

Állatorvostudományi Egyetem
Kórélettani és Onkológiai Tanszék



A mieloperoxidáz hiány vizsgálata kutyákban
ADVIA 2120i hematológiai automatával

Study of myeloperoxidase deficiency in dogs
with ADVIA 2120i hematology analyzer

Készítette: **Szegedy-Maszák Flóra**

Témavezető: **Szabó Bernadett, Msc**

Kórélettani és Onkológiai Tanszék
tanszéki mérnök

Budapest, 2023

Absztrakt

A neutrofil granulociták kulcsszerepet töltenek be a kórokozók elleni védekezésben. A mieloperoxidáz a neutrofilek azurofil granulumaiban tárolt enzim, amely többek között a kórokozók elpusztításában vesz részt. Kutyaik esetében egyes patológiás folyamatok során a neutrofil granulociták a normálisnál kevesebb mieloperoxidázt tartalmaznak.

Az ADVIA 2120i hematológiai automata peroxidáz festési eljárás során különíti el a fehérvérsejteket, mieloperoxidáz deficiencia esetén a neutrofil granulocitákat nem megfelelő frakcióba sorolja.

Munkánk során olyan vérmintákat vizsgáltunk, melyek mieloperoxidáz hiányos neutrofil granulocitákat tartalmaztak. A vizsgálatra kiválasztott minták esetén a hematológiai eredmények és a kenetelemzés között minimum 10 %-os eltérés volt, illetve a monocita arány minimum 17% volt. A deficiens egyedekből származó minták eredményeit egészséges negatív kontroll, és mieloperoxidáz deficienciát nem mutató akut gyulladással állatokból származó mintákkal hasonlítottuk össze.

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen módszerekkel lehet a deficiens neutrofil granulocitákat hatékonyabban azonosítani.

Az eredmények alapján a manuális kenetelemzésen kívül, az ADVIA 2120i hematológiai automata macskákra fejlesztett beállításain hatékonyan azonosíthatóak a deficiens sejtek. A nem peroxidáz festési eljárást alkalmazó Sysmex XT-2000i hematológiai automatával szintén pontosabb eredmények kaphatóak, bár ezzel a módszerrel a mieloperoxidáz deficiencia nem detektálható.

Az MPXI értékek vizsgálata alapján ez a paraméter sem a mieloperoxidáz deficiencia megítélésére, sem gyulladással markerként nem alkalmazható.

Abstract

Neutrophil granulocytes play a key role in the defence against pathogens. Myeloperoxidase is an enzyme stored in the azurophilic granules of neutrophils that plays a role in the destruction of pathogens. In dogs, during certain pathological processes, neutrophil granulocytes contain less myeloperoxidase than normal.

ADVIA 2120i hematology analyzer differentiates white blood cells with peroxidase staining, misclassifying some of the neutrophil granulocytes into the inappropriate fraction in case of myeloperoxidase deficiency.

In our thesis study, we examined blood samples containing myeloperoxidase deficient neutrophil granulocytes. The samples selected for testing, there was a minimum of 10% difference between the hematological results and the blood smear analysis and a minimum monocyte ratio of 17%. The results of samples from deficient individuals were compared with those from healthy negative controls and animals with acute inflammation without myeloperoxidase deficiency.

Our aim was to investigate methods to more effectively identify deficient neutrophil granulocytes.

The results suggest that, besides manual blood smear analysis, these cells can be effectively identified on the ADVIA 2120i hematology analyzer's setup developed for cats. More accurate results can also be obtained with the Sysmex XT-2000i hematology analyzer that is not using a peroxidase but nucleotide staining method, however myeloperoxidase deficiency cannot be detected with this method. Examination of MPXI values suggests that this parameter is neither a useful tool for assessing myeloperoxidase deficiency nor a marker of inflammation.

Tartalom

Absztrakt.....	1
Abstract.....	2
Tartalom	3
Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	5
Szakirodalmi áttekintés.....	6
A neutrofil granulociták.....	6
A neutrofil granulociták általános jellemzői	6
A granulocytopenia és a neutrofil granulociták funkciója	6
Neutrofil granulociták toxikus változásai.....	9
Mieloperoxidáz enzim	11
Történeti áttekintés	11
A mieloperoxidáz enzim általános jellemzői	12
Mieloperoxidáz funkciói.....	13
Mieloperoxidáz, mint biomarker	14
A mieloperoxidáz kimutatása	16
Anyag és módszer.....	27
Eredmények	31
Betegpopuláció elemzése	31
Mieloperoxidáz deficiencia megjelenése ADVIA 2120i automatával végzett hematológiai vizsgálatokban	34
Mieloperoxidáz deficiencia elemzési lehetőségei Advia 2120i automatával.....	37
A BASO csatorna alkalmazhatóságának vizsgálata	37
Macska állatfajhoz kapcsolódó kapuzás alkalmazhatóságának vizsgálata.....	38
Mieloperoxidáz hiányt mutató minták összehasonlító vizsgálata ADVIA 2120i és Sysmex XT2000i automatákon	40
Az átlagos mieloperoxidáz index (MPXI) informatikai értéke	41
A mieloperoxidáz szintjének változása a neutrofil granulocitákban.....	41
Az MPXI és a CRP kapcsolata.....	43
Következtetések.....	44
Összefoglalás	49
Köszönetnyilvánítás	50
Irodalom jegyzék	51

Rövidítések jegyzéke

AKI Acute kidney injury - Akut vese károsodás
ANCA Antineutrophilic cytoplasmic antibody - Anti-neutrofil citoplazmatikus antitest
ARDS Acute respiratory distress syndrome - Akut respirációs distressz szindróma
CPV Canine parvo virus - Kutya parvo vírus
DER Dúrva felszínű endoplazmatikus retikulum
DIC Disszeminált intravaszkuláris koagulopátia
DNS dezoxiribonukleinsav
EGPA Eozinofil sejtes granulomatosis polyangiitissel
G-CSF Granulocita-kolónia stimuláló faktor
GPA Granulomatosis polyangiitissel
HCK Hematopoietic Cell Kinase - Hematopoietikus Sejt Kináz
IBD Inflammatory Bowel Disease - Gyulladásos bélbetegség
IFN γ Interferon gamma
IMHA Immun mediált hemolitikus anaemia
LDL Alacsony sűrűségű lipoprotein
LUC Large Unstained Cells - Nagy méretű nem festődő sejtek
MPA Mikroszkópikus polyangiitis
MPO Myeloperoxidase - mieloperoxidáz
MPO-ANCA Anti-Myeloperoxidase Antineutrophilic cytoplasmic Antibody
MPXI Mean peroxidase index - átlagos peroxidáz aktivitási index
NET Neutrofil extracelluláris csapda
ORR Opsonin recognition receptor - opsonin felismerő receptor
PAMP Patogén molekuláris mintázat
PMN Polymorphonuclear Cells - polimorfonukleáris sejtek
PR3-ANCA Anti-Proteinase 3 Antineutrophilic cytoplasmic Antibody
PRR Pattern recognition receptor - mintázat felismerő receptor
RNS ribonukleinsav
SIRS Systemic Inflammatory Response Syndrome - szisztémás gyulladásos válasz szindróma
SLE Szisztémás lupus erithematosus
TLR Toll-Like Receptor
TNF Tumor nekrosis faktor

Bevezetés

A neutrofil granulociták fontos szerepet töltenek be a szervezet kórokozók elleni védekezési mechanizmusában. Intracelluláris granulumaik különféle enzimeket tartalmaznak, melyek résztvesznek az immunválasz egyes mechanizmusában. Az egyik ilyen enzim a mieloperoxidáz, mely a neutrofilek azurofil granulumaiban található meg. Az ADVIA-2120i hematológiai automata a fehérvérsejtek közötti differenciáció során a mieloperoxidáz festődés alapján különíti el az egyes sejttípusokat. Kuttyák esetében gyakran találkozunk azzal a jelenséggel, hogy az automata és a manuális kenet elemzés során kapott értékek a fehérvérsejtek eloszlását illetően nagy mértékben különböznek. Ez a jelenség annak tulajdonítható, hogy a mieloperoxidáz deficiens neutrofil granulociták festődése eltér a normálistól, emiatt az automata ezeket a sejteket más frakcióba sorolja, mint ahová ténylegesen tartoznak. A deficienciát mutató neutrofilek ilyenkor általában vagy a monocita frakcióba számlálódhatnak, vagy a nem festődő sejtek (LUC) közé kerülnek. Az automata a mieloperoxidáz festődés mértékét az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) számolt paraméterrel fejezi ki. A mieloperoxidáz hiány esetén ez az érték általában fals magas, de vannak olyan esetek is, amikor alacsonyabb a normálisnál. A mieloperoxidáz hiánynak alapvetően két típusa ismert. Az egyik a genetikai defektus miatt kialakuló örökletes forma, mely során a sejtek sosem tartalmaznak normális mennyiségű enzimet. A másik és gyakoribb típus az ideiglenes mieloperoxidáz deficiencia, amikor a szervezetben éppen zajló gyulladásos folyamat miatt, a sejtekből nagy mennyiségben kerül ki vagy használódik fel az enzim és emiatt jelentkezik egy ideiglenes, relatív mieloperoxidáz hiány.

Jelen szakdolgozat célja az, hogy megvizsgáljuk a kuttyákban milyen kórformák esetén fordul elő a neutrofil granulociták mieloperoxidáz hiánya, illetve, hogy az egyes betegségek patomechanizmusa hogyan magyarázza ezt a jelenséget. Fontos kérdés, hogy a laboratóriumi diagnosztika során milyen más módszerrel lehet az ADVIA 2120i hematológiai automata által nem megfelelően differenciált deficiens neutrofil granulociták mennyiségét pontosabban meghatározni.

Kutyában gyulladásos folyamatok esetén a leggyakrabban a gyulladás súlyosságának vizsgálatára használt akut fázis fehérje a cCRP. Munkánk során azt is vizsgáltuk, hogy akut gyulladásos problémák esetén az MPXI mint marker használható-e a gyulladásos folyamat súlyosságának megítéléséhez. Illetve, hogy az MPXI alkalmas-e a mieloperoxidáz deficiencia detektálására.

Szakirodalmi áttekintés

A neutrofil granulociták

A neutrofil granulociták általános jellemzői

A neutrofil granulociták, a polimorfonukleáris leukocitákon belül (PMN) a különféle emlős állatfajok és az ember legnagyobb mennyiségben előforduló fehérvérsejtjei. Élettani esetben előfordulásuk aránya a perifériás vénás vérben, a fehérvérsejtek között nagy variációt mutat fajok (és alfajaik) között, de általánosan elmondható, hogy a „neutrofilekben gazdag” véré fajok (így az ember, az emberszabásúak, a kérődzők, a lófélék, a sertésfélék és a húsevők, stb.) esetében 60 - 80% közötti (a limfocitákhoz viszonyított arányuk (neutrophil to lymphocyte ratio (N:L) nagyobb mint 1.5 - 2). A „limfocita gazdag - neutrofilekben szegény” véré állatokban (például patkányok, egerek), a neutrofil granulociták aránya csak 10 - 20%. [1]

A neutrofil granulocita sejtek átlagos átmérője 12 - 15 mikrométer széles. Karakteres denz sejtmagjuk van, mely 2 - 5 lebenyéből épülhet fel, citoplazmájuk halvány színű, gyengén festődik. Elsődleges és másodlagos (specifikus) granulomokat tartalmaznak, melyek lizoszómális eredetűek. Az elsődleges granulomok mieloperoxidázt (MPO) és egyéb sav-hidroxiláz enzimeket (defenzin, katepszin), míg a másodlagos granulomok laktoferrin, lizozimot és egyéb enzimeket tartalmaznak (teljesség igénye nélkül, elasztáz, kollagenáz, alkalikus foszfatáz). Ezen granulomok összeolvadhatnak többféle intracelluláris membránnal, vagy a plazmamembránnal, mely folyamat során jelzőmolekulákat és antimikrobiális fehérjéket juttatva a fagoszómákba, vagy a szövetek közötti térbe.

A granulocytopenia és a neutrofil granulociták funkciója

A neutrofil granulociták képződése (*granulocytopenia*) a csontvelőben zajlik. Itt az első már felismerhető neutrofil granulocita progenitor sejtalak a myeloblaszt. Ezen sejtek az egészséges csontvelő sejtjeinek kb. 5%-át teszik ki. Nagy méretű finom kromatin állományú sejtmaggal rendelkeznek, átlagosan 2 – 5 sejtmagvacska (*nucleolus*) található sejtmagjukon belül, a citoplazmájuk bazofil festődésű és granulomokat még nem tartalmaz. A myeloblasztokból képződnek a promielociták, melyek kissé már nagyobb méretűek, sejtmagjuk szinte változatlan marad és megjelennek bennük az elsődleges granulomok. Később ezen sejtekből alakulnak ki a mielociták, melyek sejtmagjában a kromatin állomány kondenzáltabb, illetve a sejtmagvacskáik már nem felismerhetők, továbbá megjelennek

bennük a másodlagos (vagy specifikus) granulomok. A mielociták már osztódásra képtelen metamielocitává differenciálódnak, melyek sejtmagja jellegzetes patkó alakú. További maturáció során „éretlen” neutrofil granulocitává válnak (ismertebb nevén „band” vagy „stab” változat), ezen sejthalakok még nem tartalmazzák az érett sejthalakokra jellemző filamentumszerű kapcsolatot a sejtmag szegmentumok között [2]. Élettani körülmények között az éretlen sejthalakok igen kis számban vannak jelen a perifériás vérben, viszont bizonyos kórélettani folyamatok (pl. különféle bakteriális infekciók akut fázisa) esetén nagyobb arányban jelennek meg a perifériás vérben, ahogy ez a balra tolódás, „left shift” jelenség esetén megfigyelhető [3]. Az elsődleges és másodlagos granulomok és a bennük lévő anyagok szintézise (*granulopoiesis*) csak a csontvelőben zajlik, a még éretlen vagy a már érett, a perifériás vérbe kerülő neutrofil granulocitákban ez a folyamat már nem indul újra [4]. A neutrofilek tehát a maturációs folyamat befejeződése után a csontvelőből a véráramba kerülnek, ahol a gazdaszervezet keringésében keresik az esetleges kórokozókat. A keringésből kemokin grádienseket követve a szövetek közé jutnak a fertőzés vagy szövetszétesés helyszínére, kihasználva a vérér fal permeabilitásának megváltozását a gyulladásos folyamat során. Amennyiben a neutrofilek aktiváció nélkül előregednek, szintén kilépnek a keringésből és apoptózison mennek keresztül. A keletkezett sejtörmelék a makrofágok fagocitálják és szállítják el. Amennyiben fertőző ágensek, vagy szöveti károsodás jelei aktiválják a sejteket, az átlagos élettartamuk, (mely egyes források szerint 6 - 10 óra a perifériás vérben, más források szerint 2 nap is lehet) jelentősen meghosszabbodik [5]. A fertőző ágensek elpusztítását alapvetően három mechanizmuson keresztül hajtják végre. Amennyiben lehetséges, a patogén ágens fagocitózisa történik, mely során a neutrofil granulocita a kórokozót a sejten belül pusztítja el a fagoszómákban. Ha a kórokozó túl nagy a fagocitózishoz, akkor a neutrofilek degranulálódnak, ekkor az antimikrobiális fehérjék a szövetközi térbe jutnak, és ott segítenek a kórokozó elpusztításában. A kiszabadult enzimeket, az azok működése során képződött anyagokat és a szétesett kórokozót ezután szintén a makrofágok szállítják el. A neutrofil granulociták több, a funkciójukat érdemben befolyásoló sejtfelszíni receptort fejeznek ki sejtfelszínükön, mint az ORR („opsonin recognition receptor”), a PRR („patter recognition receptor”), TLRs (Toll-like receptorok) [6], és egyéb a G-proteinhez kapcsolt kemokin és kemoattraktáns receptorokat, továbbá *Fc* receptorokat; szelektin, szelektin ligand és integrin receptorok, illetve egyéb változatos citokin receptorok is találhatóak rajtuk [7]. A neutrofil granulociták nemcsak antimikrobiális fehérjéket termelnek, hanem különböző a gyulladásos válaszreakciókat serkentő vagy gátló citokineket és kemokineket is. Így a perifériás vérben igen kis mennyiségben $IFN\gamma$ -t juttat,

mely termelését stimulálja különféle patogének (bakteriális LPS burkának) jelenléte és az IL-12, IL-15, IL-18 jel. Egyes paraziták jelenléte esetén bármilyen más mieloid sejt képes a Tumor Necrosis Factor (TNF) termelésére is. Továbbá a patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) felismerése után az IL-4 és IL-10 termelése jelentős [8]. Az IL-4, túlexpresszió gyengítheti a szervezet reakcióját egyes parazitás (pl. *Leishmaniosis*) és *Mycobacterium tuberculosis*) fertőzések akut szakaszában. Az IL-10 makrofág deaktiváló hatású, továbbá bizonyos fajoknál (pl. egér esetében) szepszisben a plazmaszintje emelkedik [9]. Ezen folyamatok segítségével részt vesznek a gyulladásos reakciók irányításában is. A fent említett két fertőzésellenes mechanizmus mellett a neutrofil granulociták képesek egy speciális programozott sejthalál során is segíteni a kórokozók elpusztítását. Ez a mechanizmus a neutrofil extracelluláris csapdák („neutrophil extracellular trap”-ek (NET-ek)) létrehozása. Ilyenkor a granulomokban található különféle fehérjéket és kromatin állományukat a sejtek az extracelluláris térbe juttatják. A granuláris fehérjék és a kromatin anyagai egy hálószerű struktúrát képeznek, ami a kórokozók visszatartását és a fertőzés terjedésének megelőzését segíti mind kémiai, mind mechanikus barrierként. Az extracelluláris térbe jutott mieloperoxidáz enzimet a ceruloplazmin inaktíválja [10].

Az intra-, vagy extravascularis térbe kikerült, a neutrofil granulocitákból származó citoplazma alkotók ellen kóros esetben ellenanyag termelődhet (ú.n. „anti-neutrophil cytoplasmatic antibody” vagy ANCA). Az emberi szervezetben tartósan fenn is tud maradni ezen autoellenanyagok termelése (és plazmaszintje), például leukocita proteináz 3 enzim (PR3-ANCA) és mieloperoxidáz (MPO-ANCA) ellen. Az ANCA ellenanyag komplexek önállóan, valamint ismételt granulocita és komplement aktiváció lévén különféle immunmediált vérérgyulladással járó kórképeket tudnak kialakítani (ANCA associated vasculitis). Három főbb altípus ismert, a granulomatosis poliangitisszel (GPA, korábbi nomenklátúra szerint Wegener granulomatosis), a mikroszkopikus poliangitisz (MPA) és az eozinofil granulomatosis poliangitisszel (EGPA, Churg-Strauss szindróma). Kórlefyomás változatos, az enyhétől az életet veszélyeztetőig [11].

Kutyákban is leírták az anti-neutrofil citoplazma ellenanyagot (ANCA). Meglétüket korábban elsősorban különféle gyulladásos bélbetegségekkel (IBD altípusokkal) hozták összefüggésbe [12].

Egy 2018-ban publikált tanulmányban azt vizsgálták kutyákban, hogy IBD-n kívül más immun-mediált gyulladásos betegségekben is kimutatható-e ANCA a kutatásban résztvevő kutyák véréből. Az immunmediált betegségben szenvedő kutyák véréből szignifikánsan nagyobb arányban volt kimutatható ANCA, mint a kontroll csoportnak használt beagle

kutyákéból, viszont a kontroll csoport több mint negyedében is kimutatható volt az ANCA (pl. egyszerű bakteriális fertőzések után). Arra a következtetésre jutottak, hogy kutyában az ANCA jelenléte a vérben szinte bármilyen a neutrofil granulociták aktivációjával és szöveti infiltrációval járó kórképben előfordulhat, nemcsak immunmediált kórformák esetén [13]. Az állatorvosi irodalomban kevés esetleírás található még a magas számú ANCA szeropozitivitás ellenére is súlyos vérérgyulladással járó kórfomákról. Az első esetleírás Wegener granulomatosis (GPA) jellegű betegségről 2015-ben jelent meg egy anatóliai juhászkutya eróziós orrgyulladására kapcsán [14].

Összességében tehát, a neutrofil granulociták nemcsak a kórokozók közvetlen elpusztításában, de az azok ellen kialakult direkt és indirekt immunválasz inicializálásában és irányításában is részt vesznek, illetve képesek a kórokozók terjedését is gátolni.

Neutrofil granulociták toxikus változásai

A szervezetben lezajló gyulladás során a perifériás vérben gyakran jelennek meg a neutrofil granulociták rendellenes, toxikus alakjai. Ez a jelenség nem feltétlenül jár együtt toxaemiával, a kifejezés onnan ered, hogy ezeket a sejthalakokat először gram negatív baktériumok által okozott szepszisben és következetes endotoxaemiában figyelték meg. A neutrofilek toxikus változásai nem a baktériumok neutrofilekre gyakorolt toxikus hatását tükrözik, hanem olyan, az érésük során fennálló különféle patológiás körülmények között keletkező morfológiai rendellenességeket, amelyek intenzíven stimulálják a neutrofilek termelését és lerövidítik az érési időt a csontvelőben. Ez a felgyorsult érési folyamat másodlagosan a citokin stimuláció hatására következik be, ami általában a gyulladásra adott válaszreakció, de előfordulhat egyes patológiás immunreakciók esetén is. A csontvelő nem fertőző eredetű károsodása esetén vagy a kísérletesen adott vérképző citokinek (granulocitakolónia stimuláló faktor vagy G-CSF) hatására szintén megfigyelhetőek a neutrofil granulociták toxikus változásai. A legtöbb toxikus változás a sejtmag és a citoplazma közötti maturációs asszinkronitásból ered. A normális granulocitopoezis során a sejtmag megnyúlása és a kromatin fokozatos kondenzációja, illetve a citoplazma fehérje szintetizáló rendszerének (a riboszómák, a DER formájában lévő RNS) elvesztésével összhangban történik. Gyorsított maturáció esetén a sejtmag osztódása nem fejeződik be, ami miatt a sejtek megtartják egyes éretlen tulajdonságaikat. Ezek a sejtek általában nagyobb méretűek, bennük nagyobb mennyiségben találhatóak meg a riboszómák és a durva felszínű endoplazmatikus retikulum, a normálisnál világosabb kromatin állománnyal rendelkeznek. A specifikus granulumok kevésbé láthatóak, egyes esetekben a primer granulumok (amelyek

normál érési folyamaton átesett sejtekben nem láthatóak) megőrzik affinitásukat a perifériás vérből készült kenet vizsgálatára alkalmazott festékekkel szemben. A sejtek így habos, vagy vakuolizált citoplazmával is rendelkezhetnek.

A vérkenetben a toxikus elváltozásoknak öt típusa jelenhet meg a neutrofil granulociták esetében. Az első megjelenési forma citoplazmatikus bazofília, amikor a citoplazma csíkos, diffúz szabálytalan kék színnel festődik. Ez a poliriboszómák és a durva felszínű endoplazmatikus retikulum jelenlétének köszönhető.

A második jellegzetes elváltozás a Döhle-testek megjelenése, melyek halvány kerek vagy lineáris kék aggregátumok a citoplazmában. Ezt az endoplazmatikus retikulum festődése okozza. Gyakran a Döhle-testek megjelenése az első jele a toxikus változásoknak, ugyanakkor macskában kis számban egészséges esetben is megjelenhetnek a perifériás vérben. Hosszabban tárolt vérminta esetében pedig a tárolás során is kialakulhatnak a neutrofil granulocitákban. Önmagukban tehát a Döhle-testek nem feltétlenül utalnak toxikus elváltozásra.

A citoplazma néhány esetben lehet habos megjelenésű, ez a lizoszómák degranulációjának köszönhető, melyek a citoplazmában homályos vakuolumokat alkotnak. Ezt a jelenséget citoplazmatikus vakuolizációnak nevezzük. Ezek a vakuolumok a vérvételtől számított 4. órában már megjelenhetnek a mintában, így ez a jelenség sem jelent önmagában toxikus elváltozást.

A sejtmag kromatin állománya általában világosabb a toxikus sejtalakokban, ezt az elváltozást nehéz megítélni a vizsgálatok során.

A toxikus granuláció során vörös szemcsék jelennek meg a citoplazmában, kutyák esetében ez az elváltozás ritka, inkább kérődzők és lovak esetében fordul elő.

Mivel a toxikus neutrofil sejtalakok megjelenése általában gyulladással jelez, ezen minták esetében gyakran balra tolódást láthatunk a vérképben. Néhány esetben előfordulhat a balra tolódás toxikus neutrofilek megjelenése nélkül is (pl.: IMHA kutyában), de ez a jelenség fordítva is igaz, toxikus változás is előfordulhat balra tolódás nélkül. Utóbbi esetben a jelenséget nem gyulladás okozza, hanem a csontvelő egyéb működési rendellenessége, vagy tárolási probléma állhat aháttérben, esetleg kóros immunreakció. A gyulladás esetében a toxikus elváltozások mértéke kiindulópont lehet annak megállapítására, hogy mennyire súlyos szisztémás probléma áll fenn, ez pedig prognosztikai faktorként alkalmazható a súlyosan beteg állatok esetében.

A toxikus változások értékelésénél figyelembe kell venni a minta állapotát is. Hosszú tárolás, főleg magasabb hőmérsékleten elősegíti, hogy az egészséges vérmintában a toxikus alakok

kialakuljanak [15]. A neutrofil granulocitákban végbemenő morfológiai változások az automata hematológiai analízist nagy mértékben befolyásolják.

Mieloperoxidáz enzim

Történeti áttekintés

A mieloperoxidáz enzimet neutrofil granulocytákból először Agner izolálta 1941-ben és a gennyés váladék élénk zöld színe miatt verdoperoxidáznak nevezte el, csak később kapta a myeloperoxidáz megnevezést.

1920-ban Graham írta le először a neutrofil granulociták peroxidáz enzim leadásának mechanizmusát. Aktív *Gonorrhoea* fertőzött kenetben peroxidáz festéssel jelölte meg a sejtekben a granulomokat, amik egy idő után teljesen eltűntek, és nem maradt aktívan festődő neutrofil granulocita a kenetben.

1960-ban Hirsch és Cohn írták le a degranuláció folyamatát a fagocitákban, ekkor született meg az elképzelés, mely szerint a fagoszómákban lévő anyagok toxikusak a bekebelezett organizmusok számára. 1970-ben publikálták, hogy a mieloperoxidáz az egyike azon enzimeknek, melyek ezekben a granulomokban a toxicitásért felelősek. Amennyiben a mikroorganizmus túl nagy és a fagocitózis nem megvalósítható, a mieloperoxidáz az extracelluláris térbe is kijut, hogy ott segítse a kórokozó elpusztítását. A mieloperoxidáz mivel erősen bázikus, így a savas kémhatással rendelkező felületekhez erősen kötődik, emiatt az extracelluláris térbe jutva a mikroorganizmusok felületéhez kötődik és részt vesz annak elpusztításában. A kijutott mieloperoxidáz ezután vagy inaktiválódik a „respiratory burst” folyamata során felszabaduló egyéb anyagok által, vagy a makrofágok veszik fel és szállítják el a reakció helyéről [16].

1961-ben leírták, hogy a „respiratory burst” folyamata során hidrogén-peroxid keletkezik, és ennek szerepe van az antimikrobiális tevékenységben [17]. Ekkor kezdték el kutatni a mieloperoxidáz-hidrogén-peroxid (MPO-H₂O₂) rendszer működését, és szerepét a kórokozók elleni védekezésben. 1967-ben született meg a publikáció mely szerint, az MPO-H₂O₂ rendszer jodidion jelenlétében, *Eserichia Coli* baktériumot tartalmazó táptalajon erős antimikrobiális hatású rendszerként működik a neutrofil granulocitákban [18]. A jodidionon kívül a rendszer bromidion, illetve tiocianát ion felhasználásával is hasonlóan hatékonynak bizonyult, de azt találták, hogy az élő szervezetben leginkább a kloridionnal való reakció fordul elő [19]. Ekkor hipoklórossav keletkezik, és ez felelős a kialakuló antimikrobiális hatásért.

Az MPO-H₂O₂-halidion rendszer működése közvetlen kapcsolatban áll a NADPH-oxidáz működésével. Amikor az opszonizált baktérium bekerül a fagoszómába, a NADPH-oxidáz aktiválódik és megtörténik a degranuláció, melynek során reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkeznek [16]. Ezek közé tartozik a hidrogén-peroxidból származó reaktív oxigén gyök is, ami majd felhasználásra kerül az MPO-H₂O₂-kloridion rendszer működésekor.

A mieloperoxidáz enzim általános jellemzői

A neutrofil granulociták enzimkészletének fontos része a mieloperoxidáz enzim. A mieloperoxidáz (MPO) egy antimikrobiális fehérje, amely legnagyobb mennyiségben a neutrofil granulocitákban, kisebb mennyiségben a monocitákban, illetve a szöveti makrofágokban fordul elő. Rendszertanilag a hem-peroxidáz-ciklooxygenáz szupercsalád tagja. Ezen hem-peroxidáz enzimcsaládba tartoznak többek között a myeloperoxidáz enzimeken kívül, az eozinofil peroxidáz, a thyroid peroxidáz, a nyál („salivary”) peroxidáz, a laktoperoxidáz az ovoperoxidáz, a peroxidazin, a peroxinectin és a ciklooxygenáz enzimek is, melyek kis számú aminosav eltéréssel sokféle szerteágazó funkciót látnak el [20]. Filogenetikailag 60 mieloperoxidáz típus 16 alcsaládba lett sorolva [21]. Emberben a 17-es kromoszómán kódolt, a gén kifejeződése csakis a csontvelőre korlátozódik; a fehérje mérete 150 kDa, két nehéz láncból, két könnyű láncból, illetve két vas atomból épül fel [22]. A fagocita sejtekben található mieloperoxidáz a természetes immunitásban játszik szerepet.

A mieloperoxidáz szintézis a neutrofilek fejlődésének promyelocita stádiumában kezdődik el és a myelocita stádiumban fejeződik be. A mieloperoxidáz szintézis elsődleges transzlációs terméke egy inaktív enzim, amely kotranszlációs n-glikoziláción és hem beépítésen megy keresztül és így alakul ki az enzimatikusan aktív proMPO [23]. Miután a folyamat lezajlott az azurofil granulomokban, a mieloperoxidáz tartalmú granulomok a leánysejtekbe kerülnek, ahol betöltik funkciójukat. A monociták esetében a promonocita állapotban nagyobb mennyiségben van jelen a sejtekben a mieloperoxidáz, de később az érett monocitákban már csak kis mennyiség található meg, a szövetekben jelen lévő makrofág stádiumban pedig már nem mutatnak mieloperoxidáz aktivitást a sejtek.

A neutrofil granulociták azurofil granulumaiban lévő enzimek hierarchikus rendszer szerint szabadulnak ki a sejtekből. A sorrend a különböző jelátviteli utak aktivációjától függ. A sejtfelszíni kemotaktikus, fagocita receptorok, vagy az intracelluláris TLR9 receptor ligációja kalcium és HCK-függő jelátviteli utakat aktivál, Rac-2-mediált aktin- és mikrotubulus reorganizációt vált ki, amely során az azurofil granulomokat a plazmamembránba vagy a fagoszómába szállítják és a célmembránhoz kötik. Ezután a

granulumok membránja és a célmembrán fúziója következik, mely során a granulumokban tárolt anyagok a fagoszómába, vagy az extracelluláris térbe jutnak. A proMPO a granulumok aktivációjakor alakul át érett MPO-vá, ez egy homodimer, melyet két glikolizált protomer alkot, melyek tartalmaznak egy nehéz és egy könnyű láncot, illetve egy hem csoportot. A két hemi-MPO-nak nevezett alegység funkcionálisan független egymástól. Esetenként néhány proMPO a granuloma aktiváció ellenére nem alakul át érett mieloperoxidázzá, ekkor a proMPO monomerkét szekretálódik az extracelluláris térbe [23].

Mieloperoxidáz funkciói

A mieloperoxidáz az azurofil granulumokból kijutva a MPO-hidrogén-peroxid-klorid rendszer részeként játszik szerepet a kórokozók elleni védekezésben. A fehérvérsejtek aktivációja növeli a mieloperoxidáz szintézist a csontvelőben. A „respiratory burst” folyamata során a mieloperoxidáz hidrogén-peroxiddal és egy halogénnel való reakciójában halogénessav keletkezik, mely erős antimikrobiális hatással rendelkezik, lokálisan az erősen alkalikus milió kialakulását biztosítja. Az emberi és (magasabb rendű) állati szervezetben ez a halogén leggyakrabban a klór, amely reakció eredményeképp hipoklórossav keletkezik. Ennek a rendszernek köszönhetően a neutrofil granulociták képesek elpusztítani a kórokozókat. Emellett az mieloperoxidáz növeli a neutrofil granulociták felszíni integrin (CD11b) expresszióját, ami segíti az érfalhoz való kitapadást, ezzel növelve az extravazációt, majd a szövetek közé lépés mértékét [24]. Emellett szintén az extravazációt segíti, hogy az MPO az erek falának endotheljére is hatással van, a mieloperoxidáz hatására az érfal elvékonyodik, így a sejtek könnyebben jutnak át rajta.

A nem aktivált neutrofil granulociták az MPO-val bevont felületekhez tapadnak. Szabadon az érrendszerben keringő MPO és béta-2 integrin CD11b-hez kötődik és így modulálja az intracelluláris kalcium szinteket és a citoszkeleton szerveződését. In vitro kísérletek során a mieloperoxidáz nagy mértékben irányított neutrofil motilitást váltott ki. A mieloperoxidáz tehát szerepet játszik a gyulladás során a neutrofil granulociták érpályán kívülre irányuló migrációjában is [23].

A mieloperoxidáz rendszer célpontjai lehetnek vírusok, baktériumok, gombák, protozoák és egyéb paraziták, de részt vesz a tumorsejtek és egyéb károsodott saját testi sejtek elleni védekezésben is, továbbá a lerakódott immunkomplexek elminációjában is fontos szerepe van.

A vérből a gyulladt szövetbe jutó aktivált neutrofil granulociták a kórokozó elleni küzdelem során a túlélésüket elősegítő jeleket kapnak, melyek az programozott apoptózist késleltetik.

A mieloperoxidáz kötődése a neutrofil granulocitákhoz, késlelteti az apoptózist, ezzel meghosszabbítja a neutrofilek élettartamát, így ezek a sejtek hosszabban lesznek jelen a keringésben is. Ezzel a mechanizmussal a mieloperoxidáz szintén hozzájárul a szisztémás gyulladáshoz hosszabb ideig való fennmaradásához [23].

A mieloperoxidáz, ezen kívül szerepet játszik a neutrofil extracelluláris csapdák képződésének folyamatában is, ezzel szintén hozzájárulva a kórokozók elleni védekezéshez. Az exogén MPO adagolása azonban nem bizonyult hatékonynak a NET-ek képződéséhez, ebből következik, hogy ehhez a folyamathoz MPO-transzlokációra van szükség a megfelelő szubcelluláris kompartmentbe [23].

Mieloperoxidáz, mint biomarker

Ma már a humán gyógyászatban nem csak az MPO szerepét vizsgálják a különböző betegségek esetében, hanem azt, hogy a mért MPO szintek hogyan változnak adott probléma esetén, és milyen módon lehet ezt az információt a diagnosztikában hasznosítani (bizonyos limfoproliferatív malignus kórképek, szív- és érrendszeri megbetegedések, idegrendszeri érintő különféle kórformák és egyes autoimmun betegségek esetében).

Leukémia

Az akut myeloid leukémiát a Francia-Amerikai-Brit társaság kilenc altípusra osztotta. A felosztás alapja, hogy a sejtek melyik myeloid sejtvonalból származnak, milyen a morfológiai megjelenésük, illetve, milyen a sejtek szudánfekete, nem specifikus alfa-naftilacetát és nafrilbutirát és mieloperoxidáz festődése. Hat szubtipusban (M1-M4, M4EO és M6) a sejtek mieloperoxidáz pozitívak. A mieloperoxidáz pozitivitás a betegség fennállása esetén az altípus megállapításán kívül prognosztikai értékű is. A mieloperoxidáz pozitív sejtek jelenléte pozitív kimenetelhez is társul myeloid leukemia esetén [25].

Kutyák esetében flow citometriás technikával különféle immun-festési eljárásokat vizsgáltak akut myeloid leukémiában szenvedő és egészséges kutyákban. Összehasonlították az egérből nyert antihumán mieloperoxidázt, az egér antihumán makrofág ellenes antitestet, illetve a kutya neutrofil specifikus antitestet felhasználó módszereket. Az eredmények alapján az antihumán mieloperoxidáz és a kutya neutrofil specifikus antitest a neutrofil granulociták erős festődését eredményezte, a mieloperoxidáz esetén a monociták is gyengén festődtek. Az antihumán makrofág ellenes antitest, mind a neutrofil granulocitákat, mind a makrofágokat megfestette. Mindhárom esetben nem csak az egészséges, de a neoplastikus myeloblasztok és monoblasztok is azonosíthatóak voltak, tehát a három antitest kutyában is alkalmazható lehet az akut myeloid leukémiák immunfenotipizálására [26].

Szív- és érrendszeri megbetegedések

A makrofágok és neutrofil granulociták szerepet töltenek be a koronáriák falán keletkező plakkok oxidációjában és azok destabilizálásában, ezért az instabil plakkok és thrombin jelenléte esetén MPO-pozitív monocyták és neutrofilok nagyobb számban jelennek meg a perifériás vérben. Ezzel magyarázható, hogy akut koronária szindróma, szívelégtelenség, pulmonális hypertenzió, magas vérnyomás, szívműtétet követő graft elégtelenség, szívátültetés, diabetes mellitus és artériás fibrilláció, illetve arterosclerosis esetén a mért MPO szintek ezekben a betegekben korrelációt mutatnak a rizikóval, és előjelezhetik az akut kardiovaszkuláris történéseket [25].

Alzheimer-kór és egyéb az idegrendszert érintő megbetegedések

A perifériás vér mieloperoxidáz koncentrációjának növekedése és Alzheimer-kór, szklerózis multiplex, stroke, Parkinson-kór, depresszió, traumás agysérülés és epilepszia esetén emberekben pozitív korrelációt mutat [25].

Húsevő háziállatok esetén ezen fentebb említett kardiovaszkuláris, vagy az idegrendszer érintő traumás-, ischémiás-, degeneratív, vagy funkciózavarral járó, nem struktúrális kórképekben még nem lett vizsgálva a vér mieloperoxidáz aktivitásának változása.

Szisztémás lupus erithematosus (SLE) esetén a szervezetben antitestek képződnek a sejtek nukleáris komponensei, illetve a neutrofil granulociták és a monociták citoplazmatikus lizoszomális komponensei ellen, mint a porteináz-3, és a mieloperoxidáz. Az anti-mieloperoxidáz antitestek (MPO ANCA) kimutathatók ezekből a betegekben [25]. Kuttyákban a szisztémás lupus erithematosus ritkán előforduló kórkép, az ebben a betegségben szenvedő állatok mieloperoxidáz aktivitásáról és annak változásairól szakirodalmi adat jelen pillanatban nem áll rendelkezésre.

Gyógyszer metabolizmus

A mieloperoxidáz a P450 enzimes családhoz hasonló hem-peroxidáz családba tartozik, szerepe van különböző gyógyszerek metabolizmusában is. Egyrészt a peroxidáz-aktivitása különböző gyógyszerek (mint klórpromazin, mefenamin sav, fenilbutazon, indometacin, piroxikám, tenoxikám, adriamicin) metabolizmusa során szabad gyököket állít elő a gyógyszermetabolit oxidációja során, másrészt oxidáló ekvivalensek (az MPO-H₂O₂ rendszer részeként), a hipoklórossav termelése miatt, enzim (biomarker) inaktíváló hatásuk van a kolinészteráz, kreatin kináz (CK), a gliceraldehid dehidrogenáz, az alkohol dehidrogenáz és a szukcinát dehidrogenáz inaktiváció révén. A szabad gyököket tartalmazó gyógyszer metabolitok, rendellenes fehérje kötődéshez (például a kimotripszin, az albumin és az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) oxidációjához) vezetnek, DNS-, RNS- károsító

hatásuk van, telítetlen zsírsavakat oxidálnak (oxidatív stresszt jelentenek a sejte számára), DNS-sel addukt vegyületeket képeznek, ami a sejtek funkciózavarához, vagy sejthalálhoz vezethet. Egyes szélsőséges esetekben ez súlyos (idioszinkretikus) hepatotoxicitást okoz. Endotoxémia indukálta gyulladásos folyamatok esetén, többek között a fenotiazin gyógyszerek hepatotoxicitása is jelentősen nő (így más gyógyszerek, vagy új gyógyszer molekulák preklinikai vizsgálata során fontos lehet vizsgálni az adott molekula viselkedését, oxidatív stressz indukáló hajlamát “hepatocita gyulladásos kísérleti modellben” is, nem csak konvencionális *in vivo*, vagy *in vitro* kvázi fiziológiás modell rendszereken).

Az addukt képződés miatt fokozott karcinogenitási rizikó is feltételezhető [27].

Hepatitis

Egy idei tanulmányban azt vizsgálták, hogy Humán Hepatitis B és C vírus okozta krónikus májgyulladásban szenvedő emberekben és az egészséges kontroll csoportban milyen magas a szérumban mieloperoxidáz szint. Azt találták, hogy a súlyosabb fokú cirrózist mutató májbetegségben szignifikánsan magasabb volt a mieloperoxidáz szint, mint a még enyhébb kórforma esetén. Így a mieloperoxidáz használható a májcirrózis korai felismerésére biomarkerként emberben [28].

A mieloperoxidáz kimutatása

A mieloperoxidáz enzim kimutatására többféle módszer alkalmazható. Közvetlen módon kimutatható az enzim antitestek felhasználásával. Ilyen például az ELISA, a Western blot módszer, illetve a mikroszkópia. Ezek mellett a citokémiai festési eljárások során mieloperoxidáz-szubsztrátok segítségével is kimutatható. Ilyenkor a hozzáadott szubsztrátok hidrogén-peroxid felhasználásával metabolizálódnak, a reakció során, pedig színes termékek keletkeznek, amelyek aztán könnyen detektálhatóak. A hidrogén-peroxid felhasználás szintén mérhető, hidrogén-peroxid elektródák segítségével.

A közvetett kimutatási módszerek esetében a mieloperoxidáz-hidrogén-peroxid-klorid rendszer működése során keletkező termékeket mutatják ki. Ilyen elsősorban a hipoklórossav, amely a szervezetben a leggyakrabban keletkező termék. A hipoklórossav képes oxidálni az aminosavakat, például tirozint. A reakció során keletkező 3-klór-tirozin antitestek felhasználásával kimutatható.

Más intermedierek, mint a lipid-klórhidrinek, klórozott nukleozidok, fehérje-karbonilok, illetve a glutation-szulfonamid szintén potenciális biomarkerek, bár ezek kimutatását ritkán alkalmazzák a mieloperoxidáz detektálása céljából.

Alkalmazható ezenkívül a fluoreszcens detektálási módszer, mely a sejtekben lévő mieloperoxidázt mutatja ki. Ezzel a módszerrel lehetséges a mieloperoxidáz festődés alapján

sejttípusok elkülönítése, illetve szöveti struktúrák vizsgálatára is alkalmazható ez a módszer [25].

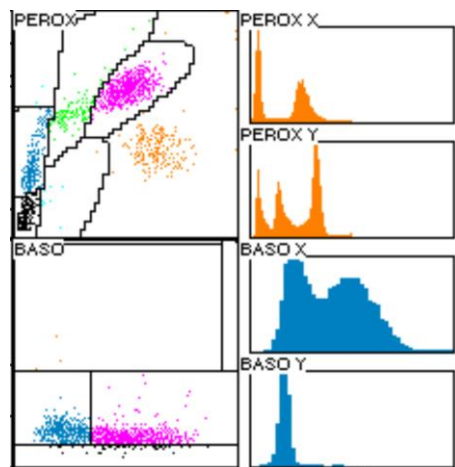
A laboratóriumi diagnosztikában a legrégebben és leggyakrabban végzett vizsgálat a hematológia. Ennek során a vér alkotó elemeinek számát és morfológiáját és egyéb tulajdonságait vizsgálják. Ezek az értékek minden kórforma során meghatározóak a diagnosztika és a kezelés során. A hematológiai automaták megjelenése előtt a vérben található sejtes elemek vizsgálata manuális kenet elemzéssel zajlott. Ennek során a levett mintából a tárgylemezre helyezett kenetben a laboratóriumi dolgozók számolják az egyes sejttípusok mennyiségét, illetve vizsgálják az egyes sejttípuson belüli sejtek morfológiai eltéréseit. Mivel a laboratóriumi diagnosztika egyre nagyobb hangsúlyt kapott az orvoslásban, így a laboratóriumokba érkező minták száma is drasztikusan nőtt. Emiatt megjelent az igény az automatizált hematológiai sejszámlálókra. 1949-ben Wallace H. Coulter fejlesztette ki az első hematológiai automatát, amely a sejteket elektromos ellenállásuk mértéke alapján képes differenciálni. Ezt hívják impedancia vagy Coulter elvnek [29].

A fehérvérsejtek differenciálását az első hematológiai automaták még nem voltak képesek elvégezni. Ezek a gépek a fehérvérsejteket egy nagy populációként értelmezték, az azon belüli eloszlásról nem adtak információt, így ezt manuális kenet elemzéssel pótolták. Az impedancia elven működő gépek a sejtek mérete alapján három sejtpopulációt képesek elkülöníteni a fehérvérsejteken belül: limfociták, közepes méretű sejtek és a granulociták. Mivel ez a módszer kizárólag a sejt méret alapján differenciálja a sejteket, emiatt az abnormális sejtalakokat könnyen rossz frakcióba sorolja, emiatt nem mindig ad megbízható értékeket. A legújabb impedancia elven működő hematológiai automaták ezt a fehérvérsejtek differenciájának relatív pontatlanságából adódó problémát további technológiák hozzáadásával javítják. A nagy frekvenciás jel használatával pontosabban képesek elkülöníteni a fehérvérsejt populációkat.

A fehérvérsejtek egyes alpopulációinak pontosabb gépi meghatározása érdekében 1996-ban megjelent az első optikai áramlási citometriás módszeren alapuló hematológiai automata. Az eljárás során a gép a hígított vérmintán lézerfény sugarat vezet át, a sejtekről a fókuszált fény különböző irányokba szóródik. A szórt fényjeleket egy fotodetektor alakítja elektromos impulzussá. A hasonló fényszórás-tulajdonságú sejteket számítógépes szoftverrel jelenítik meg szórási diagramon, így az egyes sejtpopulációk elkülöníthetőek [30].

Az ADVIA 2120i hematológiai automata két módon differenciálja a fehérvérsejteket. A basofil csatorna, kifejezetten a basofil granulociták vizsgálatára alkalmas, mivel a PEROX

csatornával ezek nem vizsgálhatók. A vizsgálatok során a mintát surfaktant és ftálsav tartalmú reagenssel keverik, ami a citoplazmát eltávolítja minden nem basofil sejtről, a vörösvérsejtek és a vérlemezkék pedig teljes egészükben lizálódnak. Ezután a gép lézertűvel világítja meg a sejteket, majd a sejtekről visszaverődő magas és alacsony szögű fénysugarakat a rendszer detektorokkal fogja fel. A fénytörés alapján meghatározható a sejtek mérete és a sejtmagok denzitása. Az eredményeket felhődiagramon jeleníti meg a műszer (1. diagram). A klusztter analízáló szoftver ezután kapukkal szétválasztja a sejtpopulációkat és így meghatározza a basophilok számát.

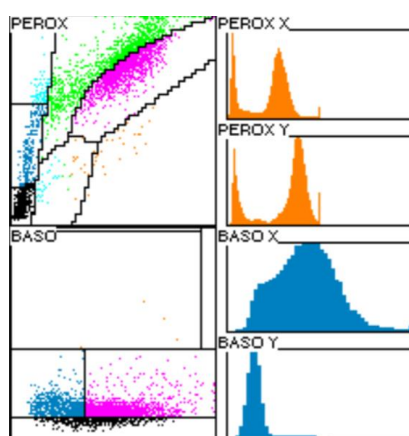


1. diagram: Egészséges állat Advia 2120i scatter

A PEROX csatorna a 4-kloro1-naftol reagenssel működik, ez reagál a hidrogén peroxiddal, ami a fehérvérsejtek azurofil granulumaiban található. A reakció során sötét precipitátum képződik. A sejteket ezután tungsten halogén lámpával világítja meg a gép, a fénytörés mértéke alapján a detektor a sejtek méretét (y tengely), az adszorbancia detektor pedig a peroxidáz festődés mértékét (x tengely) méri. Az öt alap sejtpopuláció mellett, az ADVIA hematológiai automaták egy hatodik sejtpopulációt is megjelenítenek, ez a LUC (large unstained cells) [31]. Ezek a nem festődő sejtek általában aktivált limfociták, plazmasejtek, óriás lymphociták, mieloperoxidáz negatív blasztok, mieloperoxidáz negatív neutrofilek és egyéb granulociták. Az eredményeket az automata felhődiagramon jeleníti meg, melyen az egyes pontok jelölik a sejteket (1. diagram). Ezután egy klusztter elemző szoftver különböző kapukat helyez a mintára, így meghatározza az egyes sejtpopulációk méretét a pozíciójuk, a területük és denzitásuk alapján. Az egyes neutrophil populációk x-tengely értékének átlagából az ADVIA hematológiai automata egy mértékegység nélküli számított értéket is kiad, ez a átlagos peroxidáz ativitási index (MPXI). Az MPXI azt mutatja meg, hogy a sejtek

mieloperoxidáz aktivitása mennyiben tér el a programban tárolt archetipikus populációétól, és végeredményként az eltérések átlagát számszerűsíti. Ez az érték megadja, hogy átlagosan mennyi az egyes fehérvérsejtek mieloperoxidáz tartalma. Az állatorvoslásban használt automatákban azonban hiába választható ki a minta futtatása előtt az adott állatfaj, az átlagos peroxidáz aktivitási index számításához használt archetipusos populáció értékei humán eredetűek, így ezt mindenképpen figyelembe kell venni az eredmények értékelésekor.

Kutyák esetében gyakran találkozunk mieloperoxidáz deficienciával, ami miatt a peroxidáz csatorna által mért értékek eltérhetnek a kenetelemzés során számolt értékektől. A mieloperoxidáz aktivitást csökkent mértékben mutató neutrofil granulocytákat a gép általában a monocita frakcióba sorolja. A mieloperoxidáz aktivitást egyáltalán nem mutató sejteket pedig a festődést nem mutató óriássejtek (LUC) közé. Ilyen esetekben, tehát az automata által kiadott értékek alapján az állat neutrofil granulocita száma alacsony lesz, de a monocita szám emelkedett, vagy amennyiben annyira alacsony a mieloperoxidáz aktivitás a neutrofilekben, akkor a nem festődő óriássejtek (LUC) száma lesz kifejezetten magas (2. diagram). Az ilyen esetekben a manuális kenet elemzés elengedhetetlen a megfelelő értékek megállapításához.

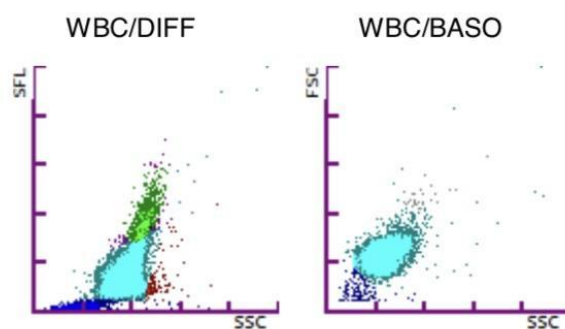


2. diagram: ADVIA 2120i scatter myeloperoxidáz hiányos állat esetén

A mieloperoxidáz használható gyulladós markerként, mivel gyulladás esetén a neutrofil granulocitákból az extracelluláris terekbe kerül, vagy a fagoszómákon belül felhasználódik. Ekkor az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) értéke magasabb vagy alacsonyabb is lehet a normálnál, attól függően, hogy a gép által neutrofil granulocita frakcióba sorolt sejtek mieloperoxidáz aktivitása mennyiben tér el a normálistól. Ilyen esetekben a peroxidáz csatorna által végzett sejt differenciáció esetén gyakrabban találkozunk alacsonyabb neutrofil granulocita számmal, mint a kenetelemzés során számolt értékek.

Amennyiben a gyulladós reakció során már elkezdődött a fiatal sejtalakok nagy mennyiségű megjelenése a perifériás vérben, akkor az MPXI nő, hiszen a fiatal neutrophil granulocitákban nagyobb mennyiségben van jelen a mieloperoxidáz. Ekkor a kenetelemzés és a gép által számított értékek általában megegyeznek.

A Sysmex XT-2000i hematológiai automata a fehérvérsejteket öt frakcióba sorolja: neutrofil granulocita, eozinofil granulocita, leukocita, monocita, illetve a bazofil granulociták, melyek külön csatornán a sejt méret és a fénytörés alapján kerülnek elkülönítésre. Ezen kívül bizonyos készülékek egy hatodik, úgynevezett valódi éretlen granulocita frakciót is elkülönít, melynek mérete alapján a gyulladós folyamatokra lehet következtetni, ami segít a fertőzések korai diagnosztikájában, illetve a folyamatok lezajlásának nyomon követésében. A sejtek közötti differenciáláshoz a rendszer lézeres módszert alkalmaz, fluoreszcein festéssel kombinálva. A mintához adott fluoreszcein festék mind a DNS, mind az RNS molekulákhoz kötődik, így a sejtek méretén kívül a műszer a belső struktúrát és a nukleinsav tartalmát is méri. Az eredményeket nem csak hisztogramon, hanem felhő diagramon is megjeleníti a rendszer (3. diagram) [32]. Amennyiben a rendszer nem tudja biztonságosan elkülöníteni a fehérvérsejt populációkat, azt jelzi a felhasználónak (a nem identifikálható sejteket a scattergram-on sötét színűvel jelzi, illetve hibüzenetet is küld), ilyenkor kenetelemzést szoktak végezni a sejtek pontosabb azonosítása érdekében.



3. diagram: Sysmex XT-2000i scattergram 1

Humán gyógyászatban a leukociták differenciálszámlálását hematológiai automatákkal végzik, és kritériumokat határoznak meg azokra az esetekre, amikor a vérkenet kézi elemzését is szükséges elvégezni. Az állatorvosi laboratóriumokban azonban a manuális vérkenet elemzés minden minta esetében elvégzésre kerül a gépi differenciálszámlálás mellett. Kutyaiból, macskákból és lovakból származó minták esetén azt vizsgálták, hogy melyek azok az esetek, amikor a manuális leukocita vizsgálatok szükségesek az automata

által végzett mérések mellett. A vizsgálatokhoz az ADVIA 120 hematológiai analizátort használták. Kézi leukocita elemzést azokban az esetekben kértek, amikor a gép által készített PEROX- és BASO- scattergram esetén rendellenességet láttak (például balra tolódás, vagy atipikus limfociták, blaszrok gyanúja, a sejtpopulációk nem megfelelő elkülönítése). Az eredmények alapján a manuális differenciálvizsgálat a kutyák esetében 21%, macskák 32%-ban és a lovak 20%-ban volt szükséges. A kapott eredményeket összehasonlítva a humán gyógyászatban publikáltakal, azt találták, hogy hasonló arányban van szükség az állatgyógyászatban a manuális kenet elemzésre, mint a humán gyógyászatban. Ez alapján tehát az állatorvosi laboratóriumokban is biztonságosan csökkenthető lenne a mikroszkópos vizsgálatok aránya, amennyiben bizonyos kritériumok alapján határozzák meg annak szükségességét az adott minta esetében [33].

Az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) változékonysága és annak tárolási stabilitása az állatgyógyászatban még nem teljesen ismert. Kutya és ló esetében alvadásban gátolt EDTA-s vérmintákból vizsgálták a mieloperoxidáz tárolási stabilitását. A vizsgálatok során azonnali feldolgozású, illetve 24, 48 és 72 órán át hűtve tárolt mintákat hasonlítottak össze. A tárolás hosszának növekedésével az MPXI csökkent a vérben. A vérelemzke aggregátumok és lipidek szintén befolyásolták az eredmények pontosságát. Azt találták, hogy a ló vérben nagyobb variabilitást mutattak az eredmények, mint a kutyákból nyert mintákban. Mivel a lovak vére nagyon gyorsan alvad, az eltéréseket magyarázhatja a vérelemzke aggregátumok hatása a mérési eredményekre, illetve az, hogy a lovak átlagos peroxidáz aktivitási index értékei alapvetően alacsonyabbak, mint a kutyáké. 72 órás tárolás után az eredmények kiszámíthatatlanul változtak, ezek alapján tehát az ilyen hosszan tárolt vérből már szinte lehetetlen releváns eredményt kapni. Nagyon alacsony alap értékek esetén a mérések nem voltak olyan pontosak, mint a referencia intervallumon belül, és az a feletti értékek esetén [34].

A neutrofil granulociták toxikus változásai befolyásolják a vérkenet elemzés hatékonyságát is. Az időben később történt méréseknél a Döhle-testek száma nőtt 8, 24 órás mérésnél mind szobahőmérsékleten való tárolás, mind jégakkival hűtött minták esetében. A hűtőszekrényben 4 Celsius fokon tartott mintákban 24 óra után figyelték meg a nagyobb mennyiségű Döhle-testek megjelenését. A kenetelemzés szobahőmérsékleten tárolt vérminta esetén már 4 órával, jégakkival hűtött minta esetén 8 órával, hűtőben 4 Celsius fokon tartott mintában 24 óra után fals eredményekhez vezettek a neutrofilekben in vitro bekövetkező „pszeudo-toxikus” változások [35].

A mieloperoxidáz festődés alapján készült felhődiagramon a neutrofil granulociták elhelyezkedése, illetve az átlagos peroxidáz aktivitási index értékek gyulladás során jelentősen változnak. Lovakban endotoxémia során vizsgálták az értékek változásait. A gyulladásos inger kiváltására *Escherichia coli* endotoxin infúziót használtak, amelynek mennyiségét és hatását így könnyen tudták kontrolálni, ami lehetőséget adott arra, hogy hosszabb időn keresztül figyeljék meg a neutrofilek számában, morfológiájában és az átlagos peroxidáz aktivitási index értékekben bekövetkezett változásokat. A neutrofilek számát, az MPXI-t az ADVIA 2120 hematológiai automatával, a neutrofilek morfológiai változásait pedig a scattergram-ok és manuális vérkenet elemzéssel vizsgálták, 10 napon keresztül. Azt találták, hogy az endotoxin infúzió azonnal súlyos csökkenést okozott a neutrofil granulocyták számában. Azonban 14 órával az infúzió kezdete után már a referencia értékek feletti neutrofil számokat mértek. A neutrofilia még 78 órával az infúzió kezdete után is megfigyelhető volt. A nagyobb méretű óriás neutrofilek 36 - 48 óra után jelentek meg a vérben, a