B 3813

LABORDIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁSOK

BEVEZETÉSE A KLINIKAI GYAKORLATBAN

DR. BARISKA JÁNOS

Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet
Központi Laboratóriuma
Budapest

1998

TARTALOM

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 2

BEVEZETÉS 3

A FEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE 4

CÉLKITŰZÉS 5

A SZÉRUMLIPOPROTEINEK VIZSGÁLATA 5

CÉLKITŰZÉS 6

GYÓGYSZERSZINTMÉRÉS 7

CÉLKITŰZÉS 8

MÓDSZEREK 10
- I. A szérumfehérjék elektroforézise 10
- II. A szérumlipoproteinek vizsgálata 17
- III. Gyógyszerszintmérés 23

EREDMÉNYEK 31
- I. A szérumfehérjék elektroforézise 31
- II. A szérumlipoproteinek vizsgálata 35
- III. Gyógyszerszintmérés 39

ÖSSZEFOGLALÁS 42

IRODALOM 49

PUBLIKÁCIÓK 51

MELLÉKLET 56

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm ***Dr. Bálint Géza*** főigazgató főorvosnak, hogy munkám feltételeit biztosította.

Köszönöm ***Dr. Juhász Péter*** osztályvezető főorvosnak munkám elméleti és gyakorlati kérdéseiben nyújtott folyamatos segítségét.

Köszönöm a ***Központi Laboratórium valamennyi munkatársának*** támogatását.

Köszönöm az ***ORFI mindazon munkatársának*** segítségét, akik valamilyen formában segítették munkámat.

Köszönöm ***Dr. Matkovics Béla*** egyetemi tanárnak szakmai tanácsait és folyamatos érdeklődését, amellyel e munka elkészültét kisérte.

BEVEZETÉS

A klinikai kémia elméletének és gyakorlati eredményeinek alkalmazása az egészségügyi intézmények laboratóriumai számára nélkülözhetetlenek. Alapvető érdek fűződik mind az egészségügyi szolgáltatást nyújtók, mind a betegek részéről ahhoz, hogy a laboratóriumi vizsgálatok minél olcsóbbak legyenek s egyúttal feleljenek meg a legmagasabb szintű minőségi követelményeknek. Ez biztosíthatja csak azt, hogy elkerülhetők legyenek a vizsgálatismétlések és a klinikus orvosok diagnosztikus tevékenységét-, valamint a kívánatos terápia felállítását folyamatosan segíthesse a laboratóriumi szakszemélyzet. Ugyanakkor az egészségügyi intézmények érdekelt vezetőinek elemi kötelessége azon fáradozni, hogy a klinikai kémiai laboratóriumok megfelelő műszerekkel való ellátását, azoknak időben történő pótlását megoldják.

Mivel a laboratóriumokban végzett vizsgálati eljárások számos alapanyaga, az elterjedten használatos tesztek nagy része, az alkalmazott vegyszerek nem kis hányada csak külföldről szerezhető be világpiaci áron, elemi érdeke fűződik minden laboratóriumnak ahhoz, hogy saját maga gondolkodjon azon milyen új vizsgálati eljárásokkal-, esetleg vizsgálati módszerek módosításával, vagy szükséges anyagok helyettesítésével csökkentheti a laboratóriumokra nehezedő anyagi terhet.

A fentiek vezettek arra, hogy megpróbáljak abba az irányba lépni, amely egyrészt olcsóbbá teszi a laboratóriumi tevékenységet, ugyanakkor ez nem rontja le azt a minőséget, amelyet joggal elvár a szakma illetve a gyógyítást végző klinikus orvos.

Tevékenységem három területre irányult:

- a fehérjék elektroforézise,
- a lipidek vizsgálata,
- a gyógyszerszintmérés

Ez indokolja azt, hogy disszertációm e hármas tagolódást követi.

A FEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE

A fehérjékben genetikailag meghatározott *minőségű aminosavak,* ugyancsak genetikailag *meghatározott számban* és *sorrendben* kapcsolódnak egymáshoz. Ezt az aminosavsorrendet nevezzük a fehérje *elsődleges /primer/* szerkezetének, amely az egyes fehérjéket elsősorban megkülönbözteti egymástól és alapvetően meghatározza szerkezeti és funkcionális tulajdonságaikat.

A fehérjék *másodlagos szerkezetét* a peptidkötések karbonil /=CO/ és imino- /=NH/ csoportjai között létrejövő *hidrogénhidak* stabilizálják. A szerkezet stabilitása a létrejövő *hidrogénhidak* számától függ. Két kitüntetett ismétlődést */periociditást/* mutató másodlagos szerkezet figyelhető meg: a *csavarmenetes /helikális/* és a *redőzött /lemez-/* szerkezet.

A fehérjék *harmadlagos* szerkezetét a periodikus szerkezet kialakulását gátló aminosavak /Gly, Pro, Asp/ jelenléte adja. Ezen aminosavak a peptidkötések síkjának rotációját teszik lehetővé. A peptidlánc felcsavarodik és ezáltal az aminosavsorrendben távoli aminosavak egymáshoz a térben közel kerülnek. Ezáltal alakulnak ki a fehérjemolekuláknak a funkció szempontjából kitüntetett struktúrái , mint pl. az enzimek *aktív helyei,* az immunglobulinok *antigénkötő helyei* stb. E harmadlagos szerkezet egyben azt is jelenti, hogy a fehérjemolekuláknak van *belseje* /itt a *hidrofób* kölcsönhatások érvényesülnek/ és megtalálható a *felszine* /ahol a *poláros oldalláncokat* tartalmazó aminosavak helyezkednek el. A biológiailag aktív fehérjék funkciója csak megtartott harmadlagos szerkezet mellett biztosított.

A fehérjék közül többen azzal tűnnek ki, hogy funkcionális molekuláit nem egyetlen polipeptidlánc alkotja. Az ilyen fehérjéket *oligomer fehérjéknek* nevezzük, a felépítő egységek /polipeptidek/ a *protomerek ill. alegységek.* Ezek adják a fehérjék *negyedleges* szerkezetét.

A fehérjekonformáció kialakításában két környezeti tényezőnek jelentős szerepe van:

- a fehérjemolekula azon részei, amelyek elektromos polaritással rendelkeznek */hidrogénkötésre* alkalmasak, erősen *hidratálódnak* és eltávolodnak egymástól /
- az *apoláros* aminosav-oldallácú molekulaszakaszok viszont összetömörödnek

Azon fehérjék, amelyekben sok poláros oldallánc van a *hidratáció* következményeként a vizes közegben *oldott állapotban* vannak. A molekula disszociáló csoportjai a hidrogénion koncentrációtól függően ionizáltak , és ennek megfelelően *elektromos térben* az anód ill. a katód felé vándorolnak. Ezen *elektroforézis* jelenséget használhatjuk fel a klinikai laboratóriumokban a fehérjék szétválasztására. A gyakorlatban csaknem kizárólag un. *zónaelektroforézis* kerül alkalmazásra, ami hordozóanyagon történő vándoroltatást jelent. A hordozóanyag lehet: *szürőpapír, cellulózacetát, keményítő, agaróz, agar, poliakrilamid* stb.

CÉLKITŰZÉS

A humán orvosi gyakorlatban a szérum /vizelet, synovia/ elektroforézisének kiemelt jelentősége van. Megerősíthet egy iránydiagnózist ill. iránymutatásul szolgálhat a megfelelő terápiás kezelési terv elkészítésébe. Intézetünkben évente kb. 18000 szérumelektroforézis vizsgálat készül. A külföldön elérhető kész agar-agaróz réteget tartalmazó elektroforézis-lemezek nagyon drágák. Ez késztetett arra, hogy kidolgozzuk a megfelelő összetételű lemezre felvihető gélréteg összetételét , s megoldjuk a folyamatos gélöntés technológiáját.
Ugyancsak feladatként jelöltük meg az alkalikus-foszfatáz /AP/ izoenzimek-, a laktátdehidrogenáz /LDH/ izoenzimek-, valamint az amiláz-izoenzimek elektoforézis utján történő elválasztásának kivitelezését. A fent megnevezett izoenzimek szétválasztásának az adja meg a jelentőségét, hogy adott beteg szérumából mért nagy enzimaktivitása esetén - az elektroforézises szétválasztás hiányában - nem derül ki, hogy a magas aktivitásnak mi a valódi oka. Az elektroforézis elvégzése esetén viszont egyértelműen megállapítható, hogy az adott izoenzimek közül melyik /pl. LDH esetén a szövetekben ötféle hibridforma található/ felszaporodása okozta a magas enzimaktivitást. Ezen speciális szérumizoenzim elektroforézis kiértékelése komoly segítséget ad a klinikus orvosok kezébe egy adott diagnózis felállításában.

SZÉRUMLIPOPROTEINEK VIZSGÁLATA

A lipoproteinekről szerzett ismereteink az utóbbi időkben megsokszorozódtak, számos új adat került megismerésre a hyperlipoproteinaemiák pathomechanizmusában is.
A plazma lipidek közül a trigliceridek /TG/ elsősorban energiahordozók, míg a koleszterin /K/, a koleszterinészter /KÉ/ és a foszfolipidek / PL/ a sejtek építőkövei.
A vízben oldhatatlan lipidek a plazmában fehérjékkel makromolekuláris lipid-fehérje koplexeket az un. lipoproteineket alkotnak. A lipoproteineket alkotó fehérjék - az *apoproteinek* - nemcsak a részecskék strukturanyagai, hanem a lipoproteineket felismerő sejtfelszini *receptorok* ligandumai és a lipoproteinek /LP/ anyagcseréjében szereplő enzimek szabályozói.
A cardiovasculáris megbetegedések prevenciójában, diagnosztikájában a klinikai laboratóriumi vizsgálatok mind nagyobb szerepet kapnak. Egyöntetű vélemények szerint a cardiovasculáris betegségek vonatkozásában un. hajlamosító tényezők - *rizikófaktorok* - ismeretesek. Elsődleges rizikófaktorok: a hyperlipoproteinaemia, a dohányzás, a hipertónia. Másodlagos rizikófaktorok: a túlsúly, a mozgáshiány,

a Diabetes mellitus, a köszvény és a hiperurikémia, a Policitaemia. További rizikófaktorok: előrehaladott szívinfarktus, rossz irányú EKG változások.
A rizikófaktorok egy része /hyperlipoproteinaemia, hyperglikaemia, hyperurikaemia / csak laboratóriumi vizsgálatokkal mutatható ki. Ezek közül legnagyobb jelentőséget a lipidanyagcsere zavarainak tulajdonítunk. A szérumminták vizsgálatával megállapítjuk a hyperlipoproteinaemia fennállását, s nagyrészt az így kapott leleteken alapul a hyperlipoproteinaemiák típusmeghatározása is, melynek prognosztikai és terápiás jelentősége is van. A *Fredrickson-féle* lipidanyagcsere zavar típusai:

- I. Típus: lipoproteinlipáz hiányzik vagy csökkent működésű,
- II/A Típus: emelkedett szérumkoleszterin szint,
- II/B Típus: emelkedett szérumkoleszterin és szérumtriglicerid szint,
- III. Típus: szérum - lipidelektroforézis során prebéta- ill. betalipoprotein nem válik szét un. broad -béta lipoprotein alakul ki.
- IV. Típus: szénhidrát-indukálta zsíranyagcserezavar,
- V. Típus: zsírindukált zsíranyagcserezavar

Újabban a genetikai alapon történő felosztást alkalmazzák:

- Exogén hyperlipaemia /CHY/ - a Fredrickson I. Típusnak felel meg . /LPL hiány/
- Endogén hyperlipaemia/VLDL/-a Fredrickson IV. Típussal azonos,
- Kevert hyperlipaemia /VLDL + CHY/- a Fredrickson V. típusnak felel meg
- Hypercholesterinaemia /LDL/- Fredrickson II/A típusnak felel meg,
- Kombinált hyperlipaemia /LDL+VLDL/ - Fredrickson II/B típusnak felel meg,
- Remnant hyperlipaemia /IDL/- Fredrickson III. típusnak felel meg,
- Lamellaris hyperlipaemia: oka familiaris LCAT hiány

A jelölések jelentése: CHY= Chylomicron, LPL=Lipoproteinlipáz, VLDL= Very Low Density Lipoprotein, LDL= Low Density Lipoprotein, IDL= Intermediete Density Lipoprotein, HDL=High Density Lipoprotein, LCAT=Lecitin-Cholesterin-Acil-Transferase. HPL=Hyperlipoproteinaemiák.

A HPL kezelési irányelveit meghatározzák , hogy a beteget melyik Fredrickson féle fenotípus csoportba soroljuk be.

CÉLKITŰZÉSEK

A modern civilizációban élő emberek több, mint 5o %-a hal meg szív és keringési betegségek következtében. Hazánkban évente kb. 28ooo embert ér szívinfarktus. A klinikai laboratóriumokban ezért is fontos szerepet tölt be a lipidanyagcsere zavarokkal kapcsolatos vizsgálatok sora.

Célként tűztük ki mindazon vizsgálatok bevezetését ill. új módszerek kidolgozását, amelyek lehetővé teszik a gyors, olcsó, de a minőségi követelményeknek megfelelő vizsgálati panell beállitását. Ennek keretében beállítottuk az alábbi módszereket:

- **Precipitációs módszerrel választjuk szét, majd határozzuk meg a lipoproteineket,**
- **Saját öntésű gélen állítjuk be a szérum-lipoproteinek-elektroforézisét,**
- **Elektroforézises módszerrel határozzuk meg a Lp/a/-t,**
- **Turbidimetriás módszerrel határozzuk meg az apo-B-t, apo-A-t,**

Kidolgozunk egy , a lipidanyagcsere zavarok vizsgálatát szolgáló *laborvizsgálati tervet.* A klinikus orvosok munkájának segítése érdekében megszerkesztünk egy *TÁBLÁZATOT,* AMELY TARTALMAZZA A Fredrickson féle zsíranyagcsere zavarok típusainak elektroforetikus képét / a normál elektroforetikus képtől való eltérést/, a primer-és a szekunder zsíranyagcsere betegségek csoportosítását, valamint az ajánlott diétás ill. gyógyszerezési gyakorlatot.

GYÓGYSZERSZINTMÉRÉS

A medicina egyik legnagyobb gondja a fokozódó gyógyszerhasználat. Helytelen a gyógyszer felhasználása, ha:

- **az alkalmazott dózis elégtelen a hatáshoz,**
- **ha túladagoláskor nem kívánt, káros tünetek jelentkeznek.**

Számolni kell a gyógyszerekkel elkövetett öngyilkosságokkal, valamint azzal is, hogy hazánkat sem kerülte el a nyugtatókkal, altatókkal, kábítószerekkel ill. pótszerekkel történő - sajnos máris nagy tömegeket érintő- kereskedelem és az azokkal való visszaélés.
Krónikus gyógyszerszedés esetén a kumuláció súlyos toxikus állapothoz vezethet. Kézenfekvő, hogy a gyógyszerek vérszintmérését vagy az elterjedt szóhasználattal élve a drogmonitorozást /therapeutic drug monitoring/ a kórházi laboratóriumok végezzék. Az egyetemeken a gyógyszertani studiumok keretében a medikusok dozirozást tanulnak, de a terápiás gyógyszerszintekről alig hallanak.

Mely molekulák mérésének van értelme? Azoknak , amelyek a következő kritérium-akt teljesítik:

- a hatás reverzibilis,
- a terápiás index szűk,
- a vérszint és a hatás között van összefüggés /és ez utóbbi mérhető legyen /,
- az eredeti molekula és metabolitja/i/ között mennyiségi összefüggés legyen, különösen akkor, ha a metabolitok terápiásan aktívak,
- további szempont: egyáltalán beveszi e a gyógyszert a beteg?

A mérési eredmények alapján a klinikusoknak lehetősége van az individuális, egyénre szabott gyógyszerelésre.

Jelenleg nálunk az a helyzet, hogy a gyógyintézetbe utalt beteget a felvétele után azonnal vérvételre küldik és a diagnózishoz szükséges és szükségtelen vizsgálatok tömegét végzik a laboratóriumok. A vizsgálatok száma évente átlagosan 10 %-kal növekedik. A terápiánál azután néhány kivételtől eltekintve megszűnik a laboratóriumok szerepe, a beteg pedig a kialakult sémák szerint szedi a gyógyszert több, kevesebb eredménnyel.

A cél természetesen nem lehet a laboratóriumi vizsgálatok számának további növelése, hanem a betegágy mellett tevékenykedő orvos munkájának támogatása legyen a vér gyógyszerszintmérésének a célja.

Sok országban már klinikai farmakológiai részlegek működnek a nagyobb intézetekben. Itt a gyógyszermonitorozáson túl gyógyszerelési tanácsot is kaphat a klinikus. Ezek megszervezése nálunk is szükséges.

CÉLKITŰZÉS

Intézetünkben egyre több az idős beteg, akiket nem lehet úgy gyógyszerelni, mint a fiatalkorú vagy a középkorú betegeket.
Megváltozott a gyógyszerek metabolizmusa, kiválasztása, a receptorok érzékenysége.
Az idős betegeket általában több betegség miatt kezelik, fokozottan kell számolni interakciókkal , a megváltozott gyógyszerhatással. Ezek a körülmények szintén indokolttá teszik a vér gyógyszerszintmérését. Nem várt genetikai és interakciós tényezőkön alapuló vagy nem kívánt gyógyszerhatások válhatnak ismertté.

A fenti meggondolások vezettek abban, hogy Intézetünkben létrehozzak egy olyan laboratóriumot, amely :

- a szérumban /vizeletben/ kialakult gyógyszer szintjének mérésével foglakozik,
- farmakokinetikai mérések végzését teszi lehetővé,
- gyógyszerelési tanácsot adhat a klinikusok számára

A gyógyszerszintmérési munka egyik központi problémája, hogy a kérdéses gyógyszermolekulát vagy annak metabolitját mérjük e? Az ezzel kapcsolatos további probléma az autentikus molekula beszerzése azok standardként történő alkalmazásához.

Az adott gyógyszerek ill. azok metabolitjai mérésére a legalkalmasabb készülék a nagy érzékenységű folyadékkromatográfiás berendezés, melynek angol neve után /High Performance Liquid Chromatography/ a HPLC elnevezése terjedt el. Ennek egyik nagy előnye , hogy a kromatográfiás körülmények megfelelő átalakításával egyetlen kromatogrammon meghatározhatnánk az

- alapvegyületet /a megfelelő gyógyszermolekulát/,
- és annak metabolitját is.

A HPLC rutinszrűen alkalmazott módszerré válhat. Szerepe kettős:

- a nehezebb analízisek, mint a terápiás gyógyszermonitorozás elterjedtekké válnak, a HPLC válik standard módszerré a gyógyszerszintek mérésére,
- a HPLC standard módszerré válik a rutin eljárások ellenőrzésére s egyben az automatizált módszerek ellenőrzését is végezheti.

Célunk volt továbbá az, hogy az Intézet „beteganyagához" alkalmazkodva olyan gyógyszerszintmérések elvégzésére tegyük alkalmassá a laboratóriumot, amely részben segíti a klinikus orvosok munkáját, részben nyílt, prospektív IV. fázisú gyógyszervizsgálatot is biztosít.

MÓDSZEREK

I. A SZÉRUMFEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE

A szérumfehérjék elektroforézisét *zónaelektroforézissel* végezzük. Hordozóanyagként az 1980-as évek elején *szűrőpapírt* használtunk, azonban e módszer időigényessége, a szérumfehérjefrakciók nem megfelelő elválása és nem utolsósorban a vizsgálatkérések számának emelkedése miatt áttértünk a *cellulózacetát - fólia* hordozóanyagra. A cellulózacetát fólia mikroporózus, habszerű szerkezetű. Az egyéb fizikai és kémiai összetétele alapján alkalmas hordozóanyagként. Gyakorlatilag nem adszorbeálja a fehérjéket, azok jól frakcionálódnak rajta. Nem köti meg a festéket, tökéletesen színteleníthető. Teljesen átlátszóvá tehető, így fotometrálásra közvetlen alkalmas.

Cellulózacetát elektroforézis

- Szükséges anyagok:

1. Veronal puffer: 2,76 g dietil-barbitursavat és 15,4 g Na-dietil-barbiturátot oldunk 1000 ml deszt. vízben.
   A puffer többször használható !

2. Fixáló festék oldat: 0,5 g Ponceau S festéket, 7,5 g triklór-ecetsavat és 7,5 g szulfoszalicilsavat oldunk 25o ml deszt. vízben.
   Sötét üvegben tartandó és többször használható !

3. 5 %- ecetsav oldat:
   A használtat ki kell önteni !

4. Abs. alkohol:
   Az üvegből kivett mennyiség fél napig használható !

5. Transzparens oldat: 25 ml jégecetet és 75 ml abs. alkoholt elegyítünk.

■ **Munkamenet**

Készítsük elő műanyag vagy üveg edényekbe az alábbi odatokat:

1. **100 ml Veronal puffer**
2. **100 ml Fixaló festék oldat**
3. **100 ml 5 %-os ecetsav oldat**
4. **100 ml 5 %-os ecetsav oldat**
5. **100 ml 5 %-os ecetsav oldat**
6. **100 ml abs. alkohol**
7. **Egyenlőre hagyjuk üresen**

Áztassunk be egy cellulózacetát membránt 3-4 percre az előkészített Veronal pufferbe. Közben 8 szérummintából vigyünk fel 10 -10 ul-t egy parafilm csíkra. A pufferből kivett membránt itassuk le az e célra szolgáló itatós papírral. Rögzítsük a kádban, amelybe előzőleg puffert öntöttünk. A mintákat az „A" jelzésű helyen vigyük fel a membránra. Minden minta felvitel után a felvivőt öblítsük el deszt. vízben. Zárjuk le a kádat, csatlakoztassuk az áramforráshoz. Az órát állítsuk be 18 percre. A kezdeti áramerősség 4 - 6 mA között legyen. _Az alkalmazott feszültség értéke 27o V. Az elektroforézis befejezésekor vegyük ki a membránt és kb. 7 - 1o percre tegyük bele a fixáló festék oldatba. Az ezután következő három edényben - amelyekben 5 %-os ecetsav oldat található - a membránt 1-1 percig differenciáljuk. A következő lépés az, hogy abs. alkoholos oldatban áztatjuk a membránt 1 percig. Közben elkészítjük a transzparáló oldatot és beleöntkük az üresen hagyott hetedik edénybe. Ebbe tegyünk egy megfelelő méretű - a membrán mérténél valamivel nagyobb - üveglemezt. Légmentesen simítsuk rá a cllulózacetát fóliát. Egy perc múlva üveglemezzel együtt vegyük ki a membránt és hajszárítóval szárítsuk meg. Éles pengével válasszuk le az üveglemezről a cellulózacetát fóliát és Densitométerbe helyezve értékeljük ki.

A felhasznált membrán mérete: 145 mm hosszú és 57 mm széles ./Beckman „CELLULOSEACETAT-MEMBRAN - MICROZONE PLUS „ /

Agarózgél elektroforézis

- Szükséges anyagok

1. ORWOANALYT TRAGERFOLIE ET - 1OO

Méret: 24 x 3o cm, Vastagság: 0,18 mm
Az elektroforézishez használt lapméret: 75 x 100 mm

2. Az agaróz-agar gélréteg összetétele:

0,7 % agaróz, 0,3 % agar, 1,2 %-os barbital-puffer
0,2 % Na - azid, 0,1 % Ca-laktát

3. Barbital-puffer: pH : 8,6 ionerősség: o,o5

1500 ml deszt. vízben oldunk
2,76 g 5,5 dietil-barbitursavat
15,4o g 5,5 dietil-barbitursavas-Na-t

- Az agaróz alapú gélréteg öntési technológiája

1. 500 ml 1,2 %-os Barbitalpufferbe teszünk 3,5 g agarózt, 1,5 g agart, o,5 g Na-azidot.

2. Az oldatot forrásig melegítjük, majd kb. 30 percen át forrásban tartjuk.

3. A még forrsásban lévő agaróz oldatot 5 egyenlő részre osztjuk és 1oo - 1oo ml-es Erlenmayer lombikba szétosztjuk. /Az oldat lehűlés után megdermed és gélesedik./

4. A lemezre való öntés előtt a 1oo ml agaróz-oldatot újra forrásig melegítjük.

5. A méretre vágott ORWO lemezre / vagy lemosott Beckman lemezre/ - amelyet előzőleg szintező asztalra helyeztünk - 5,5 ml agarózgélt viszünk fel pipettával egyenletesen, majd 2 - 3 percig hűlni hagyjuk.

/ 100 ml agarózgél oldatból kb. 18 lemez önthető. A gél-oldatnak a gélöntés ideje alatt forrásban kell maradnia! /

6. A kiöntött és a lehűlés után megdermedt agarózgél réteget tartalmazó lemezt minimum 2 - 3 napra nedves kamrába helyezzük. Ennyi idő alatt alakul ki a megfelelő gélszerkezet.

7. Az agarózgélréteget tartalmazó lemezeket kivesszük a nedves kamrából s a szérumok felvitele előtt Whatman-4 jelzésű szűrőpapirral a gélfelületet óvatosan leitatjuk.

■ Az agarózgél elektroforézis kivitelezése

1. A megfelelően előkészített gélrétegre „ felvivő sablont" helyezünk.

2. Felvisszük az előzőleg pufferrel 4 : 1 arányban felhígított szérum 3 - 5 ul-ét.

3. A mintának a gélbe történő beszívódása után eltávolítjuk a „felvivő sablont", majd a lemezt az elektroforézis cellába helyezzük. /A cellát előzőleg pufferrel fel kell tölteni !/

4. Az elektroforézis ideje kb. 18 - 20 perc. A feszültség 1oo V, az áramerősség stabilizált. /Beckman redszerű elektroforézises rendszer használata estén. A lemezre 10 minta vihető fel./

5. Az elektroforézis befejeződése után a lemezt tartókeretbe helyezzük, majd 3 percre fixálás céljából ecetsav-etanol-víz elegybe helyezzük. / 600 ml víz, 1200 ml abs. alkohol, 200 ml 99%-os ecetsav /.

6. A fixálás után 90 C fokon szárítjuk a lemezt.

7. A lemezt festék oldatba helyezzük. / 1 csomag Beckman „PARAGON BLUE „ festéket 1000 ml 5 %-os 99 %-os ecetsavban oldunk/.

8. Festődés után 2 percre 5 %-os ecetsav oldatba helyezzük a lemezt.

9. Ezután újra ecetsav-etanol-víz elegy következik 2 percig.

1o. Végül ismét 5 %-os ecetsav oldatba kerül a lemez.

11. Szárítás következik 90 C fokon.

■ Kiértékelés:

Beckman Appraise Densitometerrel 6oo nm hullámhosszon.
A referencia értékek:

Albumin:	56 - 68 %
Alpha-1- globulin	2,5 - 4,5 %
Alpha-2- globulin	9 - 14 %
Béta-globulin	8 - 12 %
Gamma-globulin	10 - 18 %

Alkalikus-foszfatáz /AP/ izoenzim elektroforézises vizsgálata

Cellulózacetát - fólián

A szérummintákat az összaktivitásuknak megfelelően visszük fel a membránra a perforációtól kb. 2,5 cm-re. A felvitt mennyiség 3 - 1o ul. A membránt előzőleg „áthúzzuk „ a futtató pufferben.

Futtató puffer:

2,45 g barbitursav
9,81 g Na-barbiturát
5,75 g TRIS
feloldásra kerül 1000 ml deszt. vízben. / pH: 8,8 /

Futtatás: 19o V, 3 - 5 mA mellett 35 percig /SARTORIUS készülékben /

Substrat: 1,6 g 2-amino-2-methyl-1-propandiol /SIGMA/
2o mg Magnéziumklorid

2 %-os agargélt főzünk deszt. vízben, melyet 4 ml-ként szétosztunk vérvételi vagy centrifugacsövekbe. Ezeket jégszekrényben tároljuk.

Előhívó substrat: 3 ml substratot + 4 ml 2 %-os agargélt + 3 mg Indoxyl-phosphatot összekeverünk és gyorsan üveglapra öntjük a futtatásnak megfelelő szélességben.

A cellulózacetát - elektroforézis után a membránt „arccal" a gélre fektetjük buborékmentesen és 1 óra hosszat inkubáljuk 45 C fokon sötétben. Majd a membránt megszárítjuk.

Az AP - izoenzim elektroforézise során a membránra minden szérum mellé annak hőkezelt párját is felvisszük.

Az 56 C fokon történő hőkezelés:
A szérumból lezárható Eppendorf csőbe mérünk 1oo ul szérumot és 56 C fokon 1o percig inkubáljuk.

A cellulózacetát membránra minden szérumminta mellé felvisszük a hőkezelt „párját" is, mert a hőkezelés következtében a csont eredetű AP-izoenzim eltűnik és csak a májeredű AP izoenzim marad meg.

Alkalikus-foszatáz /AP/ izoenzim elektroforézise

Agarózgélen

Puffer: 1oo ml deszt. vízben oldunk 53,3 g TRIS-t + 3 g bórsavat /pH: 9,2/

Futtatás: a szérumfehérjék elektroforéziséhez használt lemezt 1 óra hosszat áztatjuk pH = 9,6 -os Beckman féle equlilibráló oldatban. a

Substrat: a celleulózacetát membránon történő AP izoenzimelektroforézishez használt substrat 2,5 ml-éhez adjunk 3,o mg Indoxylphosphatot. Oldódás után a gélre öntjük óvatosan olyan módon, hogy a lemezt beborítsa. Sötétben 45 C fokon inkubáljuk 1 óra hosszat, majd fixáljuk és differenciáljuk 5 %-os ecetsavoldatban. A lemezt 90 C fokon szárítjuk. /1,2/.

Értékelés: Beckman Appraise Densitometerrel

Laktátdehidrogenáz/LDH/-izoenzim elektroforézise

Agarózgél elektroforézis

Futtató gél: 1 %-os agaróz a szérumfehérjék elektroforézise pufferében Egy lemezre kb. 6,o ml puffert öntünk. A szérumminta felvitelének helye a a lemez „A" jelű helye. A felvitt szérumminta mennyisége: 5 ul.

