

**A folyadékkromatográfiával kapcsolt
tömegspektrometriával mért kortizol prognosztikai
szerepe kritikus állapotú betegekben**

Ph.D. Tézis

Dr. Tarjányi Zita

Doktori Iskola és Program vezetője:

Prof. Dr. Kovács L. Gábor Ph.D.

Témavezetők:

Dr. Mezősi Emese Ph.D.

Prof. Dr. Kovács L. Gábor Ph.D.



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécs

2014

1 Bevezetés

1.1 Kortizol meghatározás

A kortizol a mellékvesekéreg zona fasciculata rétegében termelődő glükokortikoid hormon. A keringő kortizol 90%-a kortikoszteroid-kötő globulinhoz (CBG) illetve albuminhoz kötődik, a fennmaradó mintegy 10% szabad formában van jelen. A biológiai hatásért kizárólag a szabad frakció a felelős. Kortizol jelen van a vérben, a vizeletben és a nyálban; utóbbiak arányosak a plazmában keringő szabad kortizol koncentrációjával, ezért a plazma össz-kortizol koncentrációjánál sokkal érzékenyebben tükrözik a biológiailag aktív kortizol mennyiségét.

A legtöbb laboratóriumi módszer kizárólag össz-kortizol (TC) meghatározásra alkalmas, pedig a szabad kortizol (FC) szint mérése lényegesen több információt szolgáltat a biológiai hatásért felelős kortizol koncentrációjáról. Az albumin és CBG koncentrációk változásai befolyásolhatják a vizsgálat eredményét. Az FC szint megállapítására különböző módszerek állnak rendelkezésre. Az egyik lehetőség az FC kiszámítása a TC és CBG mennyiségi meghatározását követően, a szabad kortizol index vagy a Coolens formula használatával. Az ily módon meghatározott FC érték nem megbízható, mivel figyelmen kívül hagyja a kötési jellegzetességek egyének közötti eltéréseit, illetve a mérésekből fakadó lehetséges hibák összeadódnak. Az FC szint direkt mérése sokkal korszerűbb és pontosabb megoldás. Ahhoz, hogy a mérés során ténylegesen csak a szabad frakciót határozzuk meg, a minta előkészítést a fehérjék mechanikai eltávolításával kell kezdenünk. Fehérjementes oldatot egyensúlyi dialízissel vagy ultrafiltrációval állíthatunk elő. Utóbbihoz egy membránszűrő szükséges, melynek molekulatömeg cut-off értéke meghaladja az analit tömegét, de kisebb a CBG és az albumin molekulatömegénél. A szabad kortizol becslésének legegyszerűbb módja a nyál kortizol (SC) szint meghatározása, mivel ebben az esetben nincs szükség a fehérjék eltávolítására. Az FC és az SC analízise nagymértékben hasonlít a TC meghatározáshoz. Az egyetlen különbség, hogy a TC mérés során a fehérjéhez kötött hormon frakciót fel kell szabadítani.

A különböző mátrixok esetén is alkalmazható, rutinszerűen használt immunoassay eljárások (enzimimmunoassay és elektrokemilumineszcencia assay) szenzitivitása nagy, azonban a specificitás növelése a szerkezetileg nagyon hasonló szteroidok meghatározása során, nagy kihívást jelent. Az alig különböző kémiai

struktúrák vizsgálata immunoassay esetén keresztreakcióhoz, ennek következtében pedig hibás eredményhez vezethet. Ez leginkább akkor jelent problémát, ha a beteg a szokásos prednizolon vagy metilprednizolon kezelésben részesül. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a kortizol elleni antitestekkel számos szteroid és szteroid tartalmú készítmény is keresztreagál. További analitikai problémát jelent az immunvizsgálatok esetén az antitest interferencia (heterofil antitestek vagy autoantitestek).

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (HPLC-MS) specificitása meghaladja az immunoassay specificitását, mivel a vegyület azonosítása az összetevők pontos tömege, nem pedig azok szerkezeti jellemzői alapján történik, ami lehetővé teszi a nehezen elkülöníthető vegyületek pontos mennyiségi meghatározását. HPLC alkalmazásával kiküszöbölhető a keresztreaktivitás és a heterofil antitestek megjelenése. A HPLC-MS módszer lehetővé teszi többféle metabolit meghatározását kis térfogatú mintából, bevezetése azonban szigorú validálást igényel.

1.2 Kritikus állapotú betegek endokrin változásai

A kritikus állapot, súlyos betegség, fertőzés, műtét vagy trauma következtében kialakult, életet veszélyeztető állapotot jelent, mely létfontosságú szervek elégtelenségében illetve súlyos fizikai stresszben nyilvánul meg. A túlélés érdekében elengedhetetlen az elégtelenül működő szervrendszerek támogatása. Az intenzív ellátás új terápiás lehetőségei nélkül a betegeknek nincs esélyük a túlélésre.

A szervezet által a kritikus állapotra adott központi és perifériás stresszválasz, különböző neuroendokrin és anyagcsere változásokkal jár együtt. A súlyos fizikai stressz az életveszélyes állapot legvégső formája. Az utóbbi években számos új adat látott napvilágot a kritikus állapotú betegek endokrin válaszáinak patomechanizmusáról.

