szintet fogadtuk el a módszerek funkcionális szenzitivitásának. Ezeket az értékeket az ábrákon piros számmal tüntettük fel. Ezzel a módszerrel a Tg módszer funkcionális szenzitivitása 0,46 ng/ml, (CV: 17%) a TgAb módszerek ECLIA esetében 24 IU/ml (CV: 19%); a CLMA módszer esetében pedig 0,36 IU/ml (CV: 19,2%) TgAb szintet kaptunk. A funkcionális szenzitivitás alatti értékeket nem mérhetőnek tekintettük.

IV.1.2. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo

In vitro vizsgálatok

In vitro TgAb manipulációs vizsgálatot három év alatt két alkalommal, több mérési sorozatban végeztünk. 2005-ben az **első vizsgálat** sorozatban csak egyféle TgAb módszert (ECLIA) és a kalibráláshoz használt birkában termeltetett humán Tg elleni TgAb preparátumot (Roche) alkalmaztunk.

A 2007-ben végzett **második vizsgálat** sorozathoz már kétféle TgAb módszert (ECLIA, Roche; CLMA, Abbott) és háromféle antitest kalibrátor készítményt [birka (Roche) és két humán TgAb (Roche és Abbott)] alkalmaztunk az in vitro manipulációhoz. A két antitest manipulációs vizsgálatot az alábbiakban részletezem.

Első TgAb manipulációs vizsgálat:

Az első in vitro vizsgálat számára egy év alatt sikerült 9 olyan szérum poolt nyernünk - a laboratóriumba TgAb meghatározásra küldött, az analitikát követően megmaradt szérum mintákból - amelyekben az antitest szintje az ECLIA TgAb módszer analitikai szenzitivitása (10 IU/ml) közelébe esett úgy, hogy a 24 IU/ml-t nem érte el. A gyűjtés során a mintákat 2 ml-es natív vacutainer csövekben -80 C°-on tároltuk a feldolgozásig.

A 9 szérumszámú Tg koncentrációja 7.8-tól 125 ng/ml közé esett, a Tg szintek átlaga $41,8 \pm 38,8$ ng/ml volt.

Kivitelezés: a kilenc különböző Tg tartalmú szérumszámú pool-ból nyert mintákhoz TgAb kalibrátort adtunk növekvő mennyiségben úgy, hogy megközelítsük, illetve túlhaladjuk az antitest pozitivitást jelző, döntéshozatali (<115 IU/ml) TgAb értéket. A pontosan visszamért TgAb szintek átlagát és növekedési mértékét a **9.táblázat** összegzi. Annak érdekében, hogy az ismert Tg tartalmú mintákat ne érje számottevő hígítás, a legmagasabb koncentrációjú (3250 IU/l) TgAb kalibrátort alkalmaztuk. Ez a Roche ECLIA módszer esetében humán Tg ellen birkában termelt, humán szérumszámú mátrixban oldott, polyclonalis TgAb volt. A kalibrátor mérhető Tg-t nem tartalmazott. Az így nyert mintákat egy óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd mindegyik mintából Tg és TgAb mérést végeztünk.

9. táblázat

Az első TgAb manipuláció során elért TgAb értékek

Manipuláció	Tg Ab átlag \pm S.D. IU/ml N=9	TgAb szint növekedés mértéke
0.	$16,1 \pm 3,8$	1
1.	$39,1 \pm 5,5$	2,5*
2.	$75,6 \pm 12,5$	4*
3.	$131,4 \pm 13,8$	8,6*
4.	$200,6 \pm 16,2$	13,5*

* $p < 0,01$ szignifikáns eltérés a natív mintából mérhető Tg szinthez képest

A második TgAb manipulációs vizsgálat:

Az első vizsgálatban leírt módon tanulmányoztunk további 28 db olyan szérumszámú poolt, amelynek TgAb szintje egyik módszerrel sem volt detektálható volt, illetve nem érte el a TgAb módszerek funkcionális szenzitivitását (ECLIA, CLMA). A TgAb manipulációt a mintákban háromféle TgAb kalibrátor készítménnyel is elvégeztük: **1. Ab:** birkában

termelt (TgAb: 3250 IU/ml; Roche), valamint a kétféle gyártó által előállított humán TgAb-t tartalmazó kalibrátor - **2. Ab**: hTgAb: 190 IU/ml, Abbott és **3. Ab** hTgAb 210 IU/ml, Roche) oldattal. Mindegyik mintából Tg és TgAb meghatározást végeztünk a két módszer (ECLIA, Roche és CLMA, Abbott) közül azzal a módszerrel, amelyik módszer kalibrátor készítményével végeztük a TgAb manipulációt. Az antitestekkel történő manipulációkat 7 lépcsőben végeztük el, ennek során 196 olyan mintát nyertünk, amelyek többségében a TgAb titere a cut off értékek (CLMA: <4,2; ECLIA <115 IU/ml) alatt maradt. A 28 db szérumból 20-at (Tg koncentrációja 8,25 és 75,9 ng/ml közé esett, Tg szintek átlaga $35,7 \pm 19,4$ ng/ml) a kétféle humán (2. Ab és 3. Ab) antitesttel történt manipulációhoz használtunk 7 lépcsőben (N=140). A további 8 poolt (kiindulási Tg szintjük 14,2 és 93,2 között, átlagérték $46,5 \pm 31,7$ ng/ml) a birka antitesttel (1. Ab) manipuláltuk 7 lépcsőben (N=56). A mintákban az antitestek mennyisége 1,1-45-szöröséig növekedett az antitest és az alkalmazott TgAb módszertől függően.

IV.1.2.2. Az in vitro eredmények adaptálása a klinikai esetek Tg szintjeire

27 DTC-s thyreoidectomián és I-131 ablation átesett beteg (22 nő és 5 férfi, átlagéletkoruk 47 év, alsó quartilis 42 felső 58 év, átlagos követési idő 2,5 év, alsó quartilis 0,5 felső 8,0 év), gondozása során nyert összesen 134 szérumból mintát vizsgáltunk. Azonos betegtől a gondozás során nyert minták száma 2 és 6 között volt. Egyik betegnek sem volt a DTC diagnózisa előtt ismert autoimmun pajzsmirigy betegsége. A mintavétel 28 esetben thyroxin megvonásban („off thyroxin”), a többi esetben thyroxin kezelés mellett („on thyroxin”) történt. 2 betegnek volt ismert metasztatikus betegsége.

Az összes mintában megmértük a Tg és TgAb szinteket. Ezekből és a Tg és TgAb szintek között in vitro tapasztalt összefüggés alapján számított Tg szinteket kalkuláltunk, feltéve, ha a beteg mintájában a TgAb szint biztonságosan detektálható (24 IU/ml felett) volt.

A Tg-visszanyerés (recovery) és a TgAb szintek közötti kapcsolat elemzése

94 DTC betegmintában vizsgáltuk a TgAb szintek mellett a Tg visszanyerési (recovery) százalékot (Tg%) is. ATg% meghatározása a következőképpen történt: a natív szérumban megmértük a kiindulási Tg szinteket, majd ismert, magasabb koncentrációjú Tg

oldatot (Tg „confirmatory reagens”: ~800 ng/ml humán Tg-t tartalmaz, Roche) adtunk a beteg szérumához. Ennek a Tg-al manipulált mintának és a natív betegmintának a megmért Tg szintjéből számoltuk a Tg%-ot az alábbi matematikai formulát alkalmazva:

$$\text{Tg\%} = \frac{\text{Tg ng/ml (natív mintában + a confirmatory reagens Tg szintje)} - (0,8 \times \text{a minta natív Tg szintje})}{0,2 \times \text{Tg ng/ml (confirmatory reagens pontos Tg szintje)}}$$

IV.1.3. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására.

IV.1.3.1.: A mintavételi körülmények hatásának vizsgálata

26 egészséges önkéntestől történt mintavétel, amelyet legalább 2 óras fennlétet követően reggel 8 és 10 h között, ülő helyzetben 5,4 mg EDTA tartalmú vacutainer csőbe végeztünk. Ennek során összesen 86 olyan mintát nyertünk, amelyek preanalitikai körülményeit pontosan rögzítettük, egészen a plazma mélyhűtőbe helyezéséig. Az azonos preanalitikai eljárással kezelt mintákat 6 csoportba osztottuk. Az egyes csoportba sorolt mintákkal történt előkezeléseket a *10. táblázat, illetve a folyamatábra (10. ábra)* teszi áttekinthetővé.



10. ábra

A minták előlétele a vérvételtől a tárolásig

10. táblázat

A hatféle in vitro preanalitikai körülménynek kitett minták áttekintése

	Vérminták Preanalitikai körülmények	Azonos eljárással kezelt minták azonosító száma és mintaszáma (n)					
		1.* (n=22)	2. (n=9)	3.** (n=20)	4. (n=11)	5. (n=12)	6. (n=12)
Mintavételi cső hőfoka	előre lehűtött K-EDTA cső	X	X			X	
	szobahőmérsékletű K-EDTA cső			X	X		X
Tárolás a vérvételtől a laborató- riumba érkezésig	0-5 °C-on	X	X			X	
	szoba- hőmérsékleten			X	X		X
Centri- fugálás	30 percen belül 0-5 °C-on	X	X				
	30 percen belül hűtés nélkül			X	X		
	2 h után 0-5 °C-on					X	
	1 h után hűtés nélkül						X
Tárolás az analitikáig	-20 °C-on	X		X		X	X
	-80 °C-on		X		X		

* A PRA assay-t gyártó által megadott előírás szerint. **A RENIN assay-t gyártó előírása szerint.

Az 1. és 3. csoport mintáit pontosan a gyártó által megadott PRA ill. REN protokollnak megfelelően kezeltük, így ezeket tekintettük az alap (100%) értéknek (alap PRA $1,76 \pm 0,44$ ng/ml/h, alap REN $31,1 \pm 13,7 \mu\text{U/ml}$). Az 1, 2 és 5 csoportnál a mintavétel előhűtött csőbe, míg a 3, 4 és 6 csoportnál szobahőmérsékletű csőbe történt. Az 1-4 csoport mintáit centrifugáltuk, majd a plazmát 30 percen belül fagyasztottuk, az 1 és 3 csoport mintáit -20 °C-ra, míg a 2 és 4 csoport mintáit -80 °C-ra. Az 5. és 6. csoportba tartozó mintákat 2 órán át szobahőmérsékleten tartottuk, majd ezután centrifugáltuk és

fagyasztottuk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra. Ugyanazon beteghez tartozó, különféle preanalitikai körülménynek kitett mintákat egy napon, egy assay-n belül analizáltuk.

IV.1.3.2. A hosszabb tárolás hatásának vizsgálata

10 egészséges önkéntestől történt mintavétel (előzőben leírtnak megfelelően). A mintákat pontosan a gyártó által megadott PRA ill. REN protokollnak megfelelően kezeltük. Centrifugálás után a friss plazmából mért értékeket tekintettük a kiindulási (0. óra) szintnek (PRA: $2,7 \pm 0,8\text{ ng/ml/h}$; REN: $51,8 \pm 17,3\text{ }\mu\text{U/ml}$). A mintákból nyert plazmát ezt követően 3 további részre osztva plastik csőben tároltuk 2, 5 ill. 7 hétig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Így összesen 40 PRA és 40 REN meghatározást végeztünk.

IV.1.4. A PRA és a renin koncentráció (REN) értékekből számított aldosteron/renin hányadosok összehasonlítása

IV.1.4.1. Belgyógyászati betegektől származó minták

Összesen 134 egyéntől történt mintavétel. (80 nő, 54 férfi, életkoruk $46,1 \pm 15,5\text{ év}$). Közülük 49 normális vérnyomású önkéntes szolgált kontrollként. 26 betegnek incidetálisan felismert mellékvese adenómája volt, közülük 19 volt hipertóniás, akik közül 5 esetben találtunk primér hyperaldoszteronizmusnak (PA) megfelelő hormonértékeket. 59 beteg hipertóniás volt, közülük 34 még nem kezelt, 25 kezelt. Az utóbbiak közül 9 ACE gátló vagy ARB kezelésben részesült, 9 beteg béta blokkolót, 7 beteg dihidropiridin típusú Ca-antagonista készítményt szedett. Mindegyik vizsgált személy normoka-laemiás, Na bevitelük liberális- semmiképp sem megszorított- volt.

Mintavétel: reggel 8-10 óra között, legalább 2 h fennlét után, 10-15 perces nyugodt ülő testhelyzetben való tartózkodást követően történt a vérvétel. A mintákat 15-30 percen belül centrifugáltuk (9. táblázatban a 4-es és 5-ös mintatípushoz hasonlóan), majd a

nyert plazmát -20 C°-on tároltuk a mérés időpontjáig, ami mindegyik paraméter esetében ugyanazon a napon történt. A tárolási idő nem haladta meg a 2 hetet.

IV.1.4.2. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikonciptensek (OAC) hatása az aldoszteron és renin szintekre, ill. ezek hányadosára

86 egészséges, önkéntes, normotóniás (119±9/78±7 Hgmm), normális szérum Na és K szintű, (Na: 138,3±4,3mmol/l, K:3,7±0,3 mmol/l) nőnél (életkoruk 27,3±7,5 év) történt mintavétel. Közülük 63 szedett különböző gesztagén hatóanyagú (gestodene=GTD 25, desogesztrel=DSG 22, drospirenone DRSP=6) OAC-t hosszabb ideje (2,8±2.3 év). A tabletták mindegyike kismennyiségű ethinyloestradiolt (0,027±0,006 mgmin.: 0,02, max. 0,035 mg) tartalmazott. A szedett antikonciptensek pontos nevét és összetételét az **11. táblázat** foglalja össze.

11. táblázat

Az alkalmazott antikonciptens készítmények neve és összetétele

Gyári név	Eset-szám	Ethinyloestradiol tartalom		Gesztagen tartalom	
		mg/tabletta	mg/hó	hatóanyag	mennyiség mg/tabletta
Milligest	3	0,03;0,04;0,03	0,7	gestodene N=25	0,05;0,07;0,1
Triodena	3	0,03;0,04;0,03	0,7		0,05;0,07;0,1
Lyndinette	11	0,03	0,63		0,075
Marvelon	2				
Minulet	1				
Gestomix 20	3				
Harmonet	2				
Mercilon	7	0,02 0,035	0,42	desogestrel N=22	
Dienille, Cypromix	8				
Novynette	7				
Yasminelle	11	0,02	0,42	drospirenon N=16	3
Yadine	3	0,03	0,63		3
Volina	2	0,03			

OAC-t nem szedő 23 normális menstruációs ciklusú nő képezte a kontroll csoportot.

A mintavétel: reggel 8-10 óra között, legalább 2 h fennlét után, 10-15 perces nyugodt ülő helyzetben történt. A mintákat közvetlenül a levétel után (**10. táblázatban** a 4-es és 5-ös mintatípushoz hasonlóan) 2500 fordulaton 10 percig centrifugáltuk, majd a plazmát -20 C°-on tároltuk a mérés időpontjáig, ami egyik esetben sem haladta meg a 3 hetet.

IV. 2 Analitikai módszerek

A kvantitatív renin esetében a két módszerhez más-más mértékegységet tüntettem fel, mivel megjelent közleményeimben is a folyóirat előírásának megfelelően eltérő egységek szerepelnek. Az egyes paraméterekhez tartozó egyéb, gyakrabban használt mértékegységek átszámolásához az átváltási faktorokat a **12. táblázat** összegzi.

12. táblázat

Fontosabb mértékegységek és átváltási faktorok

Paraméter	Mértékegységek, átváltásuk
aldoszteron ng/dl	ng/dl=(pg/ml)/10 pmol/l=pg/mlx2,774
aldoszteron/renin	(ng/dL)/(ng/L) x17,3 = (pmol/L)/(mU/L)
aldoszteron/PRA	(ng/dl)/(ng/ml/h)x27,74 = (pmol/L)/(ng/ml/h)
Kvantitatív renin	μU/ml=mU/l 1 mU/l=1,6xng/l 1 ng/l=0,6xmU/l

Az alkalmazott analitikai módszerek fontosabb jellemzőit (immunkémiai elv, mértékegység, mérési tartomány, reagenst és automatát gyártó neve, a módszer visszavezethetősége, kalibrátor, az alkalmazott antigén, illetve antitest, reprodukálhatósági és szenzitivitási adatok, valamint referencia tartományt) a **13. táblázatban** foglaltam össze.

A biomarkerek meghatározása teljesen automatizált módszerrel történt a Tg, TgAb, TSH, és a kvantitatív renin (REN) immuno-luminometrikus módszer esetén. Az aldosteron (ALD) és plazma renin aktivitás (PRA), valamint a kvantitatív renin (REN) immuno-radiometrikus módszert manuálisan végeztük, a radioaktivitás méréséig, amelyhez gamma számlálót és automatikus mintaváltót (IZINTA) használtunk. A táblázatban a csillaggal jelölt funkcionális szenzitivitási értékek a saját mérési adatainkon alapsznak.

A REN és PRA mérése előtt a fagyott plazma mintákat 0-5 C°-os jeges vízfürdőben engedték fel a PRA meghatározásához, ill. szobahőmérsékleten a REN meghatározás céljára. Mindkét analit esetében a fagyasztott minta felolvadását és azok homogenizálását követően azonnal megtörtént a mérés. A PRA és REN méréseket ugyanazon a napon végeztük. A PRA mérésekor a gyártó javaslata szerint a hosszabb, 18 órás inkubációs időt választottuk. A két részre osztott 4, ill. 37 C°-on, 2 óra hosszan inkubált minta angiotenzin I mennyiségéből számoltuk ki a PRA-t.

A REN ILMA módszert alkalmaztam a mintavételi és eltartási körülmények tanulmányozásához, míg a belgyógyászati betegeken végzett tanulmányomhoz, valamint az antikonceptív-interakció elemzésemhez a REN IRMA módszert alkalmaztam.

Az aldosteron-renin hányadosokat (ARR) az ALD/PRA vonatkozásban (ng/dl)/(ng/ml/h) egységben, míg az ALD/REN vonatkozásában (ng/dl)/(ng/l) egységben számoltuk. ARR-re saját vizsgálatunkból származó határértéket alkalmaztunk, amelyet 77 egészséges normotóniás önkéntes véradó (48 nő és 29 férfi; átlagéletkoruk: 42,9±14,2 év; min.: 20, max.: 73 év) szérumból mért aldosteron és a már leírt standard vérvételi körülmények között vett plazma PRA és REN eredmények hányadosából határoztuk meg. Értékük az ALD/PRA esetében 30 (ng/dl)/(ng/ml/h), míg az ALD/REN esetében 3 (ng/dl)/(ng/l) volt (részletezve ld. az eredmények című fejezetben).

13. táblázat
Alkalmazott laboratóriumi módszerek

Paraméter Módszer mérték-egység	Mérési range	Műszer (gyártó)	Visszavezethetőség kalibráció	Antigén Antitest	Ref. tart.	Reprodukálhatóság		Szenzitivitás	
						CV _{intra} % (kon- troll célérték)	CV _{inter} (kontroll célérték)	Anali- tikai	Funkcionális
Tg ECLMA ng/ml	0,1 – 1000	Elecsys 2010	CRM 457 BCREU	Biotinált és Ru(bpyr)- TgAb monoklonális egér	1,4 - 78	1,8% (4,1) 1,4% (26,9)	1,8% (3,1) 3,6%(4,2) 4% (23) 8% (218)	0,1	< 1,0 0,46*
TgAb ECLIA IU/ml	10- 4000		Roche	NIBS-65/93 Anti-TgAb (birka)	biotinált humán Tg , AntiTgAb-Ru(bpyr)-Ab monoklonális humán	<115	1,8% (396) 2,1% (228) 8,6% (91)	8,7% (62,8) 7,2 % (115,0) 13% (80) 11% (198)	10
TgAb CLMA IU/ml	0-1000	Architect Abbott	1.IRP 65/093	Tg humán antigén, anti humán IgG egér monok- lonális	<4,11	4 % (4,3) 1,4% (26,9)	3,7	< 1	0,31 0,36*
TSH ECLMA mU/l	0.005 - 100	Elecsys 2010 Roche	2.IRP 80/558	anti-TSH egér és humán, monoklonális	0,27 -4,2	8,6 % (0,034) 2,1 % (0,91)	5,4% (0,084) 8,7 % (0,034)	0,005	0,014 0,016*
Aldosteron RIA ng/dl	0-200	Beckman Coulter (Immuno-tech)	Humán szérum-matrixban mért aldosteron	Anti-aldoszteron-Ab ¹²⁵ I- aldoszteron	3,4-27,3	8,5 % (5,2) 9,5 % (39,0)	6,7 % (9,9) 10,4 % (50,4)	0,6	-
PRA RIA ng/ml/h	0-50 ng/ml	RENCT DiaSorin	human tisztított (>99%) angiotenzin I	¹²⁵ I-angiotenzin I Anti-angiotensinI-IgG - nyúl	1,5-5,7	9,9 % (13,5) 7,5 % (1,5)	12,6 % (0,5)	0,2	-
REN IRMA ng/l	0-500	DSL 25100 Beckman Coulter	IRP 1st. WHO NIBSC 68/356 Rekombináns	Anti-renin-Ab ¹²⁵ I-anti renin-Ab,	5-27,8 6,1-30,4 (2011-től)	1,6 % (9,8) 5,6 % (16,3)	2,6 % (9,8) 1,7 % (89,6)	0,7	<1,2
REN ILMA μU/ml	0-500	LIAISON DiaSorin	humán renin bovin albumin foszfát- pufferben	Anti-renin-IgG Iziluminollal jelölt anti- renin monoklonalis-egér	4,4-46,1	3,7 % (15,1) 5,6 % (27,1)	8,8 % (26,8) 7,8 % (102,4)	0,33	< 2 (CI: 1,6 1,96)

Rövidítések: Me (mértékegység), ECLMA (elektrokemoluminescens immuno metrikus assay), *saját adat, ECLIA: elektrokemiluminescens immunoassay, CLMA: kemiluminometrikus assay, RIA: radio-immuno-assay, IRMA: immuno radiometrikus assay, ILMA: immuno-luminometrikus assay, *saját mérésekkel alátámasztott adat, CRM Certified Reference Material, BCR-EU: Community Bureau of Reference of the European Union , IRP - 1 st International Reference preparation, NIBSC= National Institute for Biological Standards and Control; PRA: plazma renin aktivitás; REN: kvantitatív (direkt) renin koncentráció.

IV.3. Az eredmények statisztikai feldolgoása

A stabilitási (eltartási) preanalitikai vizsgálatok során bekövetkező Tg és TgAb szintek, valamint a PRA és REN fagyasztásos tárolás során bekövetkező változásait a kiinduláskor mért értékhez képest (0. óra=100%) számolva, az attól való eltérést százalékában adtam meg. Amennyiben a tárolás során a mérni kívánt analit mennyisége a módszer szenzitivitását elérte egy mintában – a saját módszerünkkel meghatározott funkcionális szenzitivitást (<20% CV-hez tartozó) vettem figyelembe a Tg és TgAb módszerek (0,46 ng/ml és ECLIA TgAb: 24 IU/ml; CLMA TgAb: 0,36 IU/ml) esetében. A REN esetében, a gyártó által megadott funkcionális szenzitivitási értéket (<2,0 μ U/ml), míg a PRA esetében az analitikai szenzitivitást (0,2 ng/ml/h) vettem figyelembe. Ha a mért érték az előbbieken felsorolt érték alá esett, akkor a további számolásokról kihagytuk, így a statisztikai analízishez felhasznált mintaszám (N) csökkent néhány esetben. Ilyenkor az esetszámokat (N) az eredmények közlésénél feltüntettem.

A vérvételtől a minta laboratóriumba érkezéséig a 4.1.3.1 sorszámú vizsgálataim során a mért PRA és REN értékeket az 1-es és 3-as mintacsoport értékeivel (gyártó által definiált követelménynek megfelelően: 100%) hasonlítottam össze (ld.**II. táblázat**).

Az alkalmazott statisztikai modellt, az esetszám és azok eloszlása szerint választottam ki. Ha az elemzett adatok a Kolmogorov-Smirnov teszt szerint logaritmálást követően sem váltak normállá, akkor a csoportok adatait medián és alsó (25% percentilis) és felső (75% percentilis) quartilishez tartozó medián értékekben adtam meg. Amennyiben normális eloszlást követtek, matematikai átlagot és standard deviációt (SD) közlök.

Mindennek megfelelően a csoportok közti különbséget parametrikus vagy non parametrikus (One way ANOVA vagy Kruskal Wallis-ANOVA) varianciaanalízissel (ANOVA) illetve páronkénti összehasonlítással (LSD teszt, vagy Kruskal-Wallis-Rank transzformációs módszerének medián tesztjét, illetve khi négyzet próba) értékeltem.

Ugyanazon mintának különböző preanalitikai körülményeknek kitett analit értékeit non-parametrikus Wilcoxon teszttel elemeztem, hasonlóan az azonos beteghez tartozó mért és számított, - thyroxin terápiában részesülő és nem részesülő- Tg és TSH értékeket is.

Az ARR hányadosokat az aldoszteron és renin paraméterek hányadosából számoltuk az alábbi mértékegységekben megadva. ALD/PRA [(ng/dl)/(ng/ml/h) és ALD/REN (ng/dl)/(ng/L). Az átváltási faktorokat a 13. táblázat összegzi.

Az ARR hányadosok határértékét egészséges önkéntesek eredményei alapján a log-normál eloszlású hisztogram 97,5 percentilisénél határoztam meg.

Regressziós analízis alkalmazása:

Az in vitro kísérletben (4.1.2.1.) a TgAb, mint független változó és Tg értékeket logaritmus (Ln) átalakítás után lineáris regresszió módszerével elemeztem. A Tg koncentráció csökkenését a TgAb hozzáadására a kiindulási érték százalékában kifejezve az összefüggést logaritmus regresszió módszerével vizsgáltam. A görbéből származtatott egyenletet használtam a Tg érték korrekciójára azoknál a DTC-s betegnél, akiknél mérhető mennyiségű Tg (>0,46 ng/ml) és TgAb (>24 IU/ml) szintet találtunk.

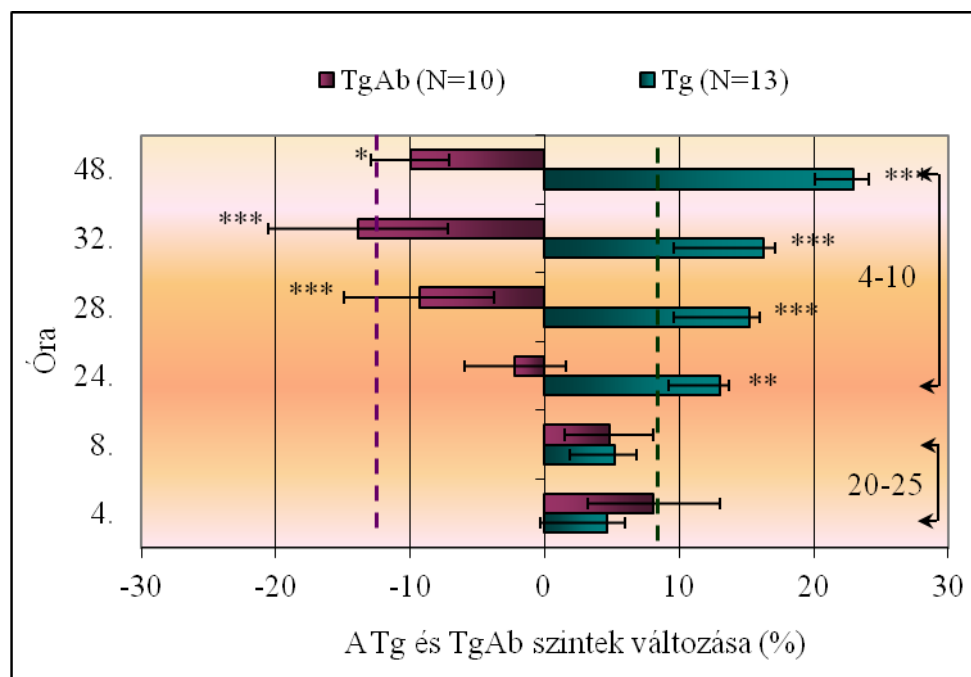
A statisztikai értékelést Statistica for Windows 4,0 és Excel, valamint SPSS for Windows (PASW Statistics 18) programcsomagok segítségével, 95%-os konfidencia intervallum mellett végeztem. Kisebb, mint 0,05 p értéket tekintettünk szignifikánsnak.

V. EREDMÉNYEK

V.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és a módszer funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.

V.1.1. Rövidtávú tárolás

Az **11. ábraszemlélteti** a Tg és TgAb szintekben bekövetkezett változást a 4. - 48. óráig történt tárolás során, a kiindulási, friss mintában mért (0. óra) koncentrációkhoz viszonyítva.



11. ábra

Változások a Tg és a TgAb szintekben a 4-48 órás tárolás során

Az oszlopok a matematikai átlagot, a hibasávok az SD-ét ábrázolják, a szaggatott vonalak (lila: TgAb; zöld: Tg) inter-assay CV%-ot szimbolizálják. *szignifikáns $p < 0,01$ eltérés a 4-8 óráig szobahőmérsékleten tárolt mintától; **szignifikáns $p < 0,001$ eltérés a 4-8 óráig szobahőmérsékleten tárolt mintától; ***szignifikáns $p < 0,0001$ eltérés a 4-8 óráig szobahőmérsékleten tárolt mintától

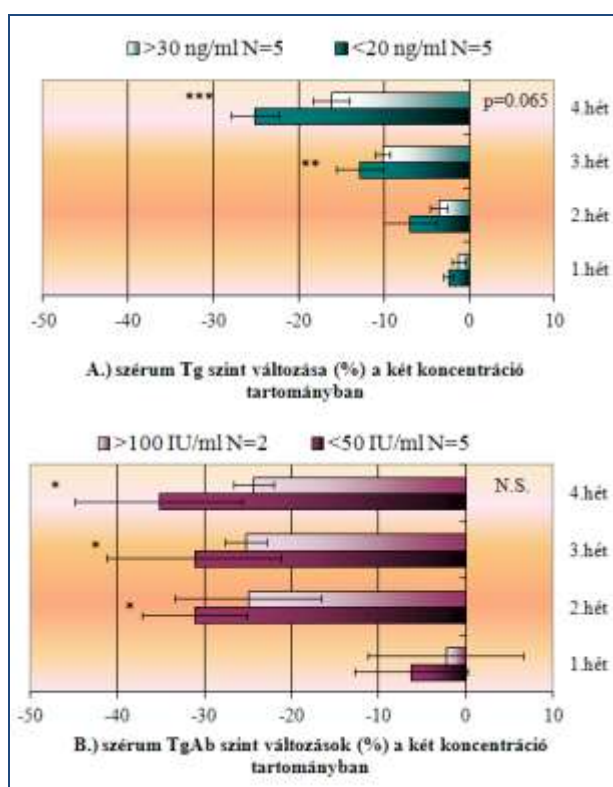
Már a rövid távú tárolás is szignifikánsan befolyásolta a mért Tg értékeket. Míg a minta 4-8 órás szobahőmérsékleten történt tárolása csak kis mértékben (5-7%) változtatott, addig a 4-10 C°-on történt tárolás során a Tg immunreaktivitás fokozatosan nőtt, 48 óra

tárolás során érve el a 23%-os maximumot. A mért Tg értékek szignifikánsan magasabbak voltak, ha a 24 óránál tovább tárolt minták értékeit összehasonlítottuk a 4-8 óráig tartó tárolás során nyert adatokkal, és 24 órás tárolás után az eltérés meghaladta a módszer variációs koefficiens (8%) értékét.

A TgAb szintek ugyancsak szignifikánsan ($p < 0,05$) változtak a rövid tárolás során. Míg a 4-8 órás szobahőmérsékleten történt tárolás során a TgAb szintek csak 5-8%-kal - nem szignifikáns mértékben - nőttek, addig 28-32 órás 4-10 °C-on történt tárolás után a TgAb szignifikánsan, 8-13%-al csökkent, és 32 órás tárolás esetén a csökkenés már meghaladta a módszer interassz variációs koefficiensének (13%) értékét is.

V.1.2. Hosszú távú tárolás

Az 1 hónapig tartó fagyasztásos tárolás során nyert tapasztalatokat a *12/A és 12/B ábra* mutatja be.



12. A-B ábra

Változások a Tg és a TgAb szintekben fagyasztásos tárolás során

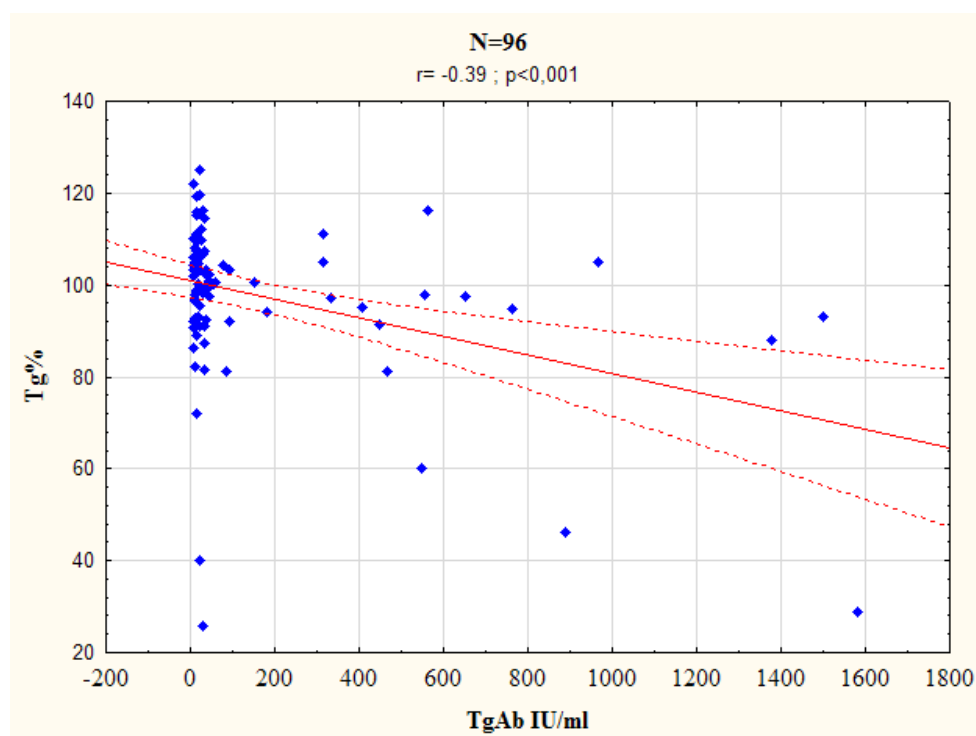
Az oszlopok a matematikai átlagot, a hibásávok a standard errort ábrázolják, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ szignifikáns eltérés az 1. héten tapasztalt változástól. Az alacsony és a magas koncentrációjú minták között a Tg esetében az eltérés közel szignifikáns ($p = 0,065$), míg a TgAb esetében egyértelműen N.S.: nincs szignifikáns különbség

A hosszú távú tárolás során $-17-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on mind a Tg, mind a TgAb értékek szignifikánsan csökkentek (Tg: $p<0,0001$, TgAb: $p<0,01$). Az interassay CV%-ot meghaladó szignifikáns csökkenés a Tg esetében a 3. héten, míg a TgAb esetében már a 2. héten bekövetkezett. A kiinduló Tg koncentráció is befolyásolta a fagyasztva tárolás okozta csökkenés mértékét a 4. héten, az alacsonyabb ($<20\text{ ng/ml}$) koncentrációjú mintákban a csökkenés kifejezettebb volt összehasonlítva a nagyobb ($>30\text{ ng/ml}$) koncentrációjú mintákkal. Ez az eltérés ugyan, egyik mérési tartományban sem volt szignifikáns, de az alacsonyabb Tg szintű minták esetében közelítette a szignifikancia határát ($<20\text{ ng/ml}$ -nél: $p=0,065$ vs. $>30\text{ ng/ml}$ -nél: $p=0,582$).

V.1.3. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo

V.1.3.1. A Tg% és a közvetlenül mért TgAb módszer összevetése

A Tg visszanyerési százalék (Tg%) és a TgAb szintek között szignifikáns, de gyenge ($r = -0,38$) negatív korrelációt kaptunk (**13. ábra**). A 94 szérumból 18 olyan eset (19%) volt, amikor csak a TgAb szint igazolta ($598 \pm 389\text{ IU/ml}$) az antitest pozitivitást, de ezt a Tg% ($95,4 \pm 12,7\%$) nem támasztotta alá.

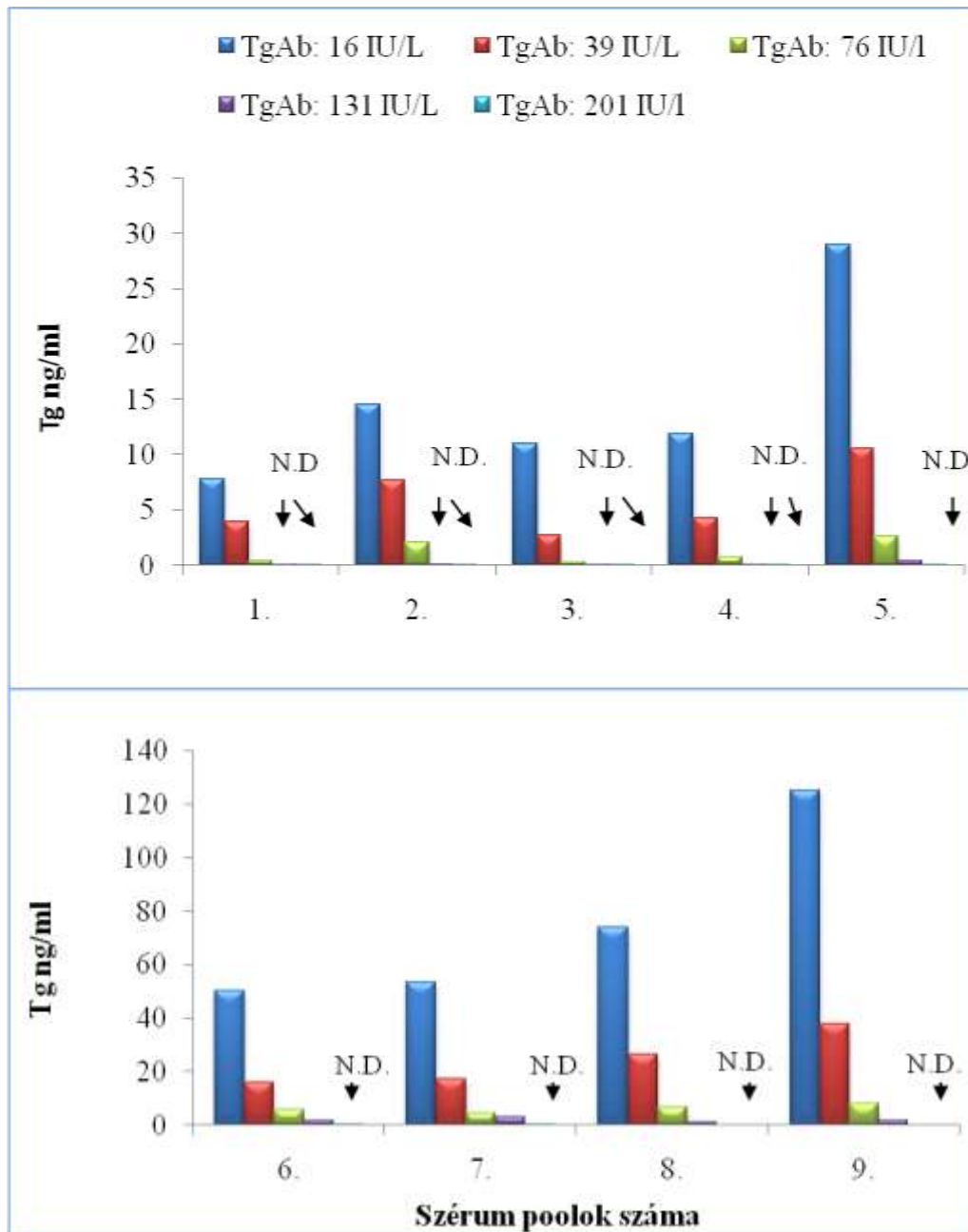


13. ábra

Korreláció a TgAb (ECLIA) szintek és a Tg-visszanyerési százalék között

V.1.3.2. *In vitro* vizsgálatok**Első vizsgálat**

A szérum mintákhoz lépcsőzetesen hozzáadott TgAb hatására bekövetkezett Tg szint változását a **14. ábraszemlélteti.**



N.D.: nem detektálható

14. ábra

A Tg szintek változása a TgAb-el történt manipuláció során 9 mintában

Mindegyik szérum pool-t (N=9) külön-külön ábrázoltuk, a kiindulási (endogén) TgAb szinttől (első oszlop: $16,1 \pm 3,8$ IU/ml) a legmagasabb (utolsó oszlop: $200,6 \pm 16,2$ IU/ml) TgAb szintű (exogen) mintáig. Jól látható, hogy a <12 ng/ml kiindulási értékű Tg szérumokban a Tg detektálhatatlanná válik, már 76 IU/ml TgAb szint esetén. Míg 29 ng/ml kiindulási Tg szintnél nem detektálható Tg szint, csak a 201 IU/ml TgAb szint mellett következett be. Az 50 - 125 ng/ml Tg szinttel rendelkező mintákban nem mérhetővé váló Tg-t csak a nagyobb, mint 200 IU/ml TgAb szint mellett tapasztaltuk (6.-9. szérum pool).

A mintákban a kiinduláskor és a visszaméréskor meghatározott Tg és TgAb átlagértékét és standard deviációját a **14. táblázatban** foglaltam össze. A mérhető Tg szint csökkenés mértéke szignifikánsnak adódott az egy mintás T próba során, minden szérum esetben.

14. táblázat

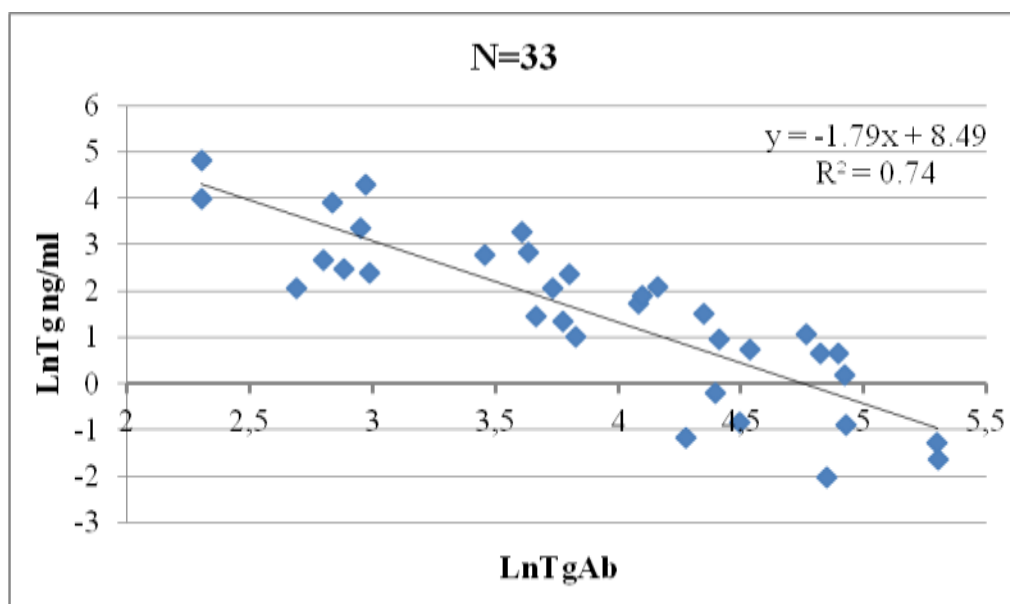
A TgAb manipuláció során mért Tg ill. TgAb értékek átlaga

Tg Ab átlag \pm S.D. IU/ml	Tg átlag \pm S.D. ng/ml	TgAb szint növekedés foka	Mérhető Tg szint csökkenés foka
$16,1 \pm 3,8$	$41,8 \pm 38,8$	1	1
$39,1 \pm 5,5$	* $14,1 \pm 11,8$	2,5	0,34
$75,6 \pm 12,5$	* $3,5 \pm 2,9$	4	0,08
$131,4 \pm 13,8$	* $1,0 \pm 1,1$	8,6	0,02
$200,6 \pm 16,2$	* $0,1 \pm 0,1$	13,5	0,002

* $p < 0,01$ szignifikáns eltérés a natív mintából mérhető Tg szinthez képest

A TgAb és a mérhető Tg szintek közötti lineáris regressziós analízis során negatív számmal jellemezhető meredekségű ($-1,76$), erős determinációs együtthatót mutató

($R^2=0,74$) összefüggést kaptam (**15. ábra**). Nem logaritmikus értékek esetében hatványfüggvény illeszthető az eredeti változókra, erős korrelációs koefficienssel ($r=0,97$; $p<0,001$).



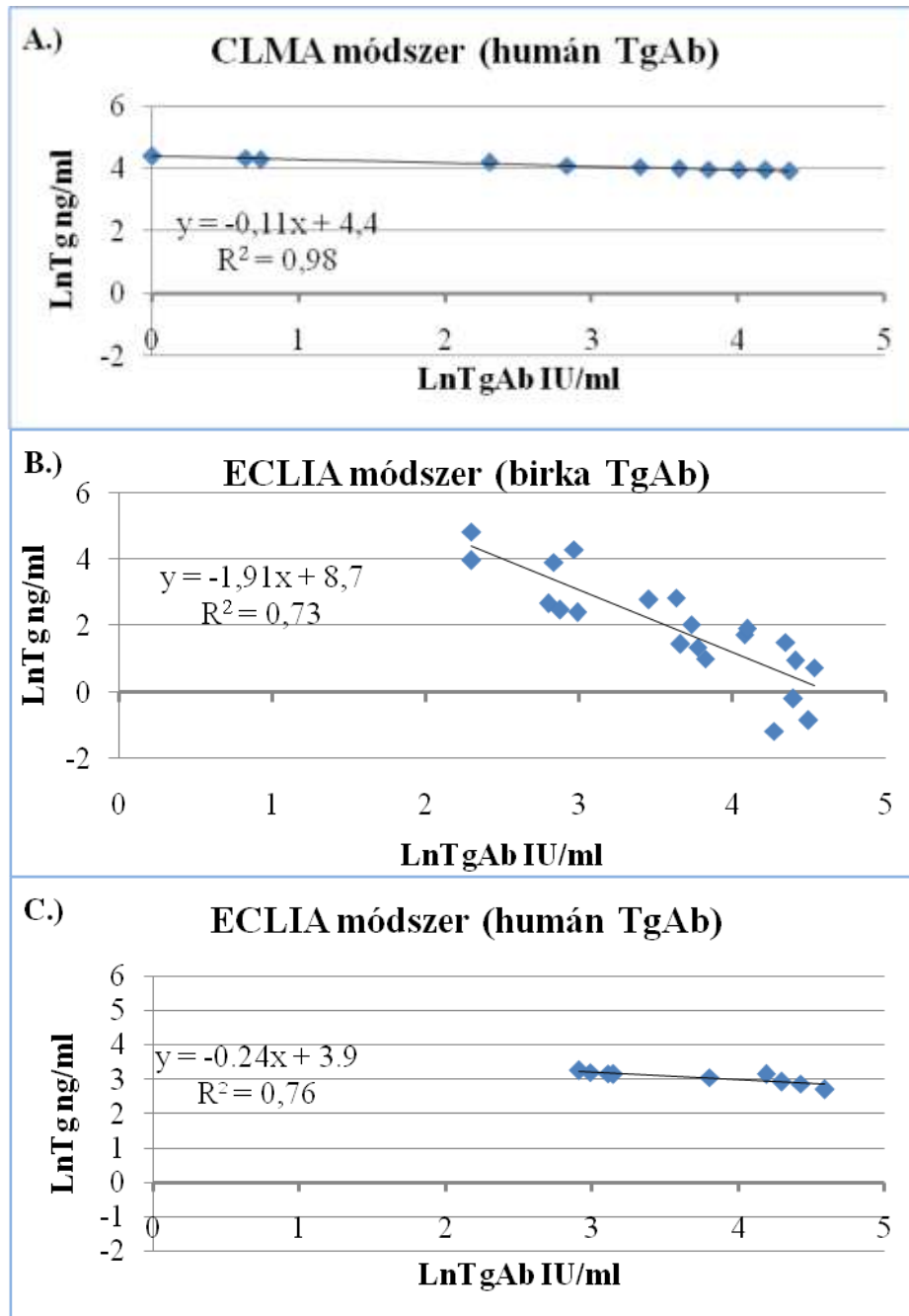
15. ábra

A Tg szintek változása a TgAb koncentráció növelésével

Második vizsgálat

A második in vitro vizsgálatsorozat folyamán a CLMA TgAb módszerrel és a hozzá tartozó humán TgAb kalibrátorral (**16-A. ábra**) valamint az ECLIA TgAb módszerrel és a hozzá tartozó birka (**16-B. ábra**) és humán TgAb kalibrátorral (**16-C. ábra**) végzett mérések eredményét a **16.-A-C. ábrák** szemléltetik. A logaritmálást követő lineáris regressziós egyenesek egyenletéből jól látszik, hogy a legmeredekebb lefutású egyenest (slope: -1,882) az ECLIA módszer és birka antitest használatakor kaptuk. Míg ugyanezen módszerrel mért, de humán antitesttel manipulált vizsgálatsorozatban a meredekség még negatív (slope:-0,235), de majdnem egy nagyságrenddel kisebb volt. Viszont a CLMA módszerrel mérve a humán TgAb-vel történt manipulációt követően értük el a legkisebb, de negatív (slope:-0,108) meredekséget. Az y tengely metszéspontjában is az ECLIA+birka TgAb kísérletben kaptuk szignifikánsan a legmagasabb (8,73) értéket,

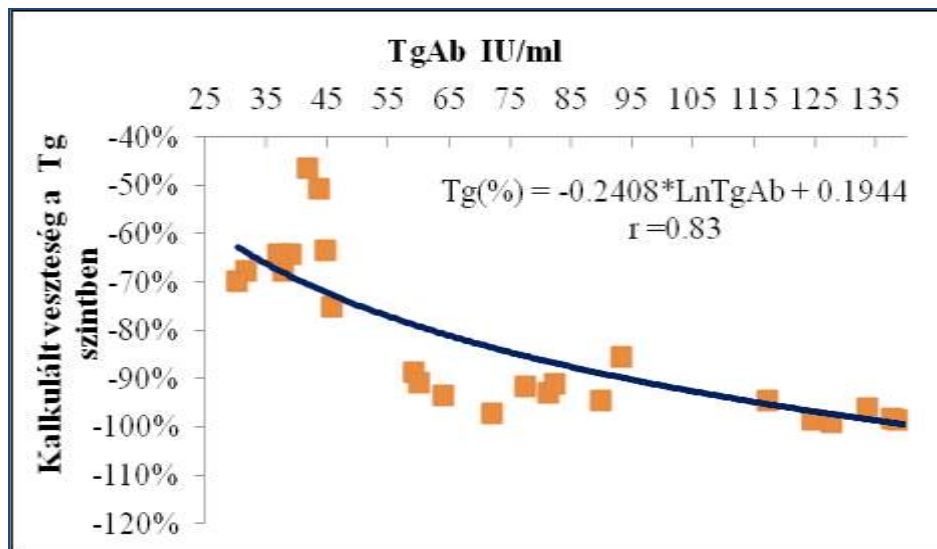
míg a human antitestekkel történt manipulációk során az y tengely metszéspontja nem tért el lényegesen (CLMA: 4,397 vs ECLIA: 3,921). A három vizsgálat során a determinációs együttható a CLMA módszer esetében volt a legkifejezettebb (R^2 : 0,98 vs. ECLIA: 0,73 és 0,76), bár a többi módszer esetén is szignifikáns ($p < 0,001$) volt.



16. ábra

Összefüggés a TgAb szintek növekedése és a mérhető Tg szintek között, két TgAb módszer használata során

A fenti regressziós összefüggések lehetőséget kínáltak az alkalmazott módszerekre vonatkozó matematikai képlet kidolgozására. Ha ismerjük egy adott minta Tg és TgAb szintjét, akkor ebből kalkulálható az antitest okozta Tg szint csökkenés. A **17. ábra** szemlélteti az első vizsgálat mérési adataiból nyert nomogrammot amelyből a becülhető Tg veszteség leolvasható.

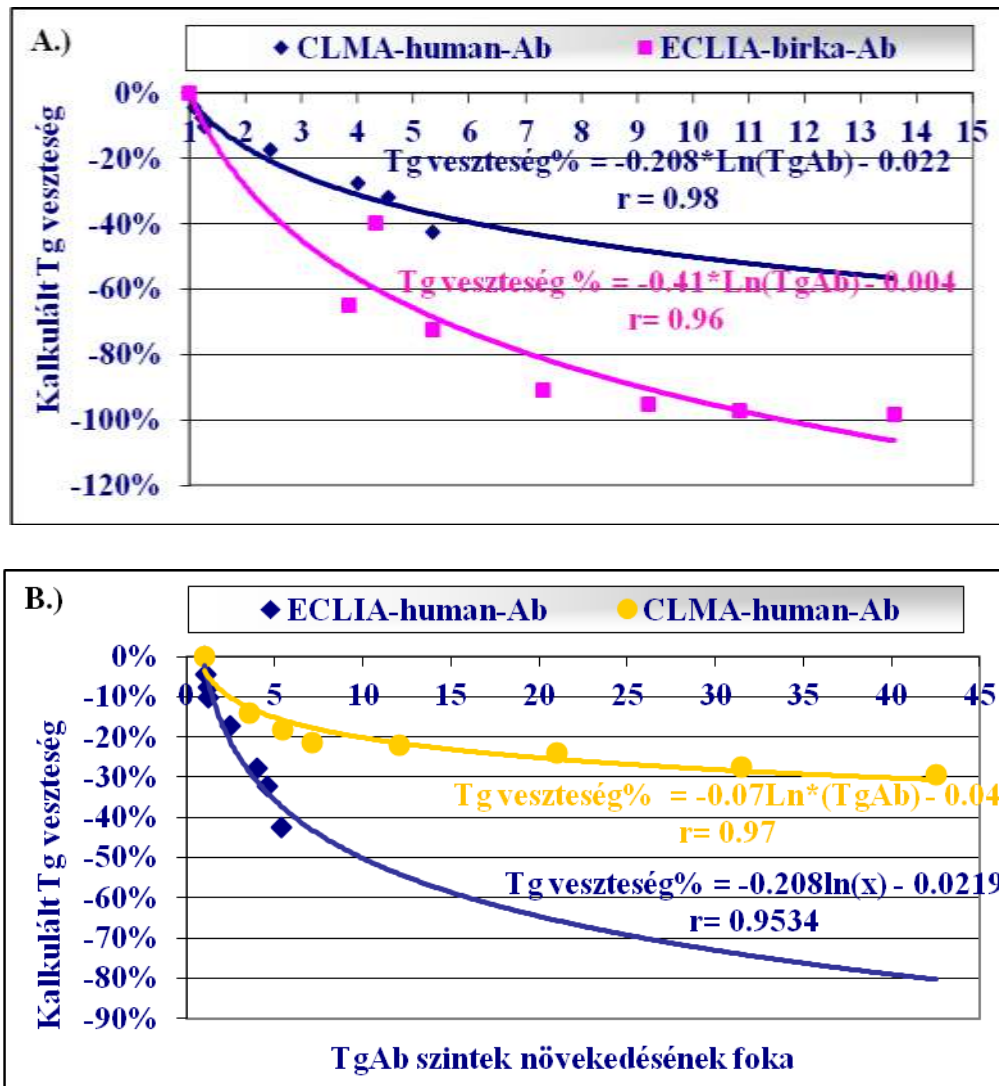


17. ábra

Korreláció a TgAb és a nem detektálható Tg szintek %-os értéke között

$$Tg \text{ veszteség} = (\text{Mért Tg} - \text{Valós Tg}) / \text{valós Tg} \% \text{-ban}$$

A módszer- és antitest-függő Tg veszteséget a TgAb szintek növekedési fokának függvényében a **18. ábra** szemlélteti. A görbék egyenleteit az ábrán tüntettem fel. Ezekből jól látható, hogy a humán antitest, ugyanolyan TgAb szint növekedés mellett szignifikánsan kisebb Tg veszteséget okozott, mint a birka antitest (**18-A. ábra**). Nagy különbség látható a két TgAb módszer között akkor is, ha csak a humán TgAb kalibrátort használtunk (**18-B. ábra**). (pl. közel 5-szörös TgAb szint növekedés a CLMA módszer esetében csak 20%-os, míg az ECLIA módszerrel 40% feletti Tg veszteséget okozott).



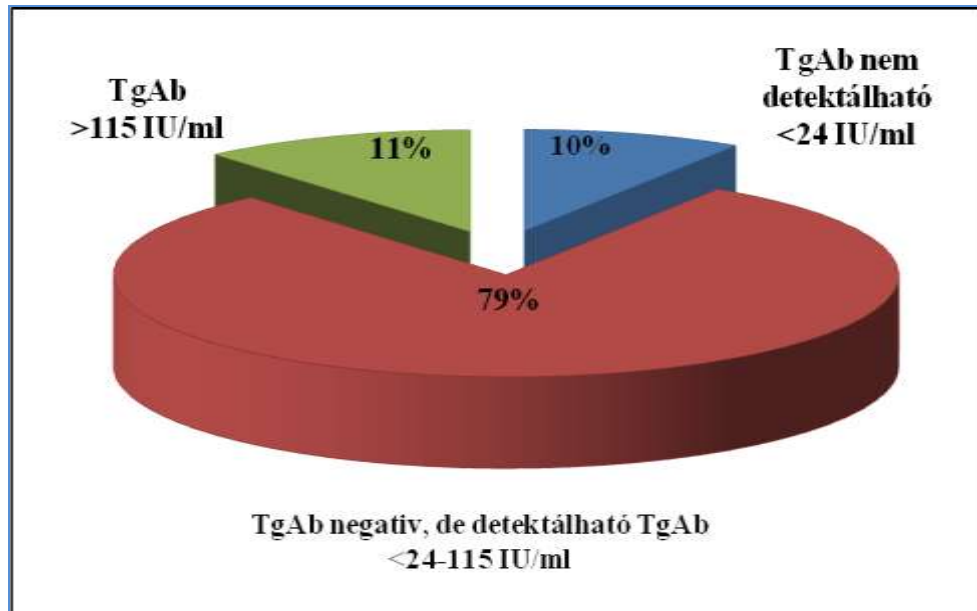
18. ábra

Módszer és antitest függő eltérések a mérhető Tg szintekben

V.1.3.3. DTC-ben szenvedő betegek mintáinak elemzése az in vitro vizsgálati eredmények figyelembe vételével

DTC-ben szenvedő betegek 134 mintáját TgAb szintjük alapján csoportosítva a betegek 79%-a (N=106) mérhető, de nem emelkedett (24-115 IU/ml) TgAb szintet találtam. Nem detektálható TgAb szint csak 10%-ban (N=13), míg a cut off értéket meghaladó

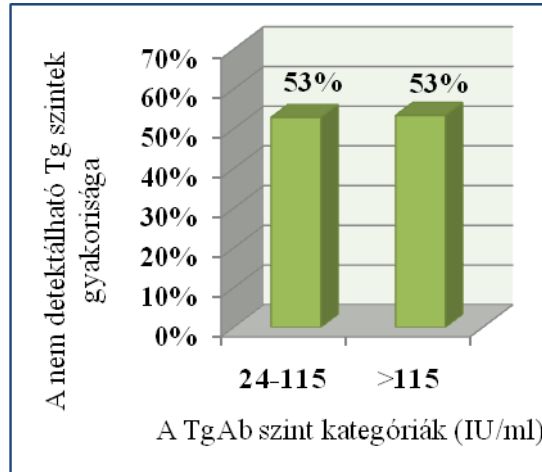
(>115 IU/ml), (azaz jelen fogalmak szerinti antitest pozitív szérum) 11%-ban (N=15) fordult elő (**19. ábra**). Nem volt különbség a betegség kezdetétől eltelt idő tekintetében a TgAb pozitív és TgAb negatív betegek között.



19. ábra

A szérum mintákban előforduló TgAb szintek %-os előfordulása a detektálhatóságot és a pozitivitást jelző határértékek szerint csoportosítva

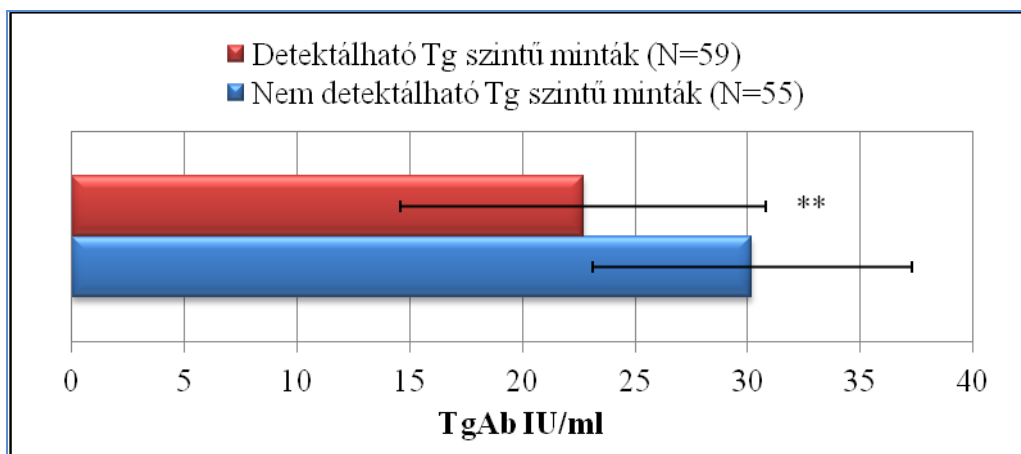
A 134 mintából 69-ben a Tg szint nem volt detektálható, míg 65 esetben a funkcionális szenzitivitás fölötti értékeket kaptunk. A nem detektálható Tg szint előfordulási gyakorisága azonos (53%) volt a TgAb negatívnak tekinthető (24-115 IU/ml) antitest szintű csoportban, a ténylegesen antitest pozitívnak minősített csoportban tapasztalt gyakorisággal (**20. ábra**).



20. ábra

A nem detektálható Tg szintek előfordulása eltérő TgAb szint mellett

Hipotézisem értelmében külön elemeztem a csak <115 IU/ml TgAb szintű „antitest negatív” mintákat (N=114) a Tg szintjük detektálhatóságának figyelembevételével. A detektálható és nem detektálható Tg szintű csoportok TgAb szintjeinek átlagát a **21. ábra** szemlélteti. Szignifikánsan ($p < 0,02$) magasabb TgAb szint igazolódott a nem kimutatható Tg szintű betegek szérumában a detektálható Tg-t tartalmazó mintákhoz képest.



21. ábra

TgAb szintek a detektálható, ill.a nem detektálható Tg szintű mintákban

ANOVA F:6,3 df,113 ; S.E.= standard hiba

Várható módon szignifikáns különbség igazolódott a thyroxin szuppressziós terápia alatt és thyroxin megvonásban nyert minták a TSH és a Tg szintjeiben. A TgAb szintek ugyan magasabbak a hormon megvonása után, de a különbség nem volt szignifikáns (*15. táblázat*)

15. táblázat

TSH, Tg és TgAb átlagértékei a T4 szuppressziós és T4 megvonásos állapotban

A vérvételt megelőző gyógyszeres kezelés	TSH átlag \pm S.D. mU/l	Tg átlag \pm S.D. ng/ml	TgAb átlag \pm S.D. IU/ml
L-thyroxin szedése	1,56 \pm 9,2 (N=123)	5,3 \pm 16,5 (N=117)	111,6 \pm 281,5 (N=107)
L-thyroxin megvonását követő 4. hétben	31,7 \pm 21,1* (N=28)	137,9 \pm 117,0* (N=28)	157,3 \pm 346,8 (N=28)

*szignifikáns ($p < 0,0001$) eltérés a thyroxint szedő csoporttól (ANOVA: F értékek TSH: 138,2; Tg: 64,8)

A 27 beteg esetében a hormonszuppressziós terápia során 123 alkalommal végzett TSH szint ellenőrzés során szupprimált értéket ($0,007 \pm 0,002$ mU/l) kaptam 14 (12%) esetben. A referencia tartományba eső ($0,92 \pm 0,77$ mU/l) TSH értékeket 41 esetben (35%), szubnormális TSH szinteket ($0,078 \pm 0,05$ mU/l) 61 (50%) esetben tapasztaltam. Emelkedett ($6,92 \pm 1,66$ mU/l) TSH szinteket 7 (5%) betegnél mértünk.

A hormonszuppressziós terápia alatt TSH szintjük alapján csoportosított betegekhez tartozó TSH, Tg és TgAb szintek átlagértékeit a *16. táblázat* foglalja össze. A Tg és a TgAb szintek között nem volt szignifikáns eltérés.

16. táblázat

TSH, Tg és TgAb szintek a hormonszuppressziós terápia alatt a különböző TSH szintű betegek csoportjaiban

TSH értékek	TSH ± S.D. mU/l	Tg ± S.D. ng/ml	TgAb ± S.D. IU/ml
Szupprimált N = 14	0,007 ± 0,002	0,22 ± 0,39	25,3 ± 18,0
Szubnormális N = 16	*0,078 ± 0,05	5,63 ± 18,23	148,9 ± 354,9
Normális N = 41	*0,92 ± 0,77	5,49 ± 16,49	67,5 ± 171,1
Magas N = 7	*6,92 ± 1,66	12,69 ± 17,42	168,1 ± 252,5

* szignifikáns (P<0,0001) eltérés a szupprimált TSH értékű csoporttól.

A TSH szuppressziós terápiában részesülők (N=123) Tg és a TSH szintjei szignifikáns (p<0,01) közepes pozitív korrelációt (r=0,57) mutattak, viszont a Tg és TgAb értékek között nem mutatkozott szignifikáns összefüggés.

Mivel a Tg szint alapvetően függ a TSH elválasztásától, ezért elemeztem a nem detektálható Tg szintek előfordulási gyakoriságát, szupprimált (<0,014 mU/l), szubnormális (0,015-0,26 mU/l), referencia tartományon belüli (0,27-4,2) és enyhén magas (4,3-6,5 mU/l) TSH szintű betegek csoportjaiban. A Tg kimutathatósága függött az anti-test szintek mennyiségétől a különböző TSH szintű csoportokon belül is.

Mért és számított Tg szintek

Az in vitro vizsgálatban megállapított regressziós egyenes egyenletet alkalmazva (ld. 7. ábra) 65 betegszérum esetében tudtuk a mért Tg és TgAb szintekből Tg értékeket kalkulálni, így szignifikánsan nagyobb értékeket kaptunk.

17. táblázat

A mért és a TgAb szintre korrigált Tg értékek

Betegek	Mért Tg Median (Q25 Q75) ng/ml	Kalkulált Tg Median (Q25 Q75) ng/ml
Thyroxin kezelés alatt N = 22	5,53 (2,17 11,33)	3,3 (1,6 6,9)*
Thyroxin megvonásban N = 4	20,4 (6,4 111,6)	32,33 (10,1 258,1)

*szignifikáns ($p < 0,01$) eltérés a mért értéktől

A 134 szérum minta közül 26 tartalmazott egyaránt mérhető mennyiségű Tg-t és TgAb-t. (22 on thyroxin és 4 off thyroxin állapotban levett minta volt.) Az in vitro kísérletből származó egyenletet használva számított Tg értékek szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabbak voltak a mért Tg értékeknél az on thyroxin levett mintákban: 3,3 (1,6-6,9 ng/ml) szemben a 5,53 (2,17-11,32 ng/ml) értékkel (17. táblázat). A kisszámú off thyroxin mintában ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,068$). Két beteg esetében a mérttel ellentétben a számított Tg érték meghaladta a 2 ng/ml szintet on thyroxin (mindkettő 1,7-ről 2,7 ng/ml lett), a betegség perzisztálásának gyanúját ezekben a betegekben az off thyroxin értékek (16,8 illetve 6,1 ng/ml) alátámasztották.

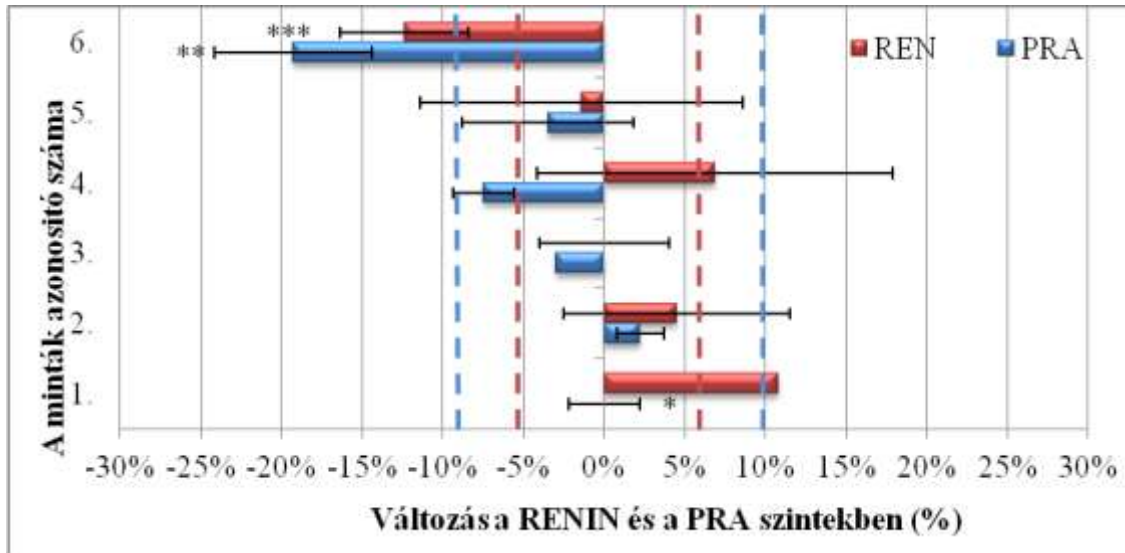
V.2. A primer aldosteronizmus biomarkereinek vizsgálata

V.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására

V.2.1.1. A mintavételtől a mélyhűtésig

A minták 2 órán át szobahőmérsékleten tárolása után, úgy a PRA, mind a REN értéke szignifikánsan ($p < 0,001$) csökkent, míg mindkettő változatlan maradt, ha a mintákat 0-5 C° között tároltuk ugyanilyen ideig. A REN érték szignifikánsan magasabbnak bizonyult, ha a mintákat hűtött EDTA-s csövekbe vettük és 30 percen belül 0-5 C° között tároltuk, a szobahőmérsékleten tartott mintákhoz képest. A REN érték emelkedését ta-

pasztaltuk a hűtött EDTA-s csövekbe vett és 30 percen belül 0-5 C° között tárolt (1 csoport) valamint a gyártó utasításának megfelelően kezelt, gyorsan -80 C°-ra fagyasztott (4 csoport) mintákban is, azonban az emelkedés itt nem bizonyult szignifikánsnak. (22. ábra)



22. ábra

Változások az analít szintekben a hatféle preanalitikai körülménynek kitett mintákban

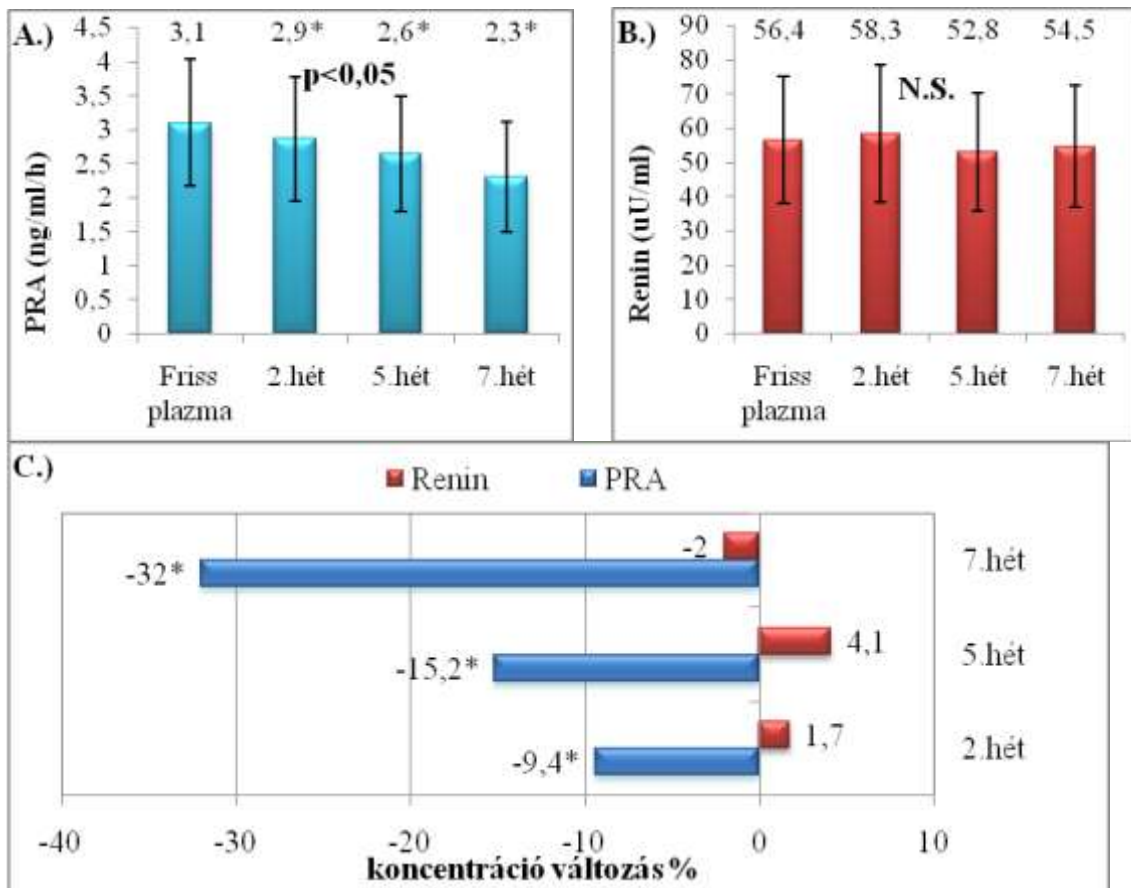
ÁBRAMAGYARÁZAT: Az oszlopok a %-os eltérést, a hibasávok a \pm standard hibát szemléltetik; a szaggatott vonalak a legmagasabb intra-assay variációs koefficiens mutatókat (bordó: PRA 9,9%, és kék:REN 5,6%), ANOVA REN: $F=7.03$, $df=4$, $p<0.001$; PRA: $F=1.6$, $df=4$, $p=0.18$. REN LSD teszt: ** szignifikáns ($p<0.001$) különbség az összes többi mintától, * az 5. és 6. mintától. PRA LSD test: ***szignifikáns ($p<0.05$) különbség a 2. és 3. mintától.

Az 1-6 csoportokban a minták tárolási körülményeit a 10. táblázat részletezi.

V.2.1.2. A fagyasztásos tárolási idő hatása a PRA és REN szintekre

A -20 C°-on történt tárolás során a PRA 2 hét múlva $9,4\pm 2,4\%$ -al csökkent (nulladik héten $3,1\pm 0,9$ ng/ml/h, második héten $2,9\pm 0,9$ ng/ml/h). A statisztikailag szignifikáns ($p<0,05$) csökkenés azonban klinikailag nem tekinthető relevánsnak, tekintetbe véve a

módszernek a csökkenés mértékénél nagyobb intra-assay CV értékét. Sokkal jelentősebben ($15,2\pm 4,7\%$) csökkent a PRA az 5. hétre, ($2,6\pm 0,8$ ng/ml/h, $p<0,02$ a kezdő héthez képest), majd még jelentősebben ($31,9\pm 4,7\%$) a 7. héten ($2,3\pm 0,76$ ng/ml/h, $p<0,01$ a kezdő héthez). Ezzel ellentétben a REN változása ugyanezekben az időtartamokban vizsgálva nem volt szignifikáns, 5% alatt maradt - kezdő hét $56,4\pm 17,7$, hetedik hét $54,5\pm 16,9\mu\text{IU/ml}$ - (23. ábra).



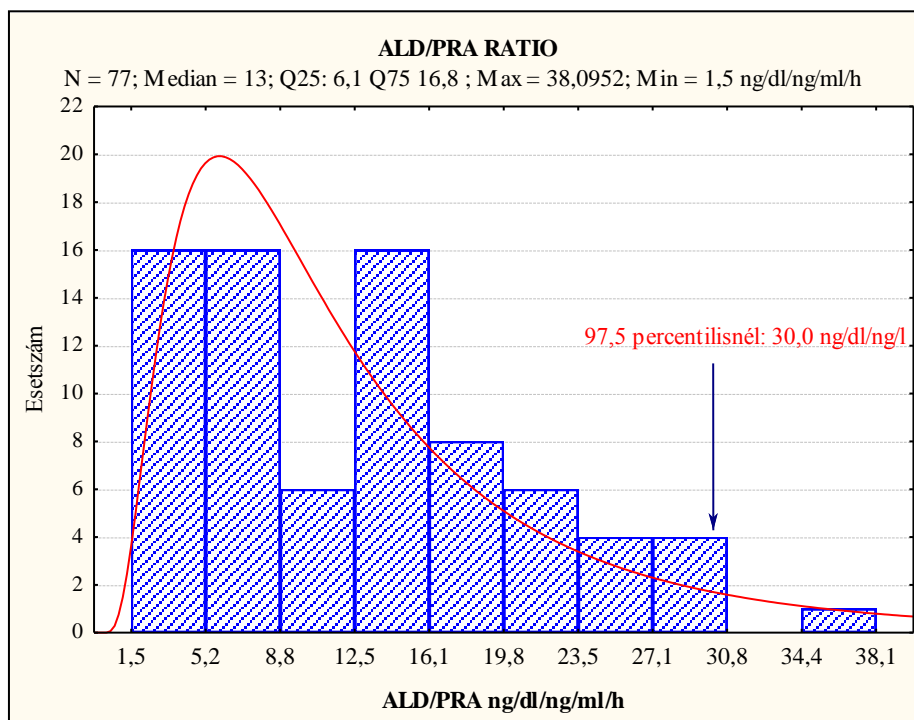
23. ábra

Fagyasztásos tárolás hatása a PRA (A panel) és REN (B panel) szintekre, valamint a tárolás során mért mennyiségi változások százalékos ábrázolása

V.2.2. Két renin módszerrel nyert aldosteron/renin hányadosok összehasonlítása

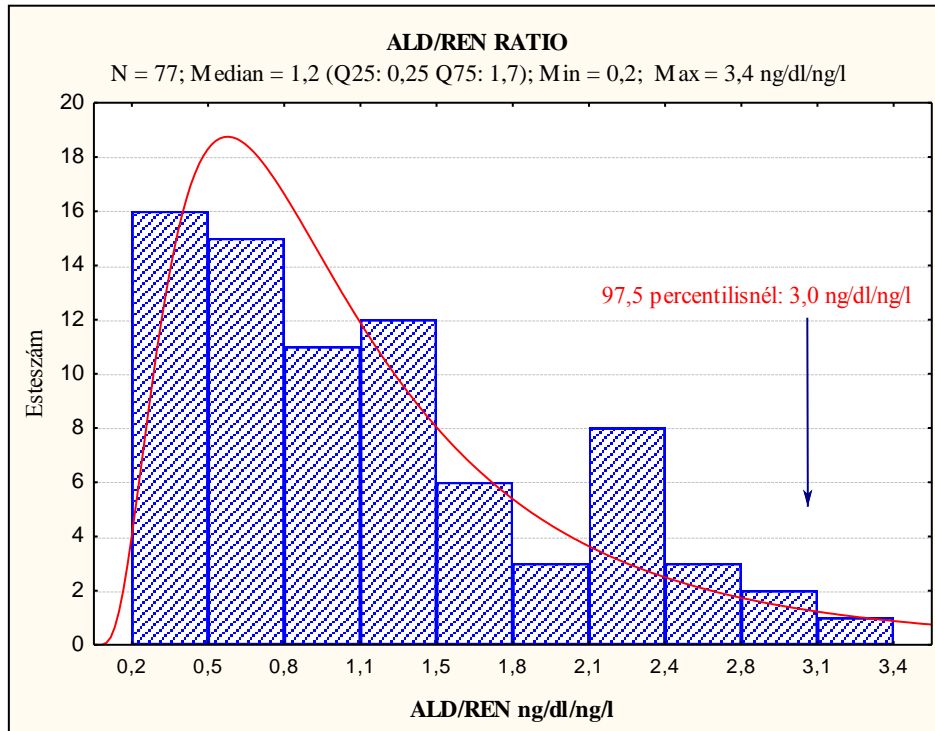
V.2.2.1. Referencia tartományok meghatározása

Az egészséges, normotenziós felnőttek Ald/PRA hányadosok hisztogramját a **24. ábra**, az ALD/REN hányadosok hisztogramját a **25. ábra** szemlélteti. Primér aldosteronizmus vontakozásában a döntéshozatali határértéket a 97,5-es percentilisével 30 ng/dl/ng/ml/h-ban kaptuk.



24. ábra

Az aldosteron/ plazma renin aktivitás értékek hányadosának hisztogramja egészségesekben. Jelmagyarázat: ALD: aldosteron, PRA: plazma renin aktivitás.



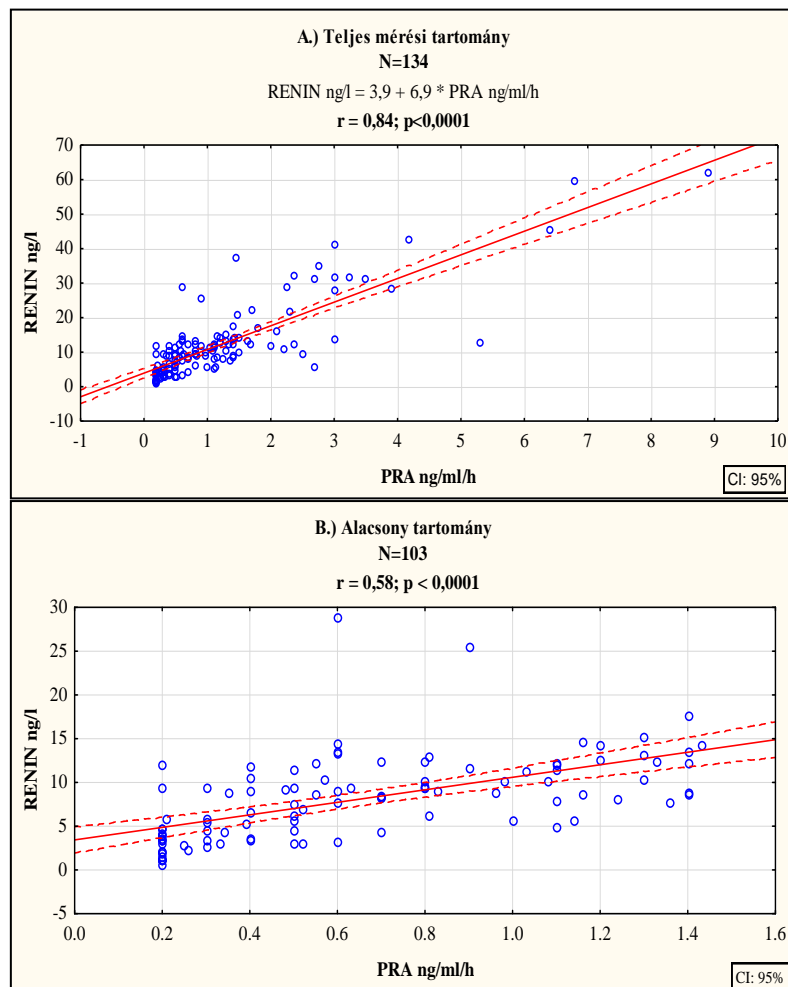
25. ábra

**Az aldosteron és kvantitatív aktív renin szintekből származtatott
hányados hisztogramja** Jelmagyarázat: ALD: aldosteron, REN: aktív renin kon-
centráció,

V.2.3. A két renin módszer közötti korreláció

A PRA ($1,2 \pm 1,4$ min.: 0,2, max.: 8,9 ng/ml/h) és a REN ($12,1 \pm 11,0$ min.: 0,7, max.: 62,1 ng/l) szint között szignifikáns, erősen pozitív korrelációt ($r=0,84$) tapasztaltam a teljes mintaszámot ($n=134$) tekintve (**26-A. ábra**). A korreláció azonban az 1,5 ng/ml/h értéknél alacsonyabb tartományban ($n=103$, PRA: $0,6 \pm 0,4$ ng/ml/h, min.: 0,2, max.: 1,4, REN: $8,1 \pm 4,9$ ng/ml, min.: 0,7, max.: 28,8) már jóval gyengébb ($r=0,59$), bár így is szignifikáns ($p < 0,0001$) volt (**26-B. ábra**). Ha a két kiugróan magas REN értéket kizártuk ($N=101$) a korrelációs koefficiens akkor is csupán 0,68-ra változott..

A PRA 15,7%-ban (21/134) a detektálhatósági határ alatt volt, míg a REN esetében ez csak egy esetben (0,8%) fordult elő.



26. ábra

Korrelációk a PRA és a REN szintek között a teljes és az alacsony mérési tartományban

V.2.4. A két módszerrel nyert saját klinikai tapasztalatok

V.2.4.1. Kezeletlen betegek

Az antihypertenzív szerrel nem kezelt csoportok összehasonlítása során a medián teszt csak az ALD esetében mutatott ki szignifikáns különbséget ($p < 0,01$). Ugyanakkor a rang transzformációt követő ANOVA teszttel vizsgálva, csupán a REN esetében nem

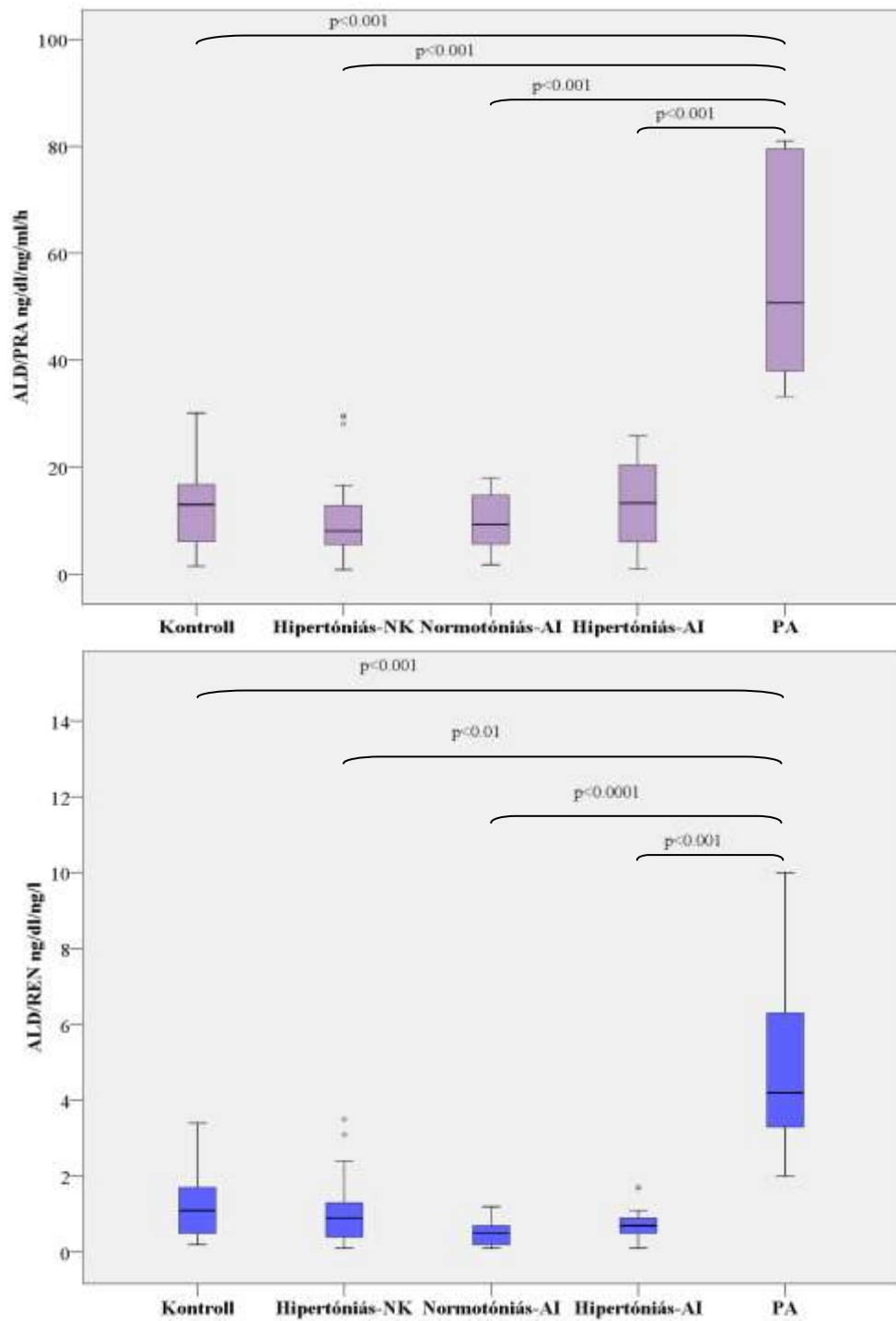
kaptunk szignifikáns eltérést a különböző csoportok között. A PA csoport esetében (részben a vártak megfelelően), mindkét módon képzett hányadosok a legmagasabbak voltak és szignifikánsan eltértek minden más csoporttól. A nem hypertóniás mellékvesekéreg adenomás csoport ALD értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak az egészséges kontroll illetve a hypertóniás csoport értékeihez képest. Az eredményeket a **19. táblázat** részletezi, az ARR közötti különbségeket a **27. ábra** szemlélteti.

19. táblázat

Kezelésben nem részesülő csoportok medián értékei és a csoportok közötti eltérések.

Gyógyszert nem szedő egyének (N)	ALD ng/dl	PRA ng/ml/h	REN ng/l	ALD/PRA ng/dl/ng/ml/h	ALD/REN ng/dl/ ng/l
N=109	Medián alsó es felső kvartilis				
Kontroll (49)	10,5 4,8 14,9	0,8 0,5 1,4	9,5 7,7 12,5	13,0 6,1 16,7	1,1 0,5 1,7
Hipertóniás (34)	9,1 5,8 14,7	0,9 0,3 1,4	9,8 5,6 14,3	9,7 6,7 28,1	1,0 0,4 1,9
Normotóniás, mellékvese-kéreg adenóma (7)	3,6** 2,3 6,0	0,6 0,2 0,8	9,3 4,0 13,5	9,3 3,8 15,0	0,6 0,2 1,2
Hipertóniás + mellékvesekéreg adenóma (14)	7,7 3,8 9,2	0,6 0,2 1,1	9,4 4,0 11,5	13,3 6,1 20,4	0,7 0,5 1,1
PA (5)	15,9 13,3 16,2	0,2* 0,2 0,4	4,8 1,6 6,5	50,7*** 38,0 79,5	4,2*** 3,3 6,3
Median teszt: df=4 Khi ² : P érték:	12,5 <0,05	NS	NS	NS	NS
Kruskal-Wallis ANOVA H érték: P érték:	15,1 <0,01	10,7 <0,05	NS	13,1 <0,05	13,2 <0,05

A csoportok közötti összehasonlítás során szignifikáns eltérés **kontroll, hipertóniás és PA csoporthoz hasonlítva ($p < 0,05$); ***az összes többi csoporthoz, *csak a kontroll csoporthoz hasonlítva ($p < 0,01-0,05$). NS: $p > 0,05$.



27. ábra

Kezelésben nem részesülő személyek ARR medián értékei

Jelmagyarázat: a boxplot oszlopokba húzott vízszintes vonal a medián értékeket, a hibásávok az alsó és a felső kvartilis értékhez tartozó mediánokat szemlélteti.

Kezelt betegek

A különböző antihypertenzív szerek hatását vizsgálva kontrollként nemcsak a nem kezelt hypertóniás csoportot, hanem a PA-s betegeket is számításba vettük. A medián teszt a PRA ($p<0,001$) és a REN ($p<0,05$) esetében is szignifikáns volt, míg a rang transzformációt követő ANOVA esetében csupán az ALD esetében nem találtunk szignifikáns különbséget. A legerősebb szignifikáns eltérést a PRA és az ALD/PRA esetében tapasztaltuk. ($p<0,01$). A PA csoportban mért ALD/REN hányados a nem kezelt hypertóniás, valamint az ACE/ARB és Ca-antagonista terápiában részesülő betegekhez képest volt szignifikánsan magasabb (**20. táblázat és 28. ábra**).

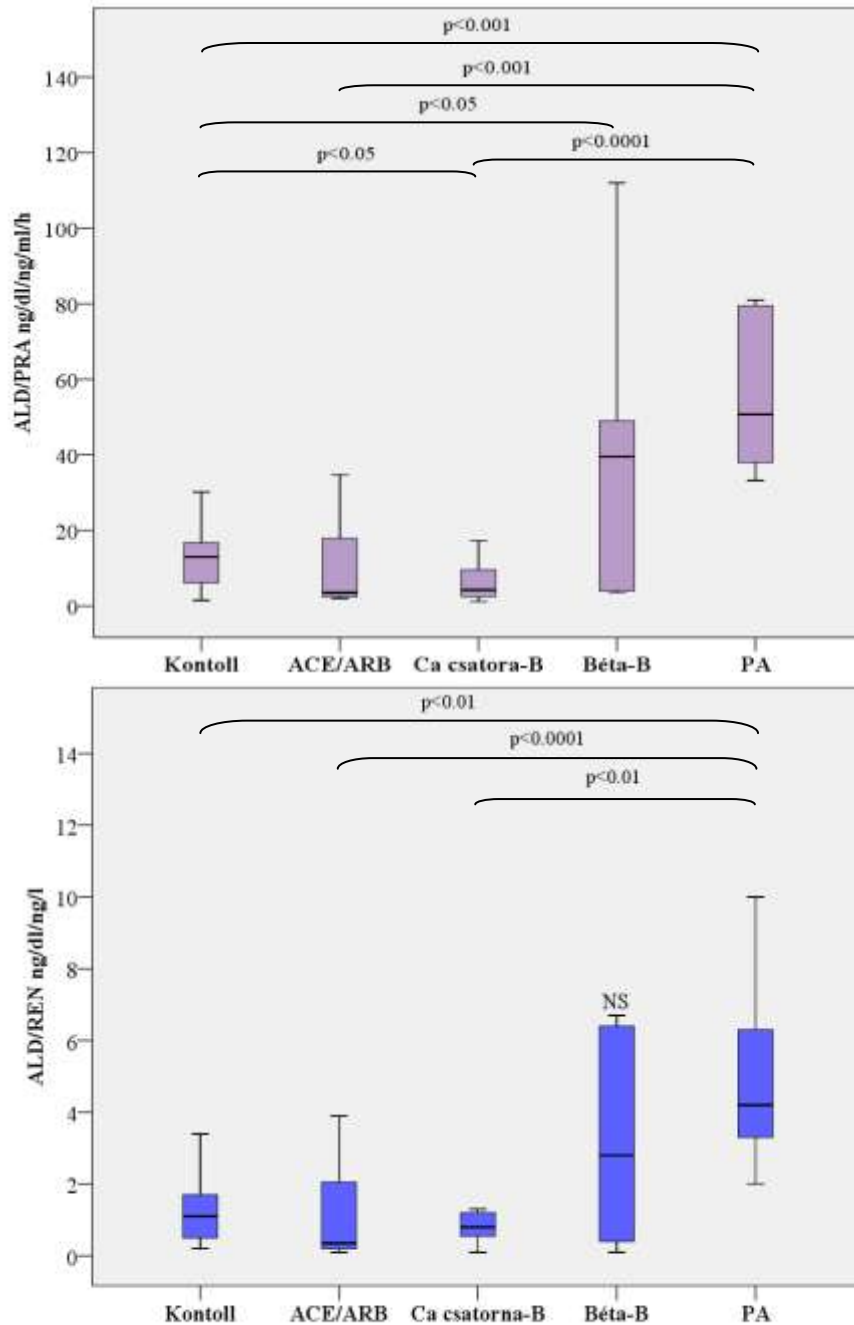
20. táblázat

Gyógyszeres kezelésben részesülő csoportok medián értékei a gyógyszert nem szedő hipertóniás és a primer aldosteronizmusban szenvedő (PA) mellékvesekéreg adenómás esetekhez hasonlítva

Csoportok (N) N=64	ALD ng/dl	PRA ng/ml/h	REN ng/l	ALD/PRA ng/dl/ ng/ml/h	ALD/REN ng/dl/ng/l
	Medián				
	Alsó és felső kvartilis				
Hipertóniás, nem kezelt (34)	9,1 5,8 14,7	0,9 0,3 1,4	9,8 5,6 14,3	9,7 6,7 28,1	1,0 0,5 1,9
ACE/ARB (9)	8,3 5,0 13,9	1,1 0,4 2,7	12,7 5,8 28,9	4,0 2,8 31,3	0,4 0,2 2,2
Ca csatorna-B (7)	10,0 4,9 10,6	2,0 1,5 2,7	13,0 9,4 22,0	4,2 2,5 12,5	0,78 0,4 1,3
Béta-B (9)	9,8 7,7 11,9	0,3* 0,2 0,5	3,5 3,4 4,6	39,6 4,0 49,0	2,8 0,4 6,4
PA (5)	15,9 13,3 16,2	0,2* 0,2 0,4	4,8* 1,6 6,5	50,7* 38,3 79,5	4,2** 3,3 6,3
Median teszt: df=4 Khi ² : P érték:	NS	18,6 <0,001	11,9 <0,05	NS	NS
Kruskal-Wallis ANOVA H érték: P érték:	NS	16,7 <0,01	10,3 <0,05	15,3 <0,01	10,5 <0,05

A csoportok közötti összehasonlítás során szignifikáns ($p<0,05$) eltérés: **hipertóniás nem kezelt és ACE/ARB kezelt esetekhez, valamint a kalciumcsatorna-blokkoló (Ca-csatorna-B) csoport értékeihez képest; *a Ca-csatorna-B csoporthoz képest. NS: a teszt nem szignifikáns. ACE: angiotenzin I konvertáló enzim gátló, ARB: angiotenzin II receptor blokkoló

Mindkét hányados átlagértékeinek logaritmususa a PA csoportban tért el szignifikánsan a többi csoporttól, az ANOVA teszt szignifikancia szintje azonos volt ($p < 0,01$). Az ARR értékeket a **28.ábra** szemlélteti.

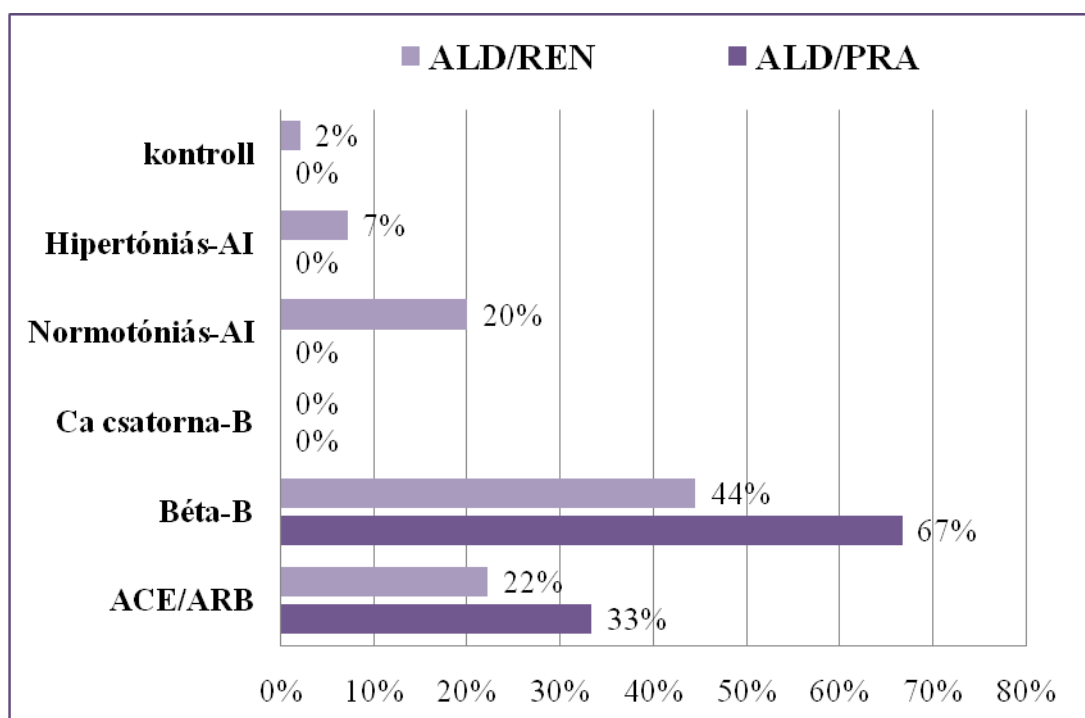


28. ábra

Az aldosteron renin hányadosok a kezelt betegek körében

A béta blokkoló kezelés hatását elemezve láthattuk, hogy a kezelt betegek ALD/PRA értékei szignifikánsan ($p < 0,01$) eltértek a kontroll, nem kezelt és ACE/ARB vagy Ca-antagonistával kezelt csoporttól, míg az ALD/REN esetében ilyen eltérést csupán a Ca-antagonista csoportban tapasztaltunk ($p < 0,001$). Ugyancsak az ALD/REN esetében a Ca-antagonistával kezelt csoport értéke szignifikánsan ($p < 0,01$) eltért a kontroll csoporttól.

A vizsgált esetek összességét tekintve a tévesen magas ARR értékek előfordulási gyakoriságát a **29. ábra** szemlélteti.



29. ábra

Tévesen magas ARR értékek előfordulása a vizsgált csoportokban

V.2.5. Eltérő gesztagén tartalmú OAC-k hatása az aldosteron és renin szintekre, ill. hányadosukra

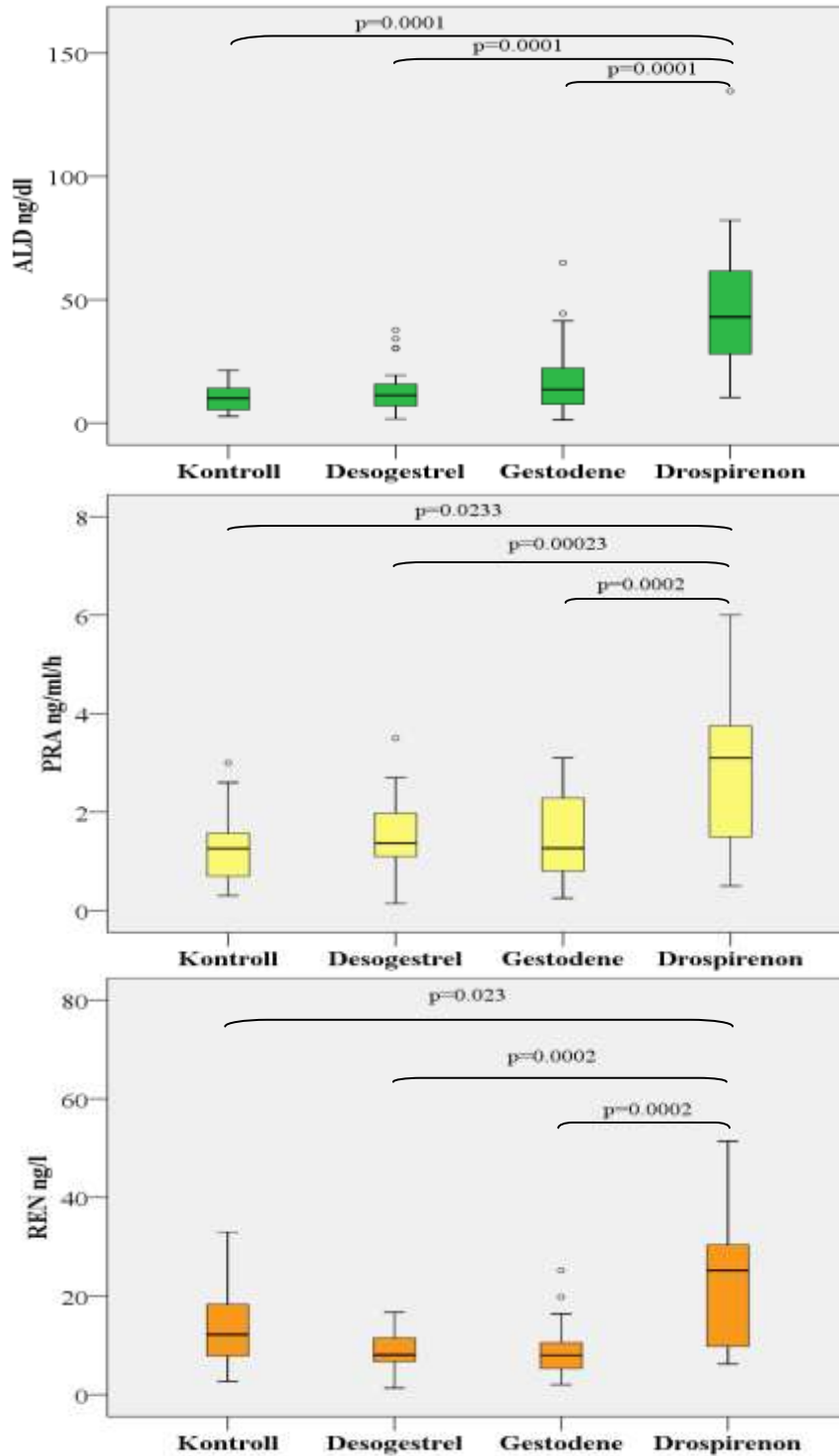
A PRA, REN és ALD értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a DRSP csoportban a DSG, GTD és a kontroll csoporthoz képest. Mind az ALD/PRA mind az

ALD/REN hányados a legmagasabb a DRSP csoportban volt. Azt ALD/PRA esetében az eltérés szignifikáns volt a DSG, GTD és kontroll csoporthoz hasonlítva. Az ALD/REN hányados szignifikánsan nagyobb volt mind a DRSP, mind a DSG és GTD csoportban a kontrollhoz képest. A legmagasabb értéket a DRSP csoportban találtam (21. táblázat, 30 és 31 ábra).

21. Táblázat
A mért biomarkerek szintjei eltérő gestagén komponensek esetén

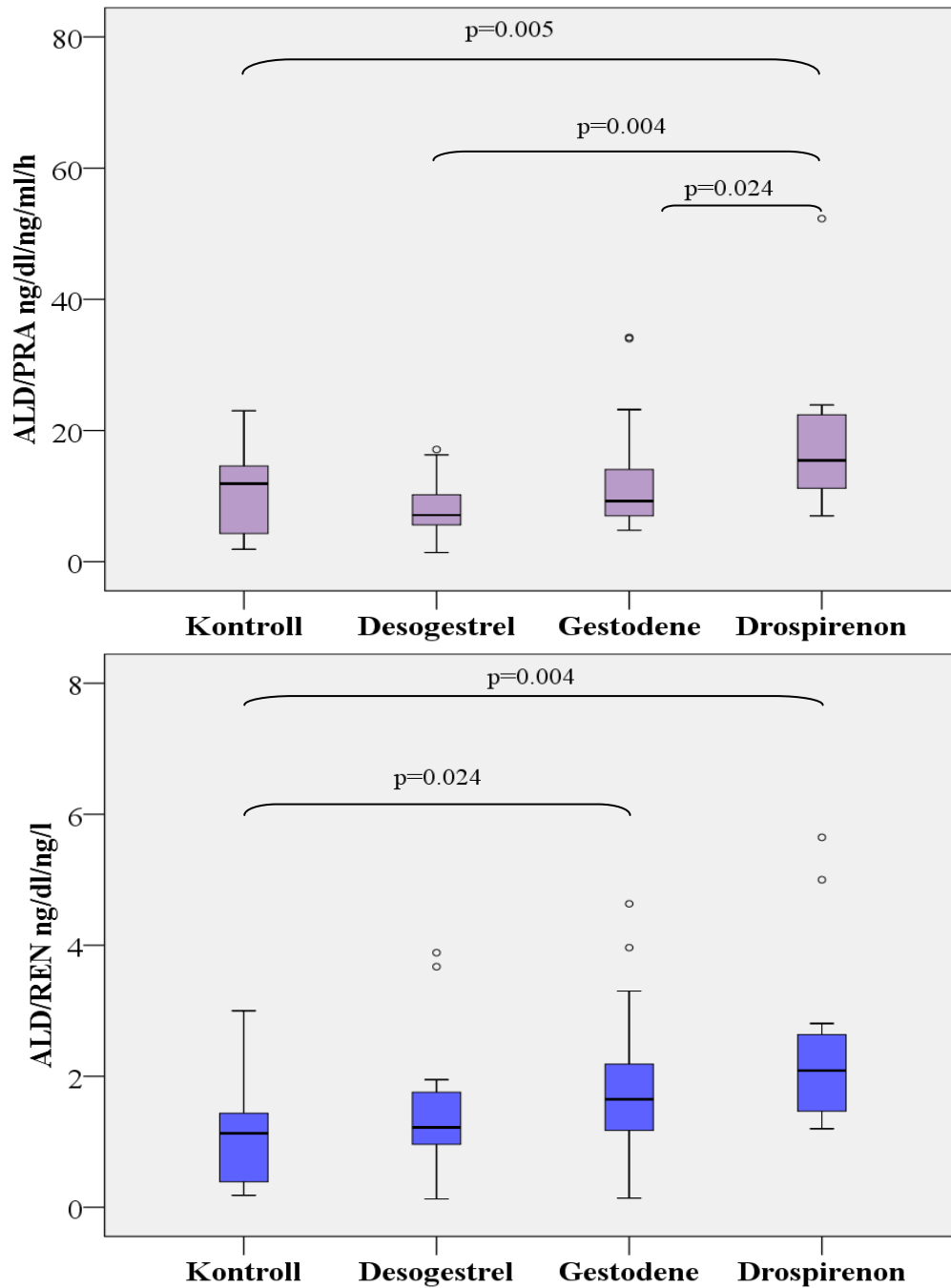
csoport	kontroll	Desogestrel	Gestoden	Drospirenon
Parameter,	Medián (Q25 Q75) Min. Max.	Medián (Q25 Q75) Min. Max.	Medián (Q25 Q75) Min. Max.	Medián (Q25 Q75) Min. Max.
PRA ng/ml/h	1.26 (0.7 1.6) 0.3 3.0	1.4 (1.1 2.0) 0.1 3.5	1.2 (0.8 2.2) 0.2 7.9	3.1* ^a (1.5 3.7) 0.5 6.0
Log10PRA ANOVA	df: 3, 82; F=4.9; p=0.0032			
REN ng/l	12.2 (7.5 21.7) 2.7 33.0	8.3* (6.8 12.3) 1.3 29.8	8.0*** (4.8 10.5) 2.0 33.0	25.2**** ^a (9.7 30.3) 6.2 51.3
Log10REN ANOVA	df: 3, 82; F=6.5; p=0.0005			
ALDOSZTERON (ALD)	10.0 (4.4 14.7) 2.7 21.3	11.5 (7.2 16.6) 1.7 37.7	13.4 (7.7 22.1) 1.2 78.1	43.7**** ^a (28.0 61.6) 10.4 134.6
Log10ALD ANOVA	df: 3, 82; F=13.7; p=0.0000			
ALD/PRA	11.8 (3.6 14.9) 1.9 23.0	8.1** (6.2 13.5) 1.4 45.0	8.7* (6.8 13.8) 4.0 38.8	15.4* ^a (11.6 22.6) 6.9 62.0
Log10ALD/PRA ANOVA	df: 3, 82; F=3.69; p=0.0150			
ALD/REN	1.1 (0.4 1.5) 0.2 3.0	1.4* (0.9 1.8) 0.1 14.7	1.6** ^b (1.2 2.4) 0.1 9.7	2.0* ^b (1.5 2.6) 1.2 5.6
Log10ALD/REN ANOVA	df: 3, 82; F=5.33; p=0.002			
A páronkénti összehasonlítás (LSD teszt) során nyert szignifikancia szintek: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 ^a szignifikáns eltérés mindhárom csoporttól , ^b szignifikáns eltérés a kontrolltól				

Rövidítések: ALD: aldoszteron, PRA: plazma renin aktivitás, REN: aktív renin; df: szabadságfok; ANOVA: variancia analízis.



30. ábra

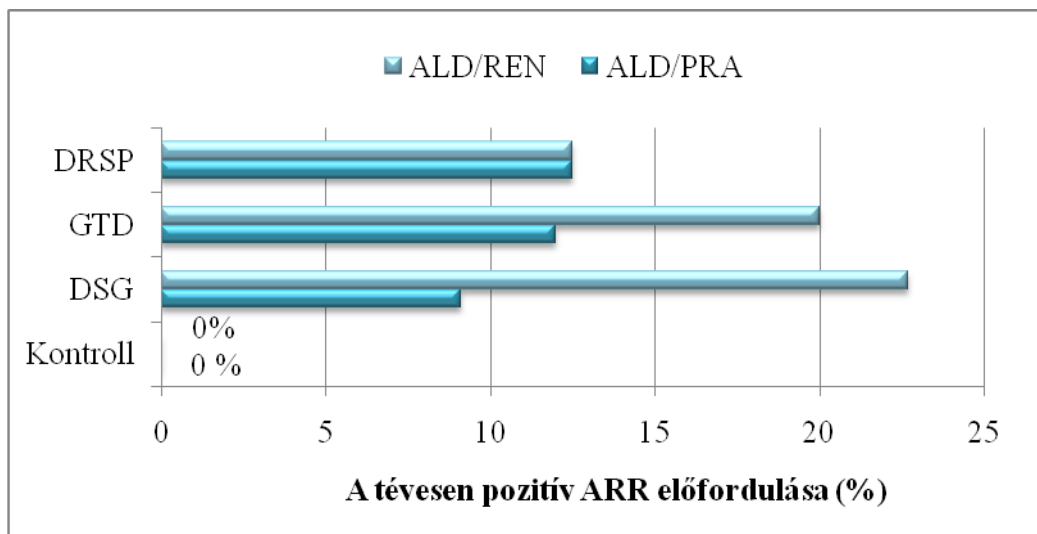
A mért medián és szélső kvartilis értékeinek változása különböző gesztagén tartalmú OAC alkalmazása során



31. ábra

A számított ARR medián és szélső kvartilis értékeinek változása különböző gesztagén tartalmú OAC alkalmazása során.

Az általuk meghatározott –intézményi- határértéket használva nem volt álpozitív emelkedett ALD/PRA vagy ALD/REN hányados a kontroll csoportban, azonban a 63 OAC szedő között az ALD/PRA hányados 7 esetben (11%), míg az ALD/REN hányados 12 esetben (19%) került a határérték fölé. Álpozitív ALD/PRA ritkábban volt tapasztalható, mint az álpozitív ALD/REN a DSG és GTD csoportban, ellentétben a DRSP csoporttal (**32. ábra**).



32.ábra

Az álpozitív aldosteron/renin hányadosok előfordulása

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.

A mindennapi laboratóriumi gyakorlatban a Tg és TgAb mérés gazdaságossági okból a mintákat összegyűjtve változó időközönként történik. Ugyanakkor *Spencer (2010)* ajánlásának megfelelően azokat a szérum mintákat, amelyekből a mérés történt, hosszabb ideig meg kellene őrizni a laboratóriumnak, az esetleges eredmény reklamációk utólagos vizsgálata érdekében. Ha így van, illetve ez várható el a laboratóriumoktól, akkor alapvető fontosságú annak vizsgálata, hogy a tárolás hossza és a tárolás körülményei mennyiben befolyásolják a Tg stabilitását.

Eredményeink megegyeznek *Y. Gao (2007)* adataival, amennyiben a szeparált vagy alvadék feletti szérumnak szobahőmérsékleten történő 4-24 órás tárolása nem befolyásolja lényegében a mért Tg értékeket. Ugyanakkor ma Magyarországon a mindennapi gyakorlatban a Tg mérés nem naponta történik. Így számunkra sokkal érdekesebb, hogy a 2-3 napon át 4 C°-on, vagy néhány hétig mélyhűtőben (-17-20 C°) történő min-tatárolásnak milyen a hatása.

Az általunk használt reagens gyártójának (Roche) álláspontja szerint a Tg stabil 24 h hosszan 15-25 C°-on, 3 napig 2-8 C°-on és egy hónapig -20 C°-on. A TgAb minták stabilak 3 napig 2-8 C°-on és legalább egy hónapig -20 C°-on. Eredményeink ettől eltérőek: a 8 órán át szobahőmérsékleten majd ezt követően 4-10 C°-on tárolt minták immunreaktivitása Tg és TgAb tekintetében már 24-28 óra elteltével szignifikánsan változik. Ugyanígy nem tudjuk megerősíteni, hogy a minta egy hónapig -20C°-on tárolása biztonságos az eredmény szempontjából. Természetesen lehetséges, hogy az általunk kapott adatok csupán az általunk használt reagensre érvényesek, hiszen az Architect-Abbott reagenssel közölt irodalmi adatok 4 C°-on egy heti, míg -25 C°-on 14 évi stabilitást írtak le (*Mannistö és mtsai. 2007*).

Tanulmányunkban a 4-10 C°-on tárolt mintákban a Tg koncentráció 48 óra elteltével már több mint 20%.-kal nőtt. A jelenséget azzal magyarázzuk, hogy részleges proteolyticus enzim bontás során olyan glycoprotein fragmensek képződhetnek, amelyeket az assay-ben használt antitest teljes molekulának ismer fel. Ezzel ellentétben a minta mélyhűtőben (-17-20 C°-on) 4 hétig tartó tárolása a mért Tg érték több mint 20%-os csökkenését eredményezte, amit a Tg immun reaktivitás degradációs folyamatok következtében létrejövő csökkenésének tulajdonítunk. Az enzimatiszikus változások mellett a fehérje konformáció változás és/vagy immun komplexek változó képződése, diszociációja, valamint az alkalmazott antitestek heterogenitása ugyancsak szerepet játszhat a folyamatban. Az a tény, hogy a Tg magasabb kiinduló koncentrációban tendenciaszerűen stabilabbnak tűnt, az enzimatiszikus folyamat fontosságát támasztja alá (a Menten-Michaelis szabály szerint a szubsztrát magasabb koncentrációja csak bizonyos határok közt képes emelni a reakció sebességét).

Eredményeink alapján a 4-8 órán át szobahőmérsékleten történt tárolás nem befolyásolja a Tg és TgAb mért értékeit, ellentétben a rövid távú 4-10 C°-on illetve a hosszabb távú -17- -20 C°-on történt tárolással. A -70- -80 C°-on történő tárolás hatásának elemzése további vizsgálatot igényelne.

A Tg szint 20%-os eltéréseit a DTC-s beteget ellátó orvos már jelentős, esetleg további klinikai lépést vagy éppen a tervbe vett beavatkozás elhalasztását indokoló változásnak tekintheti, ugyanakkor a minta tárolási körülményeiről valószínűleg nincs tudomása. Mit tehetnénk a kapott szint értékelésének megkönnyítésére? Valószínűleg olyan humán szérumban oldott, ismert tárolási tulajdonságú Tg standardok együttes tárolására lenne szükség a betegektől származó mintákkal, amelyek mért értékeinek változása irányt tudna mutatni a beteg minták változásáról is.

VI.1.2. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo

Tanulmányunk alapján már a normális tartományban lévő TgAb szintek is jelentős hatásúak a mért Tg értékekre, hiszen in vitro vizsgálatunkban, az ebben a tartományban lévő TgAb szint emelése kívülről hozzáadott TgAb-val dózis függően csökkentette a

mért Tg értékeket. Az irodalmi adatok többsége mindez idáig csupán a jelentősen emelkedett TgAb szinteket tartotta relevánsnak és csupán néhány tanulmány vetette fel, hogy a referencia tartományba eső antitest titereknek is lehet befolyása a Tg mérésre. Az in vitro tanulmányban nyert adatokból számítani tudtuk a TgAb interferencia következtében létrejövő Tg szint csökkenését DTC-s betegek olyan szérum mintáiban, amelyekben a Tg és a TgAb egyaránt mérhető mennyiségben fordult elő. Ilyen betegek jelentős számban fordulhatnak elő, hiszen a DTC-s betegek körében az antitest megjelenése jóval gyakoribb az átlag populációnál (*Spencer és mtsai. 1998*). A számított Tg mennyiség szignifikáns mértékben nagyobb volt a mértnél, és néhány esetben a döntési határértéket is átlépte. A számított Tg érték validitását a thyroxin megvonásban bekövetkező emelkedés is alátámasztotta. A DTC-s betegek gondozása során jelenleg döntéseinket a klinikai irányelvek alapján (*Cooper és mtsai. 2009, Pacini és mtsai. 2009*) alapvetően a mért Tg szintekre alapozzuk, (beleértve a kockázati csoport besorolást, további képalkotó vizsgálatok indikációját, és akár terápia indikációját), ezért úgy érezzük, hogy megfigyelésünknek van klinikai hasznossága. A tartósan nem dektálható Tg szintű betegeknél is élni kell a gondozó orvos józan éberségének.

További vizsgálatokat igényelne annak eldöntése, hogy vajon a minden egyes Tg meghatározási módszerre kidolgozott korrekciós egyenlet, és az így számított Tg értékek használata mennyiben javítaná a DTC gondozás minőségét, milyen tartós klinikai haszonnal járna. A tanulmány nyilvánvaló hátránya ugyanis, hogy a meghatározott számítási módszer csak az adott, általunk használt assay-re alkalmazható. In vitro vizsgálatunkban a TgAb koncentráció fokozatos növelésére használt antitest ugyanis birkában termelt anti-humán Tg antitest volt, amelyről nem tudjuk pontosan, mennyiben hasonlít az emberi TgAb tulajdonságaihoz, de különbségek joggal feltehetőek. Irodalmi adatok ismertek a humán TgAb-ra kalibrált assay alkalmazásáról DTC-s betegekben fellépő Tg-TgAb interferencia vizsgálatában. *Krahn és Dembinski (2009)* 4 különböző TgAb assay-t összehasonlítva sem tudták teljes biztonsággal előre jelezni az interakció jellegét és mértékét. A bevezetőben is említett különbségek az epitópokban, antitest aviditásban jelentősen befolyásolhatják a Tg-TgAb interakció kinetikáját, a kialakuló komplexek clearance-ét és biológiai féléletidejét. Ezt a sokkal komplexebb kinetikát valószínűleg sokkal bonyolultabb matematikai képlettel lehetne pontosan leírni, mint az általunk használt egyenlet.

A DTC-s betegek gondozását tekintve teljesen eltérő, illetve a korábbi gyakorlathoz részben visszatérő Schlumberger metódusa, aki minden kimutatható TgAb szintű betegnél elvégzi a I-131 egésztest scintigraphiat (*Schlumberger és mtsai. 2012*).

VI.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a renin koncentráció (REN) meghatározására.

Ismert, hogy a két eltérő metodika (PRA és REN) eltérő mintavételi és preanalitikai körülményeket igényel. A saját tanulmány is azt mutatta, hogy a különböző mintavételi és tárolási körülmények eltérő mértékben, de befolyásolják a mért PRA és REN értékeket. Mindkét módszerrel szignifikánsan csökkent értékeket kapunk, ha 2 órán át volt a minta szobahőmérsékleten a feldolgozás előtt. Ez gyakran előfordulhat a rutin ambuláns vagy kórházi mintavételi körülmények között, ha csak nem ellenőrizzük és standardizáljuk szigorúan a mintavétel folyamatát. Ugyanakkor csak kismértékű eltérést tapasztaltunk, ha a mintákat 0-5 C°-on tárolták ugyanilyen ideig. Ha feltételezzük, hogy a PRA jobb felderítése jelentős számú ambuláns mintavételt tenne szükségessé szerte országunkban PRA vagy REN meghatározásra, akkor látható az is, hogy a mintavételi helyeken centrifuga nem szükséges. Csupán a könnyebben elérhető hűtő jelenléte nélkülözhetetlen, és egy nehezebben megszervezhető körülmény: a minta 2 óra elteltével hűtve érjen be a laboratóriumba. Egy jelenlegi útmutató (*Funder és mtsai 2008*) kijelenti, hogy a minták szobahőmérsékleten is szállíthatóak, ha a plazma elkülönítése a sejtektől 30 percen belül megtörténik. Eredményeink megerősítik ezt a véleményt, azonban a mindennapi gyakorlatban betartása nehézségbe ütközhet.

Míg a PRA mintavétel hűtött csőbe történik, a REN vizsgálatra ugyanilyen módon történő mintavétel szignifikáns hibát okoz. Ez elsősorban akkor látszik fontos körülménynek, ha egyik módszerről a másikra térünk át.

Általános laboratóriumi körülmények között, elsősorban gazdaságossági, munkaszervezési okokból a PRA és REN meghatározásra küldött minták mérése meghatározott időintervallumokban történik és a mérési időpontok között beérkezett mintákat fagyasztva tárolják. Ebből a szempontból fontosnak tekinthető, hogy a mért PRA értékek 2 hét után egyre nagyobb mértékben csökkennek -20 C°-on történő tárolás hatására.

Akár kismértékű ALD emelkedés mellett ez a jelenség kóros ALD/PRA hányadost eredményezhet, ami a beteget számos további vizsgálatnak teheti ki. A REN esetében ilyen eltérést nem tapasztaltunk, ami az utóbbi metodika használata mellett szól olyan intézményekben, ahol a mintaszám nem teszi gazdaságosan lehetővé a 2 hetenkénti PRA mérést.

VI.2.2. Két módszerrel mért aldosteron/renin hányados összehasonlítása

A renin mérés arany standardjának a PRA módszer tekinthető, azonban a REN mérés is sokfelé elterjedt, elsősorban Európában. A REN mérés előnye kézenfekvő: nem igényel RIA laboratóriumot, annak drágább berendezésével, személyzetével és automatizált módszerként nagyobb tömegű meghatározásra is alkalmas. A hipertóniás populációban, a primér aldosteronizmus szűrése esetén a minta hosszabb tárolása nem okoz zavart a mérésben. Kérdés, mennyire egyeznek a REN módszerrel kapott eredmények a standard PRA módszerrel kapott eredményekkel. Korábbi adatok kiváló korrelációról számoltak be. (*Schwartz és Turner 2005*) Azonban olyan eseteket is ismertettek, ahol az alacsony renin értéket csak a PRA módszer tudta kimutatni, míg a REN nem (*Sealey és mtsai. 2005*). Saját vizsgálatunkban összességében elfogadható korrelációt kaptunk, azonban az alacsonyabb –diagnosztikai szempontból fontosabb- tartományban a korreláció már gyengébb volt.

Az antihypertenzív gyógyszerek hatását illetően az aldosteron/renin hányadosokra számos, részben ellentmondásos adatot találhatunk az irodalomban. Pedig a kérdés jelentős fontosságú, hiszen ennek alapján kell döntenünk, milyen mértékben kell kihagynunk a gyógyszereket a mérés előtt, amikor ez több-kevesebb veszéllyel járhat. *Mulatero és mtsai (2005)* adata szerint az atenolol 62%-al növelte, míg az amlodipin, fosinopril és irbesartan 17-43%-al csökkentette a hányadost. *Schwarz és Turner (2005)* vizsgálata szerint a hányados határértékét befolyásolhatja a gyógyszereszedés, azonban a diagnosztikus hatékonyságot nem, ha az eredmény értékelése a gyógyszerhatás mérlegelése mellett történt. Így gyógyszerkihagyásra alig van szükség. Más szerzők kétségbe vonták a béta-blokkolók hányadost növelő hatását. *Young (2007)* szerint a blokádnemc-

sak a reninre gyakorolt béta adrenoreceptor stimulust, hanem az aldosteron szintet is csökkenti, így a hányadost nem befolyásolja. *Stowasser és mtsai 2010* szerint azonban az aldosteron szint csökkenése kisebb, mivel a nem csökkent ACTH és az alacsonyabb kálium szint fenntarthatja a renin termelését, így a hányados inkább növekszik.

Saját méréseink igazolják a korábbról ismert gyógyszerhatásokat az ALD, REN, PRA szintekre és a képzett hányadosokra, azonban szignifikáns eltérést csak béta-blokkoló hatásban tapasztaltunk. A dihydropiridin Ca antagonisták a hányadost gyakorlatilag nem befolyásolták, ellentétben az irodalmi állításokkal, bár vannak a sajátunkat megerősítő adatok is (*Koch és mtsai. 2010*).

Mivel a renin és aldosteron mérés laboratóriumonként eltérhet, szükségesnek tűnik minden centrumban saját döntéshozatali határértéket meghatározni. Magunk, bár kis esetszámon az irodalmi értéknek megfelelő értéket kaptunk. ALD/PRA esetében az európai ajánlás (*Funder és mtsai 2008*) 20-30 ng/dl/ng/ml értéket javasol, magunk 30 ng/dl/ng/ml határértéket találtunk. ALD/REN esetében az ajánlott határérték 3,8-5,7 ng/dl/ng/l, magunk ennél alacsonyabb értéket tapasztaltunk (3,0 ng/dl/ng/l). Ezt az eltérő metodikai és preanalitikai körülmények egyaránt magyarázhatják. A gyógyszerhatásban mért hányadosok esetén az irodalmi adatok szerint a határérték eltér, magasabb.

A nem kellően standardizált preanalitikai körülmények (szérum kálium szint, testhelyzet) eltérő mértékben befolyásolják a mért aldosteron ill. renin szintet, ezáltal a hányadost. Ezért is fontosak kóros hányados esetén a PA diagnózist megerősítő tesztek. *Tanabe és mtsai. (2003)* tanulmányukban különböző random és standardizált vérvételek kapcsán 71 igazolt PA beteg esetében 31%-ban talált legalább egy mérésnél normális eredményt.

Felmerülhet a kérdés, hogy a hypertóniás vagy a véletlen megtalált mellékvese adenomás betegek esetében használható jobban az aldosteron/renin hányados. *Unger és mtsai. (2004)* adata szerint a mellékvese adenomás csoportban. Vizsgálatomban nem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz képest az adenomás és a hypertóniás csoportban egyik hányados esetében sem.

Vizsgálatom néhány eredménye (több PA a mellékvese adenomás csoportban, alacsonyabb aldoszteron érték a normotóniás mellékvese adenomás csoportban) eltér az irodalomban leírtaktól. Az eltérést a viszonylag kis esetszám mellett a statisztikai véletlen hatásával magyarázzuk, nagyobb esetszámon ezek az eredmények valószínűleg nem lennének reprodukálhatóak.

VI.2.3. Eltérő gesztagén tartalmú OAC-k hatása az aldoszteron és renin szintekre, ill. hányadosukra.

Ahmed és mtsai (2011) közleményéből ismert, hogy nők között gyakrabban találhatunk álpozitív hányadost, amit a szerzők a luteális fázisban bekövetkező aldoszteron emelkedés következményének tartottak, feltételezve, hogy az aldoszteron szintet a menstruációs ciklus is befolyásolja. A magasabb ethinyloestadiol tartalmú OAC-ek ugyancsak álpozitív hányadost okozhatnak, különösen a REN mérés esetében. Irodalmi adatok a gesztagének különböző hatását jelezték, (*Daniels és mtsai. 1987, Derkx és mtsai. 1986*) azonban tanulmányunkkal ellentétben nem összehasonlítható jelleggel.

A korábbi vizsgálatokkal egyezően magunk is azt találtuk, hogy az OAC szedése befolyásolja a mért REN értéket, míg a PRA érték kevésbé változik. A DRSP csoportban azonban mind a REN, mind a PRA szignifikánsan emelkedett. Meg tudtuk erősíteni a korábbi adatokat, miszerint a DSG és GTD csoportban a REN emelkedése kisebb, mint a DRSP csoportban.

A DRSP mineralocorticoid receptor antagonist, ami egyaránt megemelheti a renin és aldoszteron szintet, ezáltal az aldoszteron/renin hányados akár változatlan is maradhat. DeLeo és mtsai véleménye alapján a DRSP nem befolyásolja a hányadost, míg Derx és mtsai, valamint Ahmed és msai közleménye alapján csupán a REN mérésre alapozott hányadost. Saját vizsgálatunk szerint az ALD, REN és PRA érték a DRSP csoportban szignifikánsan magasabb volt nemcsak az OAC-t nem szedőkhöz, de a DSG és GTD csoporthoz képest is.

Saját méréseink alapján kidolgozott (a nemzetközi ajánlással egybevágó) ALD/REN és ALD/PRA hányados határértékek figyelembe vételével az egészséges kontrollok között álpozitív hányadost nem találtunk. A DSG és GTD csoportban az álpozitív ALD/REN

hányados kétszer gyakoribb volt, mint az álpozitív ALD/PRA hányados, ugyanakkor a DRSP csoportban a két módszerrel mért hányadosok közt különbség nem volt, eltekintve Ahmed eredményével. A különbség részben metodikafüggő is lehet, illetve okozhatja az OAC hatás eltérő időtartama is (kb. 3 hónap a korábbi tanulmányokban, míg átlagosan 3 év saját tanulmányunkban), valamint az *Ahmed és mtsai. 2011* által használt eltérő határérték (21,6 illetve 30 ng/dl/ng/ml/h, valamint 4 illetve 3 ng/dl/ng/l). Az álpozitív hányadosok gyakorisága aláhúzza a PA-t megerősítő tesztek (pl. iv. sóterhelés) jelentőségét még CT-vel igazolt mellékvese adenoma jelenlétében is.

Az álpozitív hányadosokra tekintettel célszerű lenne kidolgozni OAC szedőkre érvényes határértékeket, mégpedig külön-külön figyelembe véve a különböző gesztagén komponenseket. Ez kétségtelen több munkát jelentene, de a betegek érdekét szolgálná, figyelembe véve a másik megoldás (OAC kihagyása a vizsgálat előtt) esetleges nem kívánt terhességben megnyilvánuló következményét.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

VII.1.1. A Tg és a TgAb molekulák stabilitásának és mérésük funkcionális szenzitivitásának vizsgálata különböző preanalitikai körülmények között.

- ✓ Mindkét meghatározásra eltett mintákat csupán 24-28 óránál rövidebb ideig helyes tárolni 4-10 C°-on.
- ✓ Mindkét meghatározásra eltett mintákat csupán 2-3 hétig helyes fagyasztva tárolni -17-20 C°-on akkor is, ha a laboratórium gazdaságossági érdekei ritkább mérést indokolnának.
- ✓ Tg mérésre eltett minták hosszabb távú fagyasztva tárolása különösen akkor kerülendő, ha alacsony értékekre számítunk. (mint pl. gondozott DTC-s betegek legtöbbszörében).

VII.1.2. TgAb szintek befolyása a mért Tg szintekre in vitro és in vivo

- ✓ Már kis mennyiségű, a normális tartományba eső titerű TgAb is jelentősen befolyásolja a Tg mérést, akár nem detektálhatóvá téve az egyébként valójában mérhető mennyiségben jelenlevő Tg-t.
- ✓ A TgAb titer növekedésével bekövetkező mért Tg érték változás matematikai módon modellezhető, leírható.
- ✓ A DTC-s betegek gondozása során a kis mennyiségben jelenlevő TgAb-t is figyelembe kell venni, ilyen esetben a nem detektálható Tg szint nem jelenti bizonyossággal a beteg alacsony kockázatát.
- ✓ A matematikai modell alapján számítással korrigált Tg érték használata egyes esetekben hasznos segítséget nyújthat a DTC-s betegek követésekor.

VII.2.1. Mintavételi és tárolási körülmények hatása a plazma renin aktivitás (PRA) és a direkt renin (REN) meghatározására.

- ✓ Mintavétel után a PRA és REN meghatározás esetében szobahőmérsékleten való akár csak 2 órás tárolás már a mért értékek csökkenését okozza ellentétben a hűtve 0-5 C°-on tárolással. Így az utóbbi ajánlható, ekkor a vérvétel helyén cen-

trifuga nem szükséges, amennyiben a minta két óra alatt a laboratóriumba juttatható. Ha 30 percen belül a plazma szeparálása biztosítható, a tárolás lehetséges szobahőn.

- ✓ A fagyasztva tárolt mintákat 2 hetes intervallumokban szükséges a PRA mérésre felhasználni, a tárolásból adódó hibásan alacsonyabb érték elkerülésére. Ahol az alacsonyabb esetszámból adódóan a 2 hetenként történő mérés gazdaságtalan, ott a REN mérésre való áttérés megfontolandó.

VII.2.2. Két módszerrel mért aldosteron/renin hányados összehasonlítása

- ✓ A renin meghatározásra használt két módszer (PRA és REN) között jó korreláció igazolható, azonban a korreláció a diagnosztikai szempontból fontosabb alacsonyabb értékek esetén gyengébb.
- ✓ Az antihypertenzív gyógyszerek hatását vizsgálva a béta-blokkoló csoportban észlelhető a legkifejezettebb eltérés, míg a dihydropirin Ca csatorna antagonisták hatása nem volt jelentős. Úgy tűnik, utóbbi szerek a beteg biztonsága érdekében adhatóak a vizsgálat diagnosztikai pontosságának korlátozása nélkül mindkét módszer esetében.
- ✓ Saját laboratóriumra érvényes határértéket meghatározva az ALD/PRA hányados esetében az irodalmi adattal egyező értéket nyertünk, míg a határérték az ALD/REN esetében az irodalmi adatnál kissé alacsonyabb volt.

VII.2.3. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikoncipiensek (OAC) hatása az aldosteron és renin szintekre, ill. hányadosukra.

- ✓ OAC szedés befolyásolja a mért ALD, REN és PRA értékeket, ill. hányadosokat, mégpedig a gesztagén komponenstől függő mértékben.
- ✓ A mért értékek emelkedése a DRSP csoportban a legkifejezettebb.
- ✓ DSD és GTD tartalmú OAC szedők esetében a PRA meghatározás előnyösebb a REN vizsgálathoz képest.

Célszerű lenne OAC szedőkre érvényes hányados határértékek kidolgozása, figyelembe véve azok gesztagén komponensét.

VIII. Összefoglaló

Az endokrinológiai laboratóriumi diagnosztikában is jelentős tényező a praeanalitikai fázis. Jelen disszertáció hat endokrin markert (thyreoglobulin (Tg), thyreoglobulin ellenes antitest (TgAb), plazma renin aktivitás (PRA), aktív renin (REN), aldosteron/renin hányadosok) vizsgált praeanalitikai szempontból, azzal a szándékkal, hogy növelje a differenciált pajzsmirigy (pm.) karcinómák és a primer aldosteronizmus laboratóriumi diagnosztikájának megbízhatóságát. A betegtől vett szérum minták tárolási körülményei (hűtés, a mérésig eltelt idő), milyen mértékben befolyásolják a mérés pontosságát, megbízhatóságát a Tg, TgAb, PRA, REN tekintetében? A Tg meghatározás TgAb érzékenységének vizsgálata in vitro körülmények között, elsősorban alacsonyabb antitest titer esetén. Milyen módon befolyásolják a két különböző renin meghatározást a vérminták kezelési, tárolási módozatai? A kétféle módszerrel mért aldosteron/renin hányadosok klinikai validitásának vizsgálata a belgyógyászati gyakorlatban előforduló betegek körében. Eltérő gesztagén tartalmú orális antikonceptíviensek (OC) miképp hatnak az aldosteron és renin szintekre? Invitro kísérleteim során összesen 161 egyéni illetve poolozott vérmintát használtam a vizsgálni kívánt praeanalitikai körülmények elemzéséhez, amelynek során összesen 399 mintán 954 mérés eredményét elemeztem. Az egészséges személyek száma, akik a kontroll csoportokat alkották összesen 149 volt a PRA-REN vizsgálatokhoz. A 112 pontosan definiált betegségben szenvedő páciens (Tg-TgAb 27, PRA-REN 85) mintáinak a száma a kontrollal együtt 466 volt, amelyekből az összes vizsgált paraméter méréseinek száma 1443 meghatározást jelentett. **Eredmények és következtetések:** Már kis mennyiségű, a normális tartományba eső titerű TgAb is jelentősen befolyásolja a Tg mérést, akár nem detektálhatóvá téve az egyébként valójában mérhető mennyiségben jelenlevő Tg-t. A TgAb titer növekedésével bekövetkező mért Tg érték változás matematikai módon modellezhető, leírható. PRA és REN meghatározás esetében a minta hűtve 0-5 C -on tárolása ajánlható, hacsak 30 percen belül a plazma szeparálása nem biztosítható. Szobahőmérsékleten való akár csak 2 órás tárolás, már a mért érték csökkenését okozza. A fagyasztva tárolt mintákat 2 hetes intervallumokban szükséges a PRA mérésre felhasználni, a tárolásból adódó hibásan alacsonyabb érték elkerülésére. OAC szedés befolyásolja a mért ALD, REN és PRA értékeket, ill. hányadosokat, mégpedig a gesztagén komponenstől függő mértékben. A mért értékek emelkedése a drospirenon csoportban a legkifejezettebb.

IX. SUMMARY

In endocrine laboratory diagnostics, the preanalytical phase may influence the outcome of tests. The present study examined how the preanalytical conditions impacted on the measurements of six important markers (thyroglobulin [Tg], thyroglobulin antibody [TgAb], plasma renin activity [PRA], quantitative renin [REN] and aldosterone/renin ratios [ARR]) with the ultimate goal of increasing the reliability of laboratory diagnostics for thyroid cancer and primary aldosteronism. To determine 1) the influence of serum storage conditions (cooling, time to tests) on the accuracy and reliability of Tg, TgAb, PRA and REN measurements; 2) the sensitivity of assay for Tg determination when endogenous TgAbs with various titers are present in the patients' sera; and 3) the effect of contraceptives with different gestagen contents on measured aldosterone and renin levels. In vivo assessments of 161 individual or pooled samples were carried out. I analysed 954 measurements of 399 samples. The control group included 149 healthy persons for the PRA and REN determinations. The samples of 112 patients with well defined clinical conditions (Tg-TgAb 27, PRA-REN 85) were examined too, that represented 1143 measurements in 466 samples. **Conclusions:** 1) The preanalytical conditions, such as storage, exert a substantial effect on the outcome of Tg and TgAb immune assays. Long-term freezing of serum for Tg assessment should be avoided. Various sampling and storage conditions may differentially influence the PRA and REN assays, therefore consistency of these conditions should be maintained. Blood samples for both PRA and REN should be drawn and transported to the laboratory at room temperature and the time between blood collection and separation of plasma should not exceed 30 minutes. The storage of frozen plasma samples for PRA assay should not exceed 2 weeks. 2) Endogenous TgAbs even in the reference range exert a significant effect on the Tg immune assay. The addition of increasing concentrations of TgAbs to reach TgAb levels within or near the reference range in serum pools containing a wide range of Tg concentrations has produced a dose-dependent, decrease in the measured Tg levels. 3) Oral contraceptives with gestagen components influence the measured PRA, REN and aldosterone levels, and the greatest bias is caused by the DRSP group. Establishing group-specific ARR cut-off values is necessary for users of the most common gestagens. In DRSP-containing OC users, determination of ALD/PRA is preferable to ALD/REN.

X. IRODALOMJEGYZÉK

Arai K, Shibasaki T, Chrousos G. (2010) Aldosterone Deficiency and Resistance. http://www.endotext.org/?s=Aldosterone+Deficiency+and+Resistance
Ahmed AH, Gordon RD, Taylor PJ, Ward G, Pimenta E, Stowasser M. (2011) Are women more at risk of false-positive primary aldosteronism screening and unnecessary suppression testing than men? <i>J Clin Endocrinol Metab.</i> 96:340-346.
Ahmed AH, Gordon RD, Taylor PJ, Ward G, Pimenta E, Stowasser M. (2011) Effect of contraceptives on aldosterone/renin ratio may vary according to the components of contraceptive, renin assay method, and possibly route of administration. <i>J Clin Endocrinol Metab.</i> 96:1797-1804
Bajnok L.(2009) Hogyan lehetne javítani az endokrin hypertóniák kezelésének a helyzetén? <i>Hypertonia és nephrologia.</i> 13: 11-21.
Boldarine VT, Maciel RM, Guimarães GS, Nakabashi CC, Camacho CP, Andreoni DM, Mamone Mda C, Ikejiri ES, Kasamatsu TS, Crispim F, Hojaij FC, Hidal JT, Biscolla RP. (2010) Development of a sensitive and specific quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood thyroglobulin messenger ribonucleic acid in the follow-up of patients with differentiated thyroid ca. <i>J Clin Endocrinol Metab.</i> 95:1726-1733.
Brossaud J, Corcuff JB. (2009) Pre-analytical and analytical considerations for the determination of plasma renin activity. <i>Clin Chim Acta.</i> 410:90-92.
Cavalier E, Delanaye P, Krzesinski JM, Chapelle JP.(2007) Analytical variation in plasma renin activity: implications for the screening of primary aldosteronism. <i>Clin Chem.</i> 53:803-804.
Chung JK, Park YJ, Kim TY, So Y, Kim SK, Park DJ, Lee DS, Lee MC, Cho BY. (2002) Clinical significance of elevated level of serum antithyroglobulin antibody in

patients with differentiated thyroid cancer after thyroid ablation. <i>Clin Endocrinol (Oxf)</i> . 57:215-221.
Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. (2009) Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. <i>Thyroid</i> . 19:1153-1158.
Cubero JM, Rodríguez-Espinosa J, Gelpi C, Estorch M, Corcoy R. (2003) Thyroglobulin autoantibody levels below the cut-off for positivity can interfere with thyroglobulin measurement <i>Thyroid</i> . 13:659-661.
Daniels CR, Eisen V, Slater JD. (1987) The renin-angiotensinogen reaction during pregnancy and oral contraception: estimation of kinetic parameters by an autologous plasma renin assay <i>J Endocrinol</i> . 112:465-472.
de Bruin RA, Bouhuizen A, Diederich S, Perschel FH, Boomsma F, Deinum J. (2004) Validation of a new automated renin assay <i>Clin Chem</i> . 50:2111-2116.
De Leo V, la Marca A, Morgante G, Lucani B, Nami R, Ciotta L, Cianci A, Petraglia F. (2001) Evaluation of plasma levels of renin-aldosterone and blood pressure in women over 35 years treated with new oral contraceptives. <i>Contraception</i> . 64:145-148.
Demers LM, Spencer CA. (2003) Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease <i>Clin Endocrinol (Oxf)</i> . 58:138-140.
Derkx FH, Steunkel C, Schalekamp MP, Visser W, Huisveld IH, Schalekamp MA (1986) Immunoreactive renin, prorenin, and enzymatically active renin in plasma during pregnancy and in women taking oral contraceptives <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 63:1008-1015.
Funder J, Carey R, Fardella C, Gomez-Sanchez C, Mantero F, Stowasser M, Young W, Montori VM. (2008) Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an Endocrine Society clinical practice guideline: <i>J Clin Endocrinol Me-</i>

tab. 93: 3266-3281.
Gao Y, Yang Y, Yuan Z, Lu H. (2007) Serum Thyroglobulin Stability for Immunoassay. <i>Lab. Med</i> 38: 618-20.
Giovanella L, Ghelfo A. (2007) Undetectable serum thyroglobulin due to negative interference of heterophile antibodies in relapsing thyroid carcinoma <i>Clin. Chem.</i> 53:1871-1872.
Gláz E, Szűcs N, Varga I. (2005) Az aldoszteronról a XXI. század elején. <i>LAM</i> 15:96–107.
Goldhaber SZ, Hennekens CH, Spark RF, Evans DA, Rosner B, Taylor JO, Kass EH: (1984) Plasma renin substrate, renin activity, and aldosterone levels in a sample of oral contraceptive users from a community survey <i>Am Heart J</i> 107:119-122.
Görges R, Maniecki M, Jentzen W, Sheu SN, Mann K, Bockisch A, Janssen OE. (2005) Development and clinical impact of thyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma during the first 3 years after thyroidectomy <i>Eur J Endocrinol.</i> 153:49-55.
Grebe SKG. (2009) Diagnosis and management of thyroid carcinoma: a focus on serum thyroglobulin. <i>Expert Review of Endocrinology & Metabolism</i> 4: 25-43.
Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. <i>Diagnostic samples: from the patient to the laboratory</i> Blackwell- Wiley (2009).
Hartman D, Sagnella GA, Chesters CA, Macgregor GA. (2004) Direct renin assay and plasma renin activity assay compared. <i>Clin Chem.</i> 50 :2159-2161.
Hood S, Cannon J, Foo R, Brown M. (2005) Prevalence of primary hyperaldosteronism assessed by aldosterone/renin ratio and spironolactone testing. <i>Clin Med.</i> 5:55-60.
Kang AK, Duncan JA, Cattran DC, Floras JS, Lai V, Scholey JW, Miller JA. (2001) Effect of oral contraceptives on the renin angiotensin system and renal function: <i>Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.</i> 280: R807-813

Kim WG, Yoon WB, Kim TY, Kim. EY (2008) Change of serum antithyroglobulin antibody levels is useful for prediction of clinical recurrence in thyroglobulin-negative patients with differentiated thyroid carcinoma Clin Endocrinol Metab 93: 4683–4689.
Knudsen N, Bülow I, Jørgensen T, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P.(2001) Serum Tg-- a sensitive marker of thyroid abnormalities and iodine deficiency in epidemiological studies. J Clin Endocrinol Metab 86:3599-3603.
Koch M, Aker S, Haastert B, Rump LC. (2010) Clinical relevance of dietary salt intake on aldosterone and the aldosterone-to-renin ratio as screening parameters for primary aldosteronism Clin Nephrol. 74:182-189.
Konrády A: Differenciált pajzsmirigy-rák.(2011) Orv Hetil. 152:163-170.
Krahn J, Dembinski T. (2009) Thyroglobulin and anti-thyroglobulin assays in thyroid cancer monitoring. Clin Biochem 42:416-419
Lijnen PJ, Amery AK, Fagard RH.(1977) Renin concentration after prolonged cold storage of human plasma Clin Chim Acta. 79:51-54.
Lim DJ, Joo Hyun O, Kim MH, Kim JH, Kwon HS, Kim SH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY. (2010) Clinical Significance of Observation without Repeated Radioiodine Therapy in Differentiated Thyroid Carcinoma Patients with Positive Surveillance Whole-Body Scans and Negative Thyroglobulin Korean J Intern Med. 25:408-414.
Mahmud A, Feely J.(2005) Aldosterone-to-renin ratio, arterial stiffness, and the response to aldosterone antagonism in essential hypertension. Hypertension. 46:1118-1122.
Mallick U, Harmer C, Yap B, Wadsley J, Clarke S, Moss L, Nicol A, Clark PM, Farnell K, McCready R, Smellie J, Franklyn JA, John R, Nutting CM, Newbold K, Lemon C, Gerrard G, Abdel-Hamid A, Hardman J, Macias E, Roques T, Whitaker S, Vijayan R, Alvarez P, Beare S, Forsyth S, Kadalayil L, Hackshaw A. (2012) Ablation with low-dose radioiodine and thyrotropin alfa in thyroid cancer. N Engl J Med. 366:1674-1685.
Maruyama M, Kato R, Kobayashi S, Kasuga Y. (1988) A method to differentiate be-

<p>tween thyroglobulin derived from normal thyroid tissue and from thyroid carcinoma based on analysis of reactivity to lectins. Arch Pathol Lab Med. 122:715-720.</p>
<p>Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, Haugen BR, Sherman SI, Cooper DS, Braunstein GD, Lee S, Davies TF, Arafah BM, Landonson PW, Pinchera A.(2003) A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 88:1433-1441.</p>
<p>Männistö T, Surcel HM, Bloigu A, Ruokonen A, Hartikainen AL, Järvelin MR, Pouta A, Väärasmäki M, Suvanto-Luukkonen E.(2007) The effect of freezing, thawing, and short- and long-term storage on serum thyrotropin, thyroid hormones, and thyroid autoantibodies: implications for analyzing samples stored in serum banks. Clin Chem. ; 53):1986-1987.</p>
<p>Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. (2005) Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism J Am Coll Cardiol. 45:1243-1248.</p>
<p>Miot F., Dupuy C., Dumont J., Rousset B. (2012) Thyroid hormone synthesis and secretion. In: De Groot: chapter 2. updated 2012 dec. www.thyroidmanager.org.</p>
<p>Moreno Ortega E, Vallejo Casas JA, Mena Bares LM, del Real Núñez R, Maza Muret FR, Hidalgo Ramos FJ, Latre Romero JM. (2008) Response of thyroglobulin, anti-thyroglobulin antibodies, TSH, FT4 and total T3 after rhTSH stimulation in differentiated thyroid carcinoma. Rev Esp Med Nucl 27:253-258.</p>
<p>Morgenthaler NG, Froehlich J, Rendl J, Willnich M, Alonso C, Bergmann A, Reiners C. (2002) Technical evaluation of a new immunoradiometric and a new immunoluminometric assay for thyroglobulin. Clin Chem 48:1077-1083</p>
<p>Mulatero P, Dluhy RG, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart PM. (2005) Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation. Trends Endocrinol Metab. 16:114-119.</p>
<p>Mulatero P, Milan A, Fallo F, Regolisti G, Pizzolo F, Fardella C, Mosso L, Marafetti L,</p>

Veglio F, Maccario M.(2006) Comparison of confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism J Clin Endocrinol Metab 91:2618-2623.
Mulatero P, Bertello C, Rossato D, Mengozzi G, Milan A, Garrone C, Giraudo G, Passarino G, Garabello D, Verhovez A, Rabbia F, Veglio (2008) Roles of clinical criteria, computed tomography scan, and adrenal vein sampling in differential diagnosis of primary aldosteronism subtypes. J Clin Endocrinol Metab. 93:1366-1371.
Nascimento C, Borget I, Al Ghuzlan A, Deandreis D, Chami L, Travagli JP, Hartl D, Lumbroso J, Chougnat C, Lacroix L, Baudin E, Schlumberger M, Leboulleux S. (2011) Persistent disease and recurrence in differentiated thyroid cancer patients with undetectable postoperative stimulated thyroglobulin level Endocr Relat Cancer. 18:R29-40.
Nyunt A, Bolusani H, Forrest L, Jones MK.(2005) Completion thyroidectomy and thyroglobulin measurement in the management of metastatic differentiated thyroid cancer. Thyroid. 15:1403-1405.
Oelkers W, Helmerhorst FM, Wuttke W, Heithecker R.(2000) Effect of an oral contraceptive containing drospirenone on the renin-angiotensin-aldosterone system in healthy female volunteers Gynecol Endocrinol. 14:204-213.
Okosieme OE, Parkes AB, Premawardhana LD, Evans C, Lazarus JH. (2003) Thyroglobulin: current aspects of its role in autoimmune thyroid disease and thyroid cancer. Minerva Med 94:319-330.
Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G. (2009) ESMO Guidelines Working Group: Differentiated thyroid cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up Ann Oncol. Suppl 4:143-146.
Pacini F, De Groot LJ. (2009) Thyroid cancer. in De Groot: chapter 18. http://www.thyroidmanager.org/chapter/thyroid-cancer/
Pitarresi TM, Rubattu S, Heinrikson R, Sealey JE. (1992) Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin J Biol Chem. 267:11753-11759.
Pizzolo F, Pavan C, Corrocher R, Olivieri O.(2007) Laboratory diagnosis of primary

aldosteronism, and drospirenone-ethinylestradiol therapy <i>Am J Hypertens.</i> 20:1334-1337.
Preissner CM, O'Kane DJ, Singh RJ, Morris JC, Grebe SK. (2003) Phantoms in the assay tube: heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assays <i>J Clin Endocrinol Metab.</i> 88:3069-3074.
RÁCZ K. (2011) Hyperaldosteronismus és a mineralocorticoid hormonok valódi vagy látszólagos túlsúlyával járó betegségek. in: <i>Az endokrin és anyagcsere betegségek gyakorlati kézikönyve.</i> szerk: Leövey A, Nagy VE. Paragh Gy. RÁCZ K. Medicina Budapest 265-280.
Rosário PW, Maia FF, Fagundes TA, Vasconcelos FP, Cardoso LD, Purisch . (2004) Antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: methods of detection, interference with serum thyroglobulin measurement and clinical significance <i>Arq Bras Endocrinol Metabol.</i> 48:487-492.
Roulston JE, MacGregor GA. (1978) Measurement of plasma renin activity by radioimmunoassay after prolonged cold storage. <i>Clin Chim Acta</i> 88:45-48.
Schlumberger M, Hitzel A, Toubert ME, Corone C, Troalen F, Schlageter MH, Clausstrat F, Koscielny S, Taieb D, Toubreau M, Bonichon F, Borson-Chazot F, Leenhardt L, Schwartz C, Dejax C, Brenot-Rossi I, Torlontano M, Tenenbaum F, Bardet S, Bussi�re F, Girard JJ, Morel O, Schneegans O, Schlienger JL, Prost A, So D, Archambeaud F, Ricard M, Benhamou E. (2007) Comparison of seven serum thyroglobulin assays in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer patients. <i>J Clin Endocrinol Metab.</i> 92:2487-2495
Schlumberger M, Catargi B, Borget I, Deandreis D, Zerdoud S, Bridji B, Bardet S, Leenhardt L, Bastie D, Schwartz C, Vera P, Morel O, Benisvy D, Bournaud C, Bonichon F, Dejax. C, Toubert M, Leboulleux S, Ricard M, Benhamou E.(2012) For the Tumeurs de la Thyro�de Refractaires Network for the Essai Stimulation Ablation Equivalence Trial: Strategies of Radioiodine Ablation in Patients with Low-Risk Thyroid Cancer <i>N Engl J Med</i> ; 366:1663-1673.

Schwartz GL, Turner ST. (2005) Screening for primary aldosteronism in essential hypertension: diagnostic accuracy of the ratio of plasma aldosterone concentration to plasma renin activity Clin Chem. 2005 51:386-394.
Sealey JE.(1991) Plasma renin activity and plasma prorenin assays Clin Chem 37:1811-1819.
Sealey JE, Gordon RD, Mantero F.(2005) Plasma renin and aldosterone measurements in low renin hypertensive states. Trends Endocrinol Metab 16:86-91.
Seifarth C, Trenkel S, Schobel H, Hahn EG, Hensen J. (2002) Influence of antihypertensive medication on aldosterone and renin concentration in the differential diagnosis of essential hypertension and primary aldosteronism. Clin Endocrinol (Oxf). 57:457-465.
Smallridge RC, Meek SE, Morgan MA, Gates GS, Fox TP, Grebe S, Fatourehchi V. (2007) Monitoring thyroglobulin in a sensitive immunoassay has comparable sensitivity to recombinant human tsh-stimulated thyroglobulin in follow-up of thyroid cancer patients J Clin Endocrinol Metab 92:82-87.
Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA, Fatemi S, LoPresti JS, Nicoloff JT. (1998) Serum thyroglobulin autoantibodies: prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 83:1121-1127.
Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS. (2005) Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 90:5566-5575.
Spencer CA, Lopresti JS. (2008) Measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 4: 223-233.
Spencer C, Fatemi S, Singer P, Nicoloff J, Lopresti J.(2010) Serum Basal thyroglobulin measured by a second-generation assay correlates with the recombinant human thyro-

tropin-stimulated thyroglobulin response in patients treated for differentiated thyroid cancer <i>Thyroid</i> . 20:587-595
Spencer CA. (2010) Assay of Thyroid Hormones and Related Substances. In: De Groot: chapter 10. www.thyroidmanager.org .
Spencer C, Petrovic I, Fatemi S. (2011) Current thyroglobulin autoantibody (TgAb) assays often fail to detect interfering TgAb that can result in the reporting of falsely low/undetectable serum Tg IMA values for patients with differentiated thyroid cancer. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 96:1283-1291.
Spencer CA. (2011) Clinical review: Clinical utility of thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). <i>J Clin Endocrinol Metab</i> . 96:3615-3627.
Stockigt JR (2005) Ambiguous thyroglobulin assay results in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 90:5904-5905.
Stanojević M, Savin S, Cvejić D, Đukić A, Simonović S (2009) Correlation of Thyroglobulin Concentrations Measured by Radioimmunoassay and Immunoradiometric Assay and the Influence of Thyroglobulin Antibody. <i>Journal of Immunoassay and Immunochemistry</i> 30: 197-207.
Stowasser M, Gordon RD, Gunasekera TG, Cowley DC, Ward G, Archibald C, Smithers BM. (2003) High rate of detection of primary aldosteronism, including surgically treatable forms, after 'non-selective' screening of hypertensive patients. <i>J Hypertens</i> . 21:2149-2157.
Stowasser M, Gordon RD. (2004) The aldosterone-renin ratio in screening for primary aldosteronism. <i>Endocrinologist</i> 14: 267-276.
Stowasser M, Taylor PJ, Pimenta E, Ahmed AH, Gordon RD.(2010) Laboratory investigation of primary aldosteronism. <i>Clin Biochem Rev</i> 31:39-56.
Sundsford JA. (1971) Radioimmunological determination of plasma renin activity during the menstrual cycle and during acute progesterone administration <i>Acta Endocrinol</i>

(Copenh.) 67:174-86
Tanabe A, Naruse M, Takagi S, Tsuchiya K, Imaki T, Takano K. (2003) Variability in the renin/aldosterone profile under random and standardized sampling conditions in primary aldosteronism J Clin Endocrinol Metab 88:2489-2494.
Tiu SC, Choi CH, Shek CC, Ng YW, Chan FK, Ng CM, Kong AP. (2005) The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. J Clin Endocrinol Metab 90:72-78.
Toldy E, Lőcsei Z, Kovács L.G. (2010) A betegektől az analitikáig: az endokrin betegségek felismerését megtévesztő preanalitikai hibákról. Egészség-Akadémia 1: 187-203.
Unger N, Lopez Schmidt I, Pitt C, Walz MK, Philipp T, Mann K, Petersenn S (2004) Comparison of active renin concentration and plasma renin activity for the diagnosis of primary hyperaldosteronism in patients with an adrenal mass Eur J Endocrinol 150:517-523.
Uruno T, Miyauchi A, Shimizu K, Tomoda C, Takamura Y, Ito Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Amino N, Kuma K. (2005) Usefulness of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy specimens for diagnosing cervical lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. World J Surg 29:483-485.
Verburg FA, Wäschle K, Reiners C, Giovanella L, Lentjes EG.(2010) Heterophile antibodies rarely influence the measurement of thyroglobulin and thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer patients. Horm Metab Res 42:736-739.
Vincze B, Sinkovics I, Keresztes S, Gergye M, Boér A, Remenár E, Péter I, Szentirmay Z, Kremmer T, Kásler M.(2004) Szérum thyreoglobulin és thyreoglobulin ellenes anti-test meghatározásának klinikai jelentősége pajzsmirigyrákkal műtött betegek vizsgálata során. Magyar Onkológia 4:223-233.
Williams GH, Dluhy RG. Disease of the adrenal cortex. In: Fauci AD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. New

York: McGraw-Hill. <http://accessmedicine.com/content.aspx?aid=9140931>

Young WF.(2007) Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome Clin Endocrinol (Oxf). 66:607-618

XI. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE***XI.1. Az értekezéssel kapcsolatos saját in extenso közlemények***

1.	Lőcsei Z , Toldy E, Szabolcs I, Rác K, Kovács G L. (2009): The effect of sample storage on the reliability of thyroglobulin and thyroglobulin antibody measurments Clin Biochem. 42: 225-228. IF: 2,019
2.	Locsei Z , Rác K, Patocs A, Kovacs G L.,Toldy E. (2009): Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. Clinica Chimica Acta 402 203-205 IF: 2,535
3.	Lőcsei Z , Horváth D, Rác K, Szabolcs I, Kovács GL, Toldy E. (2012): Progestin-dependent effect of oral contraceptives on plasma aldosterone/renin ratio. Clin. Biochem. 45:(16-17):1516-18 IF: 2,076
4.	Locsei Z , Szabolcs I, Rác K, Kovács GL, Horváth D, Toldy E: (2012): Serum thyroglobulin antibody levels within or near to the reference range may interfere with thyroglobulin measurement Biochem Med (Zagreb). 22:365-70. IF: 1,343
5.	Toldy E, Lőcsei Z , Kovács L G.(2010) A betegektől az analitikáig: az endokrin betegségek felismerését megtevesztő preanalitikai hibákról. Egészség-Akadémia 1: 187-203
6.	Lőcsei Z , Horváth D, Rác K, Toldy E. (2011) Szérumtireoglobulin és tireoglobulin-antitest együttes meghatározásának jelentősége a differenciált pajzsmirigy-karcinómás betegek gondozása során. Orv. Hetilap. 152: 743-752
7.	Horváth D, Lőcsei Z , Csizmadia Zs, Toldy E, Szabolcs I, Rác K. (2012): A renin-aldoszteron rendszer vizsgálata két módszerrel különböző klinikai állapotokban. Orv Hetilap 153: 1701-1710

XI.2. Az értekezéssel kapcsolatos könyvfejezetek:

1.	Kovács L.G, Toldy E, Lőcsei Z. (2001) Általános módszertan. Az endokrin betegségek diagnosztikájában használatos laboratóriumi módszerek In: A klinikai endokrinológia és anyagcsere betegségek kézikönyve. Szerk: Leövey András. Medicina Budapest 51-62.
2.	Toldy E, Kovács G L, Lőcsei Z. (2001): A leggyakrabban alkalmazott laboratóriumi módszerek ismertetése és értékelése. Az endokrin betegségek diagnosztikájában használatos laboratóriumi módszerek In: A klinikai endokrinológia és anyagcsere betegségek kézikönyve. Szerk.: Leövey András. Medicina, Budapest 63-94.
3.	Kovács L G, Toldy E, Lőcsei Z, Mezősi E. (2008) Endokrinológiai laboratóriumi vizsgálatok In: Gyakorlati laboratóriumi medicina. Szerk.: Debreczeni L. és Kovács L. G. Budapest, Literatura Medica 397- 424.
4.	Lőcsei Z. Toldy E, Kovács L G. (2008) Laboratóriumi esettanulmányok In: Gyakorlati laboratóriumi medicina. Szerk.: Debreczeni L. és Kovács L. G. Budapest, Literatura Medica 525-528
5.	Toldy E, Lőcsei Z. (2011) Endokrin és anyagcsere-vizsgálatok laboratóriumi leleteinek értékelése. In: Az endokrin és anyagcsere betegségek gyakorlati kézikönyve. ed: Leövey A., Nagy V. E., Paragh Gy. Rácz K. Medicina, Budapest 50-56.

XI.3. Az értekezéssel kapcsolatos nyomtatásban megjelent citálható előadás-kivonatok

1.	Lőcsei Z, Toldy E, Méhes M, Kovács L G. (2006) A tireoglobulin- és tireoglobulin antitest szintek együttes mérésének jelentősége a differenciált pajzsmirigy carcinomás betegek gondozása során Magy Belorv Arch6. 59 Suppl 1: 50.
2.	Toldy E, Lőcsei Z, Papp Z, Kovács I G. (2006) Hol van a tireoglobulinantitest-szintek referenciahatára a differenciált pajzsmirigy carcinomás betegekben? Magy Belorv Arch. 59 Suppl.1 : 69.p
3.	Lőcsei Z. Toldy E, Papp Zs, Kovács L G. (2006) A tireoglobulin és tireoglobulinantitest-szintek együttes mérésének jelentősége a differenciált pajzsmirigy-carcinomás betegek gondozásában Magy Belorv Arch Suppl.4: 86.

4.	Toldy E, Papp Zs, Lőcsei Z , Kovács L G. (2006) A thyreoglobulin és thyreoglobulin antitest-szintek együttes mérésének jelentősége a differenciált pajzsmirigy-carcinomás betegek gondozásában Klin Kisérll Lab Med 32. Suppl. 39 ?
5.	Toldy E. Locsei Z , Szabolcs I, Kovács GL. (2007) From sampling to analytics: experience and diagnostic consequences with some thyroid markers. Endocrine Abstracts. 14: 331.
6.	Lőcsei Z , Toldy E, Szabolcs I. Kovács LG.(2007) Thyroglobulin antibodies in the normal range decrease the diagnostic accuracy of thyroglobulin in the care of patients with differciated thyroid cancer. Endocrine Abstracts . 14 : 141.
7.	Toldy E, Lőcsei Z , Szabolcs I. Kovacs LG.(2007) Assay-dependent interference of normal thyroglobulin levels with thyroglobulin measurement. Clin Chem and Lab Med Spec suppl T 379.
8.	Toldy E, Lőcsei Z Krkos K. Rác K. (2008) A primer aldosteronismus szűrési módszere: a mintavételtől a laboratóriumi analízisig Magy Belorv Arch 3: 265.
9.	Toldy E., Lőcsei Z . Catomio Cs, Krkos K. Rác K. Kovács L G. (2008) A mintavételtől a primer aldosteronismus szűrésének kezdetéig. Klinikai és Kis. Lab. Med. 33 , 40.
10.	Kovacs LG. Horvath D, Nagy R Locsei Z , Toldy E. (2009) Comparison of plasma renin activity with quantitative renin: drug interferencies Clin Chem and Lab Med 47: S 239
11.	Lőcsei Z . Horváth D Nagy R. Toldy E. Rác K. (2010) Helyettesíthető-e a plazma renin aktivitás az aktív renin mérésével? Magy Belorv Arch . 63: 219
12.	Locsei Z . Toldy E, Horvath D, Nagy R. Racz K. Szabolcs I, Kovacs LG.(2010) Comparison of plasma aldosteron/signal activity and aldosterone/active signal ratio in different clinical conditions Endocrine Abstracts 22: P61
13.	Horváth D., Lőcsei Z , Nagy R, Toldy E, Rác K, Kovács LG. (2010) Can we replace aldosterone/plasma renin activity ratio with aldosterone/active renin ratio. Laboratóriumi Medicina 35: P15 177

XII. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE*Az értekezéssel kapcsolatban nem álló in extenso közlemények:*

1.	Lócsei Z , Dely M, Puppí A, Práger P(1980) Extracelluláris ionok elvonásának hatása béka musculus rectus abdominis redox rendszerrel befo-lyásolt acetilcholin contractiojára. Kísérletes Orvostudomány 32: 500-506 p,
2.	Döbrönte Z, Bodnár M, Lócsei Z , Brittig F, Varga L, István L.(1989) Intra-hepaticus cholostasis tünetével jelentkező Philadelphia chromosoma negativ chronicus myeloid leukaemia. Orvosi Hetilap 130 :2315-2318
3.	Varga L, Lócsei Z .(1988) Hyperprolactinaemia a belgyógyászati gyakorlat-ban. Medicus Universalis 21 :15-17.
4.	Döbrönte Z, Lakatos F, Brittig F, Lócsei Z, Bokor N, Stöckert A, Varga L.(1989) Van-e klinikai relevanciája a Campylobacter pylori infectionak ? Orvosi Hetilap 130: 2563-2568
5.	Döbrönte Z, Lakatos F, Brittig F, Lócsei Z . (1990) Hat die Campylobacter-Helicobacter pylori Infektion eine Klinische Relevanz? Gastroenterol J. 50: 32- 37.
6.	Varga L, Lócsei Z , Döbrönte Z, Lakatos F, Brózik M, Merétey K. (1992) Helicobacter pylori allergia. Orvosi Hetilap 133: 359-362.
7.	Toldy E, Lócsei Z , Héber S, Gundy K, Varga L, Kovács L.G: (1993) Új stratégia a pajzsmirigyfunkció diagnosztikájában. Orvosi Hetilap 134 1571-76
8.	Lócsei Z , Toldy E, Varga L, Kovács L G: (1994) A TSH ultrasensitiv assay alkalmazásának klinikai jelentősége. Orvosi Hetilap 135 2477-2481
9.	Varga L, Baranyai M, Lócsei Z Toldy E, Brittig F: (1994). Hepatitis B és C virus marker vizsgálatok alkohol okozta májbetegségben. Orvosi Hetilap 135 1691-93
10.	Toldy E, Lócsei Z , Kalmár I, Varga L. Kovács L. G: (1996). A pajzsmirigy elleni autoantitestek diagnosztikus értéke. Orv.Hetilap 137.2075-2080
11.	Lócsei Z , Toldy E, Varga L. Kovács L G: (1996) A pajzsmirigyfunkció vizsgálata májcirrhosisos betegekben. Magy. Belorv. Arch 49 193-198.
12.	Zipprich B, Kobe E, Döbrönte Z, Lócsei Z , Brücke M, Schröder S, Schentke K, Lautenschlager Ch, Nilius R. (1996) A prophylacticus sclerotisatio sze-

	repe az oesophagus varicositas kezelésében. Orv. Hetilap. 137: 339-342.
13.	Fehér János, Lengyel Gabriella, Dalmi László, Dávid Károly, Gervain Judit, Gógl Árpád, Horváth Gábor, Lonovics János, Lócsei Zoltán , Ozsvár Zoltán, Pár Alajos, Schneider Ferenc, Tolvaj Gyula, Tulassay Zsolt, Weisz Gábor. (1996) Az interferon-alpha2b kezelés krónikus C hepatitisben Orv. Hetil.137: 1179-1185.
14.	Toldy E, Riba M. Lócsei Z. Varga L. Kovács LG: (1998) Szükséges-e a szabad trijódthyronein meghatározása? Klin és Kis. Lab. Med. 25 78-87.
15.	Puskás T, Lócsei Z. (1999) Többszörösen recidiváló pajzsmirigy cysta kezelése tartós drenázssal. Magyar Radiológia . 73:167-169..
16.	Varga L. Szabó J. Lócsei Z. Kalmár I. Kevei P. Lakatos F: (1999)A spontán bakteriális peritonitis diagnosztikájában és kezelésben szerzett tapasztalataink. Magy. Belorv. Arch. . 52 446-449.
17.	Toldy E, Lócsei Z. Petky Á, Móricz A, Kneffel P. Varga L. Kovács L.G: (1999): A pajzsmirigy funkció vizsgálata egészséges nők különböző reprodukciós állapotaiban. Magy. Belorv. Arch. 52 458-465.
18.	Kovács L.G, Toldy E. Lócsei Z.: (2000): Az endokrin laboratóriumi lelet értékelése: Lege Artis Medicinae 10 (2) 114-124
19.	Kovács L.G., Toldy E, Lócsei Z. Soroncz M. Kovács L: (2001) Az immunoassay csapdái Klin. Kísérlet Lab.Med. 28. 11-15
20.	Puskás T, Lócsei Z. (2001) A pajzsmirigy cysták percutan sclerotisatioja Orv. Hetil. 142: . 1503-1505
21.	Lócsei Z. (2002) Mit mondom a betegemnek, ha kiderül, hogy hypothyreosisa van? Orvostovábbképző Szemle 9:19-20.
22.	Toldy E., Lócsei Z. Szabolcs I, Kneffel P. Góth M. Szőke D. Kovács L G: (2003). A macroprolactinaemia és hyperprolactinaemia differenciál diagnosztikája. Orv. Hetilap. 144. 2121-2127.
23.	Toldy, Locsei Z, I Szabolcs, MI Goth, P Kneffel, D Szoke and GL Kovacs: (2003). Macroprolactinemia: the consequences of a laboratory pitfall Endocrine, 22 267-73 IF 1,608
24.	Toldy E, Lócsei Z, Rigó E, Kneffel P, Szabolcs I, Kovács G L. (2004). Comparative analytical evaluation of thyroid hormone levels in pregnancy and in women taking oral contraceptives: a study from an iodine deficient area. Gy-

	necol. Endocrinol. 2004. 18 219-226 IF 0,87.
25.	Lőcsei Z. Kommentár / a tesztoszteronhiány diagnózisa és kezelése című cikkhez/ (2004) Orvostovábbképző Szemle. 11 46-47.
26.	Lőcsei Z, Rigó E, Kovács LG, Toldy E, Kneffel P, Szabolcs I: (2004) Pajzsmirigy hormon szintek vizsgálata terhesekben és anticoncipienst szedő nőkben MOTESZ Magazin, 3-4, suppl 3-5.
27.	Toldy E, Lőcsei Z, Soroncz M, Kovács L G: (2004)A pajzsmirigy hormon meghatározások protein interferenciája: egy in vivo konzekvenciával járó in vitro tanulmány. MOTESZ Magazin, 3-4, supl 3-5.
28.	E TOLDY, Z LOCSEI, I SZABOLCS, A BEZZEGH and GL KOVACS: (2005) Protein interference in thyroid assays: an in vitro study with in vivo consequences Clin Chim Acta, 352 93-104 IF 1,633
29.	Toldy E, Lőcsei Z, Kovács L G. ((2008) A tesztoszteron szintek mérése és ellenőrzése: törekvések a biológiailag aktív frakció meghatározására Magy. Belorv Arch. 3: 159-165.
30.	Toldy E, Lőcsei Z. (2008) A hypothyreosis laboratóriumi vizsgálatának algoritmus Metabolizmus 6 268-276
31.	Horváth D, Nagy R, Lőcsei Z, Szabolcs I, Rác K, Kovács LG, Toldy E. (2008) Hol van a biológiailag aktív prolactin szint referencia tartományának a felső határértéke? Klin Kísér Lab Med 33: 17-24
32.	Toldy E, Nagy R, Horváth D, Nagy L, Lőcsei Z. (2009) A kardiális troponinok analitikai jellemzői, klinikai jelentőségük. Klin Kísér Lab Med 34: 27-35.
33.	Nagy R, Horváth D, Lőcsei Z, Nagy L, Soroncz M, Toldy E. (2009) Négy kardiális troponin módszer összehasonlítása a klinikailag releváns tartományban. Klin Kísér Lab Med 34: 20-26.
34.	Csákváry V, Puskás T, Bödecs T, Lőcsei Z, Oroszlán Gy, Kovács LG, Toldy E. (2009) Serdülők csontanyagcsere markereinek vizsgálata a nyugat-dunántúli régióban. Orv. Hetilap . 150: 1963-1971.
35.	Tóth Cs, Tahin B. Garzuly F, Schneider F, Lőcsei Z, Prugberger E. (2009) Pegilált interferon-alfa-2a- és ribavirin-kezeléshez társuló pulmonális sarcoidosis. Medicina Thoracalis 62: 332-336.
36.	Toldy E, Horváth D, Lőcsei Z. (2010) A pajzsmirigy működés megítélése

	terhességben Magy Belorv Arch . 63: 155-162.
37.	Lőcsei Z , Toldy E. (2010) Endokrin obesitás. Metabolizmus 8: 179-183.
38.	Tóth G, Juhos E, Tárczy Cs, Ovári L, Kneffel P, Lőcsei Z , Toldy E. (2010) A pajzsmirigy működése molaterhességben két eset bemutatása kapcsán. Magy Belorv Arch 63: 453-457.
39.	Konrády. A. Bencsik Zs. Lőcsei Z . Bénik T: Differenciált pajzsmirigyrákos betegek sorsa az elsődleges kezelés után.. Orv. Hetilap 2011 152 1731-1738
40.	Virág É. Horváth D. Lőcsei Z . Kovács L. Jáger R. Varga B Kovács LG Toldy E: D vitamin ellátottság felmérése Vas megye egészséges véradó körében Orv Hetilap 2012. 153 1629-1637
41.	Salamon A. Toldy E., Nagy L. Lőcsei Z . Felnőtkori csontvelőből származó mesenchymalis őssejtek szerepe a reparatív folyamatokban. Orv. Hetilap 2012 153 1807-1815

Az értekezéssel kapcsolatban nem álló nyomtatásban megjelent, citálható előadáskivonatainak a száma: 112.

XIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **konzulenseimnek**: *Prof. Dr. Rácz Károly* egyetemi tanárnak az MTA doktorának, hosszú éveken át tartó biztatásáért, segítségéért, a kéziratok mindenre kiterjedő alaposágú áttekintéséért, javításáért, a nemzetközi folyóiratokban való megjelenéshez alapvető levelező szerző nehéz feladatáért. Valamint *Dr. Toldy Erzsébet*, egyetemi docensnek, PhD, a több évtizedes tudományos együttműködéséért, támogatásáért, a laboratóriumi háttér biztosításáért, a kéziratok elkészítésében, áttekintésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért. Támogatásuk nélkül jelen munka biztosan nem lett volna megvalósítható.

Köszönettel tartozom **szerzőtársaimnak**: *Prof. Dr. Kovács L. Gábor* akadémikusnak, az MTA doktorának, *Prof. Dr. Szabolcs Istvánnak* az MTA doktorának, *dr. Patócs Attila Ph.D*, valamint osztályunk fiatal orvosának *dr. Horváth Dórának* a munkában, kéziratok, közemények írásában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom a Markusovszky Kórház immunassay laboratórium minden munkatársának, asszisztensének a mérések kivitelezésében, a minták gyűjtésében, tárolásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, fáradozásáért.

Valamint mindazon itt fel nem sorolt személynek akik az elmúlt évek, évtizedek során munkámat, tevékenységemet támogatták.