Puffer: 750 ml deszt. vízben oldunk
2,76 g Barbitursavat
+ 15,4 g Na-barbiturátot
/ Az e módszernél alkalmazott puffer koncentrációja duplája a szérumfehérjék elektroforézisénél alkalmazott puffernél. /15/

Futtatási idő: 2o perc
Inkubálási idő: 3o perc 45 C fokon a megfelelő substráttal
Substrat: 2,5 ml deszt. vízben az alábbiakat kell oldani:
8,0 mg NAD
5,0 mg p-nitro-tetrazólium-kék
0,12 mg N-Methylphenazonium methosulphate

Amiláz-izoenzim agarózgél elektroforézise

Futatás: a szérumfehérjék elektroforéziséhez használt gélben és pufferben
Futtatási idő: 35 perc /feszültség: 100 V /
Substrat: 3 db Phadebas tablettát 5,0 ml deszt. vízben oldunk
Inkubálási idő: 1 óra 45 C fokon

A lemez deszt. vízzel történő lemosása után szárítás 9o C fokon

VIZELET ELEKTROFORÉZISE AGARÓZALAPÚ GÉLEN

A „normális" vizelet nagyon kis fehérjetartalma miatt ajánlatos annak „bekoncentrálása" 50 x vagy még nagyobb mértékben!
Az elektroforézist ugyanazon a gélrétegen végezzük, mint amit a szérumfehérjék elektroforézisénél használtunk /3,8,9/

CEREBROSPINAL FLUID /CSF/ ELEKTROFORÉZISE AGARÓZALAPÚ GÉLEN

Az agyi-gerincvelői folyadék /CSF/ agarózgélen történő elektroforézise előtt a mintákat általában 80 x bekoncetrálás után visszük fel a lemezre.
A szérumfehérjék elektroforéziséhez használt lemezeket alkalmazzuk a mintafelvitelhez. /6/

II. A SZÉRUMLIPOPROTEINEK VIZSGÁLATA

A szérumlipoproteinek elektroforézissel történő elválasztása

Agarózalapú gél-elektroforézis

- Szükséges anyagok

Futtatáshoz használt puffer: Veronal puffer /pH=8,6 ionerősség=0,05 /

Fixáló oldat: 450 ml deszt. víz
+ 450 ml abs. alkohol
+ 100 ml ecetsav /99%-os/

Festék oldat: 165 ml abs. alkohol
+ 3 ml Paragon Lipo festék / Sudan Red 7B./
+ 135 ml deszt. víz / összekeverjük kb. 5 percet/
A használat előtt 30 perccel készítjük.

Színtelenítő oldat: 600 ml abs. alkohol
+ 400 ml deszt. víz

■ Munkafolyamat

1. Az agaróz alapú gélréteget szűrőpapírral leitatjuk és ráhelyezzük a felvív sablont.
2. A szérum-mintából 3 - 5 ul-t felviszünk az agarózrétegre. Bedif-fundálódás után behelyezzük az elektroforézises cellába.
3. Az elektroforézis 100 V mellett 25 percig tart.
4. A cellából kivéve a lemezt műanyagkeretbe helyezzük és fixáljuk 5 percet.
5. Ezután szárítjuk 9o C fokon.
6. Festjük 1o percet.
7. Színtelenítjük és differenciáljuk 1o - 1o percet.
8. Szárítjuk 90 C fokon

■ Kiértékelés

Densitometerrel 520 nm hullámhosszon

Referenciatartomány:

Chylomicronok	0 - 2 %
Béta-lipoprotein	39 - 65 %
Pre-béta-lipoprotein	3 - 30 %
Alpha-lipoprotein	17- 46 %

LIPOPROTEIN + LP/a/ elektroforézis agarose gélen

Szükséges anyagok:

1. Puffer: 7,20 g/L TRIS + 1,84 g/L Barbitursav + 1o,83 g/l Na-barbiturát + 0,10 g Na-azid

2. Festék oldat: 6 %-os Sudan black /W/V/
3. Elektroforézis ideje: 90 perc, Feszültség 50 V, Áramerősség 3o mA

4. Színtelenítő oldat: 45 %-os ethanol

- Munkafolyamat:
  1. A szérumminta 3 - 5 ul-ét felvisszük „felvívő" sablon segítségével. A bediffundálás után betesszük a lemezt a cellába.
  2. Az elektroforézis befejeződés után 80 C fokon szárítjuk.
  3. Festjük, fixáljuk: 16o ml ethanol + 2 ml Sudan black + 140 ml deszt. víz elegyében.
  4. Színtelenítjük: legalább 5 perc időtartamig
- Kiértékelés

  Densitometerrel 580 nm hullámhosszon

  Referenciaértékek:

  Beta-Lipoprotein 47-71 %

  Pre-Beta-Lipoprotein 0-27 %

  Alpha-Lipoprotein 22-46 %

  Lp/a/ kimutatási határa: 0,15 - 0,2o g/l között

Laboratóriumunkban történik a fenti módszereken kívül enzimes módszerrel történő összkoleszterin meghatározás. / Kolorimetriás, végpont meghatározással: Cholesterol esterase, Cholesterol oxidase, Peroxidase enzimek segítségével, 500 nm hullámhosszon történő leolvasással./

LDL-CHOLESTERIN + HDL-CHOLESTERIN MEGHATÁROZÁS

Szükséges anyagok:

1. NaCl: 0,876 g NaCl-ot oldunk 100 ml deszt. vízben /o,15 mólos/
2. Na-laurilszulfat oldat: 10 g Na-laurilszulfátot 100 ml 0,15 mólos NaCl oldatban oldunk, pH = 9 -es értékre állítjuk be

Kivitel:

200 ul szérumhoz 15 ul Na-laurilszulfátot adunk, s keverőmotorral jól összekeverjük. 2 órára 35 C fokos vízfürdőbe tesszük. Ezután 10 percet centrifugáljuk 1oooo g -vel. A VLDL kicsapódik hártya alakjában felül. Ez alól szívunk ki 2o ul-t és hozzáadunk 2,0 ml CHOLESTEROL /Liquid/ /"DIAPACK/ reagens oldatot. Állásidő : 2o perc. Fotometrálás : 5oo nm-en vakkal szemben /11,14/

Számolás: Extinkció x 16 = mmol/l koleszterin

Total-Koleszterin - /HDL + LDL/ = VLDL

/ LDL + HDL/ - HDL = LDL

HDL /2-3/ KOLESZTERIN MEGHATÁROZÁS

Szükséges anyagok:

1. Dinátrium-hidrogén-fosztát: ebből 0,1 mólos oldatot készítünk
2. PEG 2ooo

Oldatok készítése:

A./ 9,5 %-os PEG 2oooo oldat:

0,1 mólos dinátrium-hidrogén-foszfát oldatban oldjuk, beállítjuk pH = 6,5 -re

B./ 15 %-os PEG 2oooo oldat u.a. mint az előző, de pH = 7,5

Kivitel:

500 ul szérumhoz 1000 ul „A" oldatot adunk, 500 ul szérumhoz 1000 ul „B" oldatot adunk. Az oldatokat jól összekeverjük, 10 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd centrifugáljuk 15 percet 6000 g-vel. A felűlúszóból kiveszünk 200 ul-t és hozzáadunk 2000 ul CHOLESTEROL /Liquid //"Diapack" reagenst. 15 perc elteltével 500 nm-es hullámhosszon fotometráljuk.

Számítás: Extinkció x 5,3 = mmol/l koleszterin

Az „A" oldat kicsapja az LDL + VLDL-t, így a felülúszóban a Total-HDL-Koleszterin. A „B" oldat kicsapja az LDL + VLDL + HDL-2-t, így a felülúszóban csak a HDL-3 - Koleszterin marad. Total-HDL - HDL-3 = HDL-2-Koleszterin

Foszfolipidek enzimatikus meghatározása

Elv: A foszfolipideket /Lecitin, Lizolecitin, Sfingomielin/ foszfolipáz - D enzimmel hidrolizáljuk. A szabaddá váló Kolint TRINDER reakcióval határozzuk meg.

Reagensek:

1. Puffer: TRIS pH= 7,8 20 mmol/l, felületi aktivátor 3 mmol/l, fenol 10 mmol/l
2. Enzimek: Cholinoxydase 2ooo U/l, Phospholipase D 600 U/l Peroxdase 1000 U/l, Amino-4-Antipyrin o,5 mmol/l

Mérés: 505 nm-en, inkubálás : 37 C fokon 1o percig

Számolás: Extinkció /minta/ : Extikció /Standard/ x n , mmol/l : n = 4

Reagens Standard = 4 mmol/l Phospholipid /= 3,1 g/l/

A használt teszt: Phospholipides enzymatiques PAP 15o /bioMérieux/

APOLIPOPROTEIN A-I MEGHATÁROZÁSA TURBIDIMETRIÁS MÓDSZERREL

Reagensek: /ORION Diagnostica/

1. **Apo A-I puffer: 3o ml**
2. **Apo A-I vak puffer: 3o ml**
3. **1 fiola Apo A-I antiserum reagens 5oo ul**
4. **1 fiola lyophilizált calibrator 1,o ml**
5. **1 mágneses kártya**

Munka oldatok:

1. **Antiszérum-puffer oldat: 500 ul antiszérum + Apo A-I puffer**
2. **Vak-puffer: használati utasítás alapján**
3. **Calibrator: higítjuk 0,9 %-os NaCl-dal 1: 51 arányban**

Munkamenet:

A küvettákba az alábbi sorrendben mérjük be az anyagokat

a./ 3o ul minta-vak + 3o ul minta-test /minta/

b./ 3o ul calibrátor-vak + 3o ul calibrátor-test /calibrator/

c./ 5oo ul calibrator-vak + 5oo ul minta-vak /vak-puffer/

d./ 5oo ul calibrator-test + 5oo ul minta-test / antiszérum + puffer/

A küvették tartalmát jól összekeverjük, szobahőmérsékleten áll 30 percet.

A mérést: TURBOX /ORION DIAGNOSTICA/ készüléken végezzük.

A mérési tartomány : 0,3 - 0,35 g/l

Az APOLIPOPROTEIN B MÉRÉSE

Az Apolipoprotein A-I méréséhez hasonlóan történik.

III. GYÓGYSZERSZINTMÉRÉS

A gyógyszerhatástan a kémiai anyagok / a gyógyszerek / és az emberi szervezet kölcsönhatásával foglalkozik. E kölcsönhatások két nagy csoportja: *farmakodinámiás,* a gyógyszer hatása a szervezetre és a *farmakokinetikai,* a szervezet időbeni hatása a gyógyszerre / azaz felszívódás -abszorpció -, megoszlás -disztribúció-, metabolizmus és kiválasztás - exkréció-./ Bizonyos gyógyszerek /pl. általános érzéstelenítők, ozmótikus diuretikumok/ fiziko-kémiai tulajdonságuk révén hatnak, és ezt *nem-specifikus* gyógyszerhatásnak nevezzük. Mások bizonyos *transzportrendszerek* vagy *enzimek* hibás szubsztrátjaiként, ill. gátlószereiként fejtik ki hatásukat. A legtöbb gyógyszer azonban specifikus -rendszerint a sejtmembránban elhelyezkedő - fehérjemolekulákon keresztül hat. Ezeket a fehérjéket *receptoroknak* nevezzük, és fiziológiás körülmények között a szervezet endogén anyagaira reagálnak. Az endogén kémiai anyagok szinaptikus *transzmitterek,* vagy *hormonok* lehetnek. Ilyen transzmitter pl. a motoros idegvégződésekből felszabaduló *acetil-kolin* , amely a vázizomban lévő receptorokat aktíválva izomösszehúzódást eredményez. Azokat a vegyületeket /pl. acetil-kolin/, vagy gyógyszereket, amelyek a receptort aktiválva hozzák létre a választ, *agonistáknak* nevezzük. Azokat a gyógyszermolekulákat, amelyek kapcsolódnak ugyan a receptorhoz, de nem aktiválják azt, *antagonistáknak* hívjuk. Az antagonisták csökkentik a transzmitterek /vagy más agonisták/ receptorkötődési esélyeit, és ezzel csökkentik vagy meggátolják azok hatását.

A gyógyszerfelszívódást befolyásoló tényezők: formulálás, stabilitás savval és enzimmel szemben, bélmotilitás, táplálékmennyiség a gyomorban, a first-pass metabolizmus mértéke, lipid oldékonyság /jelentős mértékben függ a gyógyszer pH-jától és a környezet pH-jától. A nem ionos gyógyszerek sokkal lipidoldékonyabbak, mint a protonáltak /4,5/

A gyógyszer *megoszlása* a szervezetben a keringésbe jutással kezdődik.

A *t 1/2 /felezési idő/* az az idő, amely alatt a gyógyszer koncentrációja a vérben a kiindulási érték felére csökken.

A megoszlási térfogat az a látszólagos térfogat, amelyben a gyógyszer megoszlik. A megoszlási térfogatértéket felhasználhatjuk a gyógyszer *clearance-ének* kiszámítására. Ez az a vér- vagy plazmatérfogat, amelyből időegység alatt a gyógyszer eltűnik. A clearance-értéket felhasználhatjuk az adagolási rend kialakítására. Ideális gyógyszereléshez, az ismert terápiás tartományon belül, egyensúlyi /steady-state/ plazmakoncentráció szükséges. Az egyensúly akkor érhető el, ha gyógyszer szisztémás keringésbe jutásának sebessége */adagolási sebesség/* megegyezik az *eliminációó* sebességével.

A gyógyszer *t1/2* értékét eredményesen használhatjuk ahhoz, hogy olyan adagolási intervellumot válasszunk, amely esetén nem jön létre túlságosan magas *csúcskoncentráció /toxikus szint/,* és túlságosan alacsony minimális koncentráció */hatástalan szint/./10/*

A Gyógyszerszintmérési Laboratórium létrehozásával azt az elsődleges célt tűztük ki magunk elé, hogy lehetőséget teremtsünk a szérumban kialakult gyógyszerszintek mérésére.

A mérésekre High Performance Liquid Chromatographic /HPLC/ /Isco, USA/ készülékkel került sor.

VOLTAREN /DICLOFENAC/ MEGHATÁROZÁSA

Szükséges anyagok:

1. Foszfát puffer: 0,2 mol/l , pH = 7
2. Foszforsav: 0,83 mol/l,
3. Hexan - izopropilalkohol: 9o :10
4. Eluáló oldat: Methanol : foszfát puffer = 60 :40
5. Standard: Voltaren /Geigy/ 75 mg / 3 ml i.m. inj.-ból

Mintaelőkészítés:

1 ml szérumot + 2 ml 0,83 mol/l foszforsavat + 4 ml hexan-izopropilalkoholt elegyítünk, 3 percet rázzuk, centrifugáljuk. A szerves fázist átszívjuk és szárazra pároljuk. A maradékot 300 ul eluálóoldatba felvesszük. Vortex-szel keverjük. 100 ul -t injektálunk az oszlopra . /12/

Mérés: HPLC-vel /Isco/

Oszlop: Nucleosil C-18, 10 u, 25 cm x 4,6 mm

Érzékenység: 0,002

Nyomás: 6,8 PSI

Átfolyási sebesség: 1,3 ml/perc

Hurok: 100 ul

Hullámhossz: 282 nm

Belső standard: 2- /p-cyclohexen-1-yl-phenyl/ propionic acid

Retenciós idő: 8 perc 1o mp

METHOTREXAT MEGHATÁROZÁS

Szükséges reagensek:

1. 1o %-os Triklór-ecetsav
2. 0,1 mólos TRIS
3. Methanol
4. Eluens: Methanol : 0,1 M TRIS = 300 : 700
5. Standard: Törzsoldat : 2,5 mg/ml, használati: 5uM / 1ooo x /

Előkészítés: 1 ml standard vagy szérum + 0,3 1o %-os TCA. Vortex-szel keverjük, majd centrifugáljuk. Felülúszóból 100 ul-t viszünk fel az oszlopra, /Belső standard: 2-hydroxyfolic acid / 7/

Mérés:

Oszlop: Nucleosil C 18 , 5 u , 25 cm x 4,6 mm

Érzékenység: 0,01

Nyomás: 17,6 MPa

Átfolyási sebesség: 1,0 ml/perc

Hurok: 100 ul

Hullámhossz: 28o nm

Retenciós idő: 8 perc

ANTIEPILEPTIKUMOK /PHENOBARBITAL, DIPHEDAN, CARBAMAZEPIN, ETHOSUXIMID / MEGHATÁROZÁSA

Szükséges anyagok:

1. Foszfát puffer: pH = 6,0

2. cc. HCl:
3. Izopropil-alkohol
4. Ethanol
5. PBS: 0,2 mólos
6. Methanol
7. Tetrahidrofurán:
8. Standard: 25 ml methanolban oldunk: 25 mg diphedant és 25 mg Ethosuximidet és 25 mg phenobarbitalt

   Munkastandard: a törzsoldatból 2 ml-t 50 %-os methanollal 100 ml -re higítunk
9. Extrakciós elegy: 200 ml-es lombikba mérünk 14 ml ethanolt + 14 ml izopropilalkoholt, majd kloroformmal feltöltjük. Ebbe teszünk 2 mg hexobarbitalt belső standardként

Előkészítés: 200 ml szérum vagy standard
+ 200 ml foszfát puffer / pH = 6/
+ 1,6 ml extrakciós elegy

Vortex-szel 30 mp-ig rázzuk, majd centrifugáljuk. Az alsó fázisból 1 ml-t szárazra párolunk. Az oszlopra vitel előtt 100 ul elúciós elegyben oldjuk

Mérés:

Oszlop: Nucleosil C18 , 1o u, 25 cm x 4,6 mm

Érzékenység: 0,002

Átfolyási sebesség: 1,0 ml/perc

Nyomás: 4,5 PSI

Hurok: 1o ul

Hullámhossz: 254 nm

Eluens: Methanol : víz : THF = 75 : 15 : 10

Retenciós idő:

phenobarbital: 4 perc 35 mp, diphedan: 6 perc 2o mp

carbamazepin: 21 perc 10 mp, ethosuximid: 4 perc 55 mp

THEOPHILLIN, COFFEIN MEGHATÁROZÁSA

Szükséges anyagok

1. **Acetonitril**
2. **Foszforsav**
3. **Izo-propil-alkohol**
4. **Kloroform**
5. **Extrakciós elegy: 95 % kloroform és 5 %-os izo-propil-alkohol**
6. **Standard: törzs: 50 mg/100 ml methanol, használati: 15 ug/m**

Előkészítés: 2oo ul std. Vagy szérum + 1,7 ml extrakciós oldat, Vortex, centrifugálás, az alsó fázisból 1 ml-t bepárolunk, majd közvetlen injektálás előtt 100 ul eluensben oldjuk /13/

Mérés:

Oszlop: Nucleosil C 18 , 10 u, 25 cm x 4,6 mm

Érzékenység: 0,01

Nyomás: 7,7 MPa

Hurok: 10 ul

Átfolyási sebesség: 2,0 ml/perc

Eluens: bi.deszt.víz :ACN: Foszforsav = 860 : 140 : 2

Retenciós idő: Theophillin: 3 perc, Coffein: 4 perc 35 mp

Hullámhossz: 28o nm

GENTAMYCIN MEGHATÁROZÁSA

Szükséges anyagok:

1. **Acetonitril**
2. **Ecetsav**
3. **TRIS puffer**

4. 1-fluor-2,4-dinitro-benzol /FDNB/
5. Reagens: 2 %-os TRIS /vizes oldata/ + ACN, + 17 %-os ACN és FDNB /20 ml-t készítünk: 3,4 g FDNB + 16,6 ml ACN/

Előkészítés: 0,5 ml std. vagy szérum vagy vizelet + 0,5 ml 2 %-os TRIS + 2 ml ACN, vortex, centrifuga / 5 perc/. A felűlúszóból 1 ml-t zárt üvegbe mérünk + 0,1 ml 17 %-os ACN és FDNB. 1 órát 70 fokos vízfürdőbe tesszük

Mérés:

Oszlop: Nucleosil C 18, 5 u, 25 cm x 4,6 mm

Érzékenység: 0,01

Nyomás: 7,5 PSI

Átfolyási sebesség: 1,6 ml / perc

Hurok: 10 ul

Hullámhossz: 36o nm

Eluens: acetonitril : bi.deszt. víz : ecetsav = 800 : 200 : 5

Retenciós idő: 5 - 6 perc között / az anyag kettős csúcsot ad !/

PYRIDINOLINE /PYD/ , DEOXYPYRIDINOLINE /DPD/ MEGHATÁROZÁS

Szükséges anyagok:

1. Acetonitril
2. 12 N HCl
3. CROSSLINKS Standard: Pyridinolin, Deoxypyridinolin
4. CROSSLINKS KONTROLLE

Előkészítés: a reggeli első vizeletet kiöntjük. A meghatározáshoz a 7 órától 10 óráig terjedő időszak alatti vizeletet gyűjtjük össze.

Mindenegyes - a vizsgálatba bevont - vizeletmintából , CROSSLINKS STANDARDBÓL és a CROSSLINKS KONTROLLBÓL 150 ul-t kimérünk és elegyítjük 12 N HCl-lel, majd sötétben 16 óra időtartamig 100 C fokon hydrolizáljuk.

Minden mintát előoszlopon tisztítjuk. / 2,5 ml Reagens „1" /Bio-rad/ eleggyel mossuk, majd a még egyszer megismételjük a műveletet. Ezután az oszlopot 0,75 ml Regens „2" /Bio-rad/ eleggyel mossuk. A kapott eluátumot vortex-szel keverjük 24 órát sötétben állni hagyjuk 4 C fokon. A HPLC oszlopra 100 ul mintát injektálunk.

Mérés:

Oszlop: Nucleosil C 18, 5 u, 25 cm x 4,6 mm

Nyomás: 16,2 MPa

Átfolyási sebesség: 1,0 ml/perc

Érzékenység: nagy

Detector: Fluorescence /Shimadzu, RF-535/

Hullámhossz: Ex: 295 nm , Em: 400 nm

Retenciós idő: Pyridinolin: 9 - 11 perc , Deoxypyridinolin : 13-16 perc

EREDMÉNYEK

I. SZÉRUMFEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE

1. Az agarózgél elektroforézishez használt agarózalapú lemezek öntési technológiáját kidolgoztam, az agarózgélréteg összetételét - több száz különböző összetételű réteg kipróbálása után - beállítottam.

2. Az agarózgél elektroforézis módszerének beállítása után összeállítottam egy TÁBLÁZATOT, amelyben a különböző fehérjeanyagcsere zavarral járó betegséghez hozzárendeltem az elektroforézis képe alapján az általam kapott összfehérje /T.P./ , albumin /ALB./, alpha-1-globulin /Alph.-1-glob./, alpha-2-globulin /Alph.-2-glob./, béta-globulin / Béta-glob./, gamma-globulin / Gamma-glob ./ értékeket. A használt jelölések: N = normal, ↑ = emelkedett, ↓ = csökkent. / A TÁBLÁZAT a következő oldalon található /6/.

3. Megoldottam az Alkalikus-foszfatáz-izoenzimek agarózgélrétegen történő elektroforetikus elválasztását. Ez magában foglalja az agarózgélréteg összetételének kidolgozását és az elektroforézises eljárás körülményeinek beállítását. Az anód -tól a katód irányában az alábbi sorrendben jelennek meg az AP-izoenzimek: „fast liver „, máj-, csont-, intestinális izoenzimek.
/Az AP-izoenzim elektroforetikus elválasztásának „képe" a MELLÉKLETBEN található meg./

A szérumfehérjék osztályozása elektroforézises /agaróz/ módszer alapján

Az anyagcserezavar neve	T.P.	Alb.	Aplha-1-	Alpha-2-	Béta-	Gamma-glob.
HYPOPROTEINÉMIA						
A. Hiányos táplálkozás	↓	↓	N-↑	N-↑	↓	↑-N
B. Fehérjevesztés /non select./	↓	↓	↑	N-↑	↓	N-↑
Exudativ Dermatopath.						
Burn	↓	↓	↑	N-↓	↓	↓-N
Exudativ Pulmonary D.	↓	↓	↑	N-↑	↓-N	N-↑
Essential Hypoproteineam.	↓	↓	N-↑	N-↑	N-↑	N-↑
Gastroenteropathia	↓	↓	↑	N	N-↑	↓-N
Blood loss, plasmaphoresis	↓	↓	↑	N	↑	N-↑
SELECTIV PROTEIN LOSS						
Nephrotic Syndrome	↓	↓	N-↑	N-↑	N-↑	↓-N
DIFFUSE, ACUT HEPATO-						
DEGENERATIV PATTERN						
/ Severe Hepatic/	↓-N	↓-N	↓-N	↓	↓-N	N-↑
CIRRHOTIC PATTERN	↓-N-↑	↓	N	↓	↓	↑
ACUT INFLAMMATORY,						
PHYSIOLOGICAL STRESS	N	↓	↑	↑	N	N
CHRONIC INFLAMMATORY	N	↓	↑	↑	N	↑
ANEMIA						
Iron Deficiency	N	N	N	N	↑	N
In vivo Hemolysis	N	N	N	↓	N	N
POLYCLONAL GAMMOP.	N-↑	↓	N	N	N	↑

Az anyagcserezavar neve	T.P.	Alb.	Alpha-1-	Alpha-2-	Béta-	Gamma-Glob.
MONOCLONAL GAMMOP.						
Norm. Imm.Glob. Conc.	N-↑	N	N	N	N-↑	N-↑
Decreased Imm.Glob.Conc.	↑	↓-N	N	N	N-↑	↑
Hypogammaglob. with monoclonal Urine Protein /Light Chain Disease/	N	N	N	N	N	↓
HYPERLIPIDEMIC PATT.	N	N	N-↑	↑	N	N
PREGNANCY PATTERN	↓	↓	N	N	↑	N-↑
DEFECT DYSPROTEINEM.						
Analbuminemia	↓	↓	N	N-↑	N	N
Alloalbuminemia	N	N-↑	N	N	N	N
Hypo Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-1-Globulinemia	N	N	↓	N	N	N
Atransferrinemia	N	N	N	N	↓	N
Analpha-2-béta-Lipoprotein.	N	N	N	↓	N	N
Afibrinogenemia /Plasma/	N	N	N	N	N	No Fibrinog or decreas.
PRESENCE OF FIBRINOG.	N	N	N	N	N	↑
HYPOGAMMAGLOBULIN.	N	N	N	N	N	↓
HEMOCONCENTRATION	↑	↑	↑	↑	↑	↑
ACOMPLEMENTEMIA	N	N	N	N	↓-N	N
AHAPTOGLOBULINEMIA	N	N	N	N-↓	N	N

Jelölések: N = normal szint
↑ = emelkedett szint
↓ = csökkent szint

4. Megoldottam a Laktátdehidrogenáz-izoenzim agarózgélen történő elektroforézissel történő elválasztását. Intézetemben fejlesztettem ki a megfelelő agarózgélréteg öntési technológiáját , a gélréteg alkotóelemeinek minőségi és mennyiségi összetételét kidolgoztam. Az emberi szervezet szövetei öt / LDL-1, LDL-2, LDL-3, LDL-4, LDL-5 / elektroforézises csíkot adnak.

LDH-1 és LDH-2 frakcióban / „gyors „ frakció , katód oldalán/ jelennek meg:
a SZÍVIZOM, a VESE, az AGYVELŐ, az ERYTHROCYTÁK által „termelt" izoenzim,

LDH-3 frakcióban jelenik meg:
a PAJZSMIRIGY-ből-, a MELLÉKVESÉBŐL-, a NYIROKCSOMÓ-ból- a HASNYÁLMIRIGY-ből, a TÍMUSZ-ból-, a LÉP-ből és a LEUKOCYTÁK-ból kiszabaduló izoenzim.

LDH-4 és az LDH-5 frakcióban jelenik meg / „lassú" frakció, anódnál/ a MÁJ-ból és a VÁZIZOM-ból eredő izoenzim .

Az LDH-izoenzim elektroforetikus képét a MELLÉKLET-ben mutatom be.

5. Megoldottam az amiláz-izoenzim cellulózacetát- és agaróz hordozóanyagon történő elektroforézises elválasztását. A gyakorlatban még gyakrabban használatos a cellulózacetátón történő elválasztás, bár az agarózgélen történő elválás jobb és denzitométerrel is értékelhető.
Az anódtól a katód irányába haladva az alábbi a megjelenési sorrend:
„fast" liver, liver, os, intestinális, /"gyors" máj, máj, csont, béleredetű/

Az amiláz-izoenzim elektroforézises képét a MELLÉKLET tartalmazza.

II. SZÉRUMLIPOPROTEINEK VIZSGÁLATA

1. Beállítottam a szérumlipoproteinek agarózgélen történő elektroforézises elválasztását. Saját öntésű, magam által kikisérletezett összetételű agarózgélréteget használunk.
   A negatív pólustól a pozitív pólus irányában az alábbi sorrendben jelennek meg a lipoproteinek: Chylomicronok / ezek a felcseppentés helyén maradnak, Béta-Lipoprotein /LDL/, Pre-Béta-Lipoprotein /VLDL/, Alpha-Lipoprotein /HDL/.
   A Lipoproteinek agarózgélen történő elektroforézises képét a MELLÉKLET tartalmazza.
2. Megoldottam az atherogén jellegű Lp/a/ agarózgélen történő elválasz-elválasztását. Az Lp/a/ két módon fejtheti ki káros hatását : még az LDL-nél is intenzívebben kötődik az érfali glycosaminoglycanokhoz és a plazminogénnel való immunkémiai hasonlóság miatt mérsékli a fibrinolitikus rendszer aktivitását. Az Lp/a/ szint diétás vagy gyógyszeres kezeléssel nem nagyon befolyásolható.
   Az elektroforetikus elválasztás során a Pre-Béta-Lipoprotein /VLDL/ és az Alpha-Lipoprotein /HDL/ csíkja között jelenik meg. Az elektroforetikus kép a MELLÉKLETBEN található.
3. Összeállítottam egy TÁBLÁZATOT, amely tartalmazza a Fredrickson-féle /fenotípus alapú/ zsíranyagcsere zavarokhoz tartozó elektroforetogram képét, a normál értéktől való eltérést és ajánlatot tartalmaz a gyógyszerválasztást illetően. A TÁBLÁZAT a MELLÉKLET-ben található.

4. Ajánlást fogalmaztam meg arra vonatkozóan, hogy kiknél szükséges a szérum koleszterin, triglicerid, és HDL-,LDL-koleszterinszint meghatározása. Ezek az irányelvek az alábbiak:
   a./ Fiatalkori / 50 év alatti/ érbetegekben, különös tekintettel a coronáriákra,
   b./ Azokban az esetekben, ahol családi anamnesisben *infarctus myocardii* vagy *hyperlipoproteinnaemia* szerepel,
   c./ Olyan egyéneknél, akiknek *xanthomájuk* vagy *xanthelesmájuk* van,
   d./ Azoknál, akiknek széruma *lipaemiás* vagy ismétlődő *acut pancreatitisük* van.
5. Ajánlást állítottam össze a primer hyperkoleszterinaemiák diétás kezelésének indikációiról, melynek lényege:
   a./ Ha még nincs *szívbetegség* és *más rizikófaktor* jelen, akkor 6,2 mmol/l koleszterin érték felett-,
   b./ Ha legalább *kettő rizikófator* jelen van, akkor már 5,2 mmol/l koleszterinszint felett-,
   c./ Ha már *kimutatott szívbetegség* áll fenn, akkor már 4,0 - 4,5 mmol/l feletti koleszterin-szinteknél *indokolt a diétás kezelés megkezdése!*

6. A hyperlipidaemiák gyógyszeres kezelését illetően az alábbiakat ajánlom: Amennyiben a *3 - 6 hónapos diétás kezelés nem hozza meg a kívánt eredményt,* akkor a *diéta mellett gyógyszeres kezelés indokolt* !
   a./ *ISZB, atherosclerosis obliterans, fiatalkori cerebrosclerosis* esetén 5,2 mmol/l koleszterin érték felett is gyógyszeres kezelés indokolt. / Az LDL-koleszterin -szintet 2,6 mmol/l körüli értékre-, a koleszterin-szintet 4,0 - 4,5 mmol/l alá kell csökkenteni ahhoz, hogy regresszió is bekövetkezzen !/

b./ *Atheroscleroticus megbetegedés* hiányában a primer prevenció keretében nem adunk gyógyszert.

c./ Ha *legalább két rizikófaktor* vagy *familiáris hyperkolesterinaemia* bizonyított, akkor *már 6,5 mmol/l koleszterin-szint felett is* indokolt a gyógyszer adása.

d./ *Tünetmentes, más rizikófaktorral nem terhelt hyperkolesterinaemia* esetén másképpen járunk el férfiak és nők esetén:

Férfiaknál:

7,8 mmol/l feletti koleszterinértéknél /asymptomikus hyperkoleszterinaemia esetén/ indokolt a gyógyszeres kezelés,

Nőknél:

csak akkor, ha túl vannak már a változás korán, amikor már nem védi őket az oestrogen hatásra emelkedettebb HDL-koleszterin /összkoleszterin : HDL-koleszterin nagyobb, mint 5 /

Hyperkolesterinaemia esetén - normális TG esetén - a választandó gyógyszerek elsősorban *a HMG-CoA reduktázgátlók,* melyekből a szokásos dózis:

ZOCOR 10 mg, MEVACOR 2o mg, LESCOL 20 - 40 mg

/Szükség esetén a dózis tovább emelhető, vagy *Questronnal ill. Colestiddel* kombinálható!/

A hypertrigliceridaemia kezelési elveit az alábbiak szerint ajánlom:

2,3 mmol/l TG érték alatt nem szükséges kezelés !

2,3 - 4,5 mmol/l TG érték között */atherogen dyslipidaemia,* már kialakult *ISZB* esetén a diéta mellett gyógyszeres kezelés is ajánlott!

4,5-11,3 mmol/l TG között a gyógyszeres kezlés elengedhetetlen ! */familiáris kombinált hyperlipidaemia , diabetes* jelenlétében/

A Fredrickson V. tipusban:

11,3 mmol/l feletti TG értéknél /lipaemiás savó, chylomicronaemia/ a mikrocirkulációs zavarhoz vezető *acut pancreatitis* veszélye miatt gyógyszeres kezelés indokolt !

- ***A választandó gyógyszer*** **valamilyen** - ***fenofibrát:*** ***Lipanthyl, Lipidil,***
  bezafibrát: ***Bezalip retard,*** ***gemfibrozil:*** ***Gevilon, Innogem,***
  acipimox: ***Olbetam.***

A Hyperlipoproteniaemiák /HPL/ kezelése általában *monoterápiával* megoldható. Kombinált HPL-ben *két gyógyszercsoport kombinációja is* szóba jöhet., de ilyenkor a *mellékhatásokra* fokozottan ügyelni kell!

III. GYÓGYSZERSZINTMÉRÉS

1. Kialakítottam és működőképessé tettem a GYÓGYSZERSZINTMÉRÉSI LABORATÓRIUMOT.
2. Gyógyszermonitorozási csoportokat /paneleket/ alakítottam ki az alábbiak szerint:

ANTIARRHYTHMIKUMOK

Chinidin, Lidocain, Procainamid, Propanolol

ANTIBIOTIKUMOK

Tobramycin, Gentamycin, Amycacin, Chloramphenicol, Vancomycin

ANTIEPILEPTIKUMOK

Carbamazepin, Ethosuximid, Phenobarbital, Phenytoin, Primidon, Valproinsav

KARDIAKUMOK

Digitoxin, Digoxin

BRONCHOSPASMOLYTIKUMOK

Theofillin, Coffein

PSYCHOPHARMAKONOK

Lithium, Despiramin, Imipramin, Ludiomil

ZYTOSTATIKUMOK

Methotrexat

ANTIREUMATIKUMOK

STEROIDOK

Prednisone, Prednisolone, Methylprednisolone,
Methylprednisolone-hemisuccinate,
2o-alpha - hydroyprednisone
2o-beta- hydroxyprednisone

NEM STEROID GYULLADÁSGÁTLÓK /GYULLADÁSCSÖKKENTŐK/

Acetylsalycilsav, Phenylbutazon, Indometacin,
Prolaxin, Donalgin, Voltaren, Ibuprofen, Hotemin,
Biarison

BÁZISTERÁPIÁS SZEREK

Sulphasalazin, Methotrexat

OSTEOPOROSIS VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS ANYAGOK

Pyridinoline /PYD/, Deoxypyridinoline /DPD/
/ Urinary Crosslinks /

VITAMINOK

Retinol /All Trans/, Retinol palmitat /All Trans/, Retinol acetat,
Cholecalciferol / D-3 vitamin/, Cholecalciferol sulfate, Ergo-calciferol / D-2 vitamin/,
Alpha-Tocoferol / E vitamin /, Alpha-Tocopherol-acetat

3. A gyógyszerek többségénél a szérumban a terápiás tartományt meghatároztam.
4. Megvizsgáltam, hogy a Diclofenac melyik fizioterápiás kezeléssel jut be hamarabb a szervezetbe s jelenik meg a szérumban ill. synoviában.
5. Megállapítottam, hogy a koffein elimináció vizsgálata alkalmas módszer a a máj metabolizáló képességének meghatározására.

ÖSSZEFOGLALÁS

LABORDIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁSOK

BEVEZETÉSE A KLINIKAI GYAKORLATBAN

DR. BARISKA JÁNOS
Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet
H -1525 Budapest 114. Pf. 54.

A klinikai kémia köréből három nagyobb terület emelhető ki, amelybe beilleszthető az elmúlt két évtized elméleti /oktatói és előadói/ és gyakorlati munkám.

I. SZÉRUMFEHÉRJÉK ELEKTROFORÉZISE

Az 198o-as évektől kezdődően közel 3oo ezer szérumelektroforézis vizsgálatot végeztem. Ebből:

Papírelektroforézis kb. 500,
Cellulózacetát elektroforézis kb. 5o ezer,
Agaróz-agar elektroforézis kb. 250 ezer

Az agaróz-agar elektroforézishez használt agaróz-agar -gél összetételét-, valamint a gélöntési technológiát magam dolgoztam ki 1988-ban. Munkahelyem e módszert újításként elfogadta.

A klinikus orvosok diagnosztikai munkájának segítése érdekében az 1990-es évek elején kidolgoztam és bevezettem három izoenzim elektroforézises módszerrel való elválasztását. Ezek:

Alkalikus foszfatáz-izoenzimek,
Laktátdehidrogenáz-izoenzimek,
Amiláz-izoenzimek.

Ezzel párhuzamosan megoldottuk a vizeletfehérjék elektroforézissel való vizsgálatát és elkészítettem egy szérumelektroforézis értékelő lapot, amely a fő betegségcsoportokban jelzi a normál értéktől való eltérést.

II. SZÉRUMLIPOPROTEINEK VIZSGÁLATA

Beállítottuk a szérumokból történő elektroforézises vizsgálatot, amellyel megoldottuk a Chylomicron, a Low Density Lipoprotein-, a High Density Lipoprotein- és a Very Low Density Lipoprotein, valamint a Lp/a/ elválasztását.
Precipitációs módszerrel választjuk szét, majd fotometriásan határozzuk meg az összkoleszterint, a HDL-koleszterint, az LDL-koleszterint, a VLDL-koleszterint, a phospholipideket.
Turbidimetriás meghatározást végzünk az apo-A- és az apo-B fehérjék vonatkozásában.
A klinikus orvosok munkájának megsegítése érdekében megszerkesztettünk egy TÁBLÁZATOT, amely a zsíranyagcsere-betegségeket csoportosítja /Fredrickson beosztás alapján/ s jelöli a normális értékektől való eltérés elektroforetogram képét és ajánlatot tartalmaz a gyógyszerválasztást illetően.

III. GYÓGYSZERSZINTMÉRÉS

Az 199o-es évek elején megszerveztem egy önálló GYÓGYSZERSZINTMÉRÉSI LABORATÓRIUMOT. Megfelelő vizsgálati eljárással /HPLC = HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY / lehetővé kívántam tenni az optimális, individualizált gyógyszeres terápia bevezetését. Célként tűztem ki, hogy csökkenjen a túlzott gyógyszerhasználat. / Az alkalmazott kis dózisú gyógyszeradás nem vezet megfelelő klinikai hatáshoz, a túladagolás nem kívánt káros tüneteket, esetleg toxikózist válthat ki./

Gyógyszermonitorozási panelek beállításával a hatékonyabb terápiát kívántam megalapozni s egyúttal csökkenteni a gyógyszerfelhasználást, amelynek anyagi vonzata sem hanyagolható el.

A javasolt gyógyszrmonitorozási penelek:

ANTIARRHYTHMIKUMOK: Chinidin, Lidocain, Propanolol
ANTIBIOTIKUMOK: Gentamycin, Tobramycin, Vancomycin
KARDIAKUMOK: Digoxin, Digitoxin
ANTIEPILEPTIKUMOK: Carbamazepin, Ethosuximid, Phenobarbital, Phenytoin, Valproinsav,
BRONCHOSPASMOLYTIKUMOK: Theophillin, Coffein
ZYTOSTATIKUMOK: Methotrexat
ANTIREUMATIKUMOK:
STEROIDOK: Prednisone, Prednisolone, Methylpredniso.
NEM STEROID GYULLADÁSGÁTLÓK: Acetylsalycilsav, Phenylbutasone, Indometacin, Voltaren ,Ibuprofen
BÁZISTERÁPIÁS SZEREK: Sulphasalazin

VITAMINOK: Retinol, Retinol palmitat, Retinol acetat
Cholecalciferol, -sulfat, Ergocalciferol
Alpha-Tocoferol, Alpha-Tocoferol-acetat

Az OSTEOPOROZIS rizikójelzőjeként bevezettük a vizeletből történő PYRIDINOLINE és a DEOXYPYRIDINOLINE meghatározást.
A HPLC készülékkel vizsgálható minták: szérum, vizelet, synovia, nyál

INTRODUCTION OF LABORATORY DIAGNOSTIC METHODS IN THE CLINICAL PRACTICE

DR. JÁNOS BARISKA
National Institute of Rheumatology and Physiotherapy
Budapest 114. P.O.Box 54, Hungary H-1525

Three larger areas of the clinical chemistry can be named with would accomodate my theoretical work /education and public presentations/ and practical activities.

I. ELECTROPHORESIS OF SERUM PROTEINS

As from the early '80s, I carried out almost 300 thousand electrophoretic serum test. They included:

Some 500 paper electrophoreses,
Some 5o thousand cellulose acetate electrophoreses, and
Some 250 thousand agarose-agar electrophoreses.

The composition as well as the preparatory technique of agarose-agar gel as needed in the agarose-agar gel electrophoresis, I have worked out with my co-workers in 1988. My employer recognised this technique s a innovation.

In order to support the diagnostic work of clinical physicians, we developed

and introduced the electrophoretic separation method for three iso-enzymes in the early 190s. They are:

Alkaline-phosphatase iso-enzymes,
Lactate dehydrogenase iso-enzymes, and
Amylase iso-enzymes.

Simultaneously, we developed the testing procedure for urine proteins using electrophoresis, and generated a master table for the evalution of serum electrophoresis indicating the deviations from norm values in the main sickness categories.

II. TESTING SERUM LIPOPROTEINS

We have established the electrophoretic serums testing procedure by wich we were able to separate Chylomicron,, the Low Density Lipoprotein, the High Density Lipoprotein and the Very Low Density Lipoprotein as well as Lp/a/.

The total cholesterol, the HDL cholesterol, the LDL cholesterol, the VLDL cholesterol and the phospholipids were separated by the precipitation method, and were subsequently identified by photometry.
Apo-A and apo-B proteins we identified the help of turbidimetry.

In order to further the work of clinical physicians we put together a TABLE wick groups the fat metabolism sicknesses /based on Fredrickson classification/ , indicates the deviations from norm values, depicted in an elec-

trophoretogram image, and makes recommendations towards the choice of medicine.

III. MEASURING THE MEDICAMENT LEVEL

At the beginning of the '90s, I built up an independent MEDICAMENT LEVELMEASURING LABORATORY. My wish had been to possibly optimise the medication therapy, suited to the individual patient, with the help of a proper monitoring procedure / HPLC = HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY/. Thereby, my goal had to avoid the application of excessive medicament doses. /In the case of a too low dose of medicament, the expected clinical response would fail to materialise, and in the case of a too high dosage, undesired side-effects - including toxicose - might occur./ By working out a set of medicament monitoring agents, I intended to lay the foundation ti a more effective therapy, and also to reduce unnecessary medicine intake with the according economic benefit.

The suggested medicament monitoring agents are:

ANTIARRHYTMICS: Chinidin, Lidocain, Propanol

ANTIBIOTICS: Gentamycin, Tobramycin, Amykacyn, Vancomycin

CARDIACUMS: Digoxin, Digitoxin

ANTIEPILEPTICS: Carbamazepin, Ethosuximid, Phenobarbital, Phenytoin, Valproin acid

BRONCHOSPASMOLYTICS: Theophyllin, Coffein

CYTOSTATICS: Methotrexat

ANTIRHEUMATICS:

STEROIDS: Prednisone, Prednisolone, Methylprednisolone

NON-STEROID INFLAMMATION: Acetylsalicylic acid, Phenylbutasone, Indometacin, Voltaren, Ibuprofen, Hotemin

BASIC THERAPY MEDICAMENTS: Sulphasalazin

VITAMINS: Retinol, Retinol palmitate, Retinol acetate
Cholecalciferol, Cholecalciferol sulfate,
Alpha-Tocoferol, Alpha-Tocoferol acetate

As an indicator for a possible risk of OSTEOPOROSIS, we introduced the determination of PYRIDINOLINE and DEOXYPYRIDINOLINE in urine samples.

The possible samples which can be tested by HPLC are:
serum, urine, synovia and saliva.

IRODALOM

1. Aguzzi,F.,S. Jayakar,G. Merlini, and C. Petrini, Electrophoresis: Cellulose Acetate vs. Agarose Gel, Visual Inspection vs Denssitometry Clin. Chem. 27.:/1981/
2. Alpers,D.H., Secretion of hepatic and intestinal alkaline phosphatases similarities and differences. Cin. Chem. Acta, 186. 211-224 /1989/
3. Barteling,S.J., A Sample Method for the Preparation of Agarose. Clin. Chem. 15.: 1002 /1969/
4. Kabra, P.M. Tsai LL., Marton L.J. Improved liquid-chromatografic method for determination of serum cortisol. Clin.Chem. 25.: 1293-6 /1988/
5. Kane,J.P.,et al.: Normalization of low density lipoprotein levels in heterozygous familial hypercholesterolemia with combined drug regimen. N.England J.Med. 304.:251-258 /1981/
6. Killingsworth, L.M., Clinical Interpretation of Protein Patterns in Cerebrospinal , Urine, and Other Biological Fluids. In Laboratory Medicine G.J. Race, Ed. Harper and Row. Inc. Hagerstown, MD 1.-14. 1980.
7. Kovanen, P. et. al., Am.J. Card. 57, 31G-34G /1986/
8. Kyle,R.A. and P.R. Greipp, The Laboratory Investigation of Monoclonal Gammopathies, Mayo Clinic Proc. 50. :719 /1978/.
9. Laurell, C.B, Electrophoretic and Electroimmunochemical Analysis of Proteins. Scand.J. Clin. and Lab. Invest. 29. /Suppl.124//1972/
10. Neal, M.J, Medical Pharmacology at a Glance second edition Oxford Blackwell Scientitic Publication 1992.

11. Romics,L. és mtsai : The effects of Probucol on systolic time intervals in man. Int.J. Cardiol 19. 303. /1988/

12. Rose,J.Q, Jusko K.J. Corticosteroid analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 162.: 262 - 273 /1979/.

13. Said,S.A. and Sharaf A.A,
Arzneim. - Forsch. 31. 2089 /1981/.

14. The Scandinavin Simvastatin Survial Study Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary health disease The Scandinavin Simvastatin Survial Stady /4S/.
Lancet 344. /8934/:1383 - 1389//1994/

15. Trocha,P.J., Lactate Dehydrogenase Isoenzymes Linked Beta-lipoproteins and Immunglobulin A.
Clin.Chem. 23. 178o /1997/.

PUBLIKÁCIÓK

1. **Bariska J.,** Schorm J., Juhász P.:
Fehérje elektroforézisre alkalmas agarózalapú gélréteg összetételének kidolgozása és a gélréteg öntési technológiájának beállítása.
ORFI Újítási Tanusítvány /Naplószám: 3/1988/. Bp.1988.okt.12.

2. **Bariska J.,** Schorm J., Juhász P.:
Szérumfehérjék agarózgél elektroforézise ORWO ET 100 hordozófólia felhasználásával.
Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 38. Nagygyűlése Kiadványa, Sopron, 1988.okt.2o-22.

3. **J. Bariska.:**
Modified Lipoproteins. /Radicals, ions and tissue damage. Matkovics,B., Karmazsin,L. and Kalász,H. eds./ Bpest. Akadémia Kiadó 29-33. /199o/.

4. **J.Bariska.,** T.Bender.:
Determination of Diclofenac / Voltaren / concentrations in human serum and synovial fluid by High Performance Liquid Choromatography Lab. Diagn. 174. 3. /1990/

5. T.Bender., **J.Bariska.,** Erzsébet Szabó., Judit Kelemen, Andrea Rigó., Ilona Hetesi., and András Zimmerman:
Diclofenac-Absorption from Voltaren Emulgel through Iontophoresis and Phonophoresis
European Journal of Physical Medicine and Rehabilitation 130-132. 174 /1992/.

6. Darnót Gábor dr., Nemesánszky Elemér dr., és **Bariska János dr.:**
A koffein elimináció vizsgálatának diagnosztikus értéke a krónikus májbetegségekben
Orvosi Hetilap 927-931. 18./1995/

7. **Bariska J.:**
Biokémia tankönyv /Szövettani asszisztensi szakosító tanfolyam tananyaga/ Szociális és Egészségügyi Minisztérium Kiadványa Budapest, 1989.

8. **Bariska J.,** Schorm J.:
Alkalikus foszfatáz izoenzimek szétválasztása ORWO ET 1oo hordozófólián
Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 41. Nagygyűlése Kiadványa Szombathely, 1991.

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. **Bariska J.,** Zaka J.:
   HDL-koleszterin és a Miokardiális Infarctus
   ORFI Tudományos Ülés 1984. Március 13.

2. **Bariska J.:**
   A szérum fehérjék elektroforézisének értékelése a reumás betegségek tükrében
   Beckman Instruments /Ausztria/ Tudományos Ülés Bp. 1984.Dec. 06.

3. **Bariska J.,** Romics.L., Szollár L.:
   Lipidanyagcsere és a laboratóriumi diagnosztikája
   ORFI Tudományos Ülés 1986. Február 24.

4. **Bariska J.,** Judák A., Poór Gy., Mituszova M.:
   Lipoproteinek vizsgálata köszvényes betegeken
   MRE Vándorgyűlés Gyula, 1986. Október 27-29.

5. **J.Bariska.,** M. Mituszova:
   Investigation of lipid metabolism in Gout.
   Joint Symposium on Microcirculation and Gout
   Moscow, 19-26. November 1986

6. J.Bariska:
Labordiagnostik der Fettstoffwechselstörungen
Minisymposium in Piestany 21-23. November 1988.

7. **J.Bariska,** A.Judák:
Investigation of lipid metabolism in Gout
Joint Symosium on Microcirculation and Gout. Bp. 28-29.Marc. 1987.

8. **Bariska J.:**
Az alkalikus foszfatáz izoenzimek és a laktátdehidrogenáz izoenzimek elektroforetikus szétválasztásának technikája
Zala Megyei Kórház Tudományos Ülés, Zalaegerszeg 1991.október 11.

9. **Bariska J.:**
Lipidanyagcsere és a reumás betegségek
Hévizi Gyógyfürdőkorház Tudományos Ülés, Hévíz 1992.Szeptember 11.

1o. **Barika J.:**
Gyógyszermonitorozási lehetőségek az ORFI-ban
ORFI Tudományos Ülés Bpest, 1992. Január 13.

11. **Bariska J.,** Bender T.:
Diclofenac / Voltaren / koncentráció meghatározása emberi szérumból és synoviális folyadékból HPLC-vel
MLDT 42. Nagygyűlés Veszprém 1992. Szeptember 24-26.

12. Bariska J.:
A lipidanyagcsere zavarok laboratóriumi diagnosztikája
Állami Szanatórium Tudományos Ülése Sopron 1992. November 14.

13. Bariska J.:
Szabad gyökök hatása a synoviális folyadék biokémiai paramétereire
Rheumatoid Arthritisben és Osteoarthrosisban
Állami Kórhát Tudományos Ülés Balatonfüred 1993. Július 13.

14. J. Bariska:
High Resolution Protein Electrophoresis
Electrophoresis Symposium Issy-les Moulineaux ,Paris 3-5 Nov. 1993.

15. Bariska J.:
A lipidanyagcsere zavarok Laboratóriumi diagnosztikája
Budai Gyermekkórház Tudományos Ülése 1995. Február 13.

16. Bariska J.:
Lipidanyagcsere betegségek és az alapellátás
Dunakeszi Rendelőintézet 1996. Március 13.

17. Bariska J.:
Biokémia-, Általános laboratóriumi ismeretek-, Szervetlen kémia-,
Szerves kémia oktatása
Laboratóriumi asszisztensi-, szövettani szakasszisztensi képzés
Fővárosi Önkormányzat Egészségügyi Szakiskolája 1980-1998.

MELLÉKLET

U J I T Á S I L E I R Á S

T á r g y :

FEHÉRJE ELEKTROFORÉZISRE ALKALMAS AGARÓZ ALAPÚ GÉLRÉTEG ÖSSZETÉTELÉNEK KIDOLGOZÁSA ÉS A GÉLRÉTEG ÖNTÉSI TECHNOLÓGIÁJÁNAK BEÁLLITÁSA

B e a d j á k :

D r . BARLNKA JÁNOS
SCHORM JOLÁN
D r . JUHÁSZ PÉTER

ORFI Központi Laboratóriuma

B E V E Z E T É S

A klinikai kémiai laboratóriumi eljárások között a szérum fehérjék elektroforézises vizsgálata már rutin módszernek számit. Attól függően, hogy a szérum felvitele milyen hordozó anyagra történik, az elektroforézissel elérhető felbontóképesség - amely a kapott fehérjezónák számbeli növekedését jelenti - eltérő. Az érzékenység fokozásával az eljárás jelentősége egyre sokrétübb.

Korábban hordozóanyagként megfelelő minőségü szürőpapirt /papirelektroforézis/ használtak. Az utóbbi évtizedben azonban főleg a cellulózacetát fólia- /cellulózacetátelektroforézis/ ill. az agaróz-agar réteg /agarózelektroforézis/ terjedt el. A három hordózóanyag közül a legutóbbi használata adja a legtöbb információt a fehérje elektroforézis vizsgálata során.

Magyarországon az agaróz alapú Beckman „PARAGON" elektroforézis rendszerből - ilyen található az ORFI Központi Laboratóriumában is - jónéhány már üzemel. Közös gond azonban az, hogy a gyors, flexibilis technika a Beckman által gyárilag gyártott agarózlemezek magas ára miatt - loo vizsgálathoz szükséges kész agarózlemez ára 54.- Dollár - nem áll korlátlanul rendelkezésre.

A szakirodalomból / Z. med. Lab. diagn. 28 /1987/, Heft 1. 113. Von P. LINNEKE und G. KNABE ; ORWOANALYT-Trägerfolien ET loo zur Gelelektrophorrese / értesültünk arról, hogy a wolfeni /NDK/ ORWO gyár 1985 óta jóminőségü polietilénterefta-lát kötőrétegü poliészter hordozófóliát /ORWOANALYT-Trägerfo-lie ET loo / fejlesztett ki, amely alkalmas arra, hogy agaróz gélréteget vigyünk fel rá. /A Magyarországon kapható különbö-ző fóliák e célnak vizsgálataink alapján nem feleltek meg./

Az NDK Nagykövetségének Kereskedelempolitikai Osztálya /Bp. XIV. Népstadion ut lol-lo3/ képviselőjén - Dipl.-Phys. HARALD EILERT - keresztül 1987. nyarán hozzájutottunk e fóliához.

Ujitásunk célja az volt, hogy e fóliára - amelynek magyar-országi forgalmazására illetékes helyeken a kellő lépéseket meg-tettük /ennek alátámasztására 1. sz. mellékletként csatoljuk az AKADIMPEX 1988.o4.11-én kelt levelét / - magunk öntsük ki az agaróz-agar gélréteget s ezzel teremtsük meg annak a lehető-ségét, hogy ne legyünk a Beckman cég gyárilag gyártott drága kész lemezeitől utalva. Ehhez a gélréteg összetételének megfele-lő kidolgozására, valamint a gélöntési technológia beállitására volt szükség.

AZ UJITÁS LEIRÁSA

A felhasznált anyagok

1./ ORWOANALYT - Trägerfolie ET 1oo

Méret; 24 x 3o cm, Vastagság; o,18 mm

Az elektroforézishez használt lapméret; 75 x 1oo mm

2./ Az agaróz-agar gélréteg összetétele

o,7 % agaróz, o,3 % agar, 1,2 % barbitalpuffer, o,1 % natriumazid, o,1 % kalciumlaktát

3./ Barbitalpuffer /pH 8,6 ; ionerősség o,o5/ összetétele

15oo ml bidesztillált vizben feloldunk

2,76 g 5,5 dietil-barbitursavat

15,4o g 5,5 dietil-barbitursavas-nátriumsót

Az AGARÓZ gélréteg öntési technológiájának leirása

1./ 5oo ml 1,2 %-os Barbitálpufferbe beleteszünk 3,5 g agaróz, 1,5 g agart, o,5 g kálciumlaktátot és o,5 g nátriumazidot.

2./ Az oldatot forrásig melegitjük, majd kb. 3o percen át forrásban tartjuk.

3./ A még forrásban lévő agarózoldatot öt egyenlő részre - loo-loo ml térfogatokra - szétöntjük s a lombikokat lefedjük. /Az oldat lehülés hatására megdermed, gélesedik./

4./ A lemezre való öntés előtt loo ml agarózoldatot ujra forrásig melegitjük.

5./ A méretre vágott ORWO lemezre -melyet előzőleg vizszintező asztalra helyeztük - a forrásban lévő agaróz-oldatból kb. 5,5 ml gélt rétegezünk egyenletesen, majd 2-3 percig hagyjuk hülni a megdermedésig.
/ A loo ml oldatból 18 lap önthető egymás után. A gél-oldatnak a lapöntések ideje alatt állandóan forrásban kell lennie!/

6./ A kiöntött, s a lehülés után megdermedt agaróz-gélréteget tartalmazó fóliákat - a megfelelő gélszerkezet kialakulásáig - minimum 2-3 napra nedves kamrába tesszük.

7./ A szérumok felvitele előtt az agaróz lemezeket kivesszük a nedves kamrából és Whatman 4 -es szürőpapirral óvatosan a gélfelületet leitatjuk. /Vigyázni kell a gélréteg épségére, mert a leitatásnál könnyen sérülhet, vagy a szürőpapirhoz ragadhat !/

Az elektroforézis további lépései megegyeznek a már ismert agaróz-gélelektroforézis technikákkal.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A z á l t a l u n k készitett agarózgélt tartalmazó fóliákat alkalmazva az élőmunka ráforditás lemezenként - a Beckman kész lemezeihez képest - kb. 12 %-kal nőtt. /Viszonyitási alapul az elektroforézishez szükséges teljes munkaidőt vettük. Számitásainkat a 2. számú melléklet tartalmazza./

Az agarózgél öntése kb. 10% selejttel jár, tehát minden kiöntött 10 lemezből kilenc használható.

A gyári lemezek és az általunk öntött agarózgélréteg felbontóképességében nincs különbség. / 3. számú mellékletként csatoltuk az eredeti ill. az általunk öntött lemezeket./ Szakmailag legalább annyi információt szolgáltat az új módszerrel készitett gélréteg. Emellett lehetőséget ad arra is, hogy további, az orvosi gyakorlatban jelentős paraméterek meghatározásánál is alkalmazhassuk. /pl. LDH-, alkalikus foszfatáz izoenzimek stb./ Természetesen ehhez az agarózgél összetételének megváltoztatása szükséges! Ilyen irányban tovább dolgozunk.

Az ORFI Központi Laboratóriumában 1982. óta használjuk a Beckman elektroforézises rendszert. Ehhez eddig arra kényszerültünk, hogy megvásároljuk a gyárilag készitett lemezeket. Ennek évi összege kb. 10.400 dollár, ami a ma érvényben lévő kereskedelmi dollár-t átszámitási gyakorlatot figyelembevéve / 1 dollár kb. 70 Ft / 728.000 Ft-nak felel meg.

A napi átlagosan 7o db elektroforézis / ez a szám évek óta csak növekszik !/ elvégzéséhez 7 lemezre van szükség. Ennek az ára 37,8 dollárnak felel meg, ami 2646.- Ft-ot jelent. A mi általunk gyártott agarózgél lemez vegyszer ill. fólia ára - ugyancsak 1 napi igényre, tehát 7 lemezre számitva - 33,3o Ft. Az uj eljárás tehát 8o-szor olcsóbb, s egyben devizát takarit meg!

Az uj módszert 1988. február 1 óta alkalmazzuk. Tapasztalataink szerint jól bevált. /A költség számitást a 4. számu melléklet tartalmazza./

Az intézetben való ujdonsága mellett jelentőségét az is növeli, hogy ezen eljárást az összes - Beckman elektroforézises rendszert használó - labor átveheti. Ilyen módon nem kis összegü valuta megtakaritására van lehetőség.

Munkánkat bejelentettük a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 38. Nagygyülésére Sopronba, amelyre 1988. október 2o-22. között kerül sor.

Emellett folyamatban van mind hazai, mind külföldi módszertani szakfolyóiratban történő leközlése is.

1.számú melléklet.

A K A D I M P E X

Magyar Tudományos Akadémia
Külkereskedelmi Szolgálata
Bpest I.Országház u.3o.
Levélcim: 125o Bp.Pf.1o.

Önök jele:

ORWO ET-1oo fólia
rendelésük

ORFI Központi Laboratórium

Dr. Juhász Péter

Mi jelünk: Kelt: 1988.o4.11.

o93/24-8-ooo2

B u d a p e s t

Fenti számú rendelésükre közöljük, hogy a cég képviselőjének tájékoztatása szerint április végén tudnak választ adni a szállitási lehetőségekre.

Üdvözlettel:

Dutka Imréné sk.

Balásfalvi Ágnes sk.

Telefon: 759-oll, 755-291 Telex: 224433 Távirat: AKADIMPEX BP.

2.számú melléklet.

A Z É L Ő M U N K A R Á F O R D I T Á S számitása

Az agarózgél lemezre helyezzük a mintafelvivő sablont és pipettával felviszünk az 1:4 arányban higitott szérumból 5 ul-t:

- a szérum bediffundálási ideje az agarózgélbe	15 perc
- az elektroforézis futási ideje	2o perc
- a fixálás /etanol-viz-ecetsav= =6oo:3oo:1oo elegyben/	3 perc
- száritás /9o C°-on száritóban/	2o perc
- festés /1% amidofekete 1o B 5 %-os ecetsavban	
- differenciálás - 5 %-os ecetsavban - etanol-viz-ecetsav=6oo:3oo:1oo elegyben - 5 %-os ecetsavban	12 perc
- száritás	2o perc
Az elektroforézis összideje:	9o perc

Az agarózgél öntéséhez szükséges idő:

- az anyagok bemérése, az agaróz oldat forralása és szétöntése együtt	9o perc
- az ujra felforralás és a gélöntés együtt	6o perc
15 lemezre történő agarózöntéshez az összidő:	15o perc

tehát egy lemez öntésére 1o perc szükséges átlagban

Mivel a teljes elektroforézishez szükséges idő 9o perc, igy: egy lemez gélrétegének öntéséhez kb. 12 % plusz élőmunka ráforditás szükséges.

4. számú melléklet.

AZ AGARÓZGÉLRÉTEGHEZ SZÜKSÉGES VEGYSZEREK ÁRA

/A REANAL Katalógus 1986/87. évi kiadása/

A réteg összeállitásához: o,7 % agaróz
o,3 % agar
o,1 % kálciumlaktát
o,1 % nátriumazid szükséges.

Ez azt jelenti, hogy egy napi lemezigényünket figyelembevéve /napi 7o szérumminta elektroforézisével számolva/ 7 lemez öntéséhez agarózból o,35 g, agarból o,15 g, kálciumlaktátból o,oo5 g, valamint a nátriumazidból o,o5 g kell.

Ezek árai:

agarózból 25 g ára 9o6 Ft, akkor o,35 g ára 12,68 Ft

agarból 454 g ára 434o Ft, akkor o,15 g ára 1,43 Ft

kálciumlakt.looo g ára 191 Ft, tehát o,o5 g ára o,oo9 Ft

nátriumazid loo g ára 269 Ft, tehát o,oo5 g ára o,13 Ft

Az egy napra eső vegyszerigény összára: 14,249 Ft

Az ORWO fólia ára : kb. 19,ooo Ft

/A hasonló nagyságu ORWO röntgen lemez ára alapján /

Az egy napi vegyszer igény + fóliaigény : 33,3o Ft

Az egy napra szükséges gyárilag gyártott Beckman lemez ára: 37,8 Dollár, mely Ft-ban:

37,8 x 7o = 2646.- Ft

/loo vizsgálathoz szükséges kész lap ára ugyanis 54.- Dollár, ez 1988. márciusi Becman közlés - csatolva az 5.melléklet/

2646:33,3 = 79,45

Az általunk gyártott gél ára kb. 8o-szor olcsóbb !

5.számú melléklet.

A-1191 Wien, Stefan-Esders-Platz 4, P.O. Box 145

BECKMAN

National Institute of Rheumatology and Physiotherapy
Central Laboratory

Att.: Dr.Janos Bariska

Frankel Leo 17-19
H-1027 Budapest

PROFORMA INVOICE NO: 4447
DATE: 8.3.1988

VALIDITY: 90 days
TERMS: 30 days nett

YOUR REF:
OUR REF: HA/WA/H

DELIVERY-TIME: 3-4 months
COUNTRY OF ORIGIN: USA

ITM	QTY	DESCRIPTION	PART NO	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	PARAGON ELECTROPHORESIS SYSTEM - Agarose gel - stability of kits 18 months - no loss of moisture or gel integrity - high sensitivity and resolution - easy to handle Consists of power supply 240V, 2 cells, dryer, incubator, wet processor, press dryer, applicator tips, manual, test cell, timer, thermometer, workstation.	655 801		2.120,--
		Start up package (for approx. 1 year)			
2	10	Serum Protein kit (100 tests)	655 900	54,--	540,--
3	2	SPE-II (liquor) kit (80 tests)	441 760	105,--	210,--
4	5	Lipoprotein kit (100 tests)	655 910	54,--	270,--
5	1	CK-Isoenzyme kit (100 tests)	655 930		188,--
6	1	Hemoglobin kit (100 tests)	441 780		100,--
7	1	LDH-Isoenzyme kit (100 tests)	655 940		118,--
8	1	B-2 Buffer (10 bottles, 15 liters)	655 780		105,--
9	1	SPE Control serum I.D.ZONE normal	667 600		201,--
10	1	SPE Control serum I.D.ZONE abnormal	667 490		221,--
11	10	Immunofixation (10 profiles)	444 930	200,--	2.000,--
12	3	Pipet tips (1000)	NB96652 880	44,--	132,--
13	1	Wet station cups (5)	655 990		87,--
		PRICE FREE AUSTRIAN BORDER	TOTAL US $		

*For additional parts please see our price list!

BECKMAN INSTRUMENTS
Ges.m.b.H. AUSTRIA

Ing. Franz Haller
Diagnostic Systems Group

SZÉRUMFEHÉRJÉK AGARÓZGÉL ELEKTROFORÉZISE ORWO ET loo HORDOZÓFÓLIA HASZNÁLATÁVAL

Dr. Bariska János, Dr.Bariskáné Schorm Jolán

Dr. Juhász Péter

ORFI Központi Laboratóriuma, Budapest

A szakirodalomból /Z.med.Lab.diagn. 28 /1987/, Heft 1., 113/ értesültünk arról, hogy a wolfeni /NDK/ ORWO gyár 1985 óta gyárt jóminőségü poliészter hordozófóliát /ORWOANALYT - Trägerfolie ET loo /, amely polietilántereftalát tartalmánál fogva alkalmas agaróz gélréteg felvitelére.

Célunk az volt, hogy állitsunk össze a szérumfehérjék elektroforézisére alkalmas, a fenti lemezre önthető agaróz alapú gélréteget, ill. dolgozzuki ki a megfelelő öntési technológiát.

1987 ősze óta használjuk ezen agarózlapokat. Értékelhetősége nem rosszabb, mint az addig használt Beckman PARAGON lemezek, azonban kb. 8o-szor olcsóbb és devizát vált ki.

AZ AGARÓZALAPU GÉLRÉTEG ÖNTÉSÉHEZ

FELHASZNÁLT ANYAGOK

1./ ORWOANALYT - Trägerfolie ET loo

Méret: 24 x 3o cm, Vastagság: o,18 mm

Az elektroforézishez használt lapméret: 75 x loo mm

2./ Az agaróz-agar gélréteg összetétele

o,7 % agaróz, o,3 % agar, 1,2 % barbitalpuffer,

o,1 % nátriumazid, o,1% kalciumlaktát.

3./ Barbitalpuffer /pH 8,6; ionerősség o,o5/ összetétele

15oo ml bi.deszt. vizben feloldunk

2,76 g 5,5 dietil-barbitursavat

15,4o g 5,5 dietil-barbitursavas-nátriumsót

AZ AGARÓZALAPU GÉLRÉTEG ÖNTÉSI TECHNOLÓGIÁJÁNAK LEIRÁSA

1./ 5oo ml 1,2 %-os Barbitalpufferbe beleteszünk 3,5 g agarózt, 1,5 g agart, o,5 g kálciumlaktátot és o,5 g nátriumazidot.

2./ Az oldatot forrásig melegitjük, majd kb. 3o percen át forrásban tartjuk.

3./ A még forrásban lévő agarózoldatot 5 egyenlő részre /loo-loo ml-es térfogatokra/ szétöntjük s a lombikokat lefedjük. Az oldat lehülés hatására megdermed, gélesedik/.

4./ A lemezre való öntés előtt a loo ml térfogatú agarózoldatot újra forrásig melegitjük.

5./ A méretre vágott ORWO lemezre - melyet előzőleg szintező asztalra helyeztünk - a forrásban lévő agarózoldatból kb. 5,5 ml gélt rétegezünk egyenletesen. 2-3 percig ghagyjuk hülni.
/ a loo ml oldatból 18 lap önthető. A géloldatnak a lapöntés ideje alatt forrásban kell lennie!/

6./ A kiöntött /s a lehülés alatt megdermedt/ agarózalapu gélréteget tartalmazó fóliákat minimum 2-3 napra nedves kamrába helyezzük. /Ezalatt a megfelelő gélszerkezet kialakul!/

7./ Az agaróz tartalmu lemezeket kivesszük a nedves kamrából s a szérumok felvitele előtt Whatman 4-es szürőpapirral a gélfelületet óvatosan leitatjuk.

ÖSSZEFOGLALÁS

FEHÉRJE ELEKTROFORÉZISRE ALKALMAS AGARÓZ ALAPU GÉLRÉTEG ÖSSZETÉTELÉNEK KIDOLGOZÁSA ÉS A GÉLRÉTEG ÖNTÉSI TECHNOLÓGIÁJÁNAK BEÁLLITÁSA ET - loo hordozófólián

Bariska János , Schorm Jolán , Juhász Péter

ORFI Központi laboratóriuma Budapest

A szakirodalomból / Z.med.Lab. diagn. 28 /1987/, Heft 1.,113 / értesültünk arról, hogy a wolfeni /NDK/ ORWO gyár 1985 óta jóminőségü poliészter hordozófóliát /ORWOANALYT - Trägerfolie ET loo/ - melyet polietilénterefta láttal vontak be - fejlesztett ki. Ez alkalmas arra, hogy agaróz gélréteget vigyünk fel rá.

Most arról számolunk be, hogy sikerült a fenti fóliára jó minőségü gélréteget felvinnünk. Célunk az volt: dolgozzuk ki a megfelelő gél összetételét és állitsunk be hozzá egy alkalmas öntési technológiát. 1987 ősze óta Központi Laboratóriumunkban az általunk kidolgozott eljárás szerinti agarózgél lapokat használjuk a szérumok elektroforézisese vizsgálata során.

A lap minősége semmivel nem rosszabb az addig j használt Beckman PARAGON lemezeivel szemben. Előnye viszont, hogy előállitása kb. 8o-szor olcsóbb és egyuttal devizát vált ki.

Akadémiai Kiadó
Budapest, 1990

Radicals, ions and tissue damage
Matkovics,B., Karmazsin,L. and Kalász,H. eds

MODIFIED LIPOPROTEINS

BARISKA, J.

National Institute for Rheumatism and Physiotherapy
Budapest, Hungary

THE SIGNIFICANCE OF MODIFIED LIPOPROTEINS

Modified lipoproteins are relevant to the early stages of atherogenesis. It is well known that the fatty streak lesions of atherosclerosis contain foam cells. These cells are rich in cholesteryl ester and are thought to be formed from tissue macrophages (derived from circulating monocytes) by uptake of the major carrier of cholesteryl ester in the plasma low density lipoprotein (LDL). However, there are two major lines of evidence indicating that this uptake does not occur via the LDL receptor:

1. Patients with homozygous familial hypercholesterolaemia (FH) and Watanabe heritable hyperlipidaemic (WHHL) rabbits, although both lack LDL receptors, still develop lesions containing foam cells.
2. Incubation of monocytes or macrophages with native LDL in vitro does not result in foam cell formation.

It has therefore been suggested that some form of modified LDL may be responsible for the cellular accumulation of cholesteryl ester via a route other than the native LDL (B/E) receptor. Two such modifications are oxidised LDL and acetyl LDL, which are taken up by specific "scavenger" receptors on macrophages, leading to foam cell formation in vitro.

Other forms of modification which have been found to increase LDL uptake into macrophages include glycolysation, complexes of LDL with macromolecules such as proteoglycans, and self-aggregates of LDL.

Interestingly, unmodified beta-very low density lipoprotein (beta-VLDL) can also be taken up by macrophages to form foam cells, and this occurs via the B/E receptor. Beta-VLDL is found physiologically in cholesterol-fed animals, but the only modified lipoprotein for which there is

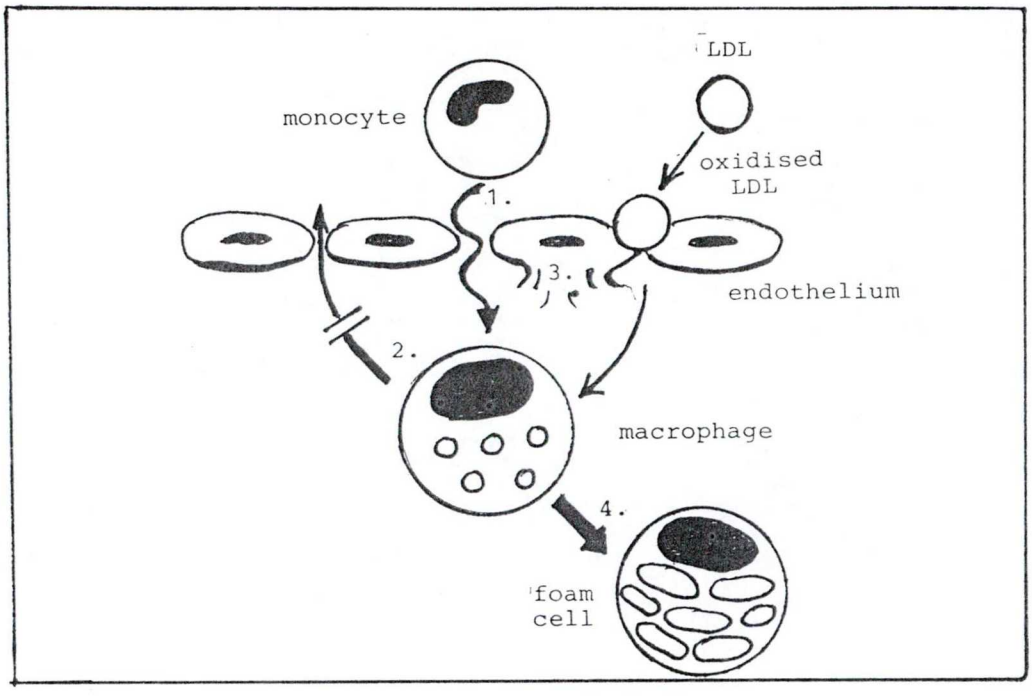


Fig. 1. Possible effects of oxidised LDL as related to atherogenesis.
1. Stimulation of monocyte chemotaxis.
2. Inhibition of macrophage mobility.
3. Endothelial cell toxicity.
4. Foam cell formation.

evidence of natural occurrence is oxidised LDL. This fact, together with other features which would favour atherogenesis (Fig. 1), suggests that oxidised LDL is certainly important in the initiation and progression of atherosclerosis.

MECHANISMS OF OXIDATIVE MODIFICATION

In the opinion of Parthasarathy, lipoxygenase may be important in the oxidative modification of LDL by cells.

A number of cells, including endothelial and smooth muscle cells, monocytes, macrophages and even fibroblasts, have been shown to oxidise LDL in vitro. It has been suggested that this effect is mediated by superoxide radicals, but Parthasarathy has found that superoxide dismutase, which engulfs these radicals, does not inhibit the effect. In addition, when

SZEGED

superoxide radicals are generated by way of xanthine oxidase, this does not increase oxidation of the lipoprotein. Furthermore, the action of the superoxide radicals would be expected to be non-selective and yet high density lipoprotein (HDL) is not oxidised by endothelial cells.

However, inhibitors of lipoxygenase such as piriprost eicosatetranoic acid have been found to inhibit the cell-mediated oxidation of LDL. Lipoxygenase is thought to generate lecithin, which is converted to lysolecithin and oxidised fatty acids by phospholipase A_2. It is these oxidised fatty acids which are believed to cause oxidative modificationof LDL. Despite these findings, Parthasarathy warns that this may not be the end of the superoxide story, since oxygen radicals are thought to be generated during the lipoxygenase reaction itself.

AUTO-OXIDATION AND CELL INJURY

Sevanian presented what he claimed was a "slightly different view" of the mechanism of atherogenesis, focusing on the cytotoxicity of cholesterol oxides and the mechanisms by which cholesterol becomes oxidised via free radicals.

Cholesterol is often regarded as a chemically inert material, but while this may be so in vitro, it appears not to be the case in vivo. Cholesterol oxides are known to exhibit a variety of effects on cell membranes and to interfere with cholesterol synthesis. Sevanian's evidence of their cytotoxic effects suggests that it is the level of cholesterol oxidation rather than cholesterol itself which is important in atherogenesis, particularly α- and β-cholesterol epoxides and cholestanetriol.

Free radical formation produces cholesterol epoxides and a series of ketone and alcohol derivatives based around carbon-7. Cholestanetriol appears to be particularly toxic. At levels as low as lo uM, it can cause retraction of confluent endothelial cells with loss of their communication and metabolic cooperation.

Experiments on New Zealand white rabbits made either hypertensive, hyperlipidaemic (by cholesterol feeding) or both, show that the severity of hypertension and hyperlipidaemia in rabbits exposed to these conditions was better correlated with the proportion of cholesterol oxides in serum cholesterol than with cholesterol itself, and that even in hyperlipidaemic/ normotensive rabbits there was a marked increase in levels of cholesterol oxides in the serum and in the aortic arch lipid, while the cholesterol

levels stayed within normal limits. Cholesterol, epoxides and cholestanetriol were particularly elevated.

LDL MODIFICATION BY MALONDIALDEHYDE

There is evidence that LDL modification by the lipid peroxidation product malondialdehyde occurs in vivo.

Haberland and her colleagues, using monoclonal antibodies raised against both the LDL-receptor binding site on apolipoprotein B-100 (ApoB-100) and the malondialdehyde-linked lysines on modified LDL, have demonstrated that there is focal deposition of malondialdehyde-modified protein in both early and late atheromatous lesions in the thoracic aorta of the Watanabe heritable hyperlipidaemic (WHHL) rabbit, the animal model for familial hypercholesterolaemia (FH).

The two antibodies appear to bind to the same regions of the intima, although the technique uses adjacent arterial sections. Specifically, they appear in the elastic lamina and the smooth muscle layers. This is evidence that LDL bound to endothelium can become modified. There is nod etectable amount of malondialdehyde-modified LDL in the plasma in these animals, suggesting that the release of malondialdehyde in vivo may be restricted to the arterial wall.

Similar experiments on normolipidaemic white rabbits demonstrated only slight aortic staining for malondialdehyd protein or ApoB-100. Since Watanabe rabbits lack the LDL receptor, the suggestion is that the endothelium-bound LDL can become modified by a physiological product of lipid peroxidation and later produces cholesteryl ester deposition in macrophage-derived foam cells of the atherosclerotic lesion.

Haberland's monoclonal antibody preparation against malondialdehyde-modified LDL appears to be specific for the cross-linked lysines, as there is cross-reactivity between modified LDL (or other proteins) and native or otherwise oxidised LDL, HDL, albumin or gamma-globulin.

REFERENCES

Avogaro, P., Bon, G.B. and Cazzolato, G. (1988) Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis 8, 79-87.

Haberland, M.E., Olch, C.L. and Fogelman, M.A. (1984) Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the

scavenger receptor of human monocyte macrophages. J. Biol. Chem., 259, 11305-11311.

Haberland, M.E. and Fogelman, A.M. (1985) Scavenger receptor-mediated recognition of maleyl bovine plasma albumin and the demaleylated protein in human monocyte macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 2693-2697.

Jurgens, G., Lang, J. and Esterbauer (1986) Modification of human LDL by lipid peroxidationproduct 4-hydroxynonenal. Biochim. Biophys. Acta 875, 103-114.

Parthasarathy, S., Fong, L.G., Otero, D. and Steinberg, D. (1987) Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84, 537-540.

Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F. and Montestruque, S. (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. Arch. Biochem. Biophys., 223, 441-452.

Steinbrecher, U.P. (1987) Oxidation of human LDL results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by liquid peroxide decomposition products. J. Biol. Chem., 262, 3603-3608.

DETERMINATION OF DICLOFENAC /VOLTAREN/ CONCENTRATIONS IN HUMAN SERUM AND SYNOVIAL FLUID BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

J. B A R I S K A, T. B E N D E R

Central Laboratory and "A" Department of Rheumatology, National Institute of Rheumatology and Physiotherapy, Budapest, Hungary

Topical application of non-steroidal anti-inflammatory drugs of late years came to the front. Elimination of systematic side-effects and obtaining of real local influence put into practice. Abroad for many years put in circulation gel and cream of ketoprofen, ibuprofen and diclofenac. Appearance of diclofenac-gél /Voltaren Emulgel/ is in every respect advantageous. Penetration of gel or cream may but accelerate with several physico-therapeutical method. The practical application of ionto-phoresis method: drug administer with electric current and for administration of sonophoresis: influx with ultrasonic treatment. Dissotiated drug molecule ingest with penetration of anions or cations into percutaneous and mainly has topically effect.

Diclofenac sodium /Voltaren/ is non-steroidal anti-inflam-matory drug used in the treatment of rheumatic disease. The lecture gives sensitive and selective high-performance liquid chromatography /HPLC/ assays for diclofenac in biological fluids. Above lumbar region and knee put into practice ultrasonic treatment and two kind electric current. The proposed reverse-phase HPLC assay provides a simple and sensitive means of determining concentrations of diclofenac in biological fluids /in human serum and syno-vial fluids/.

From the National Institute of Rheumatology and Physiotherapy (Head: *G. Balint*, M.D.), Department A, Budapest, Hungary

Diclofenac-Absorption from Voltaren Emulgel through Iontophoresis and Phonophoresis

T. Bender, J. Bariska, Erzsebet Szabo, Judit Kelemen, Andrea Rigo, Ilona Hetesi, and A. Zimmerman

Key-words: Voltaren emulgel – penetration – iontophoresis – phonophoresis.

Summary: The authors report their experience with Voltaren emulgel treatment combined with ionto or sonophoresis. As early as after the first application of Voltaren emulgel and ultrasonic treatment of the lumbar spine, diclofenac appears in serum. There is no cumulative effect, not even after 5 treatments. Diadynamic or galvanic currents cause higher drug levels in serum. Treatment of the knee joint with Voltaren emulgel and iontophoresis resulted in higher drug levels than with sonophoresis; diclofenac was found in the synovial membrane, as well as in the bone. Voltaren emulgel penetrates the skin well and has proven to be efficient both in the case of iontophoretic and phonophoretic treatments. **(Eur. j. phys. med. rehabil 1995;5:130-132)**

Introduction

In the past few years several publications appeared on the local use of non-steroid, antiphlogistic drugs (NSAIDS). Due to the frequent gastric side-effects of oral NSAIDS (non-steroid antiphlogistic drugs), more and more people tend to use percutaneously absorbed medicines. The various gels, ointments and sprays that are locally absorbed can be used by themselves or in combination with physiotherapeutical procedures. Indomethacin, ketoprofen, diclofenac and salicylate are among the locally efficacious NSAIDS that are known to be well absorbed-. Much has been written on iontophoresis and sonophoresis, although the literature gives varying figures on drug absorption. The absorption of non-steroid drugs combined with iontophoresis has had much poorer coverage.- Medicine has made use of Voltaren for over 15 years; its local variant too has been in use for years (1). The primary aim of a NSAIDS ointment or gel is to achieve a local effect. It is a realistic demand that the percutaneously used substance should penetrate the skin, the adjacent connecting tissue, as well as the joint fluids where it is to generate a local antiphlogistic effect (2, 3). Based on the proven, effect producing mechanisms of iontophoresis and phonophoresis, the various kinds of electric current and ultrasound can improve drug penetration (4). In this paper, we try to find an answer to the questions of which type of current should be used in the treatment of the lumbar spine in order to achieve a most distinct drug absorption, and whether the drug appears in the synovium if used in the knee joint. The study was done with Voltaren emulgel (Ciba-Geigy).

Subjects and methods

In the first part of the study, we had 20 participants suffering from spondylosis lumbalis. 6 patients received paralumbar ultrasound treatment (Sonopuls, intensity 0.5 W/cm^2, duration 5 min), 9 patients were treated with diadynamic current (Stimat 200 LP current, 20 min treatment duration, longitudinal treatment procedure with 150 x 150 cm^2 electrode), and 5 patients were treated with galvanic current (20 min treatment duration with 150 x 150 cm^2 electrode). Current sensitivity varied between an average of 10 and 20 mA according to the individual endurance. Between the emulgel layer and the sponge, we placed a conductor foil. Blood samples were taken half an hour after the first treatment and half an hour after the fifth treatment. Each time we placed 100 mg of Voltaren emulgel under the electrode.

14 patients with clinically diagnosed knee synovitis participated in the second part of the study (11 acute arthroses, 2 rheumatoid arthroses, 1 spondylarhritis ankylopoetica). 5 patients received 6-minutes of peripatellar sonophoretic treatment at an intensity of 0.5 W/cm^2 on 5 consecutive days, while 9 patients received a 20-minute iontophoretic treatment in the knee joint. Blood was sampled and arthrocentesis done after 5 days. Only those patients who had not been taking diclofenac in the preceding 2 weeks and had zero-levels of diclofenac in serum participated in the study.

5 patients suffering from arthrosis genu received treatment with Voltaren emulgel and a 20-minute iontophoresis (galvanic current) for 4 days before they underwent surgery at the Orthopaedics Department of our hospital. During the operation the synovial membrane and bone were removed and the diclofenac level was measured in the removed anatomic structures. Serum, synovia and synovial membrane were defined by HPLC (Isco USA, column: Nucleosil C18, 250 x 4.6 mm, globule size 10 micron).

Results

The drug appeared in serum but did not cumulate not even after the fifth treatment when applied in the paralumbar region and combined with ultrasound (Tables 4, 5, and 6). (There was no significant difference measured between the first and the fifth day.). Diadynamic currents caused higher serum levels than ultrasound, yet the most definite change occured with galvanic currents. After percuta-

Corresponding address: T. BENDER, M.D.,
National Institute of Rheumatology and Physiotherapy,
Department A, Frankel Leo Street 25–27,
54 Postbox, H-1520 Budapest.

neous application to the knee joint, the value measured in the synovium was higher than that in serum (Tables 2 and 3). The difference between the 2 groups was significant in the synovium ($p < 0.05$), whereas in serum it was not. After iontophoresis, diclofenac appeared in the synovial membrane and in the bone as well (Table 1).

Table 1. Diclofenac level in the synovial membrane and in the bone (ng/ml) (using galvanic current) (n = 5).

synovial membrane		bone
3.820		32.760
12.460		117.700
18.720		17.140
10.200		no data
10.700		no data
Average		
11.180		55.867
Standard deviation		
5.335		54.116

Table 2. Changes in the diclofenac concentration in serum and synovial fluid after 5 consecutive phonophoreses of the knee joint (ng/ml).

synovia		serum
21.500		3.500
13.000		0.000
17.000		10.280
12.740		8.100
232.000		79.000
Average		
59.248		20.176
Standard deviation		
96.637		33.125

Table 3. Changes in the serum and synovial diclofenac concentration after 5 consecutive knee joint iontophoreses (ng/ml).

galvanic current (n = 9)		
synovia		serum
1050.000		701.000
240.000		4.900
1078		338.500
21.000		5.000
28.500		30.00
872.000		26.900
399.900		6.700
75.000		18.750
60.000		193.750
Average		
424.933		147.278
Standard deviation		
451.089		237.270

Discussion

The use of local, antiphlogistic drugs in combination with physiotherapeutic treatments is still a matter of discussion in the literature on physiotherapy. In their paper on steroid iontophoresis and sonophoresis, *Chantraine* and *Bender*

Table 4. The diclofenac level in serum following 1 and 5 consecutive iontophoreses (ng/ml).

Diadynamic current (n = 9)		
First day		Fifth day
3.750		306.000
30.000		37.500
0.000		29.400
0.000		5.350
0.000		192.000
0.000		297.000
0.000		3.160
0.000		6.250
0.000		4.250
Average		
3.720		97.879
Standard deviation		
9.922		129.833

Table 5. The diclofenac level in serum following 1 and 5 consecutive phonophoreses (ng/ml).

Ultrasound (n = 6)		
First day		Fifth day
3.000		6.600
3.300		13.750
3.300		9.000
5.000		6.600
1.100		1.600
10.000		21.000
Average		
4.283		9.758
Standard deviation		
3.063		6.773

Table 6. The diclofenac level in serum following 1 and 5 consecutive iontophoreses (ng/ml).

Galvanic current (n = 5)		
First day		Fifth day
28.400		90.500
41.370		540.500
13.600		120.000
0.000		14.400
4.680		114.000
Average		
17.610		175.880
Standard deviation		
17.134		208.126

did not succeed in demonstrating an efficient drug penetration (5, 6, 7). *Gobelet* found a minor absorption in the synovium only after 45 minutes of iontophoresis (8) In the case of salicyl phonophoresis, *Dietze* found increased salicyl values in serum (9).
Pratzel demonstrated a significant increase in the serum concentration of indomethacin with Amuno gel iontophoresis (10) (note that the electrode had a large surface and the duration of the treatment was 1 hour). It seems evident, according to figures from the literature, that drug concentrations in serum and synovia are dose dependent both in the case of iontophoresis and phonophoresis. In the case of current, concentrations depend on the duration of treatment and on the surface of the electrode, and in the case of ultrasound on sound intensity. *Benson* et al. found gels to transmit ultrasound better than ointments (11). *Radenmacher* et al. compared the application of diclofenac ointment to the knee joint with placebo. They attributed the increase of synovial drug levels to circulation factors rather than to direct penetration (12).*Vogte* et al. studied ketoprofen in the fascia lata and in the muscle as well (13). *Bolten* obtained rather high standard deviations in the case of Felbinac gel (14). From our own results with diclofenac, which no doubt have shown high standard deviations too, we can deduce that the systemic absorption can play an important role in drug absorption but current or ultrasound can accelerate direct penetration. When using Voltaren emulgel in the knee joint we have always to consider the anatomic variations e.g. obesity of the patient, quantity of fluid removed in artrocentesis, basic disease. The high synovial drug level and the appearance of diclofenac in the synovial membrane prove the effect on the target organ although there are still many questions waiting to be answered.

References

(1) Riess W, Stierlin H, Degen P, et al: Pharmakokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. Scand J Rheumatol 1978; 22 (suppl): 17-19.
(2) Bender T: Iontoforezissel és fonoforezissel végzett gyógyszerpenetráció mérétékének összehasonliró vizsgálata. Balneol Gyógyfürd Gyógyidegenforg 1992;3-4:85-87.
(3) Chlud K, Wegener HH: Perkutane Therapie mit NSAID unter besonderer Berücksichtigung kinetischer Fragen. Eular Bull 1987;2:41-45.
(4) Skauen M, Zentner G: Phonophoresis. Intern J Pharm 1984;20:235.
(5) Bender T, Fehér GK: Adatok a hydrokortizon iontoforézissel történö felszivódásához. Gyógyszereink 1988;38:88-90.
(6) Gobelet C, Folloler A, Meyland F, Maeder E: Iontophorese aux corticoides. Cinesologie 1982;21:279.
(7) Bender T, Fehér GK: Adatok a fonoforezissel történö gyógyszerfelszivódáshoz. Balneol Fürdöügy Rehab 1988;3:173-176.
(8) Chantraine A, Ludy JP, Berger D: Cortisone Iontophoresis Possible? Arc Phys Med Rehabil 1986;63,38-40.
(9) Dietze C, Callies R, Hippius M: Salicylsaure Phonophorese und Salicylatnachweis. Z Physiother 1987;1978;39:99-102.
(10) Pratzel H, Machens R, Dietrich P: Iontophorese zur forcierten Hautresorption von Indometacin und Salicylsäure. Z Rheumatol 1986;45:74-78.
(11) Benson AE, McElnay JJ: Transmission of ultrasound energy through topical pharmaceutical products. Physiotherapy 1988;74:587-589.
(12) Rademermacher J, Jentsch D, Scholl M, et al: Diclofenac concentration in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. J clin Pharmac 1991;31:537-541.
(13) Vögtle-Junkert U, Peters H, Berener H, Wagener H: Spezielle Untersuchungen zur perkutanen Kinetik von Ibuprofen. Akt Rheumatol 1990;15:56-62.
(14) Bolten W, Salzmann G, Goldmann R, Miehlke K: Plasma und Gewebekonzentration von Biphenylessigsäure nach einwöchiger oraler Fenbufenmedikation bzw. topischer Anwendung von Felbinac-Gel am Kniegelenk. Z Rheumatol 1989;48:317-322.

Literature Review

Brief literature extracts

This section is a regular feature of our journal. Its aim is to report on studies in physical medicine and rehabilitation (PMR) which recently appeared in accepted journals which are not specialized in PMR. This is meant to be of service to those of our readers who have no regular access to medical libraries and thus might have missed what was printed in the N Engl J Med, Lancet, Ann Int Med, JAMA, Br Med J, etc.
We invite all our readers to contribute to these columns. All contributions should be short (max. 2 typed pages) and contain the main findings of the study followed by a brief comment on the importance, relevance, strength or short- comings of the particular study.

J. Triano, M. McGregor, A. Hondras, C. Brennan: Manipulative Therapy Versus Education Programs in Chronic Low Back Pain. Spine 1995;20:948-955.

Published meta-analyses suggest clinical benefit from manipulation for acute patients. Data are, however, inconclusive for patients having symptoms for longer than 1 month. A randomised trial was conducted on a representative sample of patients with untreated low back pain lasting 7 weeks or longer, or having more than 6 episodes in 12 months. Its aim was to contrast the effectiveness of manipulation, a manipulation mimic, and a back education programme. Methodological criticisms of earlier studies were addressed. A total of 1267 consecutive patients were screened. Block randomisation was used to assign 209 qualifying patients to treatment groups. Self-reported pain and activity tolerance served as primary outcome measures. Patients were assessed at enrollment, after 2 weeks of treatment and again after 2 weeks without treatment. Multiple teams conducted recruitment, randomisation, assessment, treatment and data analysis independently without sharing information. Treatments were carefully described, monitored and balanced for physician attention and physical contact effects. A total of 81.3% of subjects completed the study. Confounding factors and missing data were identified in approximately 20% of those completing the final follow-up. Analysis of the remaining data was carried out. A strong time effect under treatment was observed. Greater improvement was noted in pain and activity tolerance in the manipulation group. Immediate benefit from pain relief continued to accrue after manipulation, even for the last encounter at the end of the 2-week treatment interval. The authors conclude that treatment according to a defined plan using manipulation is effective even in low back pain exceeding 7 weeks' duration. This conclusion may well be correct. The majority of published evidence does support the notion that manipulation works both for acute and chronic cases. Yet we need more studies like this one to be sure. Chronic LBP is an expensive condition. Any therapy that is cost-effective would be more than welcome. We also need to know which type of patient does and which type does not respond.

E. Ernst, Exeter

A koffein elimináció vizsgálatának diagnosztikus értéke krónikus májbetegségekben

Darnót Gábor dr.[1], Nemesánszky Elemér dr.[1] és Bariska János dr.[2]

Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, Budapest, II. Belgyógyászati Osztály (osztályvezető főorvos: Nemesánszky Elemér dr.)[1]
Központi Kémiai Laboratórium (osztályvezető főorvos: Juhász Péter dr.)[2]

Mivel a koffein kizárólag a májban metabolizálódik, az utóbbi évek irodalmi adatai arra utalnak, hogy a koffein elimináció, mint májfunkciós teszt alkalmazható. Erre vonatkozó saját tapasztalatokat 40 májbetegen (11 krónikus alkoholos hepatitises, 24 cirrhosisos, 5 egyéb, nem cirrhosisos májbeteg) szereztünk. Kontrollként nyolc egyén szolgált. A cirrhosisos betegeket a Child—Pugh-kritériumok szerint csoportosítottuk. 0,2 g koffein per os beadása előtt és azt követően 3, 6, 9 és 12 óra múlva vettünk vért a koffein elimináció meghatározásához. Éhgyomri és beadás után 12 órával mért szérum koncentrációt, szérum clearance-et, felezési időt, csúcskoncentrációt és megoszlási térfogatot hasonlítottunk össze. A cirrhosissal nem járó májbetegségek esetében a koffein kinetikai paraméterek nem mutattak értékelhető eltérést a kontrollokhoz képest. A cirrhosisos betegek koffein eliminációja számottevően lassult. Eredményeink a koffein elimináció csökkenése és a Child—Pugh szerinti súlyossági stádiumok között összefüggést igazoltak. A koffein beadás után 12 órával meghatározott szérum koncentráció egyszerű és az előrehaladott stádiumban levő májbetegségek megítélésében hasznosítható módszer.

Kulcsszavak: májcirrhosis, Child—Pugh-osztályozás, májfunkciós teszt, koffein elimináció

Value of caffeine elimination test in the diagnosis of chronic liver diseases. Data from the past few years have shown that as caffeine metabolizes solely in the liver, caffeine elimination can serve as a liver function test. We have collected data by monitoring 40 persons with liver diseases (11 chronic alcoholic hepatitis, 24 liver cirrhosis, 5 non-cirrhotic liver disease). Eight subjects served as controls. The patients with liver cirrhosis were classified according to the Child—Pugh scoring system. To determine caffeine elimination blood samples were collected before and at 3, 6, 9 nd 12 hours after oral administration of 0.2 g caffeine. Fasting serum caffeine concentration and concentration 12 hours after administration, serum clearance, half life, peak concentration and volume of distribution have been compared. The respective values measured in patients with non-cirrhotic liver diseases did not differ significantly from the controls. The disappearance of caffeine was significantly decreased in cirrhotics. Our results demonstrated a good correlation between impairment of caffeine elimination and assesment of severity of liver disease by the Child—Pugh classification. Measuring serum levels in samples taken 12 hours after caffeine administration is a simple and useful method in the diagnosis of liver diseases at cirrhotic stage.

Key words: liver cirrhosis, Child—Pugh classification, liver funtion test, caffeine elimination

hepatológiai vonatkozású diagnosztikus értékű laboratóami tesztek általában a máj sokirányú működésének csak y-egy paraméterét jelentik, és nem adnak felvilágosítást vizsgált beteg májának teljes kapacitásáról. Inaktív stáumban levő cirrhosisban például a májsejtekből eredő érum enzimek aktivitásai akár normálisak is lehetnek a nnálló jelentős funkciócsökkenés ellenére. Idült májbegségben szenvedők életkilátásait döntően a máj aktuális ködésének eredője szabja meg. A máj működését elsőrban az általa termelt plazma összetevők szintézise, valaint bizonyos anyagok metabolizmusa és kiválasztása útn vizsgálhatjuk (20). Ismert farmakokinetikájú exogén yagot alkalmazva a máj metabolizálóképességét kvantiív módon jellemezhetjük (26). Számos ilyen módszer nert (brómszulfalein próba, indocianin-zöld-teszt, galaktóz terhelési próba, D-glukársav és mentol glukuronid kiválasztás vizsgálata, aminopirin kilégzési teszt, antipirin, szulfadimidin kinetika és lidokain, illetve hexobarbitál metabolizmus vizsgálata), elterjedésüknek azonban gátat szab bonyolult kivitelezhetőségük, speciális műszer- és anyagigényük, illetve esetenként a tesztanyag nemkívánatos mellékhatása is (11, 16, 18—21, 32).

Desmond és mtsai 1980-ban a koffein elimináció szignifikáns csökkenését mutatták ki májcirrhosisos betegekben (5). Ezt követően ismertté vált a koffein eliminációs képesség és a hepatológiai diagnosztikában használt rutintesztek számos összefüggése májbetegségek esetében (10, 11, 21, 27, 28). Az eddigi tapasztalatok arra utalnak, hogy a koffein clearance alkalmas a máj mikroszomális működésének kvantitatív jellemzésére (29).

1. táblázat: Cirrhosisos betegeink adatai a Child-Pugh szerinti csoportosításhoz

	1 pont	Betegek száma	2 pont	Betegek száma	3 pont	Betegek száma
szérum bilirubin (μmol/l)	<34	7	34—51	3	>51	14
szérum albumin (g/l)	>35	2	28—35	7	<28	15
ascites	nincs	5	terápiára még jól reagáló	9	alig befolyásolható	10
tudatállapot	tiszta	11	ködös	10	komatózus	3
prothrombin idő (%)	>70	7	40—70	15	<40	2
Child-Pugh-A			5— 6 pont		3 beteg	
Child-Pugh-B			7— 9 pont		5 beteg	
Child-Pugh-C			10—15 pont		16 beteg	

A koffein tesztanyagként való alkalmazása több szempontból kedvező: mint általánosan elterjedt élvezeti szer alacsony dózisban veszélytelenül adható, olcsó és könnyen hozzáférhető; per os adva gyors és teljes felszívódást követően a szervezet teljes folyadéktérében eloszlik, csekély mértékben kötődik plazmafehérjékhez; szinte kizárólag a májban metabolizálódik, kiürülését nem befolyásolja számottevően a máj átáramlás változása és minimális a vizelettel történő közvetlen kiürülése (4, 12, 25, 26).

A szérum koffein koncentráció a gyógyszer szintek monitorozásának elterjedésével mindinkább hozzáférhető magasnyomású folyadékkromatográfiás technika (HPLC) segítségével nagy pontossággal meghatározható (17, 31). A koffein elimináció jellemzésére a szérum (plazma) clearance (1, 13, 25, 34), a nyál koffein clearance (13, 28), a vizelettel ürülő koffein metabolitok meghatározása (3) és rendszeres kávéfogyasztók éhgyomri koffein szintje (21, 22, 27) egyaránt alkalmas. A koffein elimináció kinetikai paraméterei közül a beadás után 12 órával mért szérum koncentrációt tartják az egészséges egyének és a májbetegek elkülönítésére legalkalmasabbnak (21, 29).

Beteganyag és módszer

A koffein-teszt diagnosztikus értékének megítélése céljából vizsgálatainkban 40 krónikus májbetegségben szenvedő és 8 kontroll egyént vontunk be. Megelőzően végzett komplex vizsgálatainkkal 24 betegben cirrhosist diagnosztizáltunk (13 fő, 11 nő, átlagéletkor 53 év), 11 betegnek krónikus alkoholos hepatitise (7 fő, 4 nő, átlagéletkor 46 év), 5 betegnek egyéb, cirrhosissal nem társuló májbetegsége volt (2 fő, 3 nő, átlagéletkor 63 év). A 8 kontrollként szereplő, alkoholt rendszeresen nem fogyasztó személynek egyéb, a máj működését nem érintő betegsége volt (3 fő, 5 nő, átlagéletkor 62 év). Vizsgálatainkba olyan egyéneket vontunk be, akiknek gyógyszerfogyasztását átmenetileg fel tudtuk függeszteni.

A cirrhosisos betegeket a Child—Pugh-kritériumok szerint (10, 26) három súlyossági csoportba soroltuk *(1. táblázat)*. A vizsgált személyek szokásos koffein fogyasztását nem befolyásolva éhgyomri szérum koffein szintet mértünk, majd 24 órás koffein absztinencia után reggel éhgyomorra 0,2 g koffeint (2 × 0,1 g tabletta) adtunk per os. További 12 órás koffein absztinencia során 3, 6, 9 és 12 óra múlva vett vérből határoztuk meg a szérum koffein koncentrációt.

A meghatározást magasnyomású folyadékkromatográfiás módszerrel (ISCO C18 Nucleosil oszlop, 0,02 érzékenység, 7,3 MPa nyomás, 2 ml/perc átfolyási sebesség, 10 μl hurok, 280 nm UV detektor) végeztük.

A koffein elimináció jellemzésére az éhgyomri és a beadás után 12 órával mért szérum-koncentrációk mellett a MedUSA TM (CheMicro Ltd.) egy kompartment per os modell segítségével számított megoszlási térfogatot, felezési időt, csúcskoncentrációt és a koncentráció—idő függvény görbe alatti területből (AUC) a dózis és a testsúly ismeretében a Cl = D/AUC/testsúly képlet alapján clearance-et határoztunk meg (11).

A statisztikai feldolgozás során számtani átlagot (x) és szórást (SD) számítottunk, illetve Mann—Whitney szerinti szignifikancia próbát alkalmaztunk. Szignifikánsnak tekintettük a $p<0,05$, erősen szignifikánsnak a $p<0,005$ eseteket (14). A paraméterek közötti összefüggést Spearman-féle rangkorreláció vizsgálattal elemeztük (r: korrelációs együttható).

Vizsgálataink az ORFI Etikai Bizottsága jóváhagyásával történtek.

Eredmények

A 2. *táblázat* a Child—Pugh szerinti beosztásnál figyelembe vett laboratóriumi paramétereken kívül a májbetegségek diagnosztikájában leggyakrabban használt SGOT, GGT és ChE aktivitásokat tünteti fel a viszgált csoportok szerint.

A cirrhosisos betegek értékei a kontrollokétól szignifikánsan különböznek. A Child—Pugh-kritériumként szereplő laboratóriumi leletek mellett a kolineszteráz aktivitás mutat összefüggést az átépüléses májbetegség stádiumával. A kompenzált állapotban levő Child—Puhg-A stádiumú cirrhosisos betegek laboratóriumi értékei nem különböznek számottevően a cirrhosisos betegekben észleltektől.

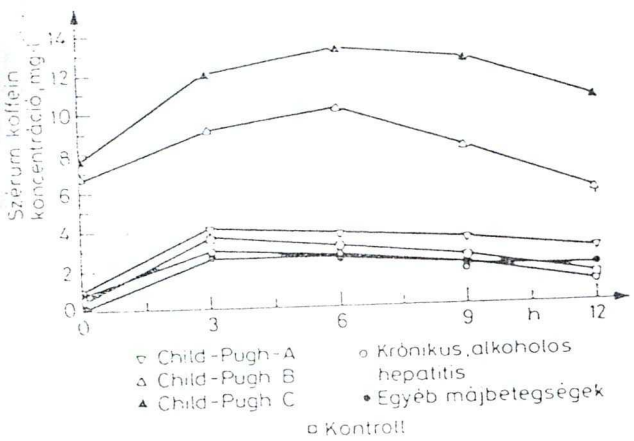
Az *1. ábra* az egyes betegségcsoportok koffein beadás utáni átlagos szérum koncentrációit mutatja az idő függvényében. Látható, hogy a dekompenzált cirrhosisos betegekben később alakult ki a szérum koffein csúcskoncentrációja, mint a kontroll, illetve a cirrhosissal nem járó májbetegségben szenvedő és a kompenzált stádiumban levő cirrhosisos betegekben. A Child—Pugh-A stádiumú cirrhosisos betegek koffein koncentrációi emelkedettek, de a kontrollokhoz, illetve a cirrhosissal nem járó májbetegségben szenvedőkhöz képest az eltérés statisztikailag nem számottevő.

A *3. táblázat* a koffein kinetika jellemzőit tartalmazza; a cirrhosisos betegek esetében észlelt éhgyomri szérum koffein koncentráció, csúcskoncentráció, a beadás után 12 órával mért koncentráció és a megoszlási térfogat maga-

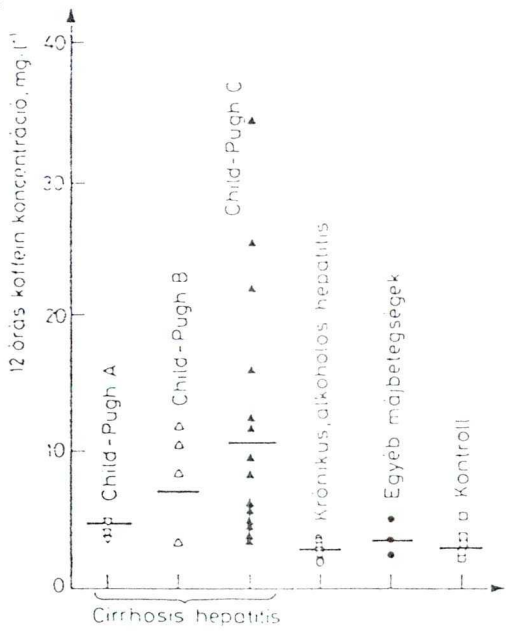
2. táblázat: Májbetegek és kontrollok laboratóriumi paraméterei

Vizsgálati csoport	Betegek száma (n)	Szérum bilirubin (μmol/l)	Albumin (g/l)	SGOT (U/l	GGT (U/l)	Che (KU/l)	Prothrombin idő (%)
Normál értékek		5 — 17	35 — 45	5 — 37	5 — 50	3,0 — 9,0	90 — 100
Kontroll	8	13 ± 6	36,2 ± 1,8	23 ± 5	44 ± 26	6,6 ± 1,4	97 ± 3
Krónikus alkoholos hepatitis	11	18 ± 11	31,3 ± 5,3	89 ± 66	349 ± 2L83	4,9 ± 1,6	90 ± 7
Cirrhosis							
Összes	24	126 ± 134	27,6 ± 4,9	118 ± 80	468 ± 475	2,1 ± 1,5	64 ± 19
Ch-P-A	3	31 ± 6	30,6 ± 3,2	99 ± 10	553 ± 393	3,3 ± 2,2	80 ± 20
Ch-P-B	5	35 ± 34	28,2 ± 3,9	79 ± 81	427 ± 480	3,5 ± 1,8	85 ± 12
Ch-P-C	16	172 ± 144	25,3 ± 4,3	134 ± 84	465 ± 511	1,5 ± 0,9	55 ± 17
Egyéb májbetegségek	5	91 ± 63	30,2 ± 1,8	197 ± 101	552 ± 399	3,2 ± 2,0	86 ± 6

ChE = kolineszteráz; Ch-P-A = Child-Pugh-A; Ch-PB = Child-Pugh-B; Ch-P-C = Child-Pugh-C



1. ábra: A szérum koffein koncentrációk alakulása az egyes betegségcsoportokban



2. ábra: A koffein beadás után 12 órával mért szérum koffein koncentrációk betegségcsoportok szerint

sabb, a szérum clearance alacsonyabb a kontroll csoporthoz, illetve a cirrhosissal nem járó májbetegségekben szenvedők értékeihez képest, a különbség minden esetben szignifikánsnak bizonyult.

A vizsgált koffein-kinetikai paraméterek a megoszlási térfogat kivételével a cirrhosisos Child—Pugh szerinti súlyosságával szoros korrelációt mutatnak.

A rutinszerűen vizsgált laboratóriumi paraméterek közül a prothrombin, az albumin és a kolineszteráz értékek mutattak szignifikáns korrelációt a koffein elimináció jellemzőivel.

A kolineszteráz aktivitás és a clearance, valamint a prothrombin idő és a megoszlási térfogat közötti egyenes arányú összefüggést a *3/a* és *3/b ábra* mutatja, a kolineszteráz aktivitás és a csúcskoncentráció, valamint a kolineszteráz aktivitás és a felezési idő fordított arányú összefüggése a *3/c* és *3/d ábrán* látható.

A krónikus alkoholos hepatitises betegek, az egyéb májbetegségben szenvedők és a kontrollok koffein-kinetikai paraméterei nem különböztek értékelhetően. Kávéfogyasztással, dohányzással, korral és nemmel összefüggő koffein elimináció változást sem a kontrollok, sem a májbetegek között nem észleltünk.

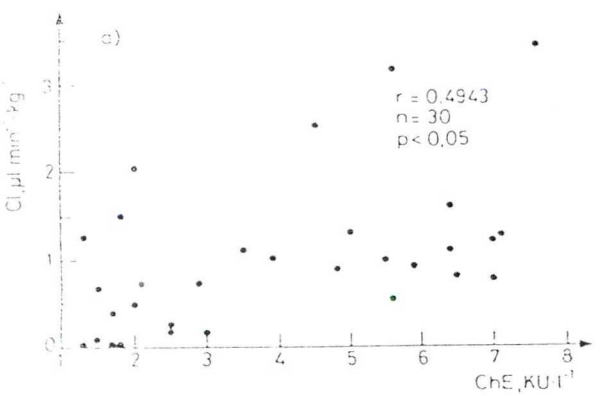
Megbeszélés

Mivel a rutin klinikai diagnosztikában alkalmazott laboratóriumi paraméterek statikus jellemzők, a máj funkcionális állapotának megítélését nem teszik lehetővé. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a koffein eliminációs próba a májcirrhosis stádiumának és kórjóslatának megítélésére

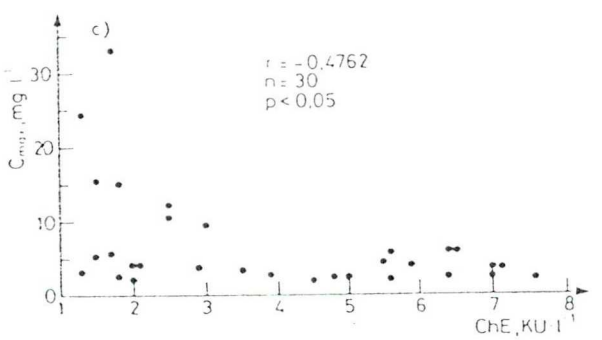
3. táblázat: Májbetegek lés kontrollok koffeine liminációs paramterei

Vizsgálati csoport	Betegek száma dohányzó/ nemdo-hányzó	C_o (mg/l)	C_{max} (mg/l)	C_{12} (mg/l)	$t_{1/2}$ (h)	V_d (%)	Cl (µl/min/kg)
Kontroll	8 3/5	0,48 ± 0,62	3,49 ± 1,69	1,35 ± 0,16	5,45 ± 3,4	56,8 ± 17,0	1695 ± 440
Krónikus alkoholos hepatitis	11 6/5	0,89 ± 0,69	2,90 ± 0,86	1 ,12 ± 0,61	6,42 ± 2,98	67,1 ± 34,9	1193 ± 509
Cirrhosis							
Összes	24 12/12	6,06 ± 7,17	10,56 ± 8,76	8,43 ± 8,6	18,7 ± 16,0	31,5 ± L24,4	282,3 ± 260
Ch-P-A	3 2/1	0,95 ± 0,88	4,10 ± 1,34	2,72 ± 0,7	9,8 ± 5,8	42,0 ± 32,9	833 ± 363
Ch-P-B	5 3/2	6,6 ± 1,42	9,97 ± 3,79	5,71 ± 4,2	13,7 ± 4,8	20,5 ± 13,5	292 ± 380
Ch-P-C	15 7/9	7,65 ± 8,39	13,08 ± 10,2	10.35 ± 9,8	21,9 ± 19,0	24,4 ± 17,4	176 ± 2,11
Egyéb májbeteg-ségek	5 2/3	0,10 ± 0,14	2,71 ± 0,85	1,68 ± 1,2	6,45 ± 0,33	61,5 ± 21,9	1555 ± 657

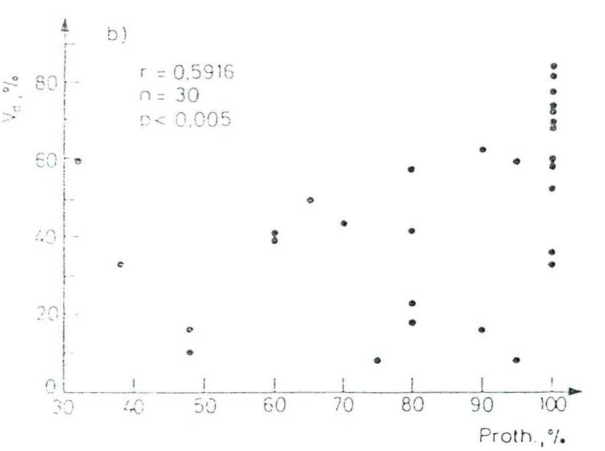
Co = éhgyomri szérum koffein konc.; C_{max} = szérum koffein csúcskoncentráció; C_{12} = a beadás után 12 h-val mért szérum koffein koncentráció; $T_{1/2}$ = a koffein felezési ideje a szérumban; V_d = a számított koffein megoszlási térfogat a testtömeg %-ában; Cl = a szérum koffein clearance (testtömeg kg); Ch-P-A = Child-Pugh-A; Ch-PB = Child-Pugh-B; Ch-P-C = Child-Pugh-C



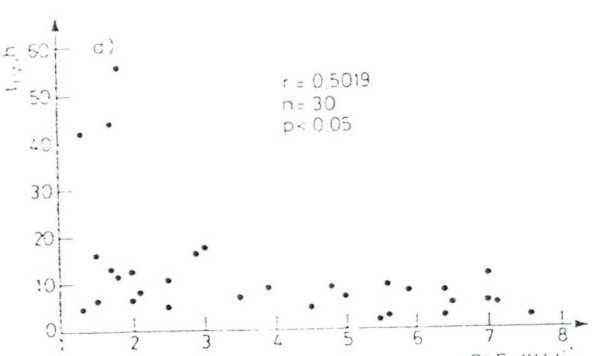
3/a. ábra: A kolineszteráz akjtivitás és a clearance összefüggése



3/c. ábra: A kolineszteráz aktivitás és a csúcskoncentráció összefüggése



3/b. ábra: A prothrombin idő és a megoszlási térfogat összefüggése



3/c. ábra: A kolineszteráz aktivitás és a felezési idő összefüggése

használt Child—Pugh-beosztással korrelációt mutat (10, 25, 26).

A koffein (1,3,7-trimetil-xantin) lebomlás első lépése során egészségesekben 70—83%-ban 3-N-demetiláció útján paraxantin (1,7-dimetil-xantin), 12%-ban teobromin (3,7-dimetil-xantin), 4%-ban teofillin (1,3-dimetil-xantin), kisebb részben egyéb metabolitok képződnek (2, 4). Előrehaladott májbetegségekben elsősorban a 3-N-demetiláció mértéke csökken (10). Ezt a metabolikus lépést az ún. policiklikus aromás szénhidrogének által indukálható citokrom P-450 alcsoport (P-450IA2) katalizálja (1, 3). Ez az indukálható enzim toxikológiai és farmakológiai jelentőséggel bír, amennyiben fokozott aktivitása összefüggésbe hozható karcinogén és teratogén ártalmakkal (2, 3). A dohányfüst több policiklusos aromás szénhidrogén-vegyületet tartalmaz és ismert a dohányzás koffein clearance-et fokozó hatása (30). Az egészségesekben megfigyelt dohányzással összefüggő koffein elimináció fokozódás előrehaladott májbetegekben nem igazolható (28). A vizelet paraxantin—teofillin—teobromin arányából ennek a policiklusos aromás szénhidrogének által indukálható enzimnek az aktivitására következtethetünk (3). Enzimindukciós hatások, fenotípusbeli különbségek (pl. acetilátor fenotípus) és májbetegségek befolyásolják a gyógyszerek metabolizmusát és felelősek lehetnek nem várt, illetve toxikus hatások jelentkezéséért (7, 8, 9, 15).

A májbetegek csökkentett gyógyszeradagjának megállapításához számos próbálkozás ellenére a klinikum számára alkalmas módszer nem áll rendelkezésünkre, a jelenleg használt biokémiai tesztek erre nem alkalmasak (8, 11, 15). Májbetegek csökkent koffein eliminációs képességéből a gyógyszermetabolizáló képesség csökkenésére következtethetünk (21). A vizeletben található bizonyos koffein metabolitok arányából az acetilátor fenotípus felismerhető (4). Ismert inzimindukciót okozó gyógyszerek (pszichofarmakonok, antiepileptikumok, analgetikumok), melyek a májfunkció megítélésében szintén használatos hexobarbital, aminopirin, antipirin kiürülését fokozzák, a koffein metabolizmusát nem befolyásolják (1, 33). Nem észleltek változást a koffein farmakokinetikájában acetilátor fenotípus szerint (9). Cimetidin és ranitidin alkalmazásakor koffein elimináció fokozódást, orális antikoncipiens szedésekor csökkenést figyeltek meg (3, 10). Koffein eliminációs csökkenést tapasztaltak intenzív osztályon kezelt szívinfarktuson átesett, hasi műtét után levő, tüdőgyulladásos, gyógyszermérgezett, illetve sokkos betegeknél májbetegség fennállása nélkül is (24).

Doppingvizsgálatok során derült ki a fokozott fizikai aktivitás koffein clearance-et csökkentő hatása (6). Felborult anyagcseréjű diabetesesekben nem észleltek változást a koffein metabolizmusában (35). Májtranszplantációra várók között a metabolikus működést jelző tesztek szoros korrelációt mutattak a rövid távú prognózissal, de a transzplantáció után a korai szövődmények észlelésében nem nyújtottak segítséget (16, 19). A csökkent metabolizálóképesség előrehaladott májbetegség jele és invazív diagnosztikus beavatkozások szükségességét veti fel (32). Krónikus májbetegekben a funkcionális próbák és a rutinszerűen használt biokémiai tesztek kapcsolatát vizsgálva csak a szérum albumin szint és az antipirin felezési idő, valamint a szérum bilirubin és a szulfadimidin felezési idő értékei között igazolódott szignifikáns korreláció (11).

A koffein clearance és a prothrombin, albumin és bilirubin értékek között statisztikailag értékelhető összefüggés mutatható ki (10).

Vizsgálatainkkal az irodalmi adatokkal összefüggő eredményeket kaptunk, melyeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a koffein elimináció vizsgálata egyszerű és veszélytelen módszer a máj metabolizálóképességének meghatározására. A Child—Pugh szerinti beosztásban szereplő klinikai jellemzők (ascites, tudatállapot), valamint laboratóriumi leletek (szérum bilirubin, prothrombin, szérum albumin) mellett azokkal együtt segíti az átépüléses májbetegség stádiumának pontosabb meghatározását. A vizsgált koffein kinetikai paraméterek mindegyike szignifikáns eltérést mutatott a cirrhosisos betegek és a cirrhosissal nem járó májbetegségben szenvedők, illetve a kontrollok között. A koffein elimináció progresszív csökkenése figyelhető meg a cirrhosis előrehaladottabb formáiban és ez a változás a Child—Pugh szerinti súlyossági stádiumokkal összefüggést mutat. Az eljárás a cirrhosissal nem járó májbetegségeken belüli finomabb elkülönítésére nem alkalmas és nem ad felvilágosítást a májbetegség eredetéről és az aktivitás fokáról. A felezési idő, clearance, megoszlási térfogat és csúcskoncentráció ismeretéhez többszöri vérvétel és mérés, valamint farmakokinetikai számítások szükségesek. Tapasztalatunk szerint a gyakorlat számára jóval egyszerűbb és szintén informatív 12 órás koncentráció meghatározás ajánlott. Az ugyancsak egyszerű éhgyomri koffein szint meghatározás a rendszeres kávéfogyasztó egyének esetében tájékoztató információt ad. A koffein-teszt diagnosztikus értéke mellett a májbetegek gyógyszeres terápiája során a dózis meghatározásában, valamint a krónikus májbetegségek prognózisának megítélésében is segítséget nyújthat.

Köszönetnyilvánítás: Köszönetünket fejezzük ki dr. Róna Kálmánnak és dr. Ary Kornéliának (Hajnal Imre Egészségtudományi Egyetem I. sz. Belklinika Klinikofarmakológiai részleg), dr. Ratkó Istvánnak (MTA SZTAKI) és Major Tamásnak (Gábor Dénes Műszaki Informatikai Főiskola) szakmai tanácsaikért, illetve statisztikai számítások elvégzéséért.

A tanulmány a „Laboratóriumi vizsgálatok kutatása és alkalmazása a májbetegségek korszerű diagnosztikájában" című ETT által támogatott kutatási téma keretében készült.

IRODALOM: 1. *Balogh, A., Simon, H. J., Reinhardt, M. és mtsai:* Zum Einfluss von verschiedenen Lebererkrankungen auf die Aktivitat zweier Subtypen des Cytochrom P-450. Dtsch. Z. Verdau.-Stoffwechs. Krankh., 1987, *47*, 1—13. — 2. *Berthou, F., Flinois, J.-P., Ratanasavanh, D. és mtsai:* Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. Drug Metab. ad Dispos., 1991, *19*, 561—567. — 3. *Campbell, E. M., Spielberg, P. S., Kalow, W. és mtsai:* Urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearence. Clin. Pharmacol. Ther., 1987, *42*, 157—159. — 4. *Grant, M. D., Tang, K. B., Kalow, W.:* Variability in caffeine metabolism. Clin. Pharmacol. Ther., 1983, *29*, 591—602. — 5. *Desmond, P. V., Patwardhan, R. V., Johnson, R. F. és mtsai:* Impaired elimination of caffeine in cirrhosis. Dig. Sci., 1980, *25*, 193—197. — 6. *Duthel, M. J., Vullon, J. J., Martin, G. és mtsai:* Caffeine and sport: role of physical exercise

upon elimination. Med. Sci. Sports and Excercise, 1991, *23*, 980—985. — 7. *Gachályi B.:* A máj gyógyszermetabolizáló képességének befolyásolása. A környezet és a genetikai tényezők szerepe. Doktori Értekezés. Budapest, 1988. — 8. *Galezazzi, R. L.:* Arzneimitteltherapie bei eingeschrankter Leber-oder Nierenfunktion. Schweiz. med. Wschr., 1983, *113*, 726—732. — 9. *Henschel, L., Hoffmann, A.:* Einschatzung der Biotransformationskapazitat nach oraler Gabe unterschiedlicher Modellsubstanzen als „Cocktail". Z. Gastroenterol., 1991, *29*, 645—649. — 10. *Holstege, A., Stainger, M., Haag, K. és mtsai:* Correlation of Caffeine Elimination and Child's Classification in Liver Cirrhosis. Klin. Wochenschr., 1989, *67*, 6—15. — 11. *Horváth, T., Pár, A., Beró, T. és mtsai:* Correlation between biochemical tests parameters of drug elimination and hepatic enzyme induction in chronic liver diseases. Acta Med. Hung., 1983, *40*, 203—213. — 12. *Jávor:* Klinikai farmakológia. Medicina, Budapest, 1980, 43—45. old. — 13. *Jost, G., Wahllander, A., Mandach, U. és mtsai:* Overnight salivary caffeine clearence: A liver function test suitable for routine use. Hepatology, 1987, *7*, 338—344. — 14. *Juvanácz, I., Paksy, A.:* Orvosi Biometria, Medicina, Budapest, 1982, *39*, 44. — 15. *Meier, P. J.:* Arzneimitteltherapie bei Leberkrankheiten. Schweiz. med. Wschr., 1982, *112*, 258—263. — 16. *Nagel, A. R., Dirix, Y. L., Hayllar, M. K. és mtsai:* Use of quantitative liver function tests-caffeine clearence and galactose elimination capacity-after orthopic liver transplantation. J. Hepatol., 1990, *10*, 149—157. — 17. *Nagy L.:* A folyadékkromatográfiás gyógyszerszint mérések ideg és elmegyógyászati esetekben. 1988. Zalaegerszeg. (Kandidátusi Értekezés). MTA kézikönyvtára. — 18. *Nemesánszky E.:* Klinikai kémiai vizsgálatok a májbetegségek korszerű diagnosztikájában. Medicina, Budapest, 1991, 49—51. old. — 19. *Oellerich, M., Burdelski, M., Lautz, H. U. és mtsai:* Lidocaine metabolite formation as a measure of liver function in patients with cirrhosis. Ther. Drug. Monit., 1990, *12*, 219—226. — 20. *Preisig, R.:* Fremdsubstanzenals Indikatoren der Leberfunktion. Schweiz. med. Wschr., 1985, *19*, 36—42. — 21. *Renner, E., Wahllander, A., Huguenin, Ph. és mtsai:* Coffein-ein ubiquitarer Indikator der Leberfunktion. Schweiz. med. Wschr., 1983, *113*, 1074—1081. — 22. *Renner, E., Wietholtz, H., Huguenin, P. és mtsai:* Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Function. Hepatology, 1984, *4*, 38—46. — 23. *Richter, E., Brachtel, D., Hofstetter, G. és mtsai:* Einpunktbestimmung der oralen Koffeinclearence bei Patienten mit Lebererkrankungen. Z. gastroenterol., 1988, *26*, 744—749. — 24. *Sánchez-Alcaraz, A., Ibánez, P., Sangrador, G.:* Pharmacokinetics of intravenous caffeine in critically ill patients. J. Clin. Pharm. Ther., 1991, *16*, 285—289. — 25. *Scott, R. N., Stambuk, D. Chakraborty, J. és mtsai:* The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. Br. J. Clin. Pharmacol., 1989, *27*, 205—213. — 26. *Wahllander, A., Beuers, U.:* Prognostischer Wert von Leberfunktionstests-Klinik, laborchemische Parameter und quantitative Funktionstests. Leber Magen Darm., 1990, *3*, 115—128. — 27. *Wahllander, A., Renner, E., Preisig, R.:* Fasting plasma caffeine concentration. Scan. Jour. Gastroenterol., 1985, *20*, 1133—1141. — 28. *Wahllender, A., Mohr, S., Paumgartner, G.:* Assessment of hepatic funktion. Comparison of caffeine clearence in serum and saliva during the day and at night. J. Hepatology, 1992, *10*, 129—137. — 29. *Wang, T., Kleber, G., Stellaard, F. és mtsai:* Caffeine elimination: A test of liver funktion. Klin. Wochenschr., 1985, *63*, 1124—1128. — 30. *Parsons, D. W., Neims, H. A.:* Effect of smoking on caffeineclearance. Clin. Pharmacol. Ther., 1978, *24*, 40—45. — 31. *Yang, L. S., Wilken, O. L., Clark, R. C.:* A high performance liquid chromatographic method for the simultaneous assay of aspirin, caffeine, dihydrocodeine bitartrade and promethazine hydrocloride in a capsule formulation. Drug Development Industrial. Pharm., 1985, *11*, 799—814. — 32. *Zilly, W., Richter, E.:* Die Arzneimittelclearance als Entscheidungshilfe für eine witerführende invasive Leberdiagnositik-Untersuchungen mit Hexobarbital als Modellsubstrat. Z. Gastroenterol., 1992, *30*, 325—328. — 33. *Zilly, W., Drost, D., Klinker, H. és mtsai:* Koffein-und Hexobarbitalclearence bei Lebererkrankungen und unter dem Einfluss einer Enzyminduktion. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 1984, *90*, 1850—1853. — 34. *Zilly, W., Richter, E. és mtsai:* Coffein bei chronischen Lebererkrankungen. Dtsch. Med. Wschr., 1983, *108*, 477—478. — 35. *Zysset, T., Wietholtz, H.:* Pharmacokinetics of caffeine in patients with decompensated type I and type II diabetes mellitus. Eur. J. Clin. Pharmacol., 1991, *41*, 449—452.

(Darnót Gábor dr., *Budapest*, Andrássy u. 110. 1062)

SZOCIÁLIS- ÉS EGÉSZSÉGÜGYI MINISZTÉRIUM

Szövettani asszisztensi szakosító tanfolyam tananyaga

BIOKÉMIA

Írta:
DR. BARISKA JÁNOS

Lektor:
DR. HULLÁN LEHEL

Budapest
1989

Dr.Bariska János, Schorm Jolán
ORFI Központi Laboratórium Budapest

Alkáli foszfatáz izoenzimek szétválasztása

ORWO ET loo hordozó fólián

A méretre vágott ORWO ET loo fóliára agaróz réteget öntünk:

Agaróz réteg összetétele:

5,5 ml 1%-os agarózt öntünk ki a 75 x loo mm nagyságu OREO fóliára. Az agarózt Barbitál pufferben oldjuk, amely 1,2 %-os. /pH=8,6, ionerősség: o,o5/

Az agaróz gélre sablon segitségével 5 ul szérumot viszünk fel s hagyjuk bediffundálni .

Futtatás: ideje 3o perc , loo V mellett

A futtatáshoz használta puffer összetétele:

5o mmol/l Trishydroxymethylaminomethan
5o mmol/l Na-diethylbarbiturát
14 mmol/l Barbital
o,1% Triton X / v/v/

Futtatás után a lemezt a szubsztrát és a festék elegyébe teszszük , ebben áll 3o percet szobahőmérsékleten

Szubsztrát összetétele: 2 mg Naphthylic-acid-phosphate per ml

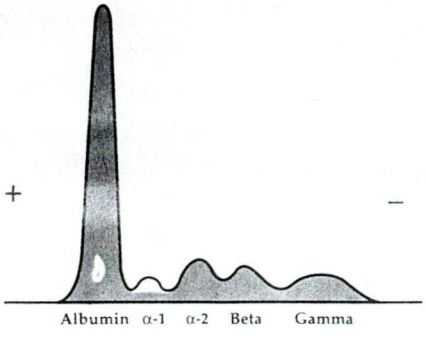
Festék: 1 mg Fast Blue BB per ml . Ezeket 6o mmol/l boratpufferben oldjuk, amelynek pH-ja 9,7.

Fixálás: 5 perc

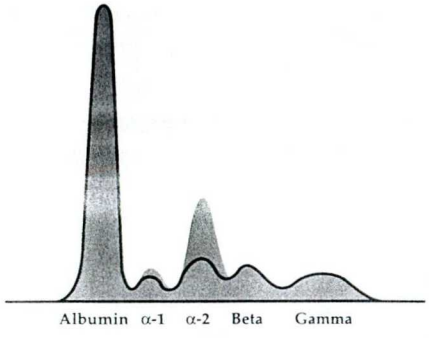
metanol:ecetsav:viz = 375 : 25 : loo elegyben

Szárítás: 9o C^{o}-on.

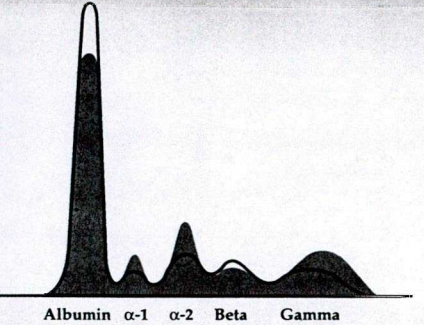
Serum Proteins



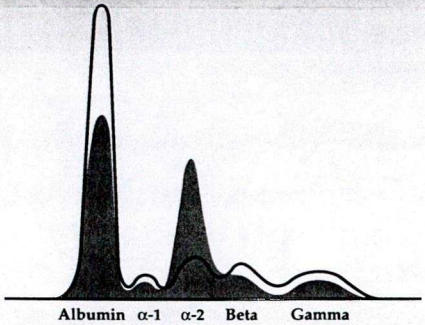
Low Alpha-1 Antitrypsin



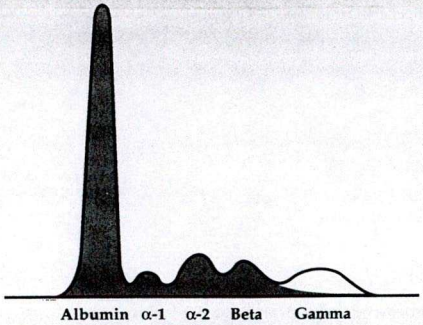
Acute Inflammatory



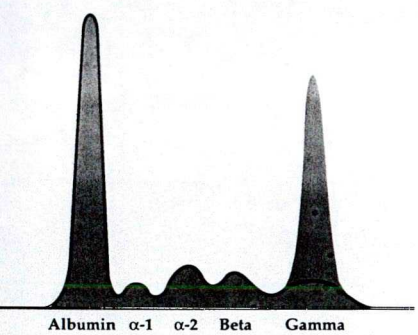
Chronic Inflammatory



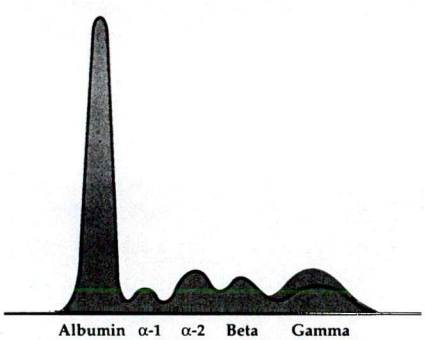
Nephrotic Syndrome



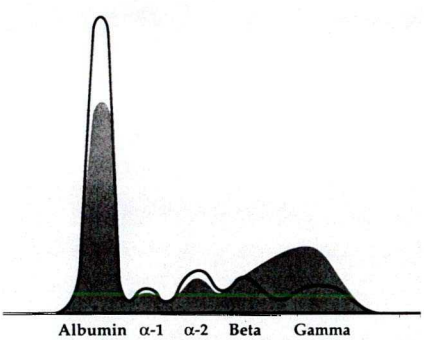
Hypogammaglobulinemia



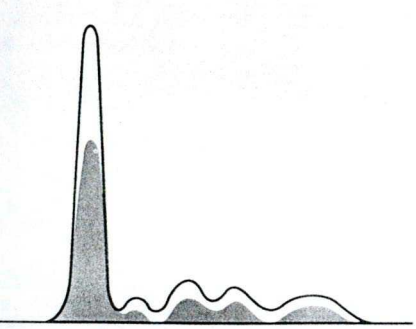
Monoclonal Gammopathy



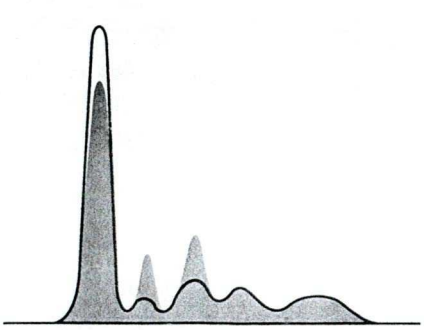
Polyclonal Gammopathy



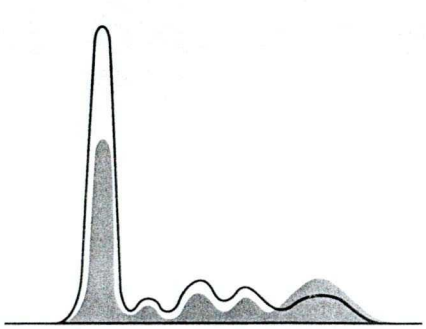
Cirrhosis



Protein Losing
Gastroenteropathy



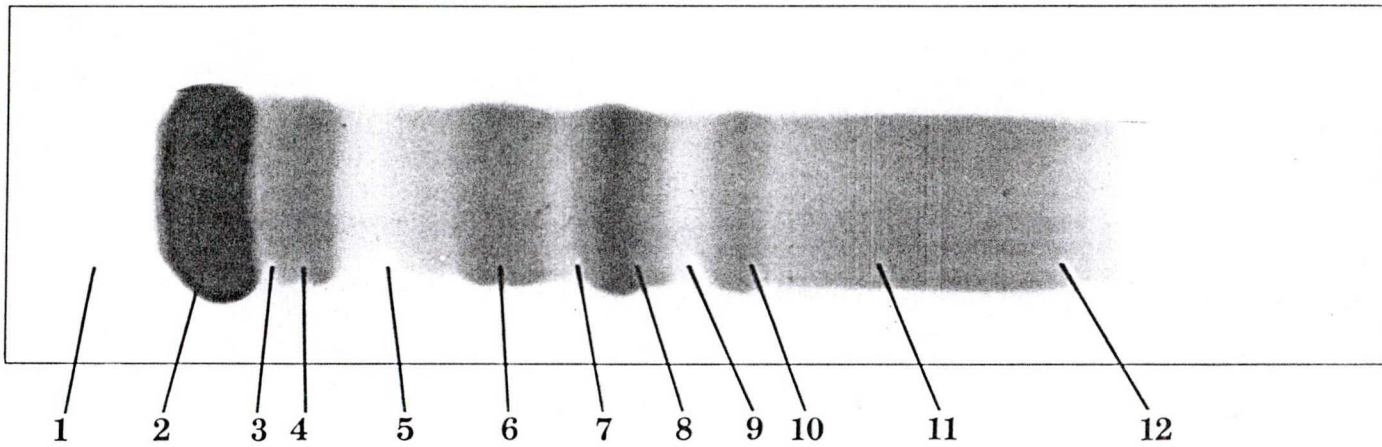
Malignancy



Severe Hepatic

Serum Patterns

Normal HRE Pattern



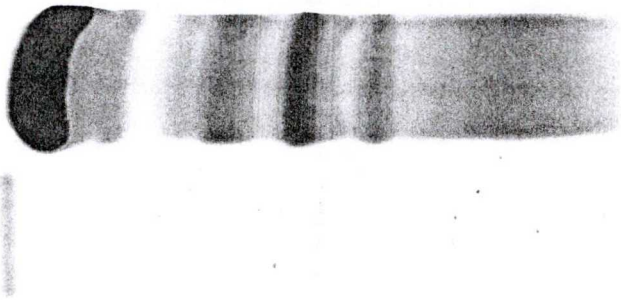
Zones	Serum Proteins Found in Zones
1. PREALBUMIN ZONE	- Prealbumin
2. ALBUMIN ZONE	- Albumin
3. ALBUMIN-ALPHA-1 INTERZONE	- Alpha-lipoprotein, (Alpha-fetoprotein)
4. ALPHA-1 ZONE	- Alpha-1-antitrypsin, Alpha-1-acid glycoprotein
5. ALPHA-1-ALPHA-2 INTERZONE	- Gc-globulin, Inter-alpha-trypsin inhibitor, Alpha-1-antichymotrypsin
6. ALPHA-2 ZONE	- Alpha-2-macroglobulin, Haptoglobin
7. ALPHA-2-BETA-1 INTERZONE	- Cold insoluble globulin, (Hemoglobin)
8. BETA-1 ZONE	- Transferrin
9. BETA-1-BETA-2 INTERZONE	- Beta-lipoprotein
10. BETA-2 ZONE	- C3
11. GAMMA-1 ZONE	- IgA, (Fibrinogen), IgM (Monoclonal Ig's, light chains)
12. GAMMA-2 ZONE	- IgG, (C-reactive protein) (Monoclonal Ig's, light chains)

Proteins listed in ( ) are normally found in too low a concentration to be visible in a normal pattern.

Urine Patterns

Normal Urine Pattern

Serum Ref.



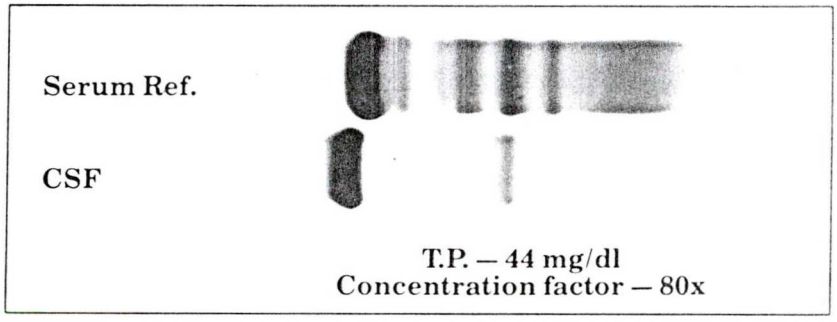
Urine

T.P. — 10mg/dl
Concentration factor — 100x

Zones	Urine Proteins Found in Zones
1. PREALBUMIN ZONE	-
2. ALBUMIN ZONE	- Albumin
3. ALBUMIN-ALPHA-1 INTERZONE	-
4. ALPHA-1 ZONE	- (Alpha-1-antitrypsin) (Alpha-1-acid glycoprotein)
5. ALPHA-1-ALPHA-2 INTERZONE	- (Zn-alpha-2-glycoprotein)
6. ALPHA-2 ZONE	- (Alpha-2-microglobulin, seen as two bands)
7. ALPHA-2-BETA-1 INTERZONE	-
8. BETA-1 ZONE	- (Transferrin)
9. BETA-1-BETA-2 INTERZONE	- (Beta-2-microglobulin)
10. BETA-2 ZONE	-
11. GAMMA ZONE	- (IgG, IgA, light chains, lysozyme, gamma trace)

Proteins listed in ( ) are normally found in too low a concentration to be visible in a normal pattern.

Normal CSF Pattern

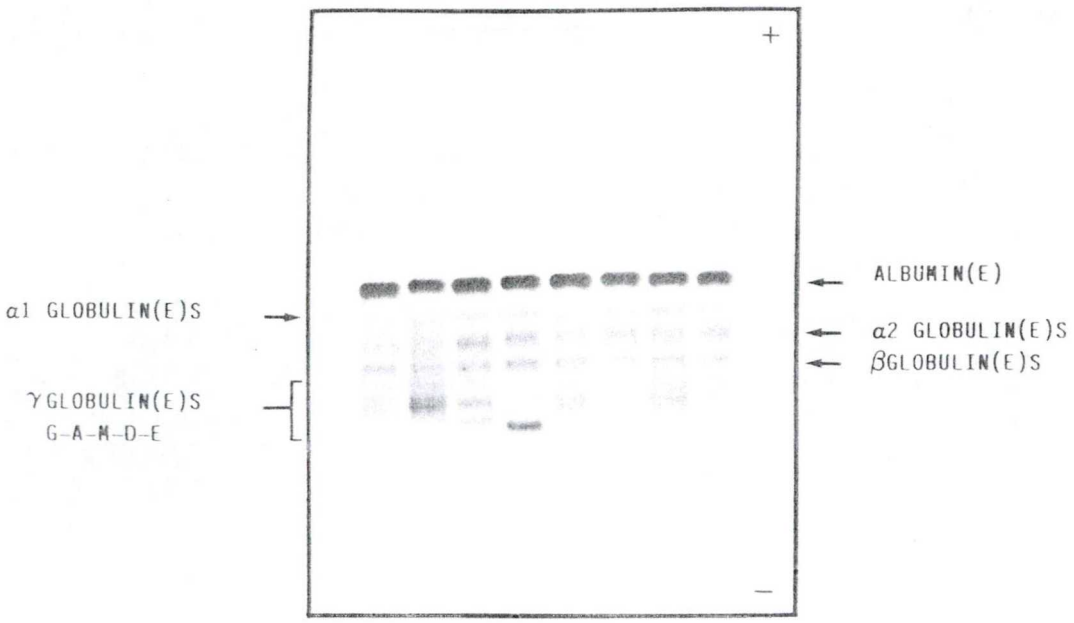


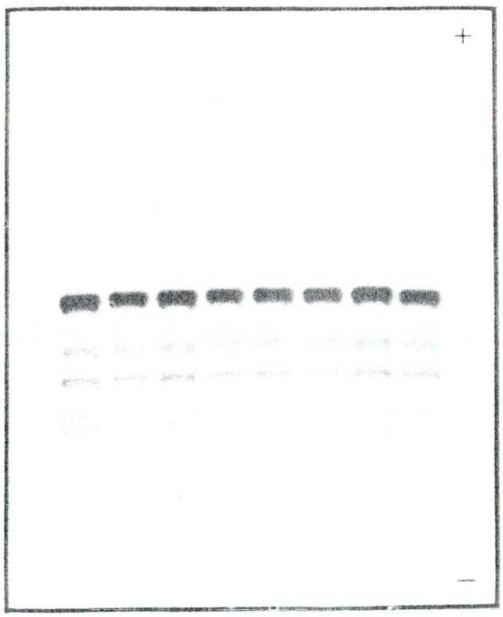
Zones	CSF Proteins Found in Zones
1. PREALBUMIN ZONE	-Prealbumin
2. ALBUMIN ZONE	- Albumin
3. ALBUMIN-ALPHA-1 INTERZONE	-
4. ALPHA-1 ZONE	- Alpha-1-antitrypsin
5. ALPHA-1-ALPHA-2 INTERZONE	-
6. ALPHA-2 ZONE	-
7. ALPHA-2-BETA-1 INTERZONE	-
8. BETA-1 ZONE	- Transferrin
9. BETA-1-BETA-2 INTERZONE	-
10. BETA-2 ZONE	- Beta-2-transferrin
11. GAMMA ZONE	- IgG (oligoclonal bands) (Gamma trace seen as a distinct band at the extreme cathodal end)

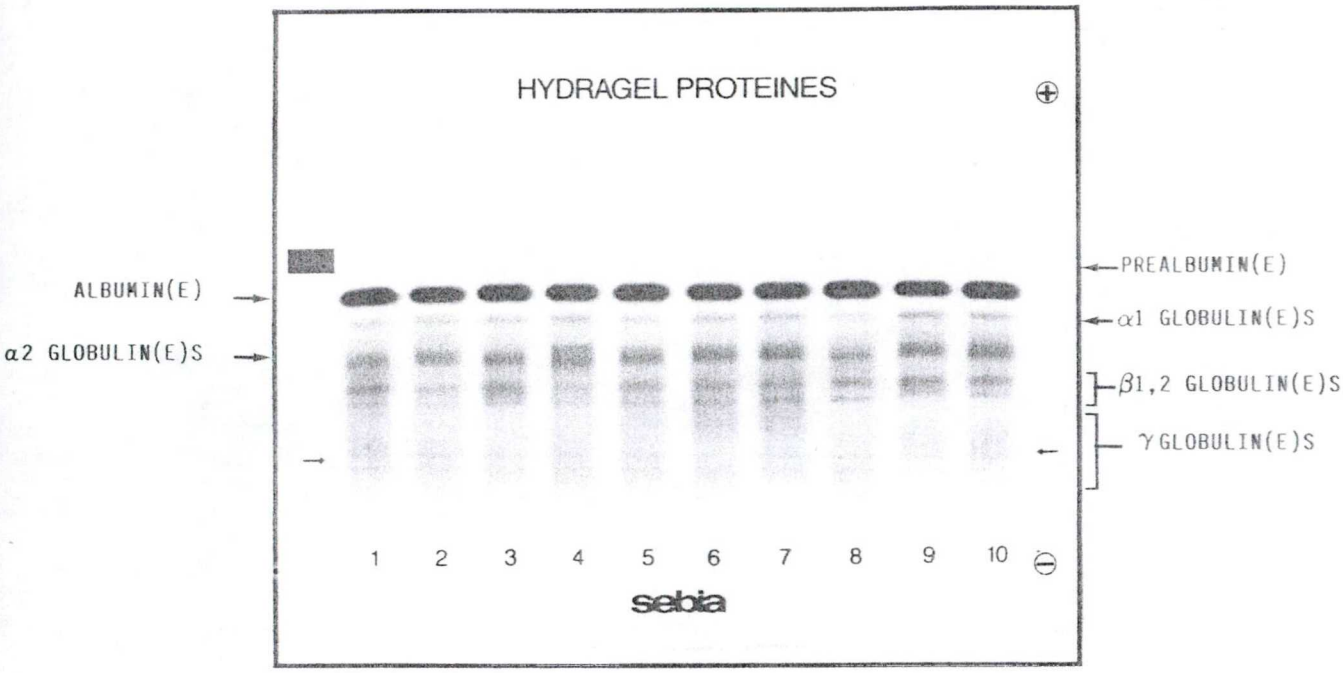
Proteins listed in ( ) are normally found in too low a concentration to be visible in a normal pattern.

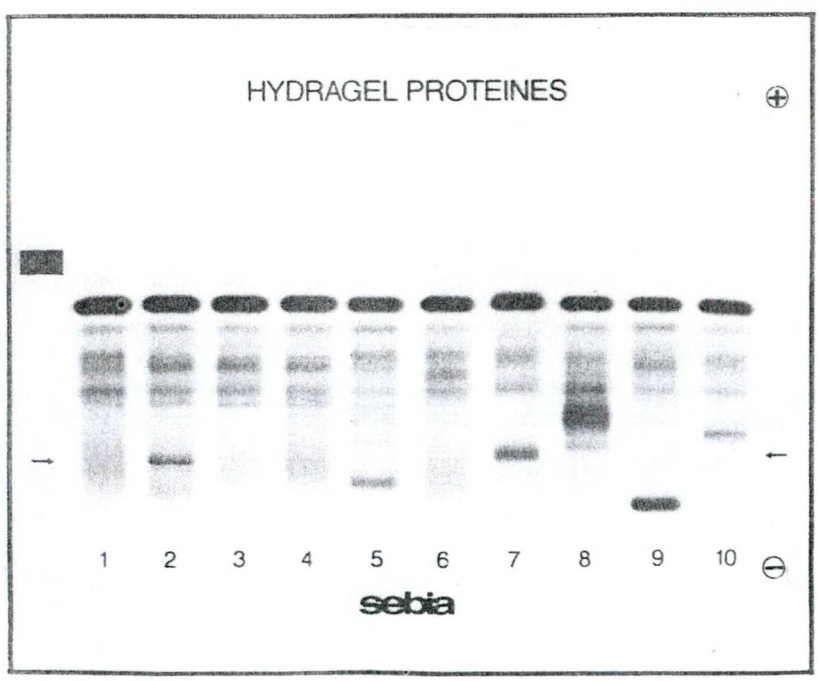
PROTEINOGRAMME SUR CELLOPLAQUE

PROTEINOGRAMME ON CELLOPLAQUE

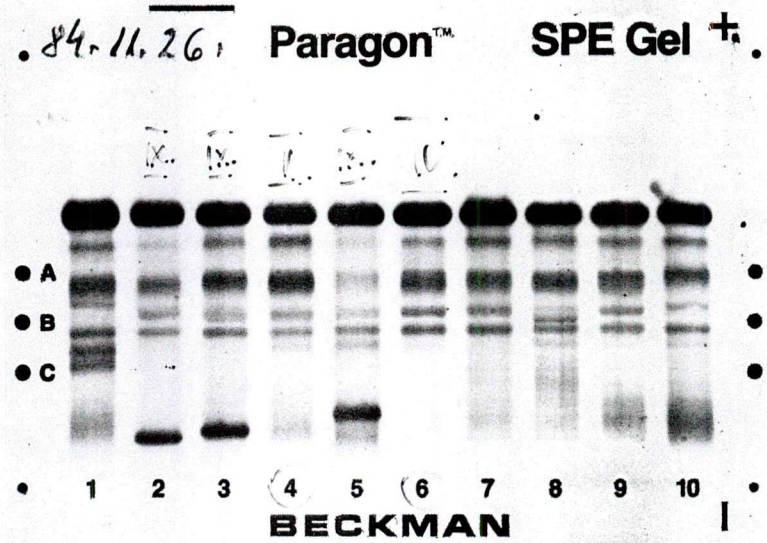


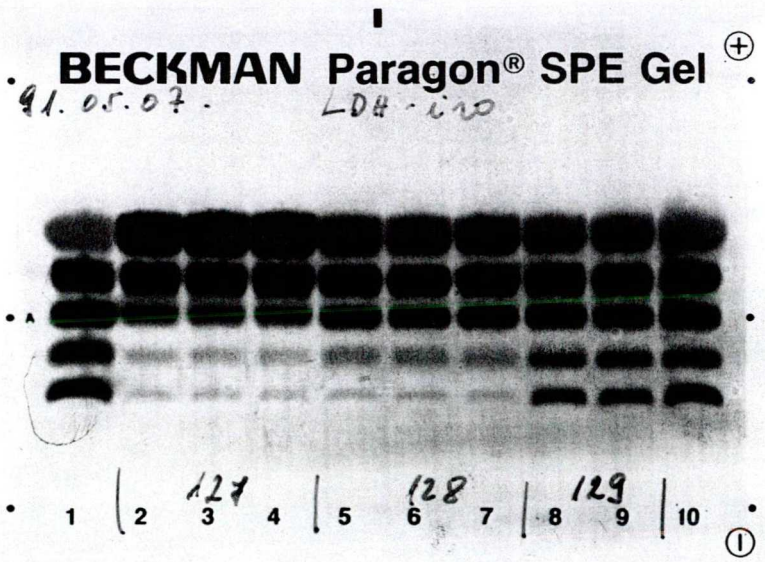






α1 GLOBULIN(E)S : OROSOMUCOID(E)- α1 ANTITRYPSIN(E)- α1 ANTICHYMOTRYPSIN(E)
α2 GLOBULIN(E)S : HAPTOGLOBIN(E)S- α2 MACROGLOBULIN(E)-CERULOPLASMIN(E)
GC GLOBULIN(E)- αLIPOPROTEIN(E)S
β1-2 GLOBULIN(E)S : TRANSFERRIN(E)-HEMOPEXIN(E)-C3 COMPLEMENT- βLIPOPROTEIN(E)S
γ GLOBULIN(E)S : G-A-M-D-E.

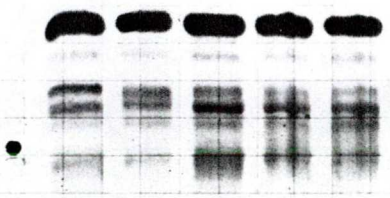

84.11.26
Paragon™
SPE Gel
A
B
C
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
BECKMAN


BECKMAN Paragon® SPE Gel
91.05.07 · LDH-iso
127
128
129
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

SZÉRUM FEHÉRJE ELEKTROFORÉZIS

992.12.17

1.



59 77 79 81 89 :

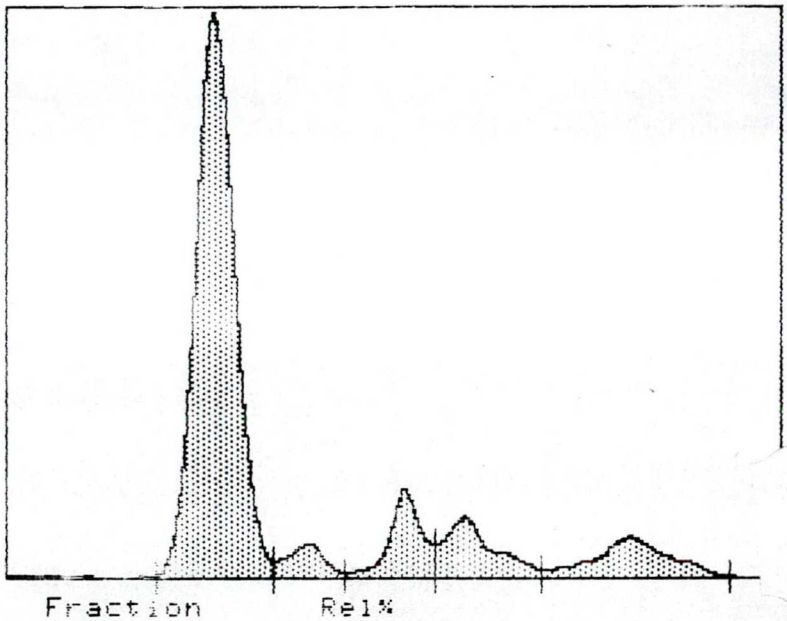
GÉLRÉTEG ÖSSZETÉTEL
AGAROZ-AGAR GEL
0,7% 0,3%

pH: 8,6 BARBITAL PUFFER
1,2%

NATRIUMAZID - Ca laktát
0,1% 0,1%

DRFI KÖZPONTI LABORATORIUM
BUDAPEST FRANKEL LEO U 17-19

Patient:
Test: SPE Gel 1 - 1 92.12.18.
DIAG:



Fraction	Rel%
Albumin	67.8
Alpha 1	4.3
Alpha 2	9.1
Beta	9.0
Gamma	9.8

A/G: 2.11

Comments:

Reference Ranges:

Fraction	Rel%
Albumin	50.0 - 71.0
Alpha 1	1.9 - 4.7
Alpha 2	5.0 - 11.0
Beta	9.0 - 15.0
Gamma	7.8 - 18.0

VIZELET FEHÉRJE ELEKTROFORÉZIS

GÉLRÉTEG ÖSSZETÉTEL

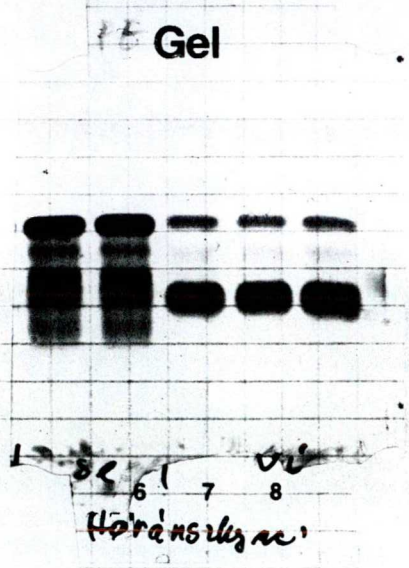
%

AGAROZ-AGAR = 0,7 : 0,3

Na-azid : Ca-laktát = 0,1%

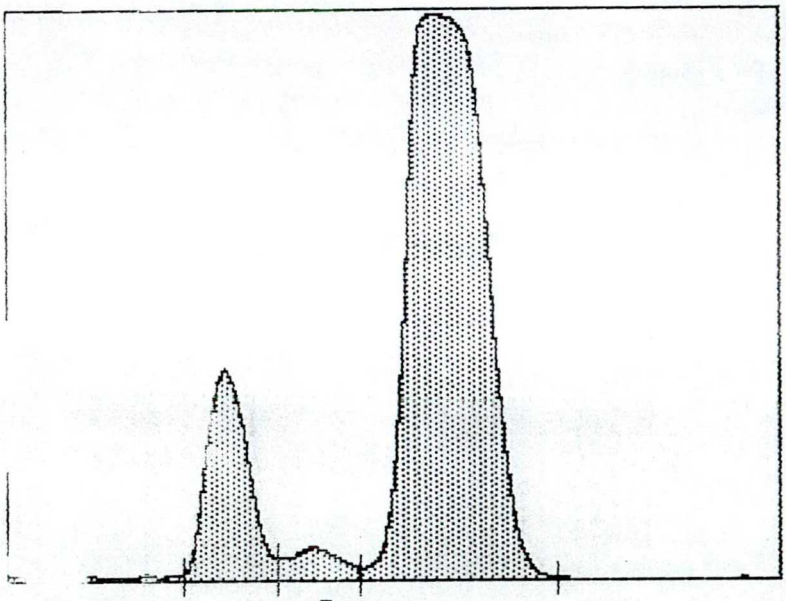
BARBITAL PUFFER : 1,8%

pH : 8,6



DRFI KOZPONTI LABORATORIUM
BUDAPEST FRANKEL LEO U 17-19

Patient:
Test SPE Gel 1 - 7 92.12.21.
DIAG



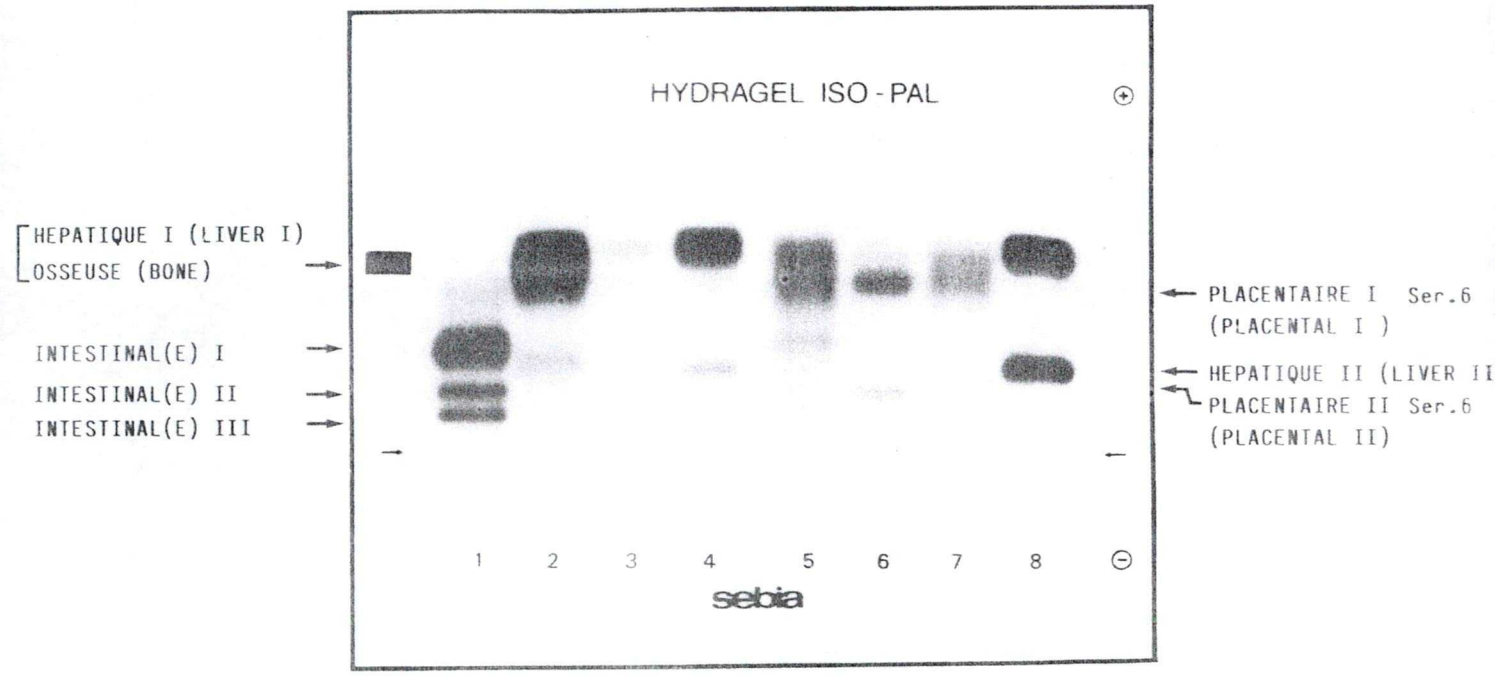
Fraction	Rel%	
1	16.6	---
2	3.2	
3	80.2	+++

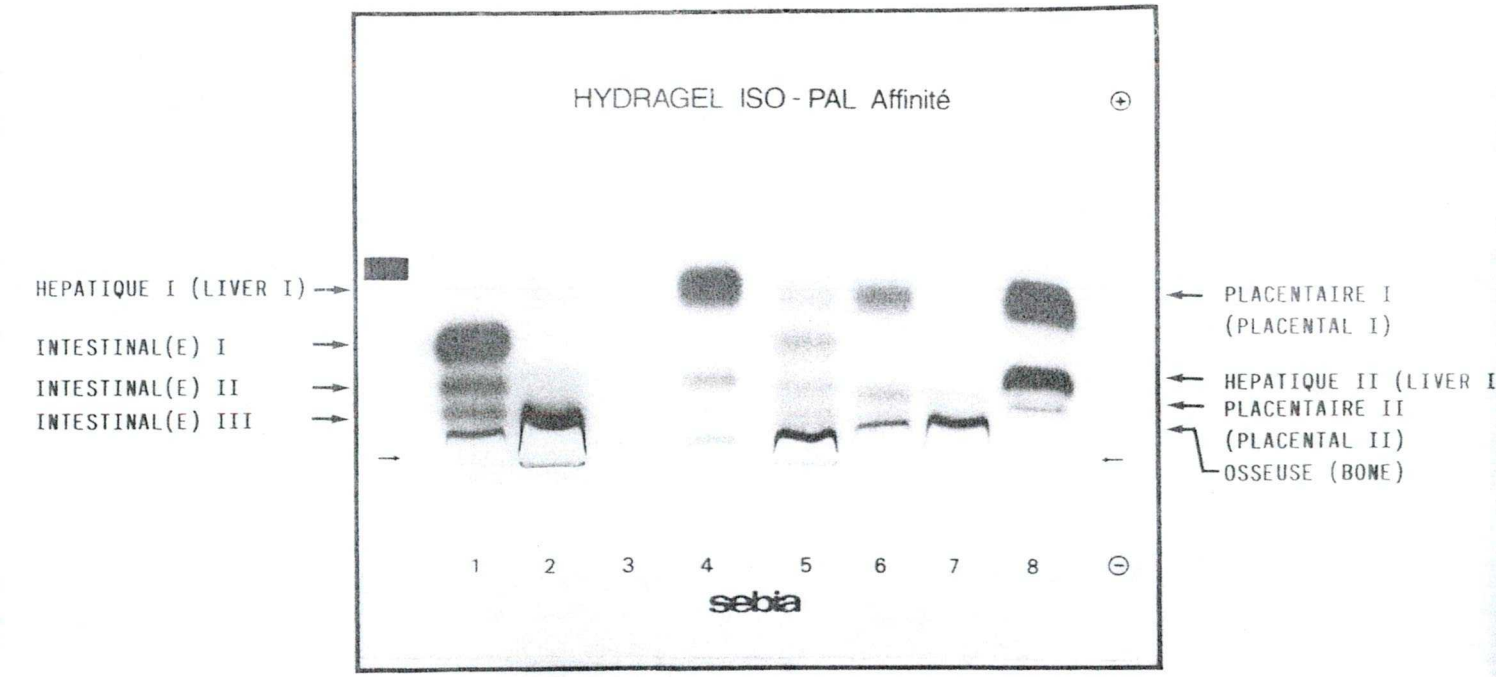
0.20

Comments:
a vizeletben beta mot. M.k. mp. lathato

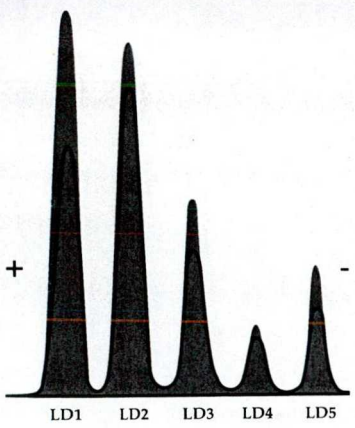
Reference Ranges:

Fraction	Rel%
Albumin	50.0 - 71.0
Alpha 1	1.9 - 4.5
Alpha 2	5.0 - 11.0
Beta	9.0 - 15.0
Gamma	7.8 - 16.0

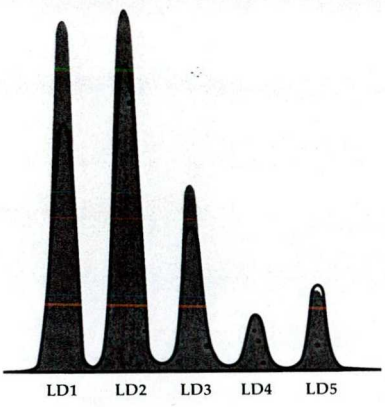

HYDRAGEL ISO - PAL
⊕
HEPATIQUE I (LIVER I)
OSSEUSE (BONE)
INTESTINAL(E) I
INTESTINAL(E) II
INTESTINAL(E) III
PLACENTAIRE I Ser.6
(PLACENTAL I)
HEPATIQUE II (LIVER II
PLACENTAIRE II Ser.6
(PLACENTAL II)
1 2 3 4 5 6 7 8
⊖
sebia


HYDRAGEL ISO - PAL Affinité
⊕
HEPATIQUE I (LIVER I)
INTESTINAL(E) I
INTESTINAL(E) II
INTESTINAL(E) III
PLACENTAIRE I
(PLACENTAL I)
HEPATIQUE II (LIVER I
PLACENTAIRE II
(PLACENTAL II)
OSSEUSE (BONE)
1 2 3 4 5 6 7 8
⊖
sebia

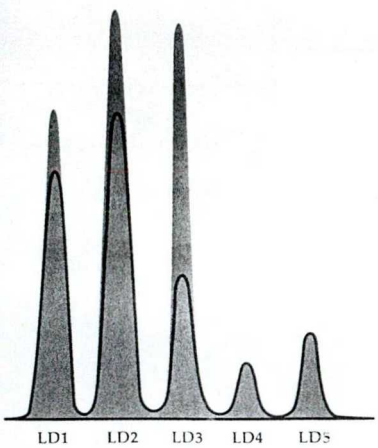
LD Isoenzymes



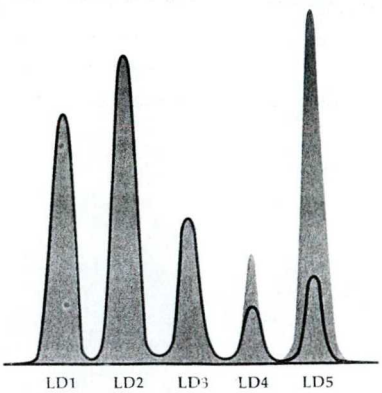
Myocardial Infarction



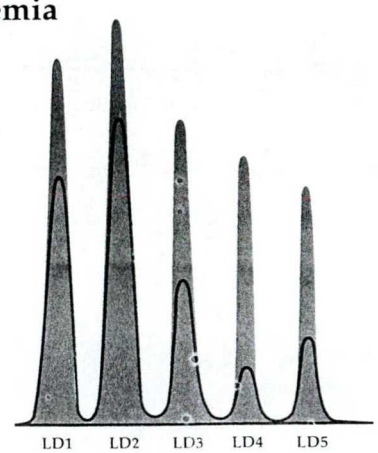
Pernicious or Hemolytic Anemia



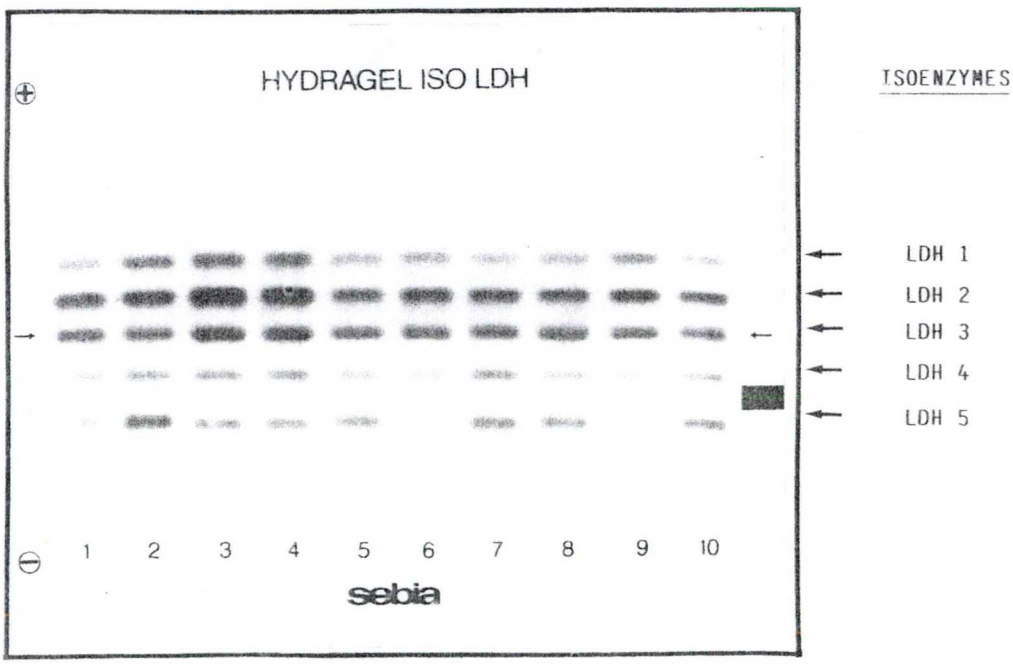
Pulmonary Infarction



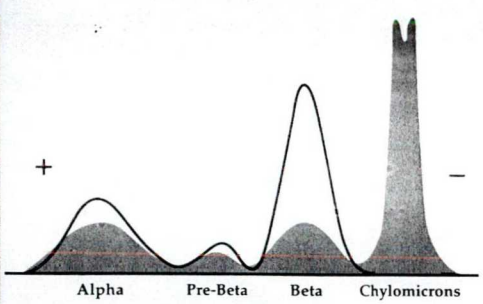
Active Liver Disease



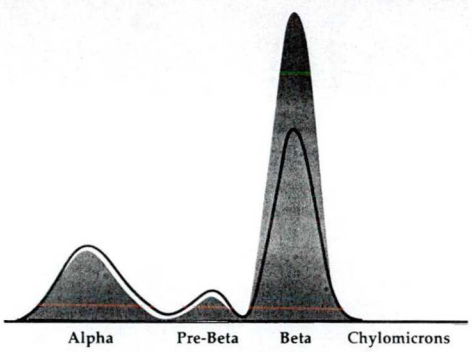
Malignant Tumor-Shock


HYDRAGEL ISO LDH
ISOENZYMES
LDH 1
LDH 2
LDH 3
LDH 4
LDH 5
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
sebia

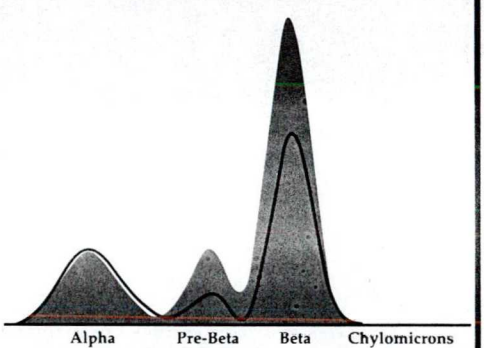
Lipoproteins



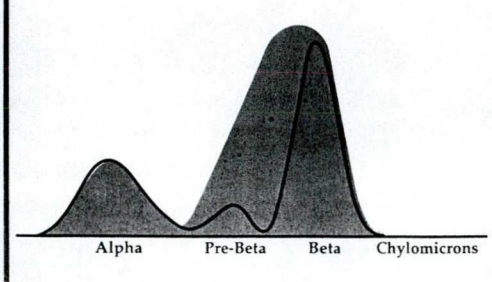
Type I



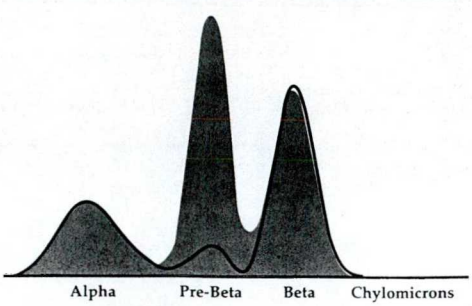
Type IIa



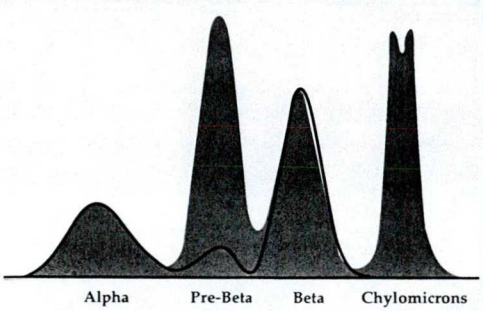
Type IIb



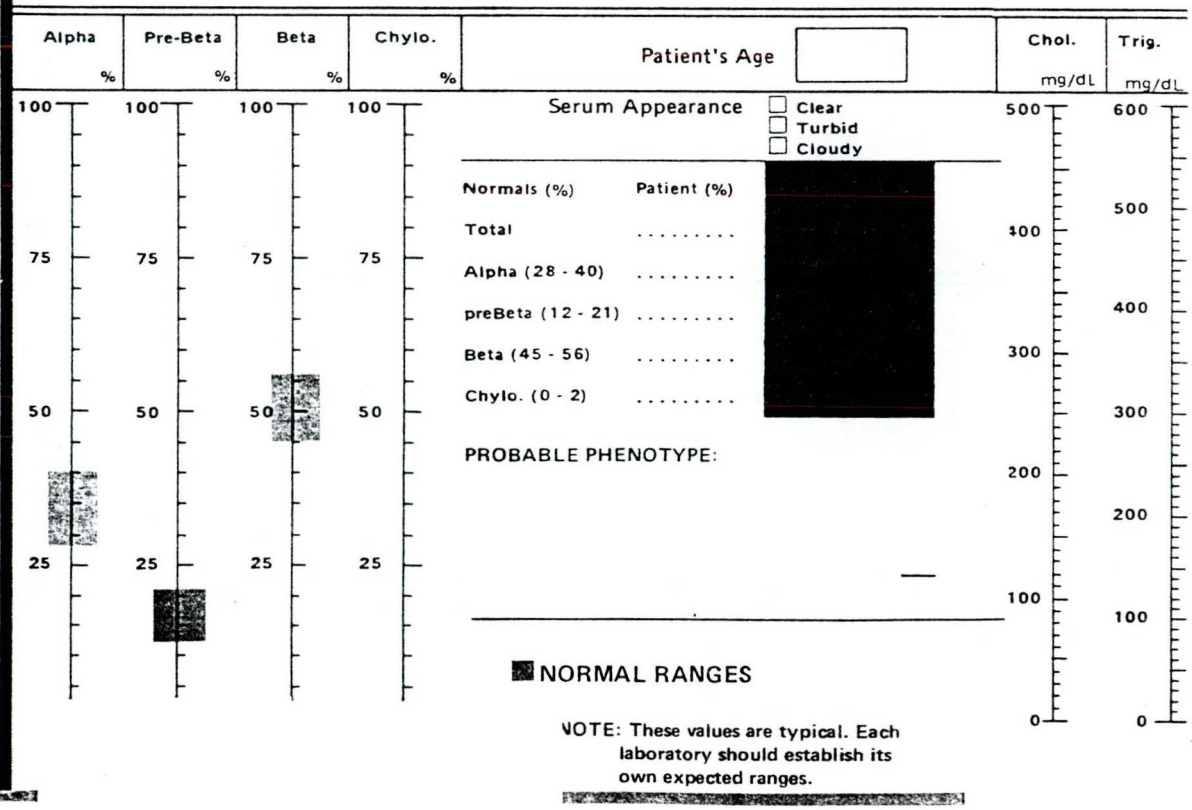
Type III



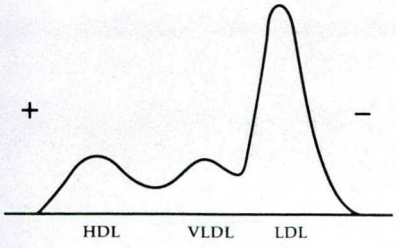
Type IV



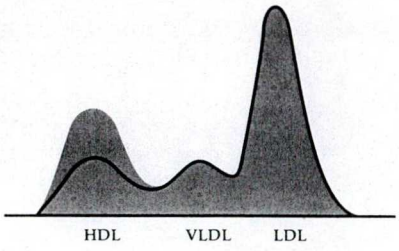
Type V


Alpha %
Pre-Beta %
Beta %
Chylo. %
Patient's Age
Chol. mg/dL
Trig. mg/dL
100
75
50
25
500
400
300
200
100
0
600
Serum Appearance
Clear
Turbid
Cloudy
Normals (%)
Patient (%)
Total .....
Alpha (28 - 40) .....
preBeta (12 - 21) .....
Beta (45 - 56) .....
Chylo. (0 - 2) .....
PROBABLE PHENOTYPE:
NORMAL RANGES
NOTE: These values are typical. Each laboratory should establish its own expected ranges.

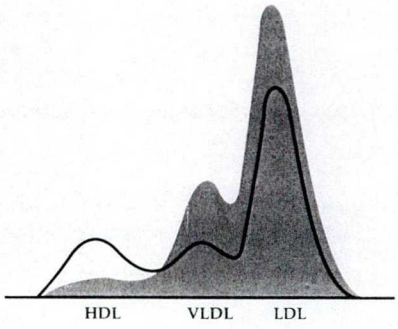
HDL Cholesterol



Average Risk
Total C/HDL Ratio = 5.0



Increased HDL - Low Risk
Total C/HDL Ratio = 3.0

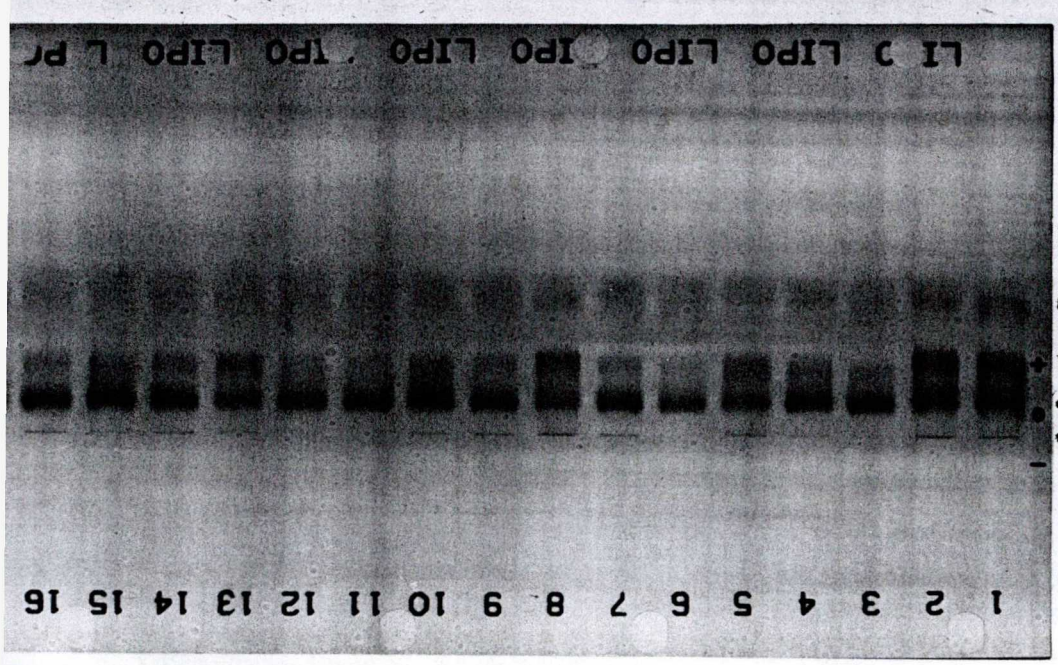


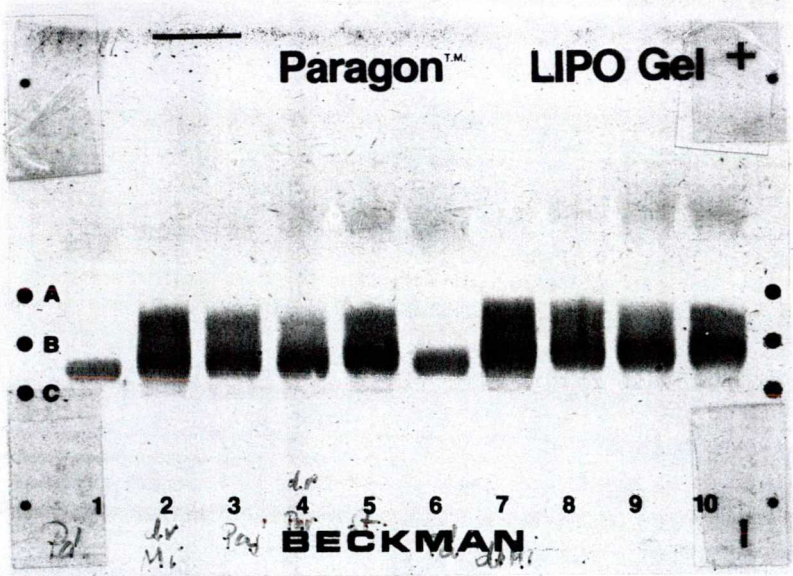
Decreased HDL - High Risk
Total C/HDL Ratio = 13.0

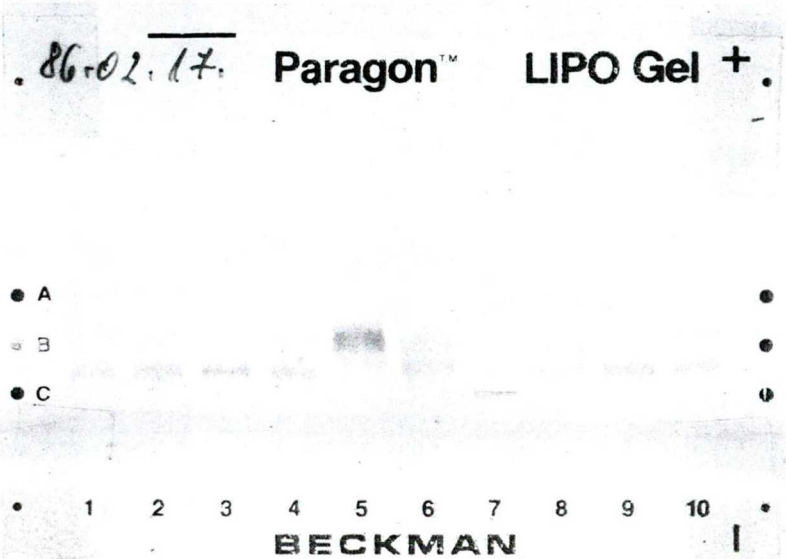
LIPOPROTEIN

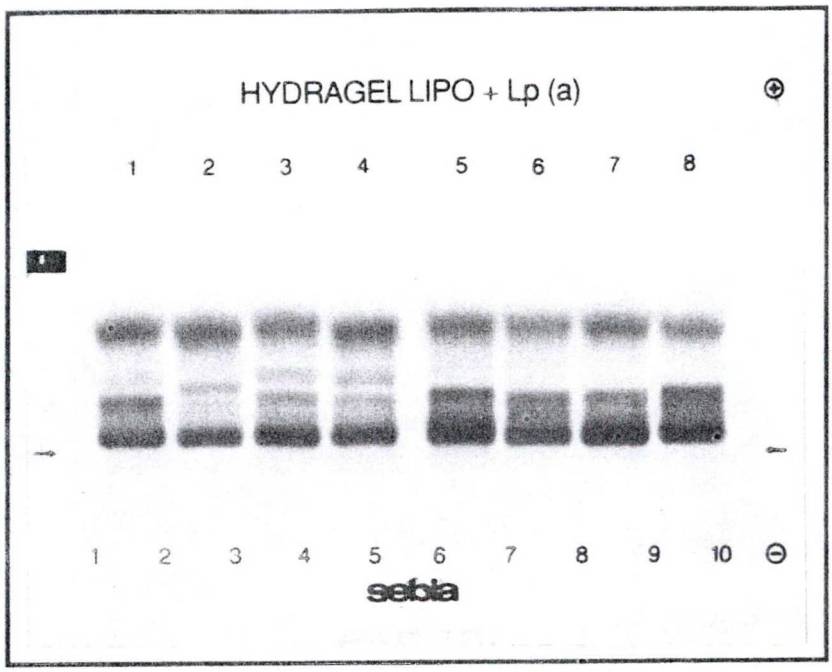
ELEKTROPHORESIS

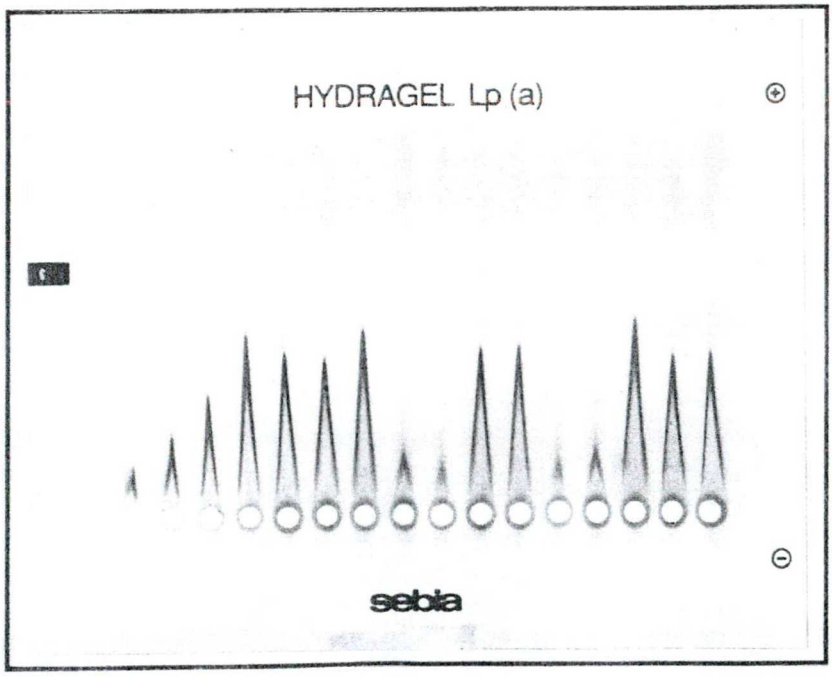
Dr. BARISKA JÁNOS





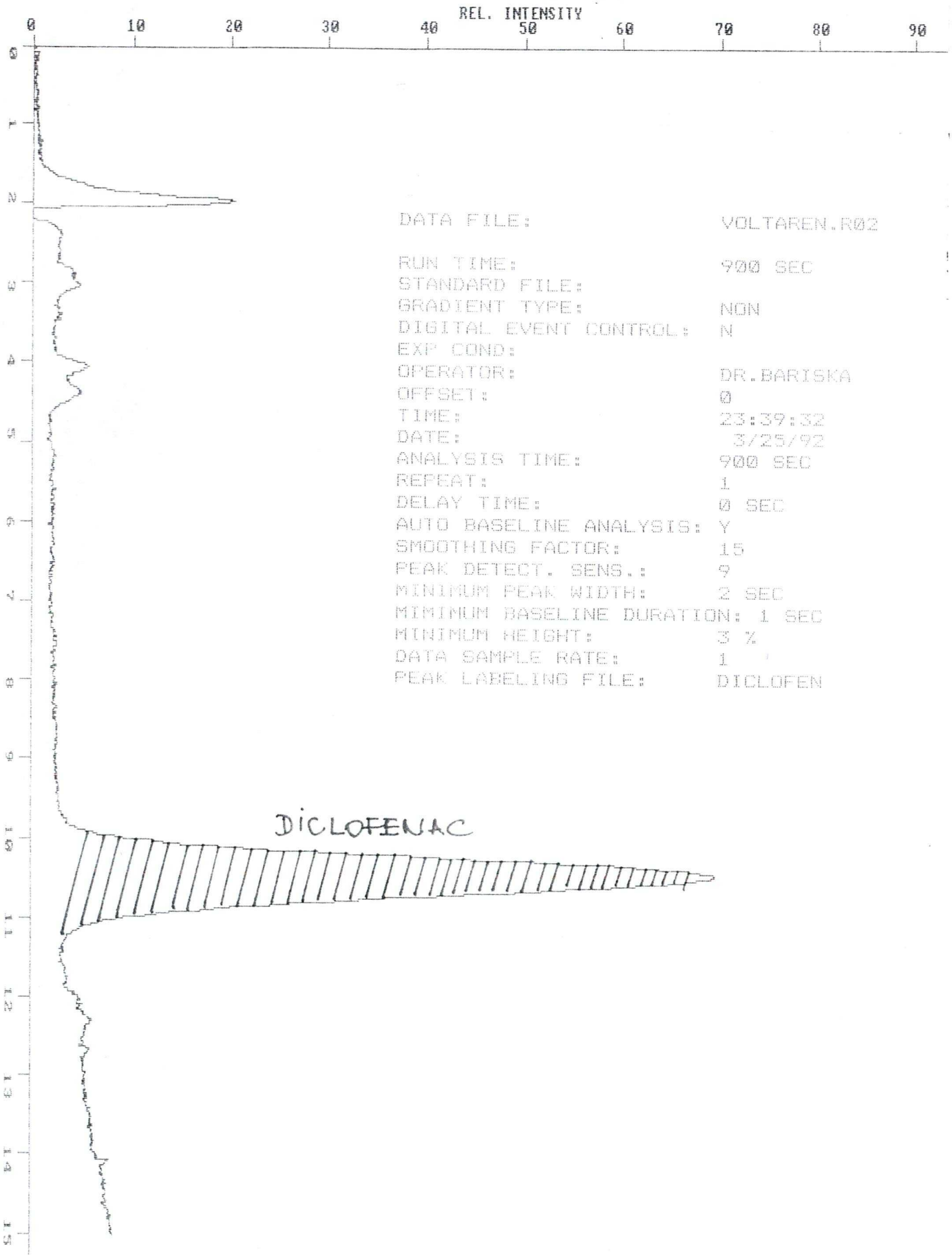



HYDRAGEL LIPO + Lp (a)
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
sebia


HYDRAGEL Lp (a)
sebia

Isco ChemResearch

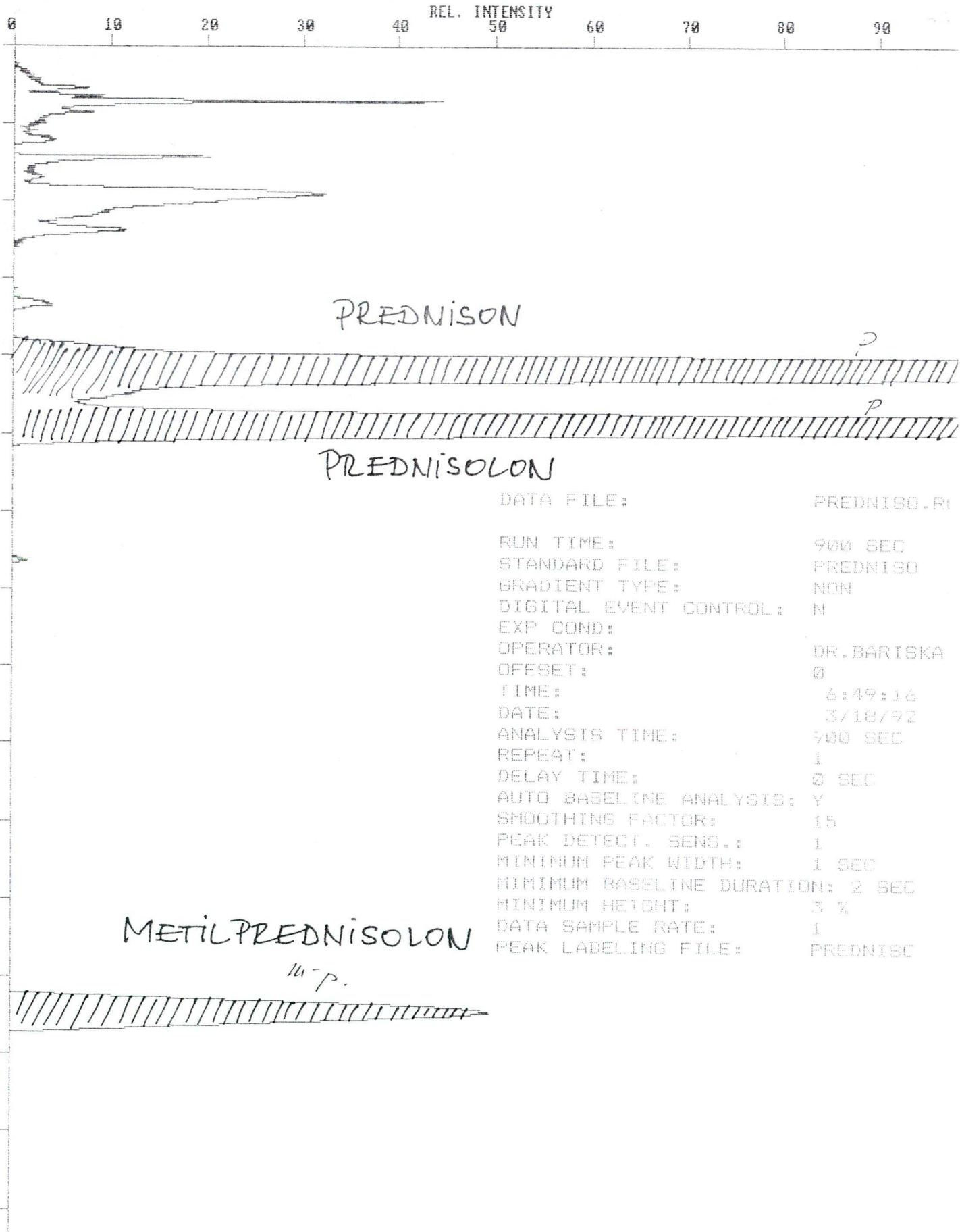
FILE:DICLOFEN.R14



DATA FILE:	VOLTAREN.R02
RUN TIME:	900 SEC
STANDARD FILE:	
GRADIENT TYPE:	NON
DIGITAL EVENT CONTROL:	N
EXP COND:	
OPERATOR:	DR.BARISKA
OFFSET:	0
TIME:	23:39:32
DATE:	3/25/92
ANALYSIS TIME:	900 SEC
REPEAT:	1
DELAY TIME:	0 SEC
AUTO BASELINE ANALYSIS:	Y
SMOOTHING FACTOR:	15
PEAK DETECT. SENS.:	9
MINIMUM PEAK WIDTH:	2 SEC
MIMIMUM BASELINE DURATION:	1 SEC
MINIMUM HEIGHT:	3 %
DATA SAMPLE RATE:	1
PEAK LABELING FILE:	DICLOFEN

Isco ChemResearch

FILE:PREDNISO.R02



DATA FILE:	PREDNISO.R
RUN TIME:	900 SEC
STANDARD FILE:	PREDNISO
GRADIENT TYPE:	NON
DIGITAL EVENT CONTROL:	N
EXP COND:	
OPERATOR:	DR.BARISKA
OFFSET:	0
TIME:	6:49:16
DATE:	3/10/92
ANALYSIS TIME:	900 SEC
REPEAT:	1
DELAY TIME:	0 SEC
AUTO BASELINE ANALYSIS:	Y
SMOOTHING FACTOR:	15
PEAK DETECT. SENS.:	1
MINIMUM PEAK WIDTH:	1 SEC
MINIMUM BASELINE DURATION:	2 SEC
MINIMUM HEIGHT:	3 %
DATA SAMPLE RATE:	1
PEAK LABELING FILE:	PREDNISC

TEOFILLIN

Isco ChemResearch

FILE:TEOFILL.R05

REL. INTENSITY

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90

0 50 100 150 200 250 300

225.95

STANDARD
TEOFILLIN
40mg/ml

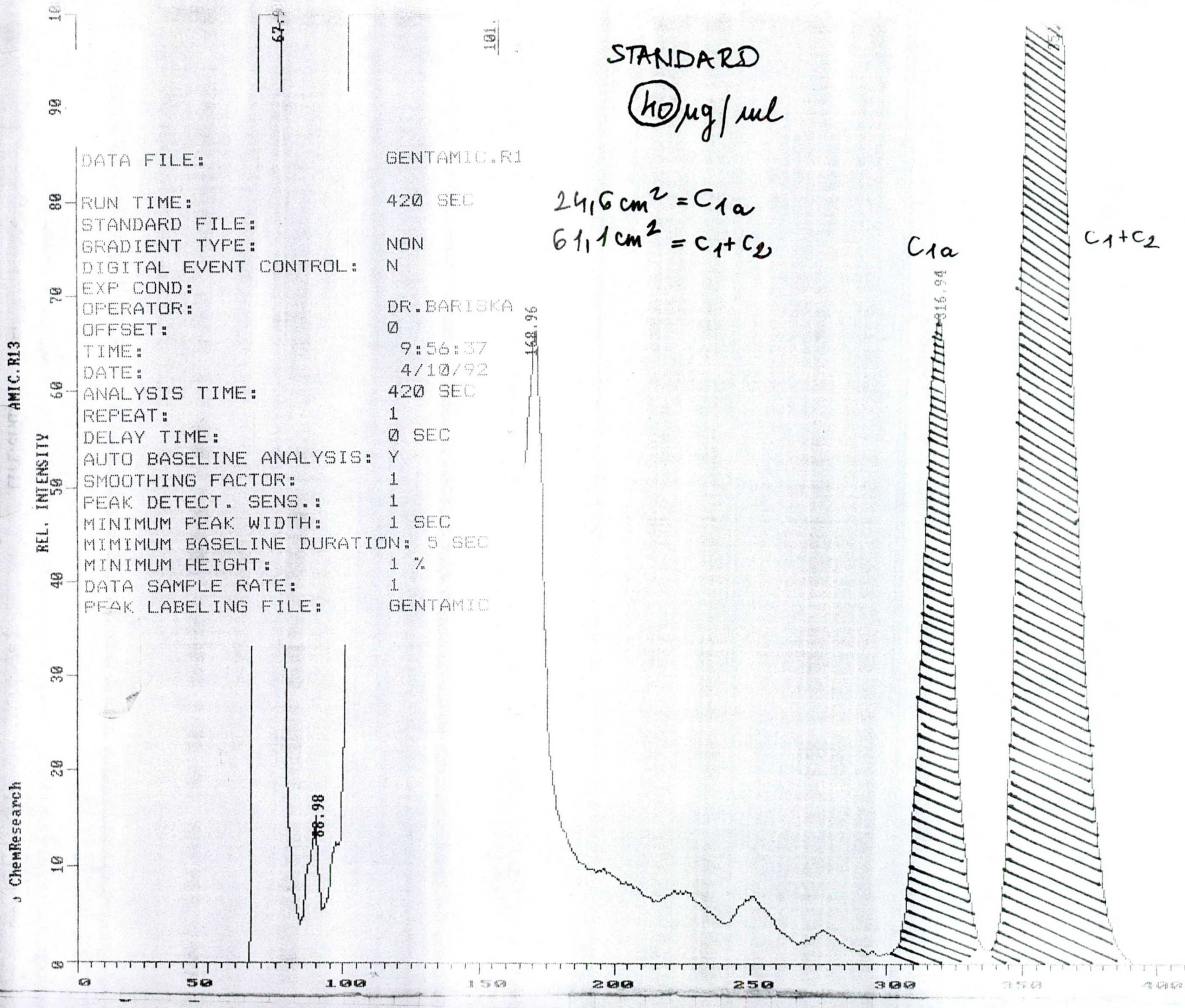
GENTAMICIN

STANDARD

10 µg/ml

24,6 cm² = C1a

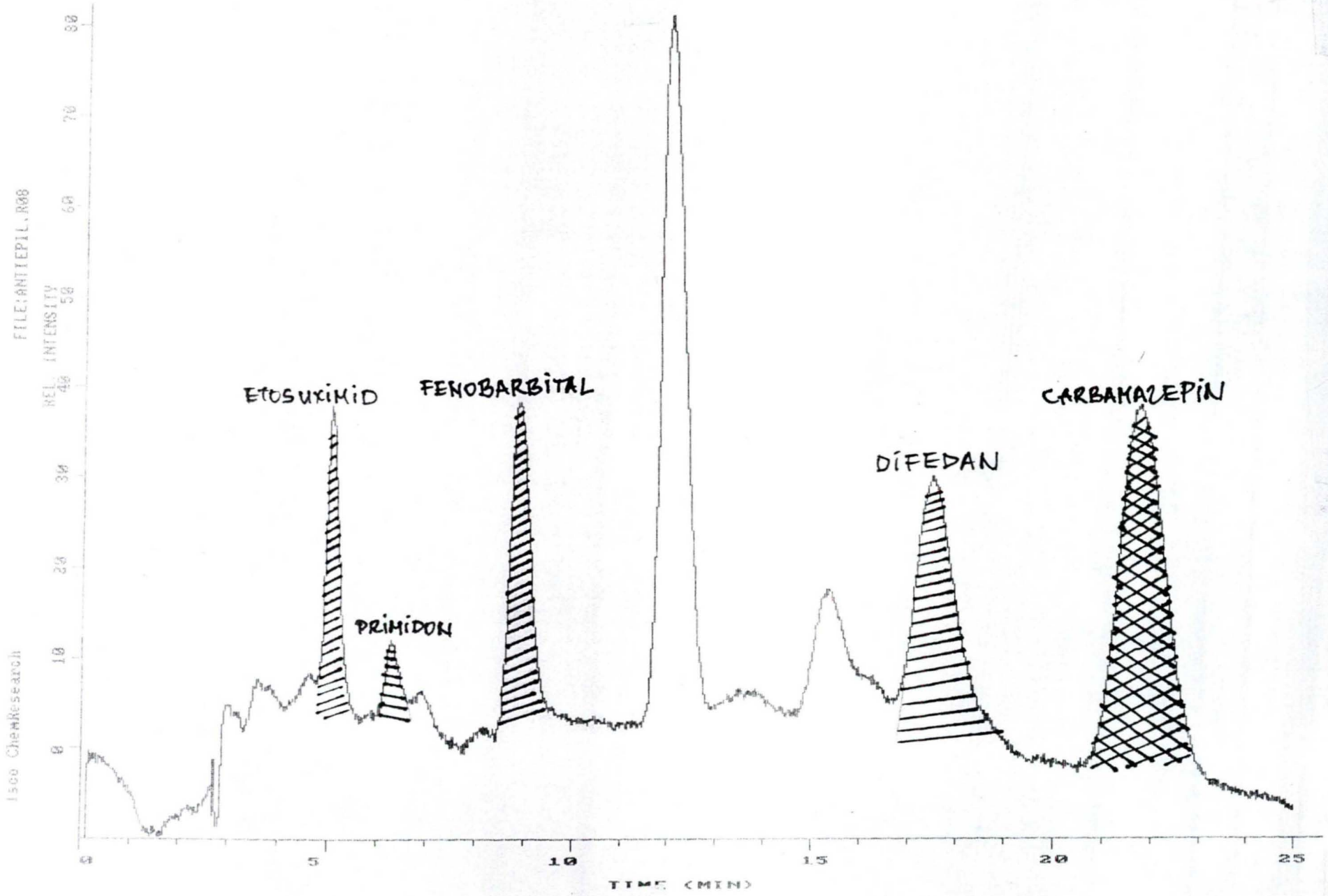
61,1 cm² = C1+C2



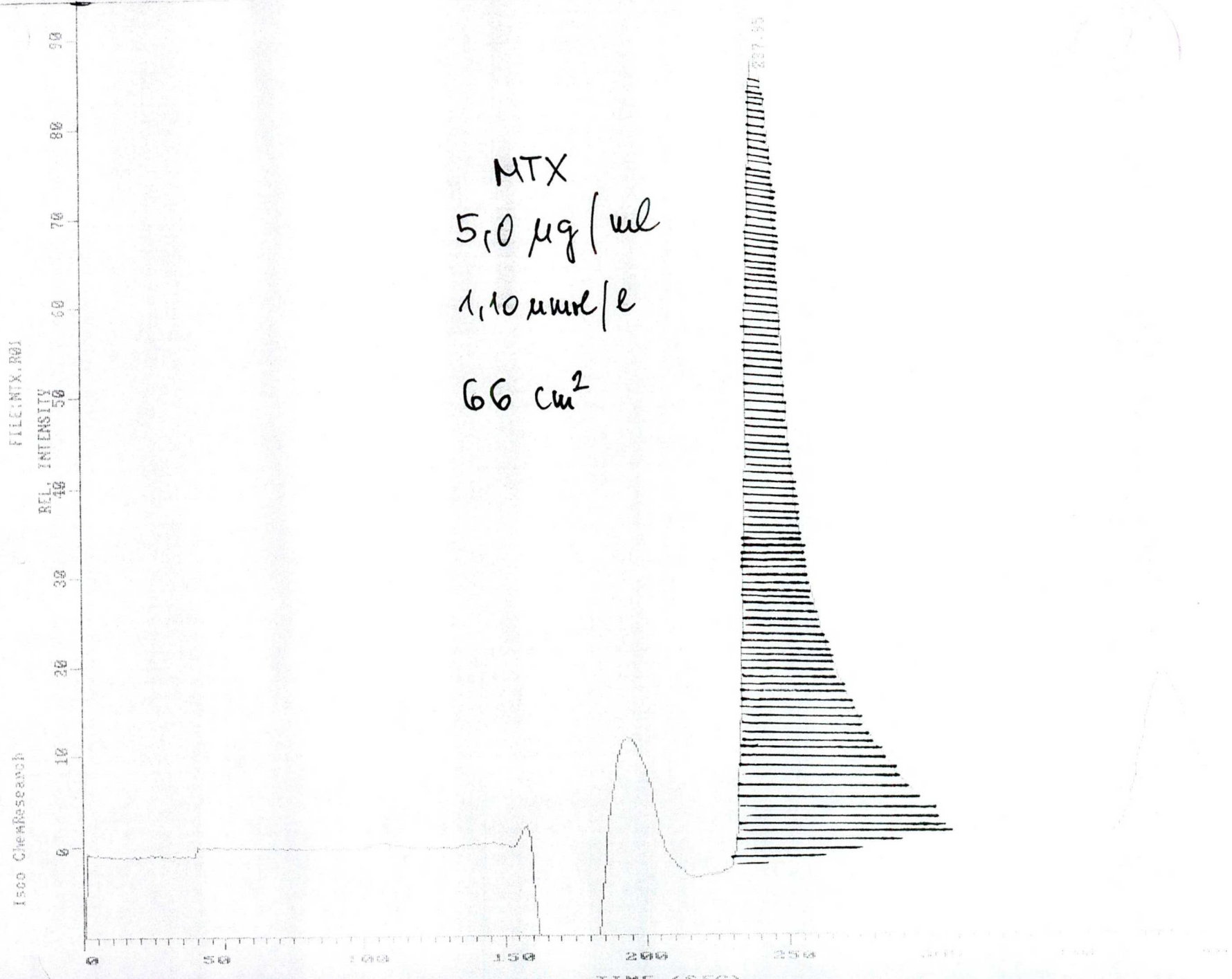
GENTAMICIN

STANDARD

PRESSURE: 7,5 PSI LOOP: 10 µl DETECTOR: UV 365


ETOSUXIMID
PRIMIDON
FENOBARBITAL
DIFEDAN
CARBAMAZEPIN
FILE:ANTIEPIL.R00
REL. INTENSITY
TIME (MIN)
Isco ChemResearch

METHOTREXAT



METHOTREXAT

DATA FILE:	MTX.R01
RUN TIME:	420 SEC
STANDARD FILE:	
GRADIENT TYPE:	NON
DIGITAL EVENT CONTROL:	N
EXP COND:	
OPERATOR:	DR BARISKA
OFFSET:	10
TIME:	10:32:32
DATE:	12/ 4/92
ANALYSIS TIME:	420 SEC
REPEAT:	1
DELAY TIME:	0 SEC
AUTO BASELINE ANALYSIS:	Y
SMOOTHING FACTOR:	1
PEAK DETECT. SENS.:	9
MINIMUM PEAK WIDTH:	1 SEC
MINIMUM BASELINE DURATION:	5 SEC

OS2LOP:

NUCLEOSIL C_{18} ⌀5µm

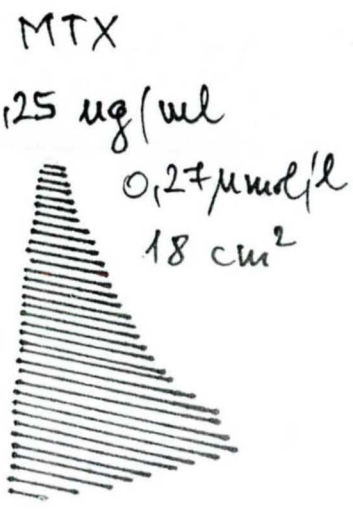
PRESSURE: 17,6 MPa

SENSITIVITY: 0,01

FLOW RATE: 1,00 ml

LOOP: 100 µl

DETECTOR: UV_{280}



Nyilatkozat

Hozzájárulok ahhoz, hogy Dr. Bariska János - aki a József Attila Tudományegyetem Természettudományi Kara Molekuláris és Sejtbiológia Doktori /PhD/ programja keretében Doktori /PhD/ fokozat megszerzéséért fordult - beadott disszertációjában az alábbi publikációkat felhasználja:

J.Bariska, T.Bender:

Determination of Diclofenac /Voltaren/ concentrations in human serum and synovial fluid by HPLC.

Labordiagnosztikai Társaság Kiadványa 174 ,3./199o/.

T.Bender., J.Bariska et.al.:

Diclofenac-Absorption from Voltaren Emulgel throught Iontophoresis and Phonophoresis

European Journal of Physical and Rehabilitation

13o-132. 174/1992/.

Ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos minősités megszerzésére, és nem is kívánom felhasználni.

Dr. Bender Tamás

Bp.1998.o2.16. osztályvezető főorvos

Nyilatkozat

Alulirott, Dr. Darnót Gábor hozzájárulok ahhoz, hogy Dr. Bariska János a PhD fokozat megszerzése céljából beadott disszertációjában az alábbi publikációt felhasználja:

Darnót Gábor dr., Nemesánszky Elemér dr., Bariska János dr.:

A koffein elimináció vizsgálatának diagnosztikus értéke a krónikus májbetegségekben

Orvosi Hetilap 927-931, 18. /1995/.

A fenti publikáció eredményeit nem használtam fel és nem is kívánom felhasználni tudományos minősités megszerzésére.

Bp,1998. 02. 13.

Dr. Darnót Gábor