

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A MUKOPOLISZAHARIDÓZIS
LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIZÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Irta:

Oldal Imre

József Attila Tudományegyetem Állattani Tanszék

Szeged

1970 - 1972

Diss. B 899



A MUKOPOLISZAHARIDÓZIS
LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIZÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	3 oldal
1. Irodalmi áttekintés	
1.1. A mukopoliszaharidok kémiaja	5 "
1.2. A mukopoliszaharidózisok biokémiaja	11 "
2. Klinikai diagnosztika, a kórkép egyes típusai	15 "
3. Laboratóriumi diagnosztika	19 "
4. Célkitűzés, vizsgálati módszerek	21 "
4.1. Vizeletvizsgálati módszerek	22 "
4.2. A Berry-teszt módosítása	24 "
4.2.1. A módszer leírása	30 "
4.2.2. Melléklet	32 "
4.3. A MPSD-re jellemző haematológiai eltérések	35 "
4.3.1. Alkalmazott vizsgálati módszerek	37 "
5. A vizsgálati eredmények értékelésének szempontjai	40 "
6. Vizsgálati eredmények	43 "
7. A vizsgálati eredmények értékelése	52 "
8. Irodalom	60 "

BEVEZETÉS

Évről-évre nagyobb figyelemmel fordul az orvos-tudomány az eddig még kellőképp nem ismert anyagcsere-betegségek felé, és nagy léptekkel halad megismerésükben, bár sokukról még nagyon kevés jelenlegi ismeretünk.

Számos, eddig tisztázatlan betegségnek igazolták vagy találták meg valószínű okát; - nem igényel különösebb bizonyítást, hogy milyen jelentőségű ezen betegségek "helyükre tétele", illetve mennyivel célszerűbben lehet így terápiájukkal foglalkozni.

Az utóbbi évtizedben mind több genetikailag determinált kórformát irtak le, melyek mindegyike enzim- vagy enzimszisztéma károsodása miatt lép fel. Polimerizáció sokszor nem könnyű, mert jellemző tünetek vagy egyáltalán nem, vagy csak egyes kórformákban, illetve ezek súlyos manifesztációja, u.n. "klasszikus" típusaiban észlelhetők. Az ilyen szembeszökő fejlődési rendellenességekkel járó esetek irányították a figyelmet a betegségekre; ám ugyanarra a kórra néha csak az anyagcsere-ut azonos eltéréseiből következtethetünk. Mivel biokémiai jellegű fejlődési rendellenességekről van szó, a kóros anyagcsere-folyamatok következtében normális vagy abnormális anyagcsere-termékek halmozódnak fel a testnedvekben, szövetekben, illetve ürülnek a vizelettel. Ezen alapvető jellemvonásuk vizsgálata révén diagnosztizálhatók, és e célra a klinikai kórnia mind több rutin módon is alkalmazható vizsgáló eljárást dolgozott ki, illetve igényel. Ezek az egyszerű u.n. szűrővizsgálati módszerek segítik a klinikust abban, hogy a gyanús betegeknek a kóros anyagcsere-folyamatok igazolására tájékozódó jellegű vizsgálatokat végezzen; és szükség ese-

tén a végleges diagnózist komplikáltabb, munkaigényesebb vizsgálóeljárásokkal felállíthassa.

A szegedi Gyermekklinikán az utóbbi években egyre több esetről számoltak be, a vizsgálatok finomodásával és szélesedésével pedig igen megemelkedett az eddig fűlöttébb ritkának számító mukopoliszaharidózisos esetek száma.

Doktori értekezésem első részében a betegségről való eddigi ismereteket foglaltam röviden össze; második részében pedig a mukopoliszaharidózis szűrő-módszereinek kidolgozására és a betegség gyakoriságának felmérésére végzett vizsgálataimról számolok be.

A MUKOPOLISZAHARIDOK KÉMIAJA

A kötőszöveti alapállomány egyik legfontosabb alkotórészét képező savanyu mukopoliszaharidák nagymolekulasúlyu, jórészt szulfatált polianion molekulák. Többségük fehérjekomplex formájában található a szövetekben, ahonnan ezidáig hétféle, jól definiált savanyu MPS-t izoláltak. Az igen változékony strukturájú szénhidrátpolimerek biokémiájáról, szintéziséről, de különösen lebontásáról mindezekig aránylag keveset tudunk. Biológiai jelentőségük, az anyagcserében betöltött szerepük minden bizonnyal jóval nagyobb annál, semhogy egyszerűen csak mechanikus-támasztó szöveti funkcióra korlátozódna. Erre utal többek közt az a tény is, hogy genetikusan determinált anyagcsere-zavaraink súlyos következményekkel járhatnak és olyan kórformákkal találkozzunk, amelyeknél változó mértékben ugyan, de a csontosodási zavar csak részjelensége a kötőszövet egészét és a visceralis szerveket, sőt az idegrendszert is érintő generalizált betegségek.

Az első nehézség, amivel mindjárt az irodalomban kezdeti olvasásakor szembekerülünk, az egymást fedő és sokszor ellentmondáshoz vezető elnevezések labirintusában való eligazodás. A korábban használatos nomenklatura alapját a kötőszöveti alapállomány szerkezetén végzett megfigyelések képezték. Az alapállomány jellemzői a nagymolekulájú fehérje-szénhidrát komplexek, amelyek specifikus festődési reakciót mutatnak. A szénhidrát komponensek lehetnek semlegesek vagy savanyúk, attól függően, hogy a molekula tartalmaz-e negatív töltésű csoportokat. A poliszaharidok relatív koncentrációja a különböző komplexekben nagyságrendi eltérést mutat.

1938-ban Meyer vezette be a " mukopoliszaharid " elnevezést olyan " állati eredetű, hexozamint tartalmazó poliszaharidok " jellemzésére, amelyek monoszaharidok kondenzációs termékeiként foghatók fel, glikozid kötéseket tartalmaznak és az élő szervezetben természetes állapotban, vagy fehérjékhez kötve fordulnak elő. A " muko "-előtag a " mucus "-szal, vagyis " viszkozus szekrétum "-mal való kapcsolatra utal. Eleinte a MPS kifejezést használták a magas fehérje- vagy peptid tartalmu proteinpóliszaharidokra is, később ezeket a vegyületeket jobb megközelítéssel " glikoproteidek "-nek illetve " mukoproteidek "-nek nevezték el. Glikoproteidek alatt olyan természetes komplexek értendők, amelyekben a fehérje és poliszaharid kovalens kémiai kötéssel kapcsolódik, míg a mukoproteidek alkatrészei elektrosztatikus kötések útján is képeznek molekuláris aggregátumokat.

A glikoproteideket Gottschalk definíciója szerint olyan konjugált fehérjéknek tekinthetjük, amelyek prosztetikus csoportként viszonylag kisszámú cukorrészből felépült egy, vagy több heteroszaharidot tartalmaznak. A szénhidrát komponensben nincsenek ismétlődő egységek. / A különböző eredetű glikoproteidek 2-6 különböző típusú cukorféleséget tartalmazhatnak, ezek közül rendszeresen előfordul az N-acetilhexóza-amin és gyakran a szialinsavak. /

A mukoproteidekben a szénhidrát-koncentráció lényegesen magasabb. A nem-elágazó poliszaharid láncban diszaharid egységek ismétlődnek, amelyek különböző szubsztituens csoportokat tartalmazhatnak. Valamennyi, a kötőszövetben előforduló mukoproteidben a poliszaharid komponens - amelyet mukopoliszaharidnak / MPS / neveznek - polianion. A negatív töltés hordozói lehetnek karboxil csoportok, szulfát-észter csoportok, vagy a kettő kombinációi. Ennek alapján Meyer megkü-

lönbözöttet polikarboxilátokat, polisulfátokat és polikarboxiszulfátokat.

Ujabban a Balázs és Jeanloz-féle racionális nomenklatura kezd elterjedni. Javaslatukra a mukopoliszaharidokat glikozaminoglikánoknak nevezik, utalva az ismétlődő diszaharid egységek hexózámin tartalmára és glikozid kötések jelenlétére. További felosztás alapját képezi a hexózámin-komponens pontosabb megnevezése, amely lehet glukózámin / ilyenkor glukózáminoglikánokról beszélnek /, vagy galaktózámin / ezek a galaktózáminoglikánok /. Az uronsav tartalma glikozaminoglikánok neve további szűkítéssel; glikózáminoglikurán. Azokat az összetett fehérjéket, amelyekben glikózáminoglikánokat találunk, proteoglikánoknak, vagy protein-poliszaharidoknak hívják.

Proteinpoliszaharidok nomenklaturája:

Meyer-féle (rég):

MUKOPROTEID

MUKOPOLISZAHARID

További felosztás a polianion jellegét kölcsönző negatív csoportok szerint:

polikarboxilát

polisulfát

polikarboxiszulfát

Balázs-Jeanloz-féle (új):

PROTEOGLIKÁN

GLIKOZAMINOGLIKÁN

További felosztás az ismétlődő diszaharidegység összetétele alapján:

glikozaminoglikurán (hexózámin-uronsav)_n

glukózáminoglikán (hexózámin-glukóz)

galaktózáminoglikán (hexózámin-galaktóz)

Kondroitin-szulfát A

Kondroitin-szulfát C

Kondroitin-szulfát B

Heparitin-szulfát

Keratoszulfát

Heparin

Hialuronsav

=

=

=

=

=

=

=

Kondroitin-4-szulfát

Kondroitin-6-szulfát

Dermatan-szulfát

Heparan-szulfát

Keratan-szulfát

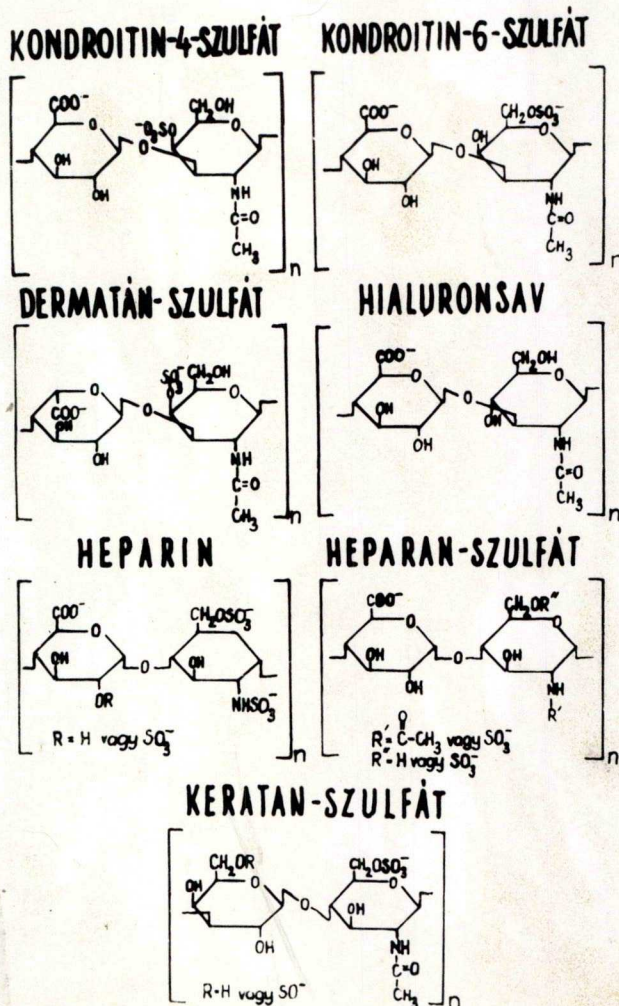
Heparin

Hialuronsav

A diszaharid egységek felépítése szerint hét glikozaminoglikán-féleséget különböztetnek meg, amelyek a közhasználatban triviális nevükön szerepelnek. Balázs és Jeanloz a triviális neveket is módosította valamelyest, elsősorban a kondroitinszulfátokét, ahol a megkülönböztető jelzések egyúttal a szulfát-csoport helyére, illetve a kondroitin-szulfát-B eltérő szerkezetére is utalnak.

Ezeket, valamint a régi és az új nomenklatura szinonimáit a könnyebb áttekinthetőség kedvéért táblázatban tüntettem fel / 1. ábra /.

Glikozaminoglikánok szerkezete



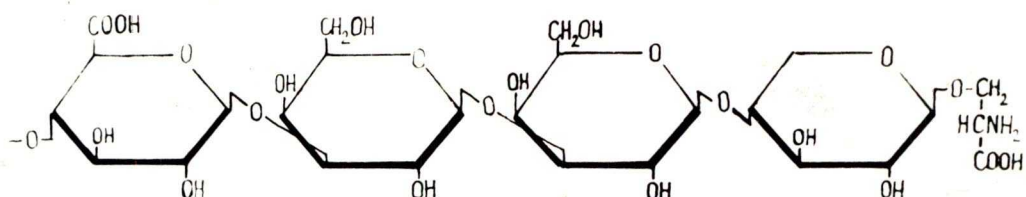
2. ábra

Szövetből történt extrahálás, tisztítás, majd szerkezetvizsgálatok eredményeképpen megállapították a már említett hét szöveti MPS poliszaharid láncában az ismétlődő diszaharid egységek szerkezetét és a glikozid kötések jellegét / 2. ábra /.