1.3 Hormonális prognosztikai faktorok kritikus állapotú betegek esetén

A klinikai gyakorlatban a kritikus állapotú betegek halálozásának megítélésére különböző prognosztikus pontrendszereket használnak: APACHE (acute physiology and chronic health evaluation), SAPS (simplified acute physiology score). Ezek kiszámításához számos vizsgálatra és laboratóriumi mérésre van szükség, míg egy önálló biomarker lényegesen egyszerűbben jelezhetné a betegség

hátrányos kimenetelét. Sok hormont vizsgáltak ebből a szempontból. A kritikus állapot akut fázisában a kezdeti magas szérum kortizol szint mellett az adrenokortikotrop hormon (ACTH) stimulációra adott alacsony kortizol választ írták le a rossz prognózis rizikófaktoraként. Megállapították, hogy az emelkedett reverz trijód-tironin (rT_3) szint és T_3/rT_3 arány is magas halálozási kockázatot jelent. Kritikus állapotú betegek nagy populációjában az ösztadiol szint, egyéb tényezőktől függetlenül, megbízhatóan előre jelezte a halálozást. Szeptikus betegek vizsgálata során a magas grelin koncentráció bizonyult a túlélés pozitív prediktorának. A túlélő csoportban szignifikánsan alacsonyabb agyi eredetű natriuretikus peptid (BNP) koncentrációt mértek a nem túlélő csoporthoz képest kritikus állapotú betegek nagyszámú kevert csoportjában. Az emelkedett adiponektin szintet is összefüggésbe hozták a halálozással légzési elégtelenségben szenvedő betegek esetén. A felvételnél mért növekedési hormon (GH) koncentráció mediánjának emelkedése a nem túlélő csoportban körülbelül 7-szerese volt a túlélőkének.

Számos vizsgálat alapján elmondhatjuk, hogy minél súlyosabb a magas halálozási kockázattal rendelkező betegek állapota, annál nagyobb mértékű endokrin változás megy végbe a szervezetben, illetve hogy a prognózis megítélésére több hormonális paraméter is hasznos lehet.

2 Célkitűzések

2.1 Új módszer validálása a kortizol meghatározására

Célunk volt egy érzékeny és specifikus HPLC-MS-alapú kortizol mérés kidolgozása nagy-felbontású Bruker micrOTOF tömegspektrométer használatával. Módszerünket az alábbi paraméterek meghatározására terveztük kifejleszteni:

- a) szérum összkortizol koncentráció
- b) szérum szabad kortizol koncentráció
- c) nyál kortizol koncentráció

2.2 Kortizol válasz meghatározása kritikus állapotú betegekben folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával

Kutatásunk célja volt,

- a) az össz- és szabad kortizol koncentrációk meghatározása HPLC-MS módszerrel kritikus állapotú betegek kevert populációjában

- b) a kortizol válasz időbeli lefolyásának meghatározása kritikus állapotú betegekben
- c) a kortizol koncentráció prognosztikai szerepének értékelése a ma legjobbnak tartott halálozási pontrendszerekhez (APACHE II, SAPS II) viszonyítva
- d) az össz- és szabad kortizol koncentrációk értékelése, mint új prognosztikai biomarker kritikus állapotú betegek esetén

3 Betegek és módszerek

3.1 Anyagok

A méréseinkhez használt analitikai standardokat a Sigma-Aldrich-tól (Budapest, Hungary), a deuterált belső standardot (9,12,12-D3 kortizol) pedig a Cambridge Isotope Laboratories Inc.-től (USA) szereztük be. Az eluensekben használt HPLC-MS minőségű oldószereket a Molar Chemicals-től vásároltunk (Hungary).

3.2 Betegek az HPLC-MS módszerrel történő kortizol mérés validálása során

Méréseinkhez 292 betegtől vettünk vért (175 nő, 117 férfi). A nők átlag életkora 59,1 év (23-82), a férfiaké 53,4 év (24-76) volt.

A vérmintákat natív (alvadásgátló-mentes) Vacutainer (Becton Dickinson, Hungary) vérvételi csövekbe gyűjtöttük reggel 8:30 és 10:00 között. A szérumot -24 °C alatt tároltuk a minta előkészítésig. A nyálmintákat egészséges egyénektől Salivette mintagyűjtő csövek (Saarstedt, Hungary) segítségével nyertük, melyeket a mérésig fagyasztva tároltunk.

3.3 Minta előkészítés

A TC minták előkészítése során 20 µl belső standard oldatot (1,1 µmol/l) adtunk 100 µl szérumhoz, majd a fehérje precipitációt 300 µl acetonitril hozzáadásával végeztük. Ezt követően a mintát 10 percig centrifugáltuk (14000 g). Az autosampler csőbe 50 µl vízhez 50 µl felülúszót kevertünk, melyből a HPLC oszlopba 20 µl-t injektáltunk.

Az FC analízishez első lépésként 500 µl szérumot ultrafiltráltunk Amicon Ultra-0.5 ml centrifuga filterrel (Merck, Hungary), melynek molekula tömeg cut-off értéke 30 kDa volt.

Az ultrafiltrátumot és a nyálmintákat szilárd fázisú extrakcióval (SPE) tisztítottuk. 400 µl nyálmintához illetve ultrafiltrátumhoz 20 µl belső standard oldatot (0,11 µmol/l) adtunk. Az extrakciót Strata-X (60 mg) polimer alapú fordított-fázisú extrakciós töltetekkel (Phenomenex, USA) végeztük. Az eluenst vákuum alatt szárítottuk, a rezidumot pedig 20%-os metanol, 2 mmol/l ammónium-acetát és 0,05% hangyasav tartalmú oldatban oldottuk vissza. Az injektálási térfogat 20 µl volt.

3.4 Eszközök

Az többlépéses gradiens elúciós elválasztást autosamplerrel és oszloptermosztáttal (30 °C) felszerelt Dionex Ultimate 3000 (Dionex, USA) analitikai HPLC-vel, Kinetex C8 2.6 µm, 2.1×100 mm analitikai oszlopon (Phenomenex, USA) végeztük 200 µl/min áramlási sebességgel. A HPLC oldószerek 2 mmol/l ammonium acetátot és 0,05% hangyasavat tartalmaztak 5%-os (A) illetve 95%-os (B) acetonitrilben.

A detektálást a HPLC-hez kapcsolt, pozitív módban működtetett electrospray ionizációs (ESI) ionforrással felszerelt Bruker micrOTOF tömegspektrométerrel végeztük.

3.5 Kritikus állapotú betegek

A prospektív, követéses vizsgálatba a Pécsi Tudományegyetem I. számú Belgyógyászati Klinika Intenzív Osztályára felvett 69 kritikus állapotú beteget (39 férfi, 30 nő) vontunk be. A betegek átlag életkora 74 (23-87) év volt. A kevert populáció sebészeti indikációval felvett betegeket és traumás sérülteket nem tartalmazott. A vizsgálat ideje alatt a vitális paraméterek és a klinikai státusz monitorozása mellett rutin laborvizsgálatokat végeztünk minden betegnél. A betegek gyógyszeres kezelését alaposan tanulmányoztuk, és a glukokortikoid kezelésben részesülő betegek mintáit kizártuk a további feldolgozásból. A bevont betegek egyike sem kapott etomidat, ketokonazol vagy egyéb szteroid metabolizmust befolyásoló gyógyszeres kezelést. A betegség súlyosságát a SAPS II és az APACHE II mortalitási pontrendszerek alapján állapítottuk meg.

A vérmintákat az intenzív osztályra történő felvétel időpontjában (0 órás), és az azt követő 6., 24., 48. és 96. órában vettük. Az össz- és szabad kortizol koncentrációkat nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt nagy

felbontású electrospray ionizációs-repülési idő (ESI-TOF) tömegspektrométerrel (MS) mértük.

3.6 Statisztika

A statisztikai analízist az IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Magyarország Kft. Budapest, Hungary) és az SPSS Statistics Version 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) szoftverekkel végeztük.

Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével határoztuk meg az adatok eloszlását. Szignifikáns eredménynek a $P < 0,05$ értéket fogadtuk el. A túlélő és nem túlélő csoportok össz- és szabad kortizol szintjeit Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze. A nem-normál eloszlású változók közötti összefüggést Spearman korrelációval vizsgáltuk. ROC (receiver operating characteristic) analízissel határoztuk meg a kortizol szintek diagnosztikus értékét a halálozás előrejelzésében. Az optimális cut-off értéket Youden's J statisztika segítségével állapítottuk meg. Az egyes kortizol kvartilisek mortalitási rizikóját Kaplan-Meier túlélési görbékkel hasonlítottuk össze. A halálozás független determinánsainak vizsgálatát bináris logisztikus regressziós analízissel végeztük.

4 Eredmények

4.1 Új folyadékromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszer bevezetése a kortizol meghatározására

4.1.1 HPLC kapcsolt ESI-TOF tömegspektrometria

A kortizol és a belső standard retenciós ideje 6 perc ($\pm 0,1$ perc), az extrakciós ionkromatogram (EIC) m/z értékét a kortizol (m/z 363,2099) és a belső standard (m/z 366,2287) tapasztalati tömege alapján választottuk, melyek a proton addukt ionok $[M+H]^+$ tömegeinek felelnek meg. A méréssorozat alatt elért nagy (1-2,5 ppm) tömegpontosságnak köszönhetően, az ionkromatográfiás csúcsok integrálását szűk tömegtartományban (± 1 mDa) végeztük.

Az HPLC-MS technikával történő kortizol mérés validálása során az alábbi koncentrációtartományokat határoztuk meg: TC 35,6-1088 nmol/l (átlag 372 nmol/l), FC 0,5-12,4 nmol/l (átlag 3,7 nmol/l), SC 0,7-10,4 nmol/l (átlag 3,2 nmol/l).

4.1.2 A módszer validálása

Az intra-assay és az inter-assay variancia meghatározásakor a 3 assay-hez (TC, FC és SC) összesen 9 mintasorozatot gyűjtöttünk. Minden sorozat 10 random módon kiválasztott mintából állt. Egy tartozott az alacsony (TC <100 nmol/l, FC és SC <3 nmol/l), egy a közepes (TC 100-500 nmol/l, FC és SC 3-8 nmol/l), és egy a magas tartományba (TC >500 nmol/l, FC és SC >8 nmol/l). Minden mintát 20 alkalommal mértünk le. Az inter-assay variancia meghatározásához a megfelelő mintákat, egymást követő napokon 6 alkalommal mértük le. Az intra-assay variációs koefficiens (CV) a 254,5 nmol/l-es TC mintákban találtuk a legjobbnak (1,7%) és a 45,8 nmol/l-es TC mintákban a legrosszabbnak (7,4%). A legrosszabb inter-assay CV-t a 254,5 nmol/l-es TC minták esetében kaptuk (9,6%), míg a legjobb a 8,4 nmol/l SC mintáknál (4,1%). Az átlag intra-assay variancia 4,7%, az átlag inter-assay variancia pedig 6,6% volt.

A módszer kimutathatósági (LOD) és kvantifikálhatósági határainak (LOQ) meghatározásához a szérum és nyálmintákat PBS-sel (phosphate buffered saline) hígítottuk oly módon, hogy a LOD esetében háromszoros, a LOQ esetében pedig tízszeres átlagos jel-zaj arányt érjünk el (n=10). Az értékek az FC és az SC meghatározás esetében: LOD 140 pmol/l, LOQ 440 pmol/l, illetve LOD 190 pmol/l és LOQ 600 pmol/l voltak. A TC esetében az értékeket LOD 9 nmol/l, LOQ 12,5 nmol/l-ben állapítottuk meg. A mérés linearitási tartománya 400 pmol/l-4000 nmol/l névleges koncentrációk között volt.

A visszanyerés meghatározásához ismert mennyiségű kortizol hozzáadása előtt és után is megmértük „poolozott” minták (n=5) kortizol koncentrációját. Az átlag recovery a TC esetén 101,2%, az FC és az SC esetében pedig 98,9% és 94,6% volt. A számított recovery értékek 94,6-107,8% közöttiek voltak.

4.1.3 Gyakran alkalmazott szteroid tartalmú terápiás készítmények zavaró hatásának vizsgálata

Az interferencia vizsgálat során a gyűjtött mintákhoz gyakran használt szteroid tartalmú készítményekből készített 5000 nmol/l-es koncentrációjú oldatokat adtunk, és a méréseket 10 alkalommal ismételtük. A kortizol koncentrációt a megfelelő készítmény hozzáadása előtt és után is megmértük. Folyadékkromatográfiával a kortizon, a dexametazon, a prednizon és a metilprednizolon elválasztható volt a kortizoltól, és a mérések során ezekkel a

szerekkel interferenciát nem tapasztaltunk. A prednizolon retenciós ideje azonban megegyezik a kortizol és a belső standard retenciós idejével, ami nem teszi lehetővé a kromatográfiaszeparációt. Ez az oka, hogy a mérések során a kortizol koncentráció átlag 3%-os (2,2-4,1%, n=10) túlbecslését tapasztaltuk. Ez az eltérés azonban kevesebb, mint a vizsgálat alatt megfigyelt átlag CV.

4.1.4 Az HPLC-MS módszer összehasonlítása a rutinszerűen használt immunoassay meghatározással nem kritikus állapotú betegek esetén

Az általunk kidolgozott HPLC-MS technikát Pearson korrelációval és lineáris regressziós analízissel vizsgáltuk 3 különböző immunoassayhoz viszonyítva. A TC mérés eredményeit a Roche Modular Analytics E 170 ECLIA assay (n=96) eredményeivel hasonlítottuk össze, mely a klinikai laboratóriumunk validált módszere. Az FC és az SC eredményeket (n=96 mindkét esetben) pedig két további immunoassay kit mérési eredményeivel vetettük össze. Az Enzo Cortisol EIA kitet (Biomarker, Budapest) használtuk az FC, és az IBL International Cortisol ELISA kitet (Diagnosticum, Budapest) az SC eredmények összehasonlítására.

Az FC és az SC mérések során a magas koncentrációtartományokban pozitív eltérést figyeltünk meg, melyet azonban a TC mintáknál nem tapasztaltunk. A Pearson korrelációs koefficiens értéke a TC és az SC eredmények esetén hasonló volt (0,991 és 0,992 $p < 0,001$); az FC eredmények azonban alacsonyabbak voltak (0,987 $p < 0,001$), mint az EIA kittel történő mérés során.

4.2 Össz- és szabad kortizol mérés kritikus állapotú betegek esetén

4.2.1 Kortizol válasz kritikus állapotú betegekben és az össz- és szabad kortizol szint korrelációja

Méréseink során 49,9 és 8797,8 nmol/l (referencia tartomány: 138-690 nmol/l, medián: 583,5 nmol/l, interkvartilisek: 381,5 és 855,8 nmol/l) közé eső TC, illetve 0,4 és 759,9 nmol/l (referencia tartomány: 1-8 nmol/l, medián: 13,4 nmol/l, interkvartilisek: 4,3 és 60,1 nmol/l) közé eső FC értékeket kaptunk. A maximális TC szint a referencia tartomány felső határértékének (ULN) 13-szorosa, a legmagasabb FC koncentráció pedig annak 95-szöröse volt.

Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgálva, a kortizol értékek nem normál eloszlásúak voltak. A TC és az FC értékek között szignifikáns korrelációt találtunk ($P < 0,001$) ($R=0,710$).

Az intenzív osztályra történő felvételkor mért összkortizol szint szignifikánsan magasabb volt a későbbi időpontokénál, és a 6 órás érték is emelkedett volt a későbbiekhez képest. A szabad kortizol szint emelkedése ezzel szemben csak a felvételkor volt szignifikáns a többi időponthoz viszonyítva.

4.2.2 A túlélő és a nem túlélő populációk kortizol értékeinek összehasonlítása

A túlélő (n=51) és a nem túlélő (n=18) (30 napos halálozás) csoportok összes szabad kortizol értékeit összehasonlítva, emelkedett TC értékeket figyeltünk meg a nem túlélő csoport 0, 6 és 48 órás mintáiban. Az FC értékek a felvételkor és a 6, 24 és 48 órás mintákban voltak szignifikánsan magasabbak a nem túlélő csoportban.

Mivel az intubáció és a mesterséges lélegeztetés is okozhat kortizol szint emelkedést, és összefüggésbe hozható a rossz prognózissal, ezért a lélegeztetett és mesterséges lélegeztetésre nem szoruló betegek kortizol szintjeit is összehasonlítottuk minden időpontban. A felvételkor mért TC szint (TC0) ($p=0,001$), a felvételkor mért FC szint (FC0) ($p < 0,001$) és a 6 órás FC szint (FC6) ($p=0,001$) szignifikánsan magasabb volt a lélegeztetett betegeknél. A halálozási ráta is szignifikánsan emelkedett volt abban az esetben, ha a betegnek szüksége volt mesterséges lélegeztetésre ($p < 0,001$).

4.2.3 A különböző időpontokban vett vérminták kortizol koncentrációjának prediktív szerepe a halálozás vonatkozásában

A kortizol szintek prediktív szerepét a mortalitás vonatkozásában a ma legjobbnak tartott halálozási pontrendszerhez (APACHE II, SAPS II) viszonyítva értékeltük.

Az intenzív osztályra történő felvételkor (FC0) és az azt követő 6. (FC6), 24. (FC24), 48. (FC48) és 96. órában (FC96) mért szabad kortizol értékek szignifikánsan korreláltak az APACHE II és a SAPS II score-ok által megjósolt mortalitással. A felvételkor (TC0) és az azt követő 6. órában (TC6) mért összkortizol szintek is korreláltak a mortalitási score-okkal, ez azonban a követő 24. órában (TC24) már nem volt kimutatható.

ROC analízissel vizsgáltuk a kortizol koncentrációk diagnosztikus értékét a mortalitás előrejelzésében, és meghatároztuk a kortizol optimális diagnosztikus pontossággal bíró cut-off értékét. Az FC0 és a TC0 értékek szenzitivitása magasabb, specificitása pedig alacsonyabb volt, mint a későbbi értékeké. Az APACHE II és

SAPS II mortalitások szenzitivitása és specificitása hasonló volt az FC6, FC24 és FC48 szintek diagnosztikus értékéhez.

A túlélést Kaplan-Meier görbékkel vizsgálva a legjobb szeparációt az FC0 kvartilisek esetén kaptuk, ugyanis az alsó kvartilisbe tartozó (vagyis a felvételtől a legalacsonyabb szabad kortizol szinttel rendelkező) betegek mind túléltek, míg a felsőben a betegek 60%-a nem élte túl a betegséget.

4.2.4 Össz- és szabad kortizol koncentrációk a halálozást előrejelző modellekben

Amivel a kortizol értékek prognosztikus szerepe igen jónak bizonyult, további vizsgálatokra modelleket alkottunk, melyekben a kortizol szintek mellett a nem, a kor és a ma legjobbnak tartott mortalitási score-ok (APACHE II, SAPS II) együttesen szerepeltek. A mortalitási score-ok mellett a 6, 24 és 48 órás szabad kortizol értékek bizonyultak a halálozás független prediktorának. A modellek önmagukban is magas szenzitivitással és specificitással rendelkeztek a halálozás tekintetében. Azon túl, hogy a kortizol prediktív szerepe hasonló a klinikai pontrendszerekéhez, fontos szempont, hogy a mortalitási score-ok meghatározásához 12 illetve 17 paraméterre is szükség van, míg kortizol egyetlen paraméter, tehát alkalmazása a prognózis megállapítására lényegesen egyszerűbb.

Azt, hogy az intubáció és a mesterséges lélegeztetés mennyire járul hozzá a kortizol emelkedéshez, nehéz megbecsülni. A kérdés tisztázására a lélegeztetési igényt, a mortalitási score-okat, a nemet, a kort és a kortizol szinteket bináris logisztikus regressziós modellekben vizsgáltuk. A lélegeztetési igény a halálozási pontrendszereknél is erősebb determinánsnak számít a mortalitás szempontjából, mellette azonban az FC6, az FC24 és az FC48 továbbra is a halálozás független meghatározói maradtak. Ezek az adatok megerősítik, hogy az intubálás és a lélegeztetés önmagában is, de legalább részben felelős a szignifikáns különbségért, amit a túlélő és a nem túlélő csoportok kortizol szintjei között megfigyelhetünk.

5 Megbeszélés

5.1 Új folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszer kidolgozása a kortizol meghatározására

A tömegspektrometriás mérések kivitelezésére általában triple-quadrupole tömegspektrométereket használnak, melyek előnye, hogy képesek az analitot

fragmentálni, és szignifikáns fragmentációs mintázatot biztosítani. A módszer a mennyiségi meghatározás során a keletkezett fragmensek csúcsait integrálja.

A másik lehetőség a specifikus tömegspektrometriás azonosításra a molekula pontos monoizotopikus tömegének meghatározása. Egy molekula pontos tömegét annak elemi összetétele határozza meg. Nagy tömegpontosság mellett kis tömegkülönbséget (1-2 mDa) is képesek vagyunk kimutatni két molekula között. Ennek eredményeképpen nő a specificitás, hiszen képesek vagyunk elkülöníteni a hasonló tömegű, de különböző elemi összetételű molekulákat. Méréseink során a mennyiségi meghatározáshoz 5,5 ppm széles tömegtartományt alkalmaztunk, mellyel sikeresen zártunk ki mindenféle interferenciát a hasonló tömegű, vagy koelválódó vegyületek esetén. Ez nagyon fontos szempont az immunoassay alternatív módszerének kifejlesztésekor, hiszen a tömegspektrometria legfőbb előnye az immunvizsgálatokkal szemben a nagyobb specificitás. A kezelés során alkalmazott szteroidok ugyanis gyakran keresztreakciót adnak a kortizol elleni antitestekkel.

A HPLC-MS módszer validálása során, a LOD és LOQ értékeket határoztuk meg elsőként. A LOQ értékek az FC (440 pmol/l), az SC (600 pmol/l) és a TC (12,5 nmol/l) esetén jóval a fiziológiás állapot során megfigyelhető tartomány (FC és SC: 1-8 nmol/l, TC: 100-800 nmol/l) alatt voltak; a TC értékek esetén azonban sokkal magasabbnak bizonyultak, mint a másik két esetben. Ennek oka, hogy a TC koncentrációtartománya viszonylag magas, bőven a tömegspektrometria mérési tartományán felül van, ezért nem volt szükség SPE alkalmazására a minták koncentrálásához. Ehelyett elegendő volt egy egyszerű acetonitriles fehérjeprecipitáció, mely a minta hígulásával járt.

A TC és az SC esetén a magasabb koncentrációtartományokban pozitív eltérést tapasztaltunk az immunvizsgálatokhoz képest. Feltételezzük, hogy ezt a különbséget az immunoassay során megfigyelhető keresztreakció okozza. Az általunk alkalmazott módszer általában alulbecsüli a kortizol szintet a három immunoassay eredményeihez viszonyítva; ez az eltérés kevésbé jelentős a validált klinikai Roche Modular E 170 ECLIA assay eredményeivel összehasonlítva. A mérési eredményeink ezzel a módszerrel korreláltak a legjobban.

A TC, az FC és az SC minták analízise során az általunk megállapított koncentrációtartományok hasonlóak voltak az irodalomban fellelhető értékekhez. A mintáink koncentráció átlaga azonban némileg magasabb (TC 372 nmol/L, FC 3.7 nmol/L, and SC 3.6 nmol/L) volt a korábbi vizsgálatokban megfigyelt értékeknél

(TC <300 nmol/l, FC és SC <3 nmol/l). Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a mintavételeket a reggeli órákban végeztük.

5.2 A kortizol hasznos prognosztikai marker kritikus állapotú betegekben

A prospektív, követéses vizsgálat során össz- és szabad kortizol szinteket határoztunk meg HPLC-MS módszerrel kritikus állapotú betegek szérummintáiban. Rendkívül széles kortizol koncentráció tartományt figyeltünk meg, mely a referencia tartomány felső határát (ULN) összkortizol esetében 13-szorosan, szabad kortizol esetében pedig 95-szörösen haladta meg. Mind az össz-, mind a szabad kortizol értékek emelkedettek voltak az intenzív osztályra történő felvételkor a későbbi időpontokhoz képest. A 2 napon belül mért szabad kortizol és a 6 órán belül mért összkortizol értékek jól korreláltak a halálózással. A magasabb kortizol szinttel rendelkező betegek halálózási rizikója is magasabb volt. A mesterséges lélegeztetés szükségessége részben felelős a magasabb kortizol szintért a nem túlélő csoportban. A kortizol koncentráció diagnosztikus értéke a halálózás megítélésében hasonló a rutinszerűen használt klinikai halálózási pontrendszerekéhez (APACHE II, SAPS II). Továbbá az FC6, FC24 és FC48 értékek prediktív modellekben a halálózás független determinánsainak bizonyultak még úgy is, ha a kor és nem mellett a modellekben a mortalitási score-ok is szerepeltek. A kortizol értékek, mint önálló paraméterek, a 12 illetve 17 paramétert magában foglaló komplex halálózási score-okéhoz hasonló prognosztikus értékkel rendelkeznek.

Az összkortizol koncentrációt kritikus állapotú betegekben mindössze néhány kulcsfontosságú közlemény vizsgálja. A szabad kortizol szintek méréséről még kevesebb tanulmány számol be, és alig érhető el adat az HPLC-MS technikával meghatározott szabad kortizol értékekről. Csupán egy közlemény hozzáférhető, melyben szeptikus sokkban szenvedő betegpopulációban össz- és szabad kortizol szinteket egyaránt mértek HPLC-MS/MS módszerrel. Az immunvizsgálaton alapuló kortizol méréseket számos analitikai hiba zavarhatja, különösképpen kritikus állapotú betegekben. A CBG és albumin koncentrációk változásai, az antitestek keresztreaktivitása hasonló kémiai szerkezetű anyagokkal, és a heterofil antitestek mind befolyásolják az eredményt. Ezek a hibalehetőségek az HPLC-MS technikával kiküszöbölhetőek. Az általunk kidolgozott HPLC-MS módszer alkalmas a kortizol pontos tömegazonosításon alapuló specifikus mennyiségi meghatározására különböző mátrixok esetén. Az összkortizol mérés egyszerű és pontos, ezért jelenleg

intézetünkben rutinszerűen alkalmazzák. A szabad kortizol meghatározás jóval összetettebb minta előkészítést igényel, mely a rutinban történő elterjedésének egyelőre gátat szab. Minden tényezőt figyelembe véve, a szabad kortizol szint mérése HPLC-MS technikával a legjobb módszer a stressz-válasz tanulmányozására kritikus állapotú betegekben, azonban prognosztikus célokra az HPLC-MS-sel történő összkortizol mérés sokkal elérhetőbbnek tűnik a napi gyakorlatban.

A gyakorlati következtetéseken túl az eredményeink elméleti vonatkozásai is jelentősek. A kritikus állapotra adott kortizol válasz arányosnak tűnik a betegség súlyosságával. Feltételezhető, hogy a stressz-válasz az életet veszélyeztető állapotnak megfelelően maximális. Nem tisztázott, hogy vajon a kortizol szint tovább növelhető-e ACTH stimuláció révén. A kritikus állapot kortizol homeosztázisának új elmélete alapján, az ACTH nem emelkedett, inkább szupresszált a magas kortizol szint miatt. Lehetséges, hogy az ACTH stimulációs teszt nem eredményez szignifikáns kortizol emelkedést azokban a betegekben, akiknek már eleve magas kortizol értékeik vannak. Őket tekintik relatív mellékvese elégtelenségben szenvedő betegeknek. Vitatott a megnövekedett kortizol termelés is, mivel sokan a magas kortizol szint elsődleges okának a glukokortikoidok csökkent metabolizmusát tartják. Célszerű lenne a relatív mellékvese elégtelenség (RAI) elméletét az új vizsgálatok alapján újraértékelni. A mi eredményeink nem támasztják alá a RAI létezését, és szerepét a kritikus állapotú betegek rossz prognózisában. További vizsgálatok szükségesek terápia refrakter szeptikus sokkban szenvedő betegekben, akiknél a nagy dózisú hidrokortizon kezelés ma rutin eljárás.

6 Következtetések

Összefoglalva, az általunk alkalmazott pontos tömeg meghatározáson alapuló HPLC-ESI-TOF-MS módszer valódi alternatív technikának bizonyult az elterjedt triple-quadrupole MS assay mellett. A munkánkban elért LOD és LOQ értékek jóval alacsonyabbak, mint az irodalomban fiziológiás tartományként elfogadott értékek. Fontos kiemelni, hogy egy nagy tömegpontosságú MS készülék használatával egy analitikai futtatás során tetszőleges számú további vegyület specifikus azonosítása is lehetővé válik.

Az össz- és szabad kortizol koncentráció kritikus állapotú betegekben olyan széles tartományon belül változik, hogy a legmagasabb összkortizol érték 13-szorosan, míg a legmagasabb szabad kortizol érték 95-szörösén haladja meg a

referencia tartomány felső határát. Az HPLC-MS módszerrel mért össz- és szabad kortizol szintek egyaránt hasznos prognosztikai markernek bizonyultak. A magas kortizol értékkel rendelkező betegek halálozási rizikója is magasabb volt. A szabad kortizol előnye az összkortizolhoz képest, hogy az intenzív osztályos felvételt követő első 2 napban képes előrejelezni a halálozást. A 6, 24 és 48 órás szabad kortizol értékek prognosztikus modellekben a halálozás független prediktorának bizonyultak abban az esetben is, ha a modellek tartalmazták a SAPS II és APACHE II halálozási pontrendszereket. Az intenzív ellátást igénylő állapotra adott kortizol válasz valószínűleg jól tükrözi a betegség súlyosságát.

7 Új eredmények

- 1) Munkánk során kidolgoztunk, és validáltunk egy új HPLC-MS módszert
 - a) a szérum összkortizol
 - b) a szérum szabad kortizol
 - c) és a nyál kortizol mérésére.
- 2) Az új módszer alkalmas a kortizol pontos molekula tömeg alapján történő mennyiségi meghatározására különböző mátrixokban. Az összkortizol szint mérése egyszerű, pontos és költséghatékony; ezért intézetünkben ma már rutinszerűen használt technika a kortizol koncentráció meghatározására.
- 3) A mi vizsgálatunk volt az első, melyben HPLC-MS módszerrel össz- és szabad kortizol szintek egyaránt meghatározásra kerültek kritikus állapotú betegek kevert populációjában.
- 4) Bebizonyítottuk, hogy az HPLC-MS módszerrel mért össz- és szabad kortizol értékek ismerete segítségünkre lehet a halálozás rizikójának és a betegség súlyosságának megítélésében, következésképpen mindkettő hasznos prognosztikai marker lehet kritikus állapotú betegek esetén.
- 5) Adataink alátámasztják, hogy a kortizol koncentrációk prognosztikus értéke a halálozás előrejelzésében hasonló a rutinszerűen használt klinikai halálozási pontrendszerekéhez (APACHE II és SAPS II), melyeket ma a legjobbnak tartanak a halálozási rizikó megítélésére.
- 6) Méréseink alapján az is elmondható, hogy a magasabb kortizol szinttel rendelkező kritikus állapotú betegek halálozási rizikója magasabb, és hogy a kritikus állapot különböző időpontjaiban mért kortizol koncentrációk a halálozás független prediktorainak bizonyultak.
- 7) Ezek a megfigyelések segíthetnek egy új prognosztikai biomarker bevezetésében a kritikus állapotú betegek ellátásában.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Montskó G*, **Tarjányi Z***, Mezősi E, Kovács GL: A validated method for measurement of serum total, serum free, and salivary cortisol, using high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution ESI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2333-2341

*due to their equal contribution, both authors are considered as first authors

IF: 3.659

Tarjányi Z, Montskó G, Kenyeres P, Márton Zs, Hágendorn R, Gulyás E, Nemes O, Bajnok L, Kovács GL, Mezősi E: Free and total cortisol levels are useful prognostic markers in critically ill patients: a prospective observational study.

Eur J Endocrinol 2014;171:751-759

IF: 3.686

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Nemes O, Kovács N, Czeiter E, Kenyeres P, **Tarjányi Z**, Bajnok L, Büki A, Dóczi T, Mezősi E: Predictors of post-traumatic pituitary failure during long term endocrine follow-up

Accepted for publication in Hormones

IF: 1.237

Nemes O, Csiszár A, Rucz K, Bajnok L, Bódis B, Gulyás E, **Tarjányi Z**, Nagy Zs, Dóczi T, Mezősi E: A hypophysadenomás betegek gondozásával szerzett tapasztalataink. *Magyar Belorvosi Archívum* 2011;(64)5:273-278

A dolgozat témájához kapcsolódó előadások és poszterek

Tarjányi Z, Montskó G, Mezősi E, Kovács GL: Összkortizol szint mérés LC-ESI TOF tömegspektrometriával humán szérumban. *Magyar Endokrin és Anyagcsere Társaság XXIV. Kongresszusa*, Szolnok, 2012.

Montskó G, **Tarjányi Z**, Mezősi E, Kovács GL: Vér össz-, szabad, valamint nyál kortizol hormon szintek meghatározása LC-ESI TOF tömegspektrometriával. 42. *Membrán Transzport Konferencia*, Sümeg, 2012.

Tarjányi Z, Montskó G, Mezősi E, Kovács GL: Measurement of serum total cortisol using high performance liquid chromatography coupled ESI-TOF mass spectrometry. *From Medicine to Bionics, 1st European PhD Conference*, Budapest, 2013.

Tarjányi Z, Montskó G, Mezősi E, Kovács GL: Measurement of serum total cortisol using HPLC coupled ESI-TOF mass spectrometry. *16th European Congress of Endocrinology*, Wrocław, 2014.

Tarjányi Z, Montskó G, Kenyeres P, Márton Zs, Hágendorn R, Gulyás E, Nemes O, Bajnok L, Kovács GL, Mezősi E: A kortizol hasznos prognosztikai marker kritikus állapotú betegekben. *Magyar Endokrin és Anyagcsere Társaság XXV. Kongresszusa*, Pécs, 2014.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt, szeretném kifejezni hálámat mentoromnak, Dr. Mezősi Emesének, a PhD tanulmányaim során nyújtott nélkülözhetetlen támogatásáért és bátorításáért. Az általa teremtett tökéletes atmoszféra biztosította mindvégig a zavartalan tanulást és munkát, melyet ez idő alatt végeztem. Felbecsülhetetlen tanácsaiért mind a tudományos mind a magánélet területén örökké hálás leszek.

Köszönettel tartozom programvezetőmnek, Kovács L. Gábor Professor Úrnak, aki mindvégig támogatta a kutatásomat.

Szeretném megköszönni a sikeres közös munkát és a korlátlan segítséget Dr. Montskó Gergelynek, aki megismertette velem a tömegspektromtetriát, és elősegítette egy teljesen új módszer alkalmazását a tudományos munkámban.

Köszönöm a folyamatos útmutatást és támogatást Bajnok László Professor Úrnak, aki segített a klinikai vizsgálatok kivitelezésében és értelmezésében.

Szeretnék köszönetet mondani közvetlen kollégáimnak, Dr. Nemes Orsolyának, Dr. Bódis Beátának, Dr. Rucz Károlynak és Dr. Keszthelyi Zsuzsannának. Köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájának és a Laboratóriumi Medicina Intézetének Ph.D. hallgatóit, nővéreit és asszisztenseit is, akik segítették a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak az éveken át tartó türelmet és támogatást.