Az ismétlődő diszaharid egységek ezen egyszerűsített szerkezete nem tükrözi teljesen a makromolekulák szerkezetét. Különösen nagy eltérés lehetséges az u.n. "linkage region"-ban, tehát a szénhidrát és fehérje komponensek kapcsolódásánál.

A kötés típusának megismeréséhez szükséges a kötésben szerepet játszó monoszaharidok és aminosavak azonosítása. Elsősorban Rodin és munkatársai vizsgálatainak köszönhető, hogy már ismeretes a kapcsolódási területek kémiai szerkezete, amely atipikus neutrális cukrok közbeiktatásával a poliszaharidot a fehérje komponenshez köti / 3. ábra /.

Poliszaharid-fehérje komponensek kapcsolódása proteoglikánokban



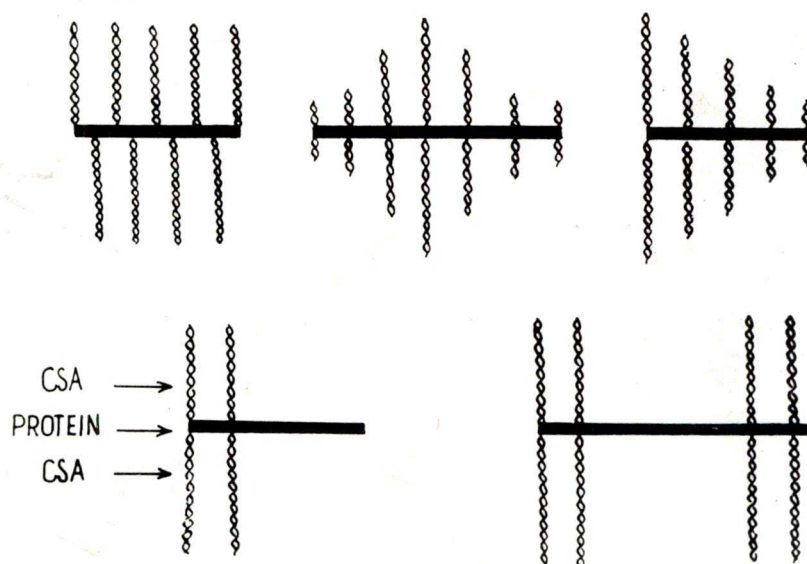
glukuronozil - galaktozil - galaktozil - xylozil - szerin

A fehérje komponens terminális aminosava, - a szerin -, hidroxid csoportján keresztül egy xylóz molekulához kapcsolódik, amely aztán digalaktosil-glükuronosil szekvenciával folytatódik a poliszaharid láncban. Ez a karakterisztikus glikopeptid jelentkezik valamennyi szulfatált MPS parciális hidrolizistermékei között.

Az MPS-ok poliszaharid komponensének szerkezete tehát jórészt ismert, a szénhidrátlánc és a fehérjerész közötti kötés is eléggé tisztázott. Felmerül a kérdés, mit tudunk meg arról az egész komplexnek a felépítéséről? Mathews valamint Partridge elképzelése szerint a proteinszaharidok egy központi fehérjemagból állnak, amelyhez számos poliszaharid lánc kapcsolódik. Ezt a modellt alapjaiban ma is helyesnek tartják, bár nagyon keveset tudnak a láncok számának és hosszának határaitól, valamint a mag körüli elhelyezkedéséről.

A lehetséges változatokat a 4. ábrán feltüntetett sematikus vázlat szemlélteti.

Kondroitin-szulfát proteidek szerkezetének lehetséges változatai



4. ábra

A MUKOPOLISZAHARIDOZISOK BIOKÉMIAJA

Az öröklődő anyagcserebetegségek nemzetközi méretekben folyó kutatásának egyik központi témája napjainkban a mukopoliszaharidózisnak nevezett betegségcsoport.

A mukopoliszaharidózis elnevezést 1952-ben Brante vezette be az irodalomba; noha már 35 évvel ezelőtt ismerték a kórképet. 1917-ben az angol Hunter írta le a kórképet, két évvel később a német Hurler ismertetett hasonló eseteket, így az 1920-as évektől a Hurler-kór elnevezés válik használatossá. Ujabban francia szerzők nyomán egyre kiterjedtebben használják a " gargyilizmus " kifejezést. / Ez a francia Gargoille = vízköpő szóból származik, utalva arra, hogy a gargyilizmusos gyermekek arca, testalkata, egész habitusa a gótikus templomokban található vízköpő figurákhoz hasonlít. /

Ugyancsak Brante nevéhez fűződik az a felismerés, hogy az MPSD az u.n. " tárolási betegségek " csoportjába tartozik, és a tárolt anyag valamilyen mukopoliszaharida.

A betegség kiváltó oka még nem ismeretes, annyi biztos, hogy genetikus eredetű, s a génanomália közvetlen megnyilvánulása multiplex enzimopátia. Badoual szerint erősen fokozódik a β -glükuronidáz, β -N-acetilaminodezoxiglükózaminidáz és az arilszulfatáz enzimek aktivitása. Austin és munkatársai két kórképben észleltek emelkedett szulfatáz-aktivitást. Ugyancsak emelkedik az epimeráz és aminoszulfatáz enzimek aktivitása. Ezzel szemben hialuronidáz és a glükózaminidáz enzimek aktivitása csökken. Bona és munkatársai

kimutatták, hogy MPSD-ban hiányzik a β -galaktozidáz, a ciszteindesszulfuráz, a citokromoxidáz, az izocitrát-dehidrogenáz és az almasavdehidrogenáz enzimek tevékenysége. Valószínű, hogy kiterjedtebb enzimvizsgálatok más enzimek zavarát is felfedik majd.

Az enzimopátia három oldalról befolyásolja a MPS anyagcserét:

1./ A mesenchymalis sejtek funkciózavara.

A fibroblastok, porcsejtek, osteoblastok anyagcseréje erősen megváltozik. A fibroblastok normálisan csak elvértve tartalmaznak MPS-t; a kötőszöveti sejtek a MPS-prekurzorokat, a diszaharid egységeket termelik és szekernálják; ezek polimerizációja az alapállományban történik. A porcsejtek és osteoblastok magát a MPS-molekulát készítik el, és ezt alacsony mólsúlyu formában választják ki. A polimerizáció és a fehérjékhez kötődés itt is az alapállományban történik.

Ezzel szemben MPSD-ban nemcsak a mesenchymalis sejtek fokozott MPS-termelése mutatkozik, hanem a termelt MPS molekulák a sejtekben felhalmozódnak, illetve a polimerizáció a sejten belül megtörténik, s az a molekulák kiválasztását megnehezíti. Valószínűleg ez a legenyhébb anomália, ugyanis olyan génhordozókban is kimutatható, akikben betegségnek egyéb jele nincs. Emellett a frakciók / HA, CSA, CSC, KS, HS / termelésének aránya is megváltozik.

A többi mesenchymalis sejtfeleség / csontvelői sejtek, RES, izomsejtek / anomáliáját nem ismerik pontosan. Kétségtelen, hogy MPSD-ban elsősorban a RES sejtjeiben sok MPS mutatható ki. Az azonban még nem tisztázott, hogy a sejtek - az ép viszonyoktól eltérően - csak tárolják, vagy termelik is a MPS-kat.

2./ A MPS-termelés kvalitatív és kvantitatív abnormalitása.

A gén-anomália természetének megfelelően dominálóná válik egyik vagy másik frakció termelése, s ez jellegzetes a kórképre; a többi frakció mennyisége lehet normális vagy csökkent. A kórosan fokozott MPS-termelés minőségileg is más molekulákat eredményez; - a kóras frakciók molekulásúlya erősen csökkent / Pl. normális CS mólsúlya: 3×10^4 - 3×10^5 , kóros CS_B mólsúlya: $1,8 \times 10^3$ /.

A kóros mennyiségű és alacsony polimeritású frakciók megjelenése magyaráz egyes tüneteket. Így pl. a vizelettel történő extrém nagy MPS-ürítés részben az alacsony molekulásúly következménye. Valószínű, hogy a kóros csontképződés, illetve meszesedés ugyan-csak összefüggésben áll velük.

3./ A MPS-ák fehérjékhez kötődésének zavara.

- Még jórészt tisztázatlan. Az ép szövetek savanyu MPS-ái laza, poláros kötéssel kapcsolódnak a fehérjékhez, az óriásmolekula két része könnyen szétválasztható. A MPSD-ban nem ilyen egyértelműek a MPS-fehérje kötődés viszonyai. Egyes esetekben a kóros MPS-frakciók igen erősen kötődnek a fehérjékhez. Az alacsony mólsúlyu MPS-ák igen könnyen átjutnak nemcsak az erek falán, hanem a sejtmembranon is. Szinte a szervezet valamennyi sejtfelesége felveszi a MPS-okat, s azok valamilyen kapcsolatba lépnek a citoplazma fehérjéivel, de a maghártyán már nem juthatnak át. A MPSD-ban a citoplazmába került MPS-ok egy része a fehérjékkel kovalens kötésre lép, így onnan kijutni nem képes, s a képződött MPS-fehérje-komplex kimarad a sejt normális anyagcseréjéből, illetve károsítja azt.

Máskor a citoplazmába került MPS-molekulát egy fehérje / vagy lipoprotein / burok veszi körül.

Végül előfordul, hogy a MPS-molekulák a citoplazmában "szabadon" helyezkednek el, igen könnyen

kioldódnak, és csak megfelelő rögzítés után mutathatók ki.

Egyelőre nem ismeretesek azok a tényezők, amelyek a MPS-fehérje-komplex képződést befolyásolják; nem tudják, hogy néha miért az egyik és máskor a másik forma áll előtérben, egy egyén különböző szöveteiben is igen nagy változatosságot mutatva.

Az enzimidifektusok vizsgálatának legújabb eredménye / Horst és Fratantoni szulfát izotóppal végzett kísérletei / azt bizonyítja, hogy a kórkép létrejöttének, a MPS-ok kóros felszaporodásának egyik fő oka a lebontó / degradatív / enzimek károsodása.

KLINIKAI DIAGNOSZTIKA, A KÖRKÉP EGYES TÍPUSAI

A MPSD mint generalizált rendszerbetegség a legváltozatosabb klinikai tüneteket produkálhatja, aszerint, mely szervet / szervrendszert / érint a kóros tárolás. Így ahol a MPS-ák felhalmozódása a csontrendszerben történik, az osteochondrodystrophia uralja a képet, ahol az érzékszervekben: cornea-homály és sükettség lép fel, ahol a lépben, májban, szivizomban, ott hepatosplenomegalia és szívelváltozások jeleenek meg. Ha a tárolás az idegrendszer sejtjeiben is történik, oligophrenia is társul a képhez.

A MPSD legjellegzetesebb klinikai tünetei a következők:

1./ Alkati rendellenességek / dysmorphismus /

Tömesebb koponya, durva vonású gargoyle arc, mélyen ülő orrgyök; széles, lapos kicsi orr, előreugró mandibula, duzzadt ajkak; nagy, a szájnyílásban mutatkozó nyelv; szabálytalan ritkán nőtt, szürkéssárga fogazat. A fülkagylók vaskosak, hypertrichosis, sűrű durva hajzat van. A bőr myoedemás jellegű, fehér, vaskos, a kézhatáron durva ráncokba szedhető.

Hypotoniás izomzat, hyperflexibilis vagy merev ízületek.

Köldök- vagy inguinalis sérvek.

2./ Csontdeformitások / dysproportionáltság /

Rövid nyak és végtagok, tompa ujjak. Előredomborodó, vagy behuzódó sternum, felperdülő alsó bordaszélek, merev, előrehajló testtartás.

3./ Somaticus retardatio

Alacsony növény, kis testsúly. A késletetett növekedés az első életévben többnyire hiányzik.

4./ Mentalis retardatio

Neurológiai defektusok, epilepsiás görcsök, psychomotoros nyugtalanság, bizarr viselkedés. Az intellektus korán károsodik.

5./ Cardiológiai eltérések

Zörej-, ritmus-, vezetési zavarok.

6./ Hepatosplenomegalia

A máj és lép megnagyobbodása / a nagy, előredomborodó has létrehozásáért felelősek /.

7./ Szemtünetek

Cornea-homály, glaucoma lehetséges.

A betegség prototipusa a " gargylizmus ", a Hurler-Hunter-kór sajátos alkati rendellenességgel, csontfejlődési zavarokkal, törpenövésével, hepatosplenomegaliával és mentális retardációval jár; vagyis viseli a diagnózis minden bélyegét.

Ezen kívül számos eltérő fenotipusos megjelenési formával bíró MPSD-os kórforma van. Ezek osztályozása és az egyes esetek besorolása ma még gyakran igen nagy nehézségekbe ütközik.

Jelenleg a McKusick által ajánlott osztályozás a legelfogadottabb - melyet táblázatban mellékelek - azzal a megjegyzéssel, hogy atipusos variáns formákat egyre nagyobb számban ismerek le, melyek nem illeszthetők be ebbe az osztályozásba. Fokozza még a bizonytalan megítélés lehetőségét, hogy e típusok között is vannak átmenetek, és ismertek lipoidózissal kombinált MPSD-ok is.

I. TÁBLÁZAT

MPSD	Klinikai tünetek	Genetika	Kóros frakció
I. Hurler-syndroma	Cornea korai homályosodása, gerinc- és végtagcsont elváltozások, törpeség, súlyos motoros és mentális retardatio	Autosomás, recesszív	CSB és HS
II. Hunter-syndr.	Törpenövés v. alacsony termet, cornea-homály, minimális csont-elváltozások, változó fokú mentális retardatio; enyhébb lefolyás	X-hez kötött, recesszív	CSB és HS
III. Sanfilippo-syndr.	Cornea-homály, igen súlyos csontdeformitások, oligophrenia, komoly központi idegrendszeri károsodás	Autosomás, recesszív	HS
IV. Maroteaux-Lamy-syndr.	Súlyos csontos és cornealis változások, alacsony növekedés, normál értelen	Autosomás, recesszív	CSB
V. Scheie-syndr.	Merev ízületek /csukló, boka/, homályos cornea, aortás visszafolyás. Gargoylismos habitus nincs, sőt a betegek általában magas intelligenciájúak	Autosomás, recesszív	CSB
VI. Morquio-syndr.	Komoly csontváltozások, nagyfokú törpeség, homályos cornea, aortás visszafolyás. Értelen változó mértékben érintett	Autosomás, recesszív	KS
VII. Dyggve-syndr.	Tünetei megegyeznek a Hurler-syndromával.	Autosomás, recesszív	HA
VIII. Polyepiphysear dysplasia	Mint a Morquio-syndromáé		csak CSA és CSC
IX. Ellis-van Creveld-syndr.	Törpenövés, rövid végtagok, polydactylia, exostosisok, fog- és köröm-hypoplasia. Intakt szellemiség		HA

A kórformával kapcsolatos kutatások az 1950-es évekig a fenotipusos manifesztációval, ennek klinikai sajátosságaival és kórlefolyással foglalkoztak. A boncolásra került esetek citológiai-hisztokémiai vizsgálatai alapján már ekkor felmerült valamilyen tárolásos betegség, elsősorban lipoidózis lehetősége. Nyilvánvalóvá vált továbbá, hogy a MPSD recesszíven öröklődik, de egyúttal az is, hogy genetikailag heterogén; pl.: a Hurler autoszomális, a Hunter nemhez kötött öröklésmenetű.

A legújabb időszekeket a modern vizsgálómódszerek alkalmazása jellemzi. Ezek felhasználása az ultrastrukturális sajátosságok, a szöveti MPS-ok és lipoidok kémiai analízise és a biokémiai genetika térhódítása jegyében a hibás gén-produktumok, enzimdefektusok keresése - felderítése irányában folyik in vivo és fibroblast kultúrákban in vitro.

Igy született meg a MPSD-ok lysosomális rak-tárbetegség koncepciója Hers vizsgálatai révén, aki a lysosomák hidrolizáló, degradatív enzimeinek hibás funkciójára, tehát a katabolizmus zavarára vezeti vissza a betegségben észlelt kettős tárolást. Bebizonyosodott ugyanis, hogy a glikolipoidok, közelebbről a gangliozi-dák kóros tárolása is jellemző a MPSD-okra, és való-szinű, hogy a mentális defektusokban e ténynek is döntő szerepe van. Mindezideig az igen heterogén geno- és fenotipusok kialakulásáért felelős primér enzimdefektus kimutatása még egyetlen típus esetében sem kapott két-ségbevonhatatlan bizonyítást. A klasszifikáció a klinikai gyakorlat számára jelenleg is csak a morfológiai-radiolo-giai-vizelet vizsgálati adatok alapján lehetséges, ezért nem tekinthető véglegesnek.

LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKA

- 1./ Vizelet vizsgálat / ismételten / több szűrő-teszttel.
- 2./ Periferiás vérkenet / esetleg csontvelő / festése toluidinkékkel a fehérvérsejtek metachromatikus zárványai kimutatására.
- 3./ EEG / nyugtató nélkül, vagy legfeljebb 0,5 mg/kg Hibernal intramuscularisan /.
- 4./ Szemészet / réslámpával, szemnyomásmérővel /.
- 5./ Csontröntgen / koponya, csigolyák, medence, kézfej /.
- 6./ Cardiológiai vizsgálatok / EKG, mellkas-rtg. /.
- 7./ Vizelet kvantitatív-kvalitatív MPS-analizise / gyűjtött, lehetőleg 24 órás vizeletből /, konzerválószer Streptomycin / 50-100 mg /.
- 8./ Kiegészítő vizsgálatok, ha az előző hét pozitív leletet adott: májbiopszia / ultrastruktúra és lysosomalis enzimek aktivitás vizsgálata /, a vizelet hialuronidáz-aktivitásának meghatározása, szülők vizsgálata.

A laboratóriumi diagnosztikában legelterjedtebbek a vizeletvizsgálatok. Az irodalom által ajánlott és használt szűrővizsgálati módszerek mindegyike lényegében a fokozott vizelet-MPS-tartalom kimutatására irányul. Ezek két csoportra oszthatók, praecipitációs / turbidimetriás / és az u.n. metachromasiás módszerekre.

I. Praecipitációs módszerek

a./ Egy kvaterner ammónium-bázis,^{az} acetil-trimetil-ammoniumbromid / = CETAVION / -, a savanyu MPS-okkal komplexet képez és ezáltal a vizeletből kicsapja azokat. A vizelet zavaros, opálos lesz emiatt; így az eredeti vizelettel összehasonlítva, szubjektíven, vagy az át-

eresztőképesség változása műszeresen / spektrofotometria / értékelhető.

b./ Ugy a human-, mint a bovin-albumin savanyu közegben szintén kicsapja a vizeletből a MPS-okat; számos erre alapuló turbidimetriás módszert dolgoztak ki.

II. Metachromasiás módszerek

A jelenség azon alapul, hogy a polianion savanyu MPS molekulákról ledisszociáló / COOH , SO_4 ... / csoportok negatív töltést hagynak vissza, és az ilyen molekulákhoz kötődő bázikus anilin festékek / toluidinkék / abszorpciós spektruma megváltozik / a kék színű festék liláspiros lesz = "metachromasia" /. Szűrőpapírra cseppentett vizeletfoltot anilinfestékkel festve, majd alkohollal vagy ecetsavval eluálva, a vizeletfoltok helyén / ha az sok MPS-t tartalmazott / intenzív liláspiros folt marad vissza.

CÉLKITŰZÉS, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A betegségcsoport homozygota gyakoriságára vonatkozóan jelenleg még megközelítően sincsenek biztos adataink. McKusick szerint három típus homozygota-frekvenciája a következő:

Hurler	1 : 10000	/ autoszómás /
Hunter	1 : 40000	/ nemhez kötött /
Sanfilippó	1 : 100000	/ autoszómás /

A Sanfilippó-syndromával kapcsolatban az utóbbi években - elsősorban nyugatnémet és svájci adatok alapján - az a vélemény alakult ki, hogy megközelíti a Hunter gyakoriságát.

A szegedi Gyermekklinikán 1966-70-ig a felvételre került betegek szisztematikus szűrése arra hívta fel a figyelmet, hogy a betegségcsoport jóval gyakoribb és variábilisabb, mint eddig gondolták. Öt év alatt 84 esetet diagnosztizáltak 45000 betegből - és egyéb, jólismert anyagcserebetegségek: gyermekkori diabetes mellitus, fenilketonuria, mucoviscidosis - gyakoriságával egybevetve úgy látszik, hogy Magyarországon a MPSD a leggyakoribb enzimopátia.

A klinika adatai szerint is valószínűleg módosulnak még a típusok arányáról alkotott vélemények, ezek szerint kiemelkedő a neurológiai és mentális defektussal, és kisebb alkati rendellenességekkel járó Sanfilippó gyakorisága; az utóbbi öt év eseteinek megoszlása nálunk:

Sanfilippó : Hurler-Hunterhez = 3,4 : 2,0

E tapasztalatok alapján látszott érdemesnek a betegségekre megbízható szűrőtesztet kidolgozni, és a klinikai beteganyagon kívül a mentálisan enyhébben retardált - bár ezáltal egyben szelektált, de random -

gyermekközösségen szűrést végezni a MPSD gyakoriságának megítélésére.

E célra a szegedi Osztrovszkij utcai Kisegítő Általános Iskola / = Gyógypedagógia, továbbiakban GYP. / növendékeit választottuk; kontrollképpen pedig a Szegedi Tanárképző Főiskola Gyakorló Általános Iskolájából / Pf = Pedfő / szűrtünk át két osztályt.

Előtte az iskolák vezetőségével ismertettük a vizsgálat célját, és a kivitelezéséhez szükséges erkölcsi támogatást és gyakorlati segítséget megkaptuk. Erre különösen GYP-n annál is inkább szükségünk volt, mert az értelmileg fogyatékos gyermekeknél iskolai körülmények között nem kis feladatot jelentett a szükséges kooperáció megteremtése.

Vizsgálati módszerek

I. Vizeletvizsgálati módszerek

1./ Kvantitatív szűrőtesztek

a./ Perry-teszt

1 ml vizelethez 6 csepp pufferolt / citromsavas puffer / 2,5 %-os CETAVLON-oldatot mérünk, összerázzuk, majd 1-2 perc után összehasonlítjuk az eredeti vizeletmintával. Ha opaleszkálóbbr, pozitív; ha nem, negatív a próba.

b./ Manley-teszt

1,5 ml vizelethez 1,5 ml 0,1 %-os vizes CETAVLON-oldatot mérnek, és 5-10 perc állás után 625 m μ hullámhosszon spektrofotometrián nézem a turbiditást.

Kontroll: 1,5 ml vizelet + 1,5 ml desztviz.

- 0,5 extinció felett pozitív / vagy kóros /.

c./ Berry-teszt

Whatman No 1. szűrőpapírra 10 és 25 μ l

vizeletet vizsínk fel egymás alá 5 μ l-enként, hőlégszáritás közben. Felvitel és száradás után a papírcsíkokat 2,2 pH-jú ecetsavas 0,04 %-os toluidinkék oldattal festjük 1 percig, majd 96 %-os etanolban differenciáljuk, míg festéket ad le. Differenciálás után levegőn szárítjuk.

E teszt egy módosított formáját párhuzamosan végeztük; a különbség annyi, hogy 10 %-os ecetsavban differenciálunk, egyébként teljesen azonos lépések mellett.

Pozitív esetben a vizeletfolt helyét liláspiros szín jelzi; negatív esetben nem kapunk foltot. A reakció 25-30 mg/l MPS-kiválasztás esetén válik pozitívvá.

2. Kvalitatív vizeletszűrő vizsgálati módszerek

/ Az eredeti Berry-teszt módosítása /

A vizelettel ürülő MPS mennyisége igen tág határok közt változhat. A normál értéket alig meghaladó mennyiségtől a napi több száz vagy ezer mg-os exkrecióig minden variáció előfordulhat. A vizelettel ürülő MPS mennyisége és a kórelfolyás súlyossága között nem észleltek összefüggést. Az MPS ürítés egyik napról a másikra megduplázódhat, vagy felére csökkenhet. Az is előfordulhat, hogy az összes MPS-ürítés a normál szint felső határa körül mozog, de a frakciók aránya, illetve kóros frakciók jelenléte biztosítja a MPSD diagnosztikát.

Az eddig említett vizeletszűrő vizsgálati módszerek együttes alkalmazásával is a kóros esetek globálisan csak 50 %-ban adtak egyértelműen pozitív leletet. Jelentős százalékban kaptunk kétes, illetve téves negatív és téves pozitív eredményeket. A téves negatív eredmények jórésze nyilvánvalóan abból adódott, hogy a betegek egy része nem, vagy alig ürített a normálnál több MPS-t, viszont ezen belül a kóros frakciók, a CSB, HS vagy a KS domináltak. Másrészt ismeretes,

hogy a MPSD intermittáló ürítéssel jár. A téves pozitivitás adódhat a következő faktorokból: pyuria, igen koncentrált vizelet, életkor / fiatal csecsenőkorban általában pozitívak a szűrőtesztok a relative fokozott ürítés miatt / és egyéb ismeretlen okból.

Mind a téves negatív, mind a téves pozitív eredmények abból adódnak, hogy az irodalomban ajánlott és általunk is alkalmazott szűrőtesztok mindegyike kvantitativ jellegű. Ezért szükségesnek látszott olyan nagyobb effektusú módszer kidolgozása, mely mindezen faktorok befolyását kiküszöböli, kvalitatív jellegénél fogva csak a kóros frakciókat mutatja ki és így a betegségcsoport diagnosztizálására alkalmasabb, specifikusabb. E célra a Berry-féle módszert módosítottuk.

A Berry-teszt módosítása

1./ Először arra kerestünk választ, hogy az egyes MPS-frakciókra vonatkozólag milyen pH-ju festékkoldat optimális; továbbá, hogy a mosásra, differentiálásra megfelelő-e az alkohol.

Eredményeinket a II. Táblázatban demonstráljuk. A standardok azonos koncentrációju oldatait / 0,3 mg/0,1 ml / Whatmann No 1. szűrőpapírra cseppentve festettük. Kiindulva a 2,3-es pH-tól / 10 % ecetsav / 3,9 pH-ig vizsgáltuk a metachromasia intenzitását. Mind a hét standardot figyelembe véve 2,9 - 3,5 pH-ig / 1 %, 0,25 %, illetve 0,05 % ecetsav / esetén kaptuk a legjobban értékelhető metachromasiát. Figyelembe véve, hogy a 0,25 és a 0,05 %-os festés és ugyanilyen ecetsavas differentiáló oldat alkalmazása esetén a papír alapszíne igen sötétkék marad, mely zavarja a kiértékelést; gyakorlati felhasználásra az 1 %-os festékkoldatot és az 1 %-os ecetsavas mosást választottuk.

II. TÁBLÁZAT

Standard MPS-k festése és differenciálása
Különböző pH-ju festékkoldatokkal és ecetsavval

Standard \ Ecetsav cc.	10 % pH 2,2	2,5 % pH 2,55	1 % pH 2,9	0,25 % pH 3,2	0,05 % pH 3,5	0,01 % pH 3,9	Mosás
HA	Ø	?	+	+	+++	++	E
	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	A
CSA	++	+++	+++	+++	++++	++	E
	+	+	+	+	+	+	A
GSC	++	+++	+++	+++	++++	++	E
	=	+	+	+	+	+	A
CSB	++	+++	+++	+++	++++	++	E
	+	+	+	+	+	+	A
KS	++	+++	+++	+++	+++	++	E
	+	+	+	+	+	+	A
HM	++	++	+++	+++	++++	++	E
	+	+	+	+	+	+	A
HEP	++	+++	+++	+++	++++	++	E
	++	++	++	++	++	++	A

Metachromasia foka: + → ++++

Az alkoholos mosást elhagytuk, amint ez a táblázat alapján érthető; a metachromasia foka alkohollal mosva / 96 %-os etilalkohol / sokkal gyengébb, sőt akár el is tűnhet / pl. a hialuronsav /.

2./ Másodszor abban az irányban folytattuk a vizsgálatokat, hogy a standard MPS-ok / testicularis / hialuronidázzal történő emésztése a Berry-féle módszerre adaptálva felhasználható-e? E célra az Organon gyár Hyason nevű készítményét használtuk. A hét standard vizes oldatát kétféle pH-ju pufferben oldott enzimmel inkubáltuk. Eredmények a III. Táblázatban.

A 0,3 mg/0,1 ml koncentrációju mind a 7,2 pH-ju borát pufferben, mind az 5,5 pH-ju acetát pufferben oldott enzimből 30, illetve 60 nemzetközi egységet / NE / adtunk. Emésztés előtt és után az oldatokat szűrőpapírra cseppentve a fent vázoltak alapján megfestettük; az irodalmi adatoknak megfelelően a CSB, KS, HM és HEP rezisztens maradt és metachromasiásan festődött, míg a többiek a különböző időtartam után az enzim elbontotta. A táblázat eredményei alapján a módosított szűrőteszthez az acetát pufferben oldott 60 NE enzimnennyiséget és a 18 órás 37°C-os inkubációt választottuk / 5. ábra /.

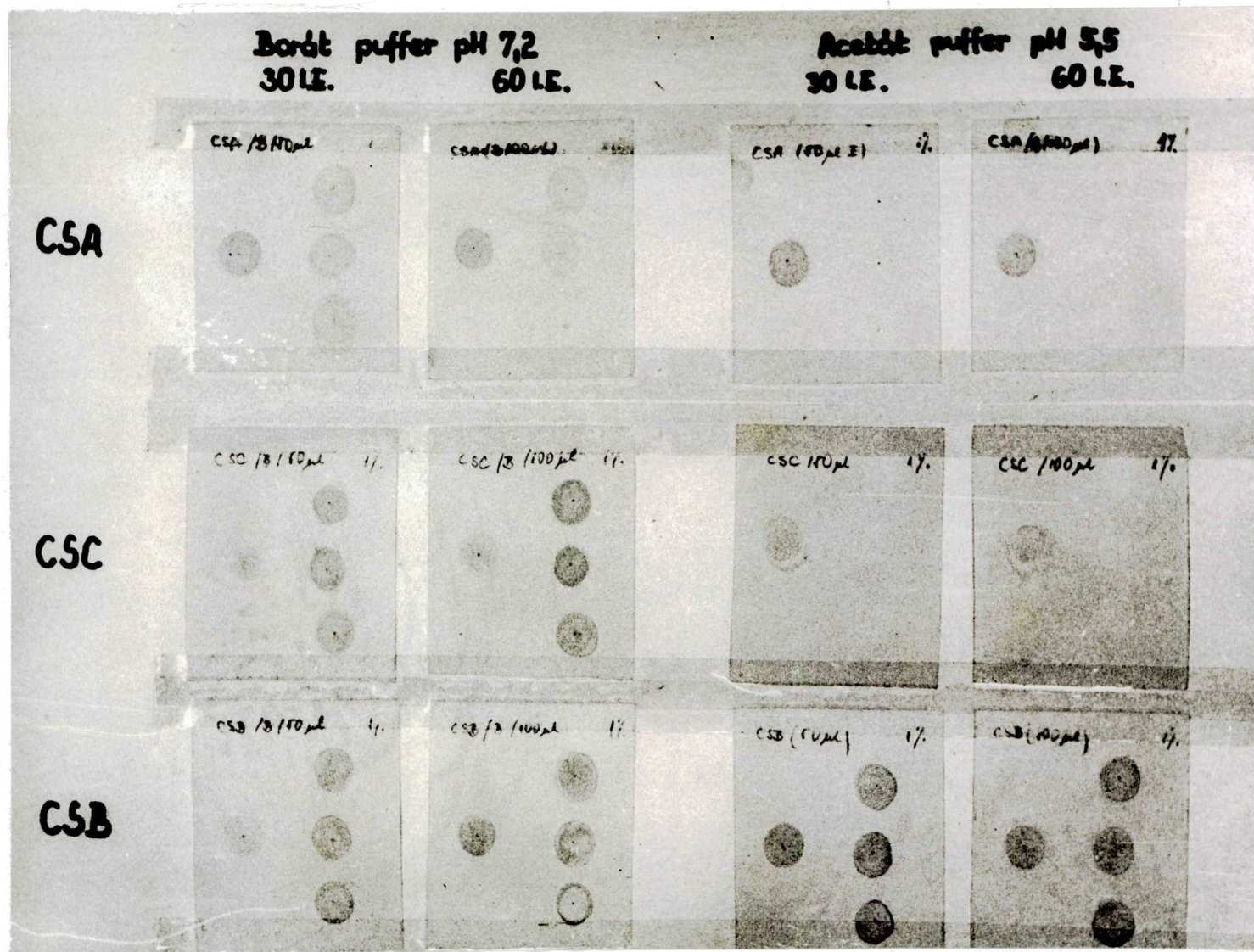
Az ábrán a standard MPS-ok emésztése 37°C-on 18 óráig van feltüntetve. A papírszeletek bal oldali, egyes foltjai az emésztetlen, kontrollok, a jobb oldali folthármak az emésztett minták 10, 20 és 30 μ l-ei, alulról felfelé haladva. A CSA és CSC normális, a CSB kóros kondroitinszulfát.

3./ A vizeletből történő tisztított MPS-prae-cipitátum nyérése céljára a Kaplan-féle eljárás leegyszerűsített formáját használtuk fel.

III. TÁBLÁZAT

Standard MPS-k emésztése hialuronidáz enzimmel

cc: 0,3 mg/0,1 ml	Borát puffer pH 7,2		Acetát puffer pH 5,5	
	100 1 /30 NE/	200 1 /60 NE/	100 1 /30 NE/	200 1 /60 NE/
HA	elbomlik /24 ó/	elbomlik /18 ó/	elbomlik /24 ó/	elbomlik /18 ó/
CSA	rezisztens	elbomlik /18 ó/	elbomlik /6 ó/	elbomlik /6 ó/
CSC	rezisztens	rezisztens	elbomlik /6 ó/	elbomlik /6 ó/
CSB	rezisztens	rezisztens	rezisztens	rezisztens
KS	rezisztens	rezisztens	rezisztens	rezisztens
HM	rezisztens	rezisztens	rezisztens	rezisztens
HEP	rezisztens	rezisztens	rezisztens	rezisztens



5. ábra

A módosított módszer hatékonyságának ellenőrzésére 48 bizonyított MPSD-homozygota MPS emésztését végeztük el.

Az eredmény: 45 pozitív

1 kétes

2 negatív

Ugyanez a módszer 45 klinikai kontrollnál a következő eredményt adta:

43 negatív

1 kétes

1 pozitív

Minden szemléletesen bizonyítja a módosított módszer nagyobb effektivitását az eredetihez képest, mivel a hialuronidázzal történő emésztés után csak a betegségre jellemző kóros frakciók maradnak meg. A párhuzamosan alkalmazott emésztetlen-emésztett MPS festés során kapott metachromasia nemcsak a fokozott, hanem a kóros ürítést is kimutatja.

E módszerrel az elsősorban csak HS-t ürítő és a hagyományos módszerekkel alig diagnosztizálható Sanfilippó esetek is kiszűrhetők, mert az emésztés után már alkalmazható a 2,9 pH-jú toluidinkék, mellyel a HS is metachromasiát ad. / Az eredeti Berry 2,2 pH-ján a HS nem festődik. / Az emésztéssel a normális vizelet fő frakcióját adó CSA és CSB lebomlik, tehát az ilyen pH mellett téves pozitivitást adó frakciók kiestek.

Végezetül módszerünk laboratóriumi igénye: 12 vizelet vizsgálatát némi gyakorlat után egy asszisztens-nő 3 nap alatt 5 óra effektív munkával végezheti el.

Módosított, kvalitatív vizelet-szűrő vizsgálati módszer

1./ MPS-ák kicsapása, tisztítása

a./ Lehetőleg gyűjtött / 6-24 óras, legfeljebb 10 napig mélyhűtött / vizelet 4 ml-éhez 0,2 ml 2,5 %-os CETAVION-t / cetiltrimetilammonium-bromid vizes oldata / adunk cseppenként, összerázás után egy éjszakára hűtőszekrénybe tesszük.

b./ Centrifugálás után a praecipitátumot NaCl-dal telített 96 %-os etanollal kétszer mossuk. Az üledéket 5 %-os Na-acetát és 0,5 N ecetsav egyenlő arányú keverékében / 0,4-0,4 ml / felvesszük, és az oldathoz kloroform-nyálalkohol 3 : 1 arányú keverékének 0,8 ml-ét pipettázzuk. Erőteljes rázás, majd a fázisok szétválása után a felső vizes fázis leszívása következik.

c./ A vizes fázist háromszoros mennyiségű abs. etanol hozzáadása és összerázása után centrifugáljuk, a kapott üledéket 0,2 ml ampullázott desztvizben oldjuk.

2./ Tesztikuláris hialuronidáz enésztés

a./ Acetát puffer készítése: 100 ml desztvizbe 8,2 g Na-acetátot és 8,76 g NaCl-t oldunk, / 1 M Na-acetát, 1,5 M konyhasó / majd finom skálájú univerzál indikátor papírral a pH-t 5,3-5,5-re állítjuk cc. ecetsav hozzácseppentésével.

b./ 1 ampulla - 150 NE - hialuronidázt / Hyason, Organon / 0,4 ml acetát pufferben oldunk.

c./ A 0,2 ml tisztított MPS-okat tartalmazó vizes oldat egyik 0,1 ml-éhez 0,2 ml / 75 NE / acetát pufferes enzimet adunk és 22-24 órán át 37°C-on inkubáljuk; a másik 0,1 ml-t a felhasználásig jégszekrényben tároljuk / a csöveket gumidugóval zárjuk /.

3./ Festés, értékelés

a./ Whatmann No 1. szűrőpapír darabkára vagy

csikra, annak felső részére a nem inkubált 0,1 ml-ből 10 μ l-t, ez alá az inkubáltból - a hígításra való tekintettel - 30 μ l-t cseppentünk / 5 mikrolitereként, hőlégszáritás közben /. A foltok azonos nagyságúak legyenek.

b./ A szűrőpapírt 0,04 % toluidinkéket tartalmazó 1 %-os vizes ecetsav oldatban 1 percre festjük, majd ugyancsak 1 %-os ecetsav oldattal mossuk, míg festéket ad le / 1-2 perc /.

c./ Levegőn való szárítás után a felcseppentés helyein a felső és az alsó foltok területén keletkező liláspiros szín intenzitását összehasonlítjuk. Negatív esetben az inkubáció után ilyen metachromasia nem, vagy csak halvány, vékony gyűrű formájában észlelhető. Pozitív esetben a szín diffúz, és minél inkább megközelíti az emésztetlen folt intenzitását, annál körjelzőbb / + - +++-ig /. Általában - különösen kezdetben és időszakonként a módszer ellenőrzésére - ajánlatos bizonyosan negatív és pozitív vizetből is felcseppenteni. Esetleg heterozygoták is adhatnak egybe pozitívítást.

MELLÉKLET

Az 1. és 2. mellékleten az emésztéses módszer eredményeként kapott papírcsíkok egymásmelyikének fotója látható.

A vizelet-MPS-tartalom koncentrációjától függően változik az emésztetlen / felső / foltok intenzitása. Vessük össze az 1/a. melléklet 1-es és 3-as eseteit! Az alapürítés kb. azonos. Az 1-es vizelet kóros frakciói az emésztés után / alsó folt / is homogén foltot adnak; a 3-asé nem. Az 1/a. 10-es esetén igen magas az alapürítés, és a vizelet MPS-frakciójának nagy része láthatóan rezisztens / kóros /. Az 1/b. melléklet a szűrés egy olyan 8-as sorozatát mutatja, ahol egy vizelet / 28-as / emelkedett mennyiségű és kóros MPS-okat tartalmaz. A 2/c. melléklet 6. vérvkép alapján pozitív eset emésztéses eredményét mutatja. A 3-as és 5-ös esetben nem észlelhető kóros vizeletürítés. Az eddigi ábrák alapján úgy tűnhet, hogy a rezisztensnek minősített frakció nem más, mint a túl nagy alapürítés után megmaradó, el nem emésztett / alkalmasint normális / MPS-ok megfestése. Hogy ez nem így van, bizonyítja a 2/d. sorozat 7. esete. Az alapürítés igen kicsi, de egészében rezisztens MPS-okat tartalmaz a vizelet. Sokkal intenzívebb alapfoltot adó vizeletek teljes MPS-tartalma elemésztődött, a 7-esé azonos intenzitással megmaradt.

/ A papírcsíkok egymásközi összehasonlítása kicsit megtévesztő, a festődés a festék többszöri használatával valamit csökken. Az egy csíkon lévő minták viszonyítása a helyes. /

1. MELLÉKLET

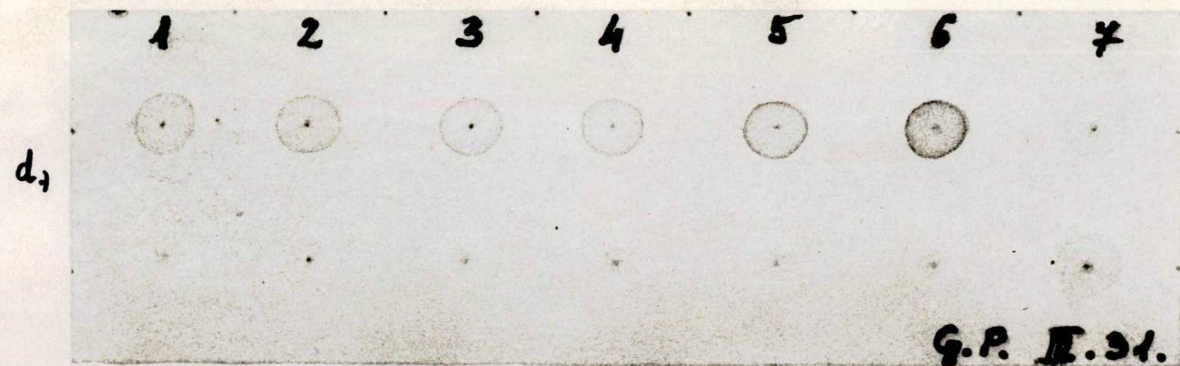
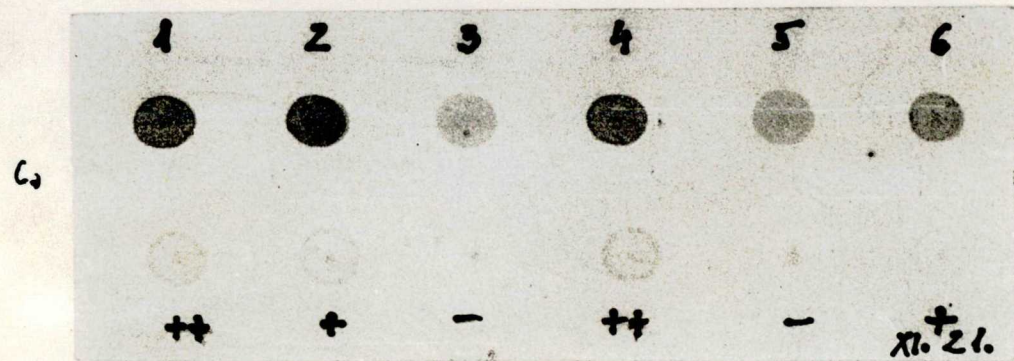
a.)

1	2	3	4	9	10	11	16
							
							
Kövek, I. 17.				I. 10.			

b.)

26	27	28	29	30	31	32	33
							
							
Kövek, I. 11.							

2. MELLÉKLET



II. Az MPSD-re jellemző haematológiai eltérések

Régi megfigyelés, hogy a betegek jelentős hányadának fehérvérsejtjeiben kóros granulatio jelentkezik. Reilly gargoyle gyermekeknél a vér neutrophil leukocytáinak citoplazmájában és egyes csontvelő-sejtekben May-Grünwald-Giemsa festéssel nagyszámu liláspiros szemcsét észlelt. A jelenséget azonban "toxicus granulatio"-ként jelölte és dokumentálta.

Gasser klasszikus, súlyos eseteknél a lymphocytákban talált ilyen inklúziókat szintén May-Grünwald-Giemsa festéssel.

Muir és munkatársai is próbálkoztak a panoptikus festéssel, de nem találták eléggé specifikusnak a MPS-ák kimutatására. Ezért új metodikát dolgoztak ki, mely jól bevált és a mai napig széles körben alkalmazzák: metilalkohol fixálás után toluidinkékkel metachromasiás festés. E módszerrel szerzett tapasztalataik alapján megállapították, hogy a lymphocytákban az intracitoplazmatikus granulumok minden esetben diagnosztikus értékűek, egészséges egyén vérében sohasem mutatható ki.

Maroteaux és Lamy, a francia szerzőpár az eddigiekben észlelt anomáliákat összesítve négyféle sejttípust különít el:

1./ Alder-Reilly féle anomalia

/ Alder mint a fehérvérsejtek örökletes granulatio anomáliáját írta le dysostosisban. / Nagy, lila színű szemcsék a fehérvérsejtek citoplazmájában / első sorban a polymorph magvu leukocytákban, de a periferia és a csontvelő egyéb sejthalakjaiban is /. Az anomalia megjelenése nem állandó.

2./ Gasser-féle abnormitás

A lymphocyták keskeny citoplazma-szegélyében néhány vacuolum, közepén sötét zárvánnyal. Ugyanezt észlelte Muir toluidinkék festéssel.

3./ Buhot-sejt

Csak a csontvelőben található meg; plasmocyta külsejű, ovális, nagy sejt excentrikus maggal, kerékkülönszerűen elrendezett chromatinnal. Kékesszürke citoplazmájában számos vacuolum, közepén sötétvörösre festődő granularis, vonalszerű és gyűrűalakú inklúzióval.

4./ Egyéb abnormális reticularis sejtek

A csontvelő histiocytáiban számos nagy, kerek, basophil granuloma.

Maroteaux és Lamy említést tesznek még u.n. basophiloid sejtekről is a periferiás vérképben. Mind az angol, mind a francia irodalom közöl adatokat arra vonatkozóan, hogy mely haematologiai eltéréseket figyeltek meg az MPSD egyes típusaiban.

Hurler syndrome

Alder-Reilly-féle anomalia a periferia és a csontvelő leukocytáiban.

Hunter syndrome

Alder-Reilly-féle sejtek, de a csontvelőkép negatív.

Sanfilippó syndrome

A periferián Reilly granulatio és Gasser sejtek, a csontvelőben Buhot-sejtek.

Maroteaux-Lamy syndrome

Alder-féle anomalia.

Scheie syndrome

Az esetek igen kis hányadában van csak elváltozás, ilyenkor néhány lymphocytában kisszámú, laza szemcsézettség látható.

Morquio syndrome

Néha a leukocytákban Alder granulatio.

A granulatio anomaliák legmodernebb, általunk is elfogadott felosztását adja Rampini, a zürichi Gyermekklinika haematologusa. A következő típusokat különbözteti meg:

1./ Komplett forma

A neutrophil granulocytákban és lymphocytákban egyidejűleg szárványok mutatható ki.

2./ Inkomplett formák

a./ lymphocyta típus: a periferiás vérképben csak a lymphocytákban, a csontvelőben egyéb sejttípusokban is látható abnormális granulatio.

b./ neutrophil típus

csak a periferiás vérkép neutrophil granulocytáiban vannak szemcsék.

c./ A ritka monocyta-lymphocyta formánál e két sejttípus tartalmaz kóros granulomokat.

A továbbiakban ezt a felosztást vettük alapul eredményeink értékelésénél.

Az általán alkalmazott vizsgálati módszerek

Kezdetben az irodalom által metachromasiás vérkenetfestés céljára ajánlott szokásos fixálással kísérleteztünk: abs. metilalkohollal 5-10 percig. Ezután 30 %-os metanolban oldott 0,1 %-os toluidinkékkel, illetve 0,01 %-os 4,5-ös pH-ra beállított festékdoldattal festettünk. Ismételt acetonos és xylolos öblítés után immerzióval vizsgálva a keneteket még a biztos, klasszikus MPSD-os gyermekeknél is csak rendkívül kisszámu sejtben láttunk metachromaticus granulomokat. Ez valószínűleg a módszer alkalmazása során előfordult technikai hibák eredménye lehetett:

- a fixáláshoz használt metanol nem volt vízmentes
- a toluidinkék festékünk előregedett.

Ezért megváltoztattuk mind a fixálási metodust, mind a festéket. A Schuchart-gyári 10-éves festék helyett friss, Merc-gyárit kezdtünk használni. Fixálás

céljára pedig a hisztokémiai irodalomban a szöveti basophilia kimutatására ajánlott MOTA-féle módszer módosított formáját alkalmaztuk.

Az eredeti MOTA-féle fixáló összetétele

99 ml 50 %-os etanol

1 ml jégecet / cc. ecetsav /

1-4 g ólomacetát

Módosítás Parwaresch szerint

75 ml 90 %-os etanol

1 ml jégecet

2 g ólomacetát

25 ml 40 %-os formalin

Az oldat elkészítése után 4-6 órával már használható. Hűtőszekrényben, légmentesen 1 hétig elteríthető. Felhasználás előtt szobahőmérsékleten állni hagyjuk, míg kristályos csapadék feloldódik, majd átszűrve a viztisza oldattal 5' -ig fixálunk. Ezután desztivizzel leöblítjük a keneteket és szűrőpapíron megszáritjuk.

Ezzel az eljárással párhuzamosan alkalmaztuk a hagyományos módszert: fixálás abszolút metanollal 5' -ig. / Hosszabb ideig történő fixálás esetén a vörsejtek zsugorodottá, ezáltal a kenetek értékelhetetlenné válnak. /

Festés

Mindkét vérkenetet átszűrte, 0,1 %-os / 30 %-os metanolban oldott / toluidinkék oldattal 20' -ig festjük. Majd alapos acetonos differenciálás után / 2x1-3' / rövid ideig xylolos derítés következik.

A metachromasia jelenségének magyarázata

A savanyú MPS-ák nagymolekulájú polianionok. Negatív töltéseik úgy keletkeznek, hogy megfelelő pH-ju közegben - COOH, illetve -SO₄ és -PO₄ csoportjaik disszociálnak. A metachromasia jelensége akkor jöhet létre, ha a töltések közti távolság nem nagyobb, mint 5A: ilyenkor a bázikus anilinfesték / toluidinkék / és a

polianion MPS molekula közt irreverzibilis kötődés jön létre. Ezáltal a festék adsorpciós spektruma megváltozik, kék színe lilára vált át.

Leolvasás

Immerzióval történik. Csak a technikailag kifogástalan kenet értékelhető: festése egyenletes, zsugorodott fehérvérsejtek nincsenek, magjuk és citoplazmájuk jól látszik.

A metanolos fixálás után a vörösvérsejtek halvány sárgás-rózsaszínűek, konturozottak. MOTA-féle fixálással igen halványak, alig észlelhetők, árnyék-szerűek. Ajánlatos a festést és a leolvasást a kenetlevétel napján elvégezni, de egy-két napi késedelem tapasztalataink szerint a kifejezett pozitivitást nem befolyásolja.

A periferiás vérkenetek metachromasiás festésével kiszűrt pozitív eseteknél az ismételt vizsgálatkor új, hatékony eljárást vezettünk be: az emésztéses módszert. Lényege: a már metanollal, illetve MOTA-oldattal fixált keneteket hialuronidáz enzimhatásának tesszük ki, mely a tárolt MPS-frakciók közül a fiziológiásan meglévőket elbontja. A rezisztens / kóros / frakciók - CSB, KS, HS - így az emésztés után is jól feltüntethetők. Enzinként ismét az Organon gyár Hyason nevű készítményét használtuk 1 M Na-acetát pufferben oldva.

Puffer készítése

100 ml desztillált vízben 8,2 g Na-acetátot és 8,76 g NaCl-t oldunk, majd univerzál indikátor papírral a pH-t jégecet hozzáseppentésével 5,5-re állítjuk be.

Enzimoldat készítése

1 ampulla Hyason / 150 NE / tartalmát 10 ml pufferben összerázással feloldjuk, majd az így nyert 10 mg%-os oldatot a fixált vérkenetekre pipettázzuk.

Nedves kamrában 37°C -on 30 percig emésztjük a keneteket, majd alapos desztilláltvizes öblítés után 0,1 %-os toluidinkékkel festünk a már ismert módon.

A vizsgálati eredmények értékelésének szempontjai

A papír-tesztek értékelésénél három kategóriát állítottunk fel:

- negatív / $\emptyset$ / a vizelet, ha a felcseppentés helyén nem kapunk foltot
- gyanus / $\pm$ / a vizelet, ha a felcseppentés helyén a festés és differenciálás után / halvány / gyűrű marad vissza
- pozitív / $+$ / a vizelet, ha a festődött folt homogen. A színintenzitás szubjektív becslése alapján $\pm$ -től ++++ -ig fokozatokat különböztettünk meg.

A módosított / emésztéses / Berry-tesztnél jó támpont még az emésztetlen és emésztett folt / ha van / festődési intenzitásának összevetése.

100 gyermek első átszűrésénél egyszeri vizeletből végeztük a vizsgálatokat. Az igen intermittáló MPS-ürítést mutatta az a tény, hogy az első szűrés eredményei és az ugyanakkor vett vérminták eredményei között nagy volt a szórás. / Teljes paralitás különben sem várható ./ A másodszori szűrés kétszeri, gyűjtött vizeletmintából történt. Bár ideális a 24 órás gyűjtöttvizeletből történő meghatározás lenne, olyan bejárásos intézetekben, mint a Gyakorlóiskola és különösen a Kisegítő Iskola, nem tudtuk kivitelezni ezt. / A teszt kidolgozását klinikai beteganyag 24 órás gyűjtött vizeletének felhasználásával végeztük. /

A vérvizsgálatok során a toluidinkékkel festett vérkeneteken 100-100 fehérvérsejtet számoltunk le, és megadtuk a metachromasiás granuláumokkal bíró, kóros sejthalakok százalékos gyakoriságát. Az intracitoplazmatikus szemcsék nagyságát, számát, eloszlását, festődési sajátosságait is figyelembe véve döntöttünk az egyes kenetek pozitivitása felül. Az irodalom által leírt kóros sejthalakok közül az alábbiakkal találkoztunk:

Reilly sejt: finom / ritkábban durvább / diffúz liláspiros szemcsézettségű neutrophil leukocytá.

Gasser sejt: a citoplazmaszegélyben egy- vagy több metachromaticus zárvány látható a sejthártyához tapadva.

Basophiloid sejt: a lymphocytánál nagyobb, de a basophil leukocytáknál kisebb, és sűrű, durva granulatioja respektálja a sejtnag határát.

A szűrővizsgálatok megkezdése előtt normális és kóros vérkenetek százait néztem át, hogy gyakoroljam az előforduló sejttípusok felismerését. Az ott szerzett tapasztalatok alapján érdemesnek látszott egy kategorizálást a vérképekre is összeállítani, mivel a bizonyított MPAD-os esetekben kimagaslóan nagy volt az eltérő típusu sejtek száma, de ezen belül változott azok aránya, valamint sok normál esetben is előfordult, hogy a sejtek igen kis százalékában észleltünk granulatiót, de tapasztalataink alapján ez még fiziológiásnak minősül.

A következő pontrendszert fogadtuk el:

Reilly sejt = kóros neutrophil leukocytá / Se /

2 - 10 %	finomszemcsék:	1 pont
	durva szemcsék:	2 "
11 - 25 %	:	3 "
26 - 50 %	:	4 "
50 % felett	:	5 "

Basophiloid sejt / Bz /

1 % : 1 pont

2 %- : 2 "

Monocyta-pozitivitás / Mo /

1 %- : 1 pont

Lymphocyta-pozitivitás / Ly /

1 % : 1 pont

2-5 % : 2 "

5 % felett : 4 "

E pontrendszer alapján a kategóriák:

0 - 2 pontig : negatív a kenet / 0 /

3 - 4 " : gyanús / ± /

5 - ponttól : pozitív / + /

Ezen kívül a pozitívnak bizonyult vérkeneteknél a granulatio anomaliák Rampini-féle típusainak megoszlását is vizsgáltuk.

Természetesen a vérkenetek vételét és festését is ismételtük. Bár az első sorozathoz képest a vérkenetek is mutattak némi eltérést, ami a festési technika esetleges hibáiból, vagy a fehérvérsejtek MPS-tartalmának változásából adódik; a vérvék állandóbbnak bizonyult, ezért az értékelés viszonyítási alapjául ezt választottam.

VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

A gyakorisági vizsgálatokat a Gy.P.-n kezdtük. Hetente két alkalommal voltunk az iskolában, egyszer-egyszer 10-12 vizelet- és vérmintát véve. A mintavétel sorrendjében minden gyermek egy számot kapott, a táblázatokban a gyerekeket reprezentáló minták száma szerepel.

A minták mielőbbi feldolgozása ajánlatos.

A vizeletmintákat a felhasználásig mélyhűtőben, vagy hűtőszekrényben tároltuk; a teszteléseket két napon belül elvégeztük. A tárolt vizeletmintákhoz konzerválószerként Streptomycint adtunk. A vérkenetek fixálása és festése szintén két napon belül, leolvasásuk és értékelésük folyamatosan történt.

A Gyermekklinikán 211 kontroll és 84 igazoltan MPSD-os betegnél végeztük el a vérkenet festését toluidinkékkel. Az utóbbi csoportból 76 pozitív eredmény született. Ennek megoszlása a fixálás módja szerint:

68 kenetet párhuzamosan fixáltunk MOTA-oldattal és metanollal, ebből 43-nál mindkét módon azonos eredményt kaptunk.

36 lett pozitív

2 gyanús

5 negatív, de közülük 4-ben a csontvelő pozitívnak bizonyult.

A többi 25-nél párhuzamosan fixálással

23 csak MOTA-val pozitív

2 csak metanollal pozitív

16 kenetet csak egyféle módon fixáltunk:

12-t MOTA-val, ebből	3 $\pm$
	9 +
4-t metanollal, ebből	2 $\pm$
	2 +

A pozitív vérkenetek sejttípus szerint megoszlása:
Az esetek 53 %-ában a neutrophil leukocytákban és a lymphocytákban egyidejűleg jelentkezett a kóros granulatio, ez a Rampini-féle komplett típusnak felel meg. 12 %-ban ezen kívül még pozitív monocytákat is találunk. Csak neutrophil sejt pozitivitást 31 %-ban észleltünk, ez az inkomplett neutrophil típus. 4 % volt az inkomplett lymphocyta forma aránya.

18 igazoltan MPSD-os betegnél végzett hyaluronidáz-emésztés bizonyította, hogy az enzim valóban csak a fiziológias frakciókat bontja el, a kórosakat érintetlenül hagyja. Ezeket a kenetek ugyanis az emésztést követően 100 %-ban pozitívak maradtak.

A csontvelőben a myeloid sor fiatalabb és érettebb elemeiben különböző intenzitású liláspiros granulatiót észleltünk.

A 100 gyógypedagógiai esetből 94-ben kaptunk értékelhető vérkenetet. Kezdetről fogva egymás mellett alkalmaztuk a MOTA-féle és a metanolos fixálást. Az első szűrés eredményeként 25 esetben kaptunk pozitív, vagy gyanús eredményt, 69 teljesen negatív volt.

Mindkét fixálással 2 +
2 $\pm$

MOTA + és metanol $\pm$	5
MOTA + és " $\emptyset$	1
MOTA $\pm$ és " $\emptyset$	3
metanol + és MOTA $\pm$	5
metanol + és MOTA $\emptyset$	3
metanol $\pm$ és MOTA $\emptyset$	2
csak MOTA +	6
csak metanol +	8

A második szűrőkor az első alkalommal pozitívnak, illetve gyanusnak talált, valamint a technikailag rosszul sikerült eseteket ismételtük meg. Az így nyert eredmény a következő:

Parallel fixálással azonos eredmény 13 esetben:

MOTA és metanol	+ 4
	$\pm$ 5
	$\emptyset$ 4
MOTA + és metanol	$\pm$ 2
MOTA + és metanol	$\emptyset$ 0
MOTA $\pm$ és metanol	$\emptyset$ 2
metanol + és MOTA	$\pm$ 0
metanol + és MOTA	$\emptyset$ 2
metanol $\pm$ és MOTA	$\emptyset$ 5

Egy kenetet nem tudtunk megismételni.

A harmadik szűrőkor csak 19 gyermekről vettünk vért. 4 kenet ugyanis már a II. vizsgálatnál negatívvá vált, két tanulót pedig iskolaváltoztatás miatt nem tudtunk elérni. Most már a párhuzamos fixálást kombináltuk az emésztéses módszerrel, tehát személyenként összesen 4 kenetet vizsgáltunk.

Emésztetlen kenetek megoszlása:

MOTA és metanol +	0
	$\pm$ 3
	$\emptyset$ 2
MOTA + és metanol $\pm$	1
MOTA + és metanol $\emptyset$	2
MOTA $\pm$ és metanol $\emptyset$	4
metanol + és MOTA $\pm$	0
metanol + és MOTA $\emptyset$	1
metanol $\pm$ és MOTA $\emptyset$	6
csak metanollal +	2

Enésztett vérkenetek: 10 esetben parallel
fixálással azonos eredményt kaptunk:

MOTA + és metanol + 1
+ 0
Ø 9

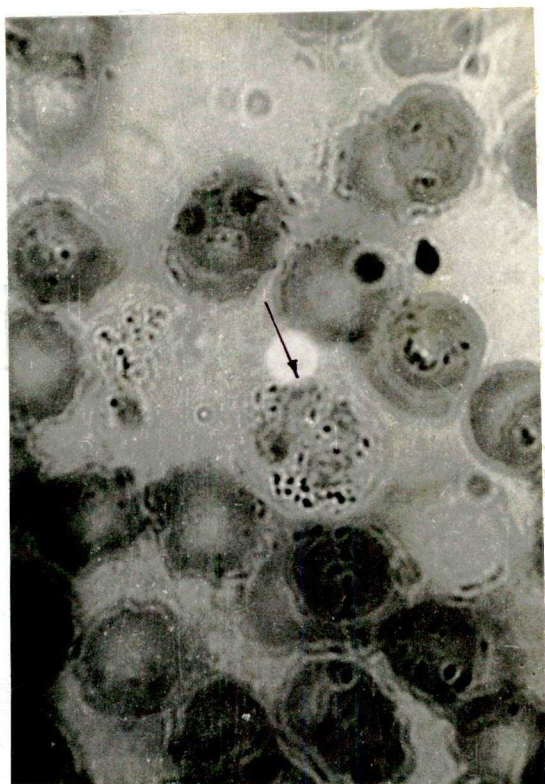
A fennmaradó 9 eset megoszlása:

MOTA + és metanol + 0
MOTA + és metanol Ø 2
MOTA + és metanol Ø 1
metanol + és MOTA + 0
metanol + és MOTA Ø 0
metanol + és MOTA Ø 5
csak MOTA-val + 1
csak metanollal + 0

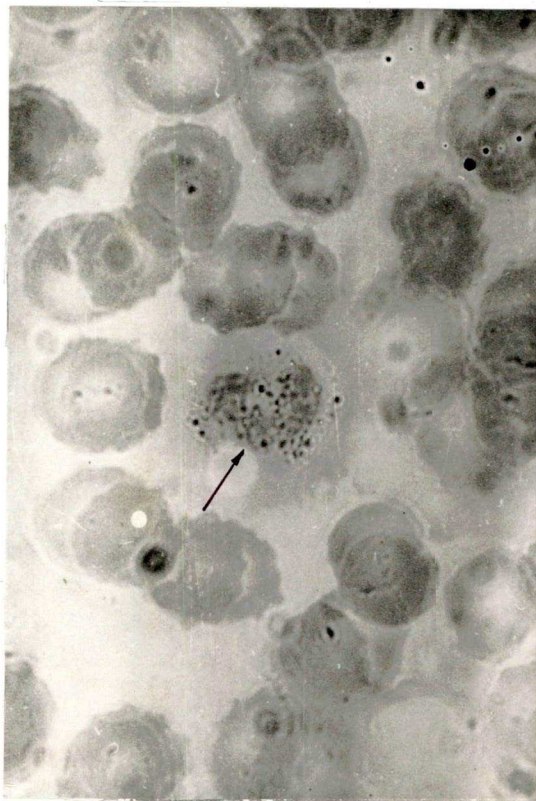
A pozitív vérkenetek sejttípus szerinti megosz-
lása a 3 szűrés adatait összesítve: az esetek 68 %
ában / 17 gyermeknél / észleltük a neutrophil leuko-
cyták és a lymphocyták egyidejű pozitivitását, ami
Rampini szerint a komplett formának felel meg. 32 %
volt az inkomplett neutrophil típus aránya / 8 eset /.
A MPSD I. kórformájára, a klasszikus Hurler-kórra
jellemző inkomplett lymphocyta-típust nem észleltük.
Klinikai tapasztalatok és irodalmi adatok alapján ebből
arra kell következtetnünk, hogy az általunk kiszűrt
gyógypedagógiai esetek döntő többsége a MPSD III. =
= Sanfilippó szindrómához tartozik. Feltetésünk igazo-
lása természetesen további klinikai és laboratóriumi
vizsgálatokat igényel.

A Gyakorló Általános Iskola 50 tanulójának
első szűrésekor mindössze egy vérkenet volt pozitív
6 többé-kevésbé gyanús képet mutatott. Összesen tehát
7 gyermeknél ismételtük a vizsgálatot, melynek során
kifejezett pozitivitást már nem kaptunk.

Az enésztés elvégzése után a 7-ből 5 kenet
teljesen negatívvá vált, 2 pedig csak a MOTA-fixálás-
sal volt gyanús.



6.a. ábra



6.b. ábra



6.c. ábra

Az ábra fotoin zárványokat tartalmazó kóros neutrophil granulocyták / Reilly-sejtek / láthatók.

A táblázatok összeállításánál az eredeti Berry-teszt adatait nem tüntettem fel, mert pozitivitásuk teljesen egybeesett az emésztéses módszer pozitivitásával, vagy negatívak voltak. / Sokszor téves negatív; amit magyaráz, hogyha a vizelet tartalmaz is kóros frakciót, de az össz MPS mennyisége nem haladja meg a 30 mg/l koncentrációt, - a teszt negatív. /

A Gy.P. értékelhető adatainak száma 94 vérkenet és 92 vizelet. Két gyermektől egy esetben sem tudtunk vizeletet hozni.

A következő táblázat a Gy.P. pozitív véreket és a párhuzamos vizeletvizsgálatok eredményeit tartalmazza:

IV. TÁBLÁZAT

Sorszám	Vérkenet	Vizelet			
		Emésztés I.	Emésztés II.	Perry	Manley
9.	+	Ø	-	-	0,135
11.	+	Ø	Ø	-	0,040
14.	+	Ø	-	-	0,000
16.	+	+	Ø	+	0,360
18.	+	Ø	-	+	0,145
20.	+	+	Ø	+	0,180
26.	+	Ø	-	-	0,120
35.	+	+	+	+	0,175
37.	+	+	Ø	-	0,195
39.	+	Ø	-	+	0,180
42.	+	+	Ø	+	<u>1,020</u>
52.	+	+	-	-	0,000
54.	+	Ø	-	-	0,210
57.	+	-	-	-	-
76.	+	+	-	+++	<u>1,000</u>
94.	+	Ø	-	-	0,070
95.	+	Ø	-	-	<u>0,800</u>

Vizelet: $\emptyset$: 9
 $\pm$: 4
 $+$: 3
nincs vizelet : 1-nél / 57-es /
összesen: 17

V. TÁBLÁZAT

A Gy.P. gyanus vérkenetei és a párhuzamos vizelet-
-tesztek adatai:

Sorszám	Vérkenet	Vizelet			
		Emésztés I.	II.	Perry	Manley
3.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\emptyset$	0,065
6.	$\pm$	$\pm$	$\emptyset$	$\emptyset$	0,359
13.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\emptyset$	0,085
15.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\pm$	0,135
24.	$\pm$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	0,183
32.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\emptyset$	0,072
40.	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\emptyset$	<u>0,410</u>
47.	$\pm$	$\pm$	$\emptyset$	$\pm$	<u>0,650</u>
62.	$\pm$	$\pm$	-	$\pm$	0,300
67.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\emptyset$	0,125
70.	$\pm$	$\emptyset$	-	$\pm$	0,370
87.	$\pm$	$\pm$	$\emptyset$	$\pm$	<u>1,150</u>

Vizelet: $\emptyset$: 7
 $\pm$: 4
 $+$: 1
összesen: 12



A Gy.P. 65 negatív vérképe 9 esetben tért el a vizelet-tesztok eredményeitől, a következő megoszlásban:

Vérkenet:	∅	:	65
Vizelet:	∅	:	56
	+	:	4 / 17, 46, 84, 88 /
	+	:	4 / 23, 27, 42, 50 /
nincs	:	:	1 / 75-ös /
összesen	:	:	65

A P.f. 50 kontrolljának eredményeit az alábbiakban foglaltam össze:

VI. TÁBLÁZAT

Sorszám	Vérkenet	Vizelet			
		Emésztés		Perry	Manley
		I.	II.		
5.	+	+	+	+	<u>1.500</u>
28.	+	+	-	+	<u>1.400</u>
	Vizelet: ∅	:	0		
		+	:	1	
		+	:	1	
	összesen	:	2		
30.	+	+	-	+	<u>0.700</u>
33.	+	∅	-	∅	<u>0,650</u>
	Vizelet: ∅	:	1		
		+	:	1	
		+	:	0	
	összesen	:	2		

Vérkenet	∅	:	46
Vizelet	∅	:	43
	+	:	3 / 1, 41, 49 /
	+	:	0
Összesen:			46

A klinikai vizsgálatokból adódó tapasztalat alapján az egyes teszt-eredményekre a következő értékelést, - vagy ahol több eset lehetséges - , valószínűségi sorrendet lehet megállapítani:

- + vérkenet: homo- és heterozygota
- + vérkenet: 1./ fiziológias variáció felső határa
- 2./ heterozygota
- 3./ homozygota

Azt a sokáig biztosnak látszó feltevésünket, hogy a vérkép kóros sejttípusainak százalékos különbsége alapján a homo- és heterozygoták elkülöníthetők, nem sikerült egyértelműen igazolni. A jelenlegi vizsgálatok szerint ez izoláltan / csak a vérkép alapján / nem dönthető el.

- + vizelet: homozygota
- + vizelet: 1./ heterozygota
- 2./ koncentrált vizelet
- 3./ enzim : MPS arány nem volt kielégítő

/ Ehhez ad felvilágosítást a Manley-teszt; a turbidimetriás mérés pozitivitása adódhat a magas / bár normál / MPS-tartalomból, tehát az emésztés után maradó pozitívitas esetleg az elégtelen enzimmennyiség rovására írható. Alacsony Manley-érték mellett maradó emésztéses folt esetén valószínűbb, hogy kóros a vizelet. /

- + vérkenet és + vizelet: biztos homozygota / 100 % /
- + vérkenet és + vizelet: 1./ homozygota / 50 % /
- 2./ heterozygota / 50 % /
- + vérkenet és ∅ vizelet: heterozygota

/ 11 bizonyított heterozygota szülónél - akik igen kevés / normális mennyiségben / ürítettek MPS-t, de kóros frakciókat is - csak 3-nál támogatta az emésztés is a diagnózist. /

+ vizelet és + vérkenet: homozygota

+ vizelet és $\emptyset$ vérkenet: nagy valószínűséggel homozygota, mert vannak olyan esetek, ahol nincs vizelet-pozitivitás / MPSD VI. /.

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Munkám során célul tűztem ki a következő feladatok elvégzését:

1./ Olyan teszt-rendszer összeállítása, mely az MPSD rutin szűrésére alkalmas.

2./ E szűrővizsgálati rendszerrel adatokat szerezni a MPSD gyakoriságáról szellemileg enyhén retardált gyermekközösségben, illetve normál populációban.

1.a./ A szűrőprogramba 4. az irodalomból átvett, a klinikán már évek óta alkalmazott tesztet vetünk be / Perry, Manley, Berry a. és b. /. Sajnos ezek sem bizonyultak kielégítőnek rutin szűrővizsgálati célra, mert igen sokszor zavaró, felesleges vizsgálatokat indukáló téves pozitív, és ha ritkábban is, de szintén félrevezető téves negatív eredményeket adtak. Természetesen e tapasztalat nem megnyugtató, amikor egy betegségesoporra jellemző, alapvetően fontos vizsgálati adatot várunk.

Lényegében mindegyik módszer kvantitatív jellegű, a globálisan fokozott MPS-ürítést regisztrálja

sok hibaforrással. Szükségesnek találtuk egy olyan szűrővizsgálati eljárás kidolgozását, mely hatékonyabb, kvalitatív jellegénél fogva specifikusabb; segítségével bizonyítható, hogy a gyanús beteg a MPSD-osok döntő többségére jellemző kóros frakciókat / CSB, HS, KS / üríti. E célra az eredeti Berry-eljárást módosítottuk. A vizeletből CETAVION-nal kicsapott és tisztított MPS-eket tesztikuláris hialuronidázzal acetát pufferben inkubáljuk, majd az inkubáció előtti és utáni oldatokból cseppentünk fel Whatmann No 1. szűrőpapírra. Ha toluidinkékkel történő festést követően az inkubált MPS-praecipitátum helyén liláspiros folt marad vissza, ez hialuronidáz-rezisztens, kóros frakció jelenlétét igazolja, mert az enzim a hialuronsavon / HA / kívül a normális frakciókat, a CSA-t és CSC-t hidrolizálja, elbontja. Standard MPS-ekkel dolgoztuk ki a módszer optimális körülményeit. Az igen ritka HA, illetve CSA és CSC-ürítéssel járó formák diagnosztikára természetesen nem alkalmas. Az eljárás megbízhatósága javítható azzal, ha konzerválószerrel gyűjtött 12-24 órás vizeletekből végezzük a vizsgálatokat.

1.b./ A vérkenet vizsgálata nem szerepel az irodalom által ajánlott rutin MPSD-os diagnosztikai eljárások között, még kevésbé a kongenitális anyagcserebetegségek screeningprogramjaiban. Mi is kezdetben a 6. helyen szerepeltettük, viszont ma már a hagyományos vizeletszűrő módszereknél értékesebbnek tartjuk. Természetesen gyakorlat szükséges ahhoz, hogy biztonsággal felismerjük és metachromasiásnak minősíthessük az inklúziókat és esetleg ismételt vizsgálat a jelenség intermittáló jellege miatt. Annak, hogy vérvizsgálati módszerünkkel valós eredményeket kapjunk, számos fel-tétele van.

A toluidinkékes festési technikát ismert és még ismeretlen faktorok befolyásolhatják, ezért szük-

séges a vegyszerek és körülmények standardizálása, továbbá nagy gyakorlat ahhoz, hogy a kenetek pozitívítását egyöntetűen tudjuk megítélni.

Differenciál-diagnosztikai nehézséget vethet fel a "toxicus granulatio" jelensége. Irodalmi adat, hogy a toxicus - septicus állapotban lévő gyermekek fehérvérsejtjeiben May-Grünwald-Giemsa festéssel durva lilás, vagy sötétkék diffúz szemcsészettség jelentkezik. Klinikai tapasztalat szerint ezek a granulumok a periferiás leukocytákban egyrészt orthochrom, másrészt metachromasiás jellegűek. A toxicus granulatio egyéb kísérő tünetei révén különböztethető meg a MPSD-től. Ezek a következők:

- leukocytosis / a fehérvérsejtszám nagyobb, mint 10000 /
- balratolt vérkép
- infectio mutatható ki az anaemiasisban.

Kóros szemcsészettség toxicus granulatióban csak a neutrophil leukocytákban fordul elő, a lymphocytákban és monocytákban soha. Hialuronidáz enzimmel anyaga teljesen feloldódik, megemésztődik / ezután nem adja a metachromasiát /. Az infectio vagy toxicus állapot lezajlása után nyomtalanul eltűnik. Vizsgálatainkat célszerű tehát esetleges hurutos, lázas betegség lezajlása után elvégezni.

A téves pozitív eredmények kiküszöbölése érdekében feltétlenül szükséges, hogy a kék színű, orthochromasiás festődésű szemcséket megkülönböztessük a liláspiros metachromasiásaktól. Ehhez gondos megfigyelés és nagy gyakorlat szükséges. Fekete színű szemcsék is adhatnak félrevezető eredményt, ezek a MOTA-féle fixálásnál ólomkicspódás okozta műtermékek.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a metilalkoholos fixálás után kevesebb pozitív eredményt kaptunk, mint MOTA-oldattal. Mi lehet ennek az oka?

Feltéhetőleg az, hogy metanolunk kevés vizet tartalmazott, mely kioldotta a sejtekben tárolt MPS-ék egy részét. Azt is látjuk azonban, hogy bár a MOTA-fixálással átlagban több a pozitív eredmény, néha csak a metanolos kenetben láthatók a liláspiros szemcsék.

A jelenség magyarázata a következő: a metachromasiás festődés mértéke függ a chromotrop anyag / jelen esetben a MPS / negatív töltésének sűrűségétől, ez pedig a pH függvénye. Míg a MPS-ék $-COOH$ csoportjai pH 6 körül disszociálnak legjobban, a $-SO_4$ és $-PO_4$ gyökök számára a savas közeg az optimális. Következésképp a neutrális pH-jú metanolos fixáláskor elsősorban a kevésbé szulfatált MPS-ék, pl. heparitinmonoszulfát / HM /, festődnek jól; míg az erősen savanyú MOTA-oldat a tulsulfatált CSB és HEP feltűntetésére alkalmas.

Gyakran láttunk MPSD-os betegek vérkenetében u.n. basophiloid sejteket. / McKusick a finom diffúz szemcsészettségű Reilly-sejttől megkülönböztetve neutrophil 2. típusnak nevezi. / 1-2 %-os előfordulásukat gyamujelnek tekintjük, de önmagában / egyéb pozitív sejtalakok nélkül / nem tartjuk kórjelzőnek.

A klinikai tapasztalatok birtokában kezdtük el a szűrővizsgálatokat a Gyógypedagógiai Általános Iskolában, melynek során 100 szellemileg retardált, s így a betegség egyik jellemző tünete által egyben szelektált, gyerekekről szereztünk adatokat. Összehasonlítási alapul szolgált a Pedagógiai Főiskola I. Gyakorló Általános Iskolájának 50 növendéke.

2./ A Gy.P. vizsgálatának összesített eredményei:

Vérkenet	Vizelet				Össz.
	Ø	±	+	nincs	
Ø	56	4	4	+1	65
±	7	4	1		12
+	9	4	3	+1	17
Össz.:	72	12	8		

Vérkenet Ø : 65 = 69,14 %
 ± : 12 = 12,76 %
 + : 17 = 18,08 %
94

Vizelet Ø : 64 = 69,57 %
 ± : 12 = 13,04 %
 + : 16 = 17,40 %
92

A P.f. kontrolljának összesített eredménye:

Vérkenet	Vizelet				Össz.
	Ø	±	+	nincs	
Ø	43	3	0		46
±	1	1	0		2
+	0	1	1		2
Össz.:	44	5	1		

Vérkenet Ø : 46 = 92 %
 ± : 2 = 4 %
 + : 2 = 4 %
50

Vizelet Ø : 44 = 88 %
 ± : 5 = 10 %
 + : 1 = 2 %
50

Meglepő módon az emésztéssel gyanus vizeletle-
letek százaléka elég közeli érték a Gyógypedagógiai
és a Gyakorló Iskolában / 13 %, illetve 10 % /. Való-
színű magyarázat: mivel a szűrések nagyrészt egyszeri
/ és nem gyűjtött / vizeletből történtek, ebből végez-
tük el a kvantitativ / Perry, Manley / vizsgálatokat.
Ennek következtében a vizsgálatra került vizeletben
lévő - részben az aktuális MPS-ürítéstől, részben
a vizelet koncentrációjától nagymértékben függő -
MPS-tartalom nem reprezentálja megbízhatóan a vizsgá-
latra került egyénnél a MPS-ürítés mértékét és milyen-
ségét. Pontosabb, megbízhatóbb eredményt 12-24 órás
gyűjtött vizelet analízise adna. Azonban még ilyenkor
is számolni lehet a MPSD-betegségcsoportban észlelt
azon lehetőséggel, hogy nemcsak egymást követő napokon,
de napszakosan is igen változó lehet a MPS-ürítés,
és emiatt kapjuk a kvantitativ szűrőtesztekkel / a már
említett / téves pozitív, vagy téves negatív eredmé-
nyeket.

Ha e megfontolások alapján újraértékeljük a
vizsgálataink során kapott gyanus emésztéses lelete-
ket az ugyanazon vizeletmintákból mért kvantitativ
teszt-eredményekkel, a következő érdekes különbségek-
hez jutunk: a Gy.P. 13 %-ban gyanus emésztéses
leletet adó vizelet-mintájából / mely 12 gyereket
reprezentál / 5 gyermeknél negatív mind a Perry,
mind a Manley, 7 gyermeknél vagy az egyik, vagy a
másik pozitív, de sohasem együtt! Ha csak a megbízha-
tóbb Manley + eseteket vesszük figyelembe, 3 gye-
reknél bizonyítható fokozott vizelet-MPS-tartalom.
Eszerint a 12 gyanus vizeletből csak 3-nál / 12 : 3 /.
A P.f. 4 gyanus emésztéses esetéből 4-nél találtam
fokozott ürítést, éspedig mindkét kvantitativ teszttel
/ az arány tehát 4 : 4 /.

Ezek az arányok arra intenek, hogy esetleg a kvantitativ tesztek eredményeit fel kell használnunk arra, hogy az igen magas / különösen 1 egész feletti / Manley-értékek esetében nagyobb enzim mennyiséget alkalmazunk az emésztésnél; mert lehetséges, hogy a gyanus vizeletek egy része a P.f.-en az elégtelen enzim rovására írható. Ez nem mondható el a Gy.P.-ról, ahol 12 gyanus vizeletből csak 3 mutatott emelkedett MPS-tartalmat, így többségükben relatív nagyobb mennyiségű kóros frakció volt, amely legalábbis a heterozygotáknak felel meg.

Nézzük még egyszer a vizsgálat adatait!

Gy.P.

Vérkenet	±	:	12,76 %	Vizelet	±	:	13,04 %
	+	:	$\frac{18,08 \%}{30,84 \%}$		+	:	$\frac{17,40 \%}{30,44 \%}$

P.f.

Vérkenet	±	:	4 %	Vizelet	±	:	10 %
	+	:	$\frac{4 \%}{8 \%}$		+	:	$\frac{2 \%}{12 \%}$

Megállapíthatjuk, hogy az enyhén imbecill Gy.P.-sok között nagyfokú halmozódását találtuk a MPSD-ra utaló klinikai leleteknek. Mindez tájékoztató és impresszionáló, ilyen hatásfokú módszerekkel még nem történt vizsgálat hasonló közösségen. Ezek az eredmények további részletes vizsgálatok alapjául szolgálhatnak.

A P.f.-en talált pozitív és gyanus leletek és MPSD-ra mutató tünetek gyakorisága sokkal kisebb, de várakozáson felüli; és valószínűleg még tapintatosabban és körültekintőbben kivitelezett vizsgálatokat igényel bizonyítása. Nehéz hinni a megdöbbentően magas számadatoknak, de két tény alapján nagyon is elképzelhető, hogy ezek az eredmények valósak, és ezek a gyere-

kek nemcsak hetero-, hanem homozigoták is lehetnek a betegségre nézve.

1./ Ugy az irodalom, de különösen a klinika adatai alapján egyre nyilvánvalóbb, hogy genetikusan mind heterogéennebbnek bizonyuló, fenotipusosan rendkívül variábilis betegségcsoport a MPSD.

2./ A veleszületett anyagcserebetegségek kutatása - főként az utóbbi 5 év tapasztalatai alapján - bizonyítja, hogy ugyanazon enzimdefektushoz kapcsolódó klinikai tünetek súlyossága a homozigotáknál igen széles skálájú lehet.

Pl. - az aminoacidopátiák prototipusa: a fenilketonuria, az esetek kb. 5 %-ában normális intelligenciával jár.

- Még meglepőbb Garrard-ék / am. / eredménye. A homocystinuriának nevezett anyagcserebetegség egyik jellemzőnek tudott szentünete / az "ectopia lentis" / alapján kezdtek szűrővizsgálatot. Ugyanez a tünet jellemzője a Marfan-szindrómának is. Mindkét betegség mentális retardációval jár / intelligencia kvóciens 50 alatt /. A több ezer átvizsgált beteg között találtak 38 homocystinuriást, ezek közül 16-nak normális intelligenciája volt.

Vizsgálati eredményeink alapján úgy találjuk, hogy a MPSD hazánkban sokkal gyakoribb enzimopátia, mint azt az irodalom hozzávetőleges adatai alapján hinnénk. A betegségcsoport nagyfokú variabilitása és az a tény, hogy a klinikai tünetek súlyossága igen széles határok között változhat, magyarázza, hogy sok esetben nem is diagnosztizálják.

Szűrővizsgálat céljára ajánljuk módszerünket, a vizelet módosított Berry-féle vizsgálatát. Hatékony-ságát nagymértékben fokozza a perifériás vérkenet tolu-idínkékes festése a módosított MOTA-fixálás után.

IRODALOM

1. Berzy H., Spinanger J.: Screening Test for Hurler's syndrome.
J. Lab. Clin. Med. 55 / 1960 /.
2. Bihari-Varga M.: A mukoproteidek és glikoproteidek kórtája.
Referátum 1970.
3. Cantz M., Chamrach A., Neufeld P. E.: Characterisation of the factor deficient in Hunter syndrome.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 / 1970 /.
4. Carter Ch. H., Wan A. T., Carpenter D. G.: Commonly used tests is the detection of Hurler's syndrome.
J. Pediat. 73 / 1968 /.
5. Danes B. S., Bearn A. G.: The effect of retinol on urinary excretion of mucopolysaccharides in the Hurler syndrome.
Lancet 1 / 1967 /.
6. Dorfman A., Matalon R.: The Hurler and Hunter Syndromes.
Am. J. Med. 47 / 1969 /.
7. Dorfman A., Lőrincz A. E.: Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the Hurler syndrome.
Proc. Nat. Acad. Sci. 43 / 1957 /.
8. Garrard, Starling D.: On the Diagnosis of Syndromes in Mental Retardation.
Pediat. Clin. N. Am. 15 / 1958 /.
9. Józsa L.: Orvosképzés 43 / 1968 /.
10. Józsa L., Szabó L.: Urinary Hyaluronidase Activities in Mucopolysaccharidosis.
Acta Paediat. Acad. Sci. Hung. 10 / 1969 /.
11. Lundquist A., Öckerman P. A.: Fine-needle aspiration biopsy of human liver for enzymatic diagnosis of glycogen storage disease and gargoylism.
Acta Paediat. Scand. 59 / 1970 /.

12. Manley H., Hawksworth J.: Diagnosis of Hurler's syndrome in the hospital laboratory and the determination of its genetic type.
Arch. Dis. Child. 41 / 1966 /.
13. McKusick V. A.: Heritable disorders of connective tissue.
C.V. Mosby Company, Saint Louis 1966.
14. McKusick V. A.: The Nosology of the Mucopolysaccharidoses.
Am. J. Med. 47 / 1969 /.
15. Meyer K.: Biochemistry and Biology of Mucopolysaccharides.
Am. J. Med. 47 / 1969 /.
16. Meyer K., Grumbach M. M., Linker A., Hoffman P.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97 / 1958 /.
17. Muir H.: The structure and Metabolism of Mucopolysaccharides / glycosaminoglycans / and the problem of Mucopolysaccharidoses.
Am. J. Med. 47 / 1969 /.
18. Muir H., Mittwoch U., Bitter T.: The diagnostic value of isolated urinary mucopolysaccharides and of lymphocyte inclusions on gargoylism.
Arch. Dis. Child. 38 / 1963 /.
19. Neifeld E. F., Fratantoni J. C.: Inborn Errors of Mucopolysaccharide Metabolism.
Science 169 / 1970 /.
20. Öckerman P. A.: Diseases of Glycoprotein storage.
Lancet 1 / 1967 /.
21. Parwaresch M. R., Lennert K.: Zur Differenzierung der Blut basophilen und gewebes matsrellen nach dem Reifegrad ihrer Granula.
Histochemie 19 / 1969 /.
22. Perry Th. L., Hansen Sh., MacDougall L.:
Canad. Med. Ass. J. 95 / 1966 /.
23. Rajk A., Tóth É., Józsa L.: Orv. Hetil. 111 /1970/.
24. Rampini S.: Das Sanfilippó-Syndroma / polydystrophe Oligophrenie, HS-Mucopolysaccharidose /.
Helv. Paediat. Acta 24 / 1969 /.
25. Schuster W., Springer J.: Diagnose und Differential Diagnose der Mucopolysaccharidosen.
Pädiat. Prax. 8 / 1969 /.

26. Spranger J., Wiedemann H. R.: Biochemische Differenzierung der Mucopolysaccharidosen. Mschr. Kinderheilk. 118 / 1970 /.
27. Steiness I.: Acid mucopolysaccharides in urine in gargylism. Pediatrics 27 / 1961 /.
28. Szabó L., Polgár J. Vass Z., Józsa L.: Hurler-variant. Lancet 2 / 1967 /.
29. Szabó L.: A mucopolysaccharidosisek jelentősége a klinikai gyakorlatban. Referátum 1971.
30. Taketomi T., Yamakawa T.: Glycolipids of the Brain in gargylism. Jap. J. Exp. Med. 37 / 1967 /.
31. van Hoof F., Hers H. G.: The abnormalities of lysosomal Enzymes in Mucopolysaccheridoses. Europ. J. Biochem. 7 / 1969 /.

Köszönetet mondok Dr. Bodn Donokos igazgató
urnak, hogy a kísérletes rész elvégzését a Gyermek-
klinikán lehetővé tette és Dr. Móczár László profess-
zor urnak a gyermekklinikai munka engedélyezéséért
és támogatásáért; továbbá Dr. László Aranka tanár-
segédnőnek és a team-munkacsoport tagjainak a szűrő-
vizsgálatok elvégzésében való részvételükért, valamint
a laboratórium dolgozóinak munkám során nyújtott
segítségükért.

Külön szeretném megköszönni Dr. Szabó Lajosnak
- a SZOTE Gyermekklinikája volt docensének - a vizs-
gálatok elvégzésénél nemszenenő támogatását és hasznos
szakmai tanácsait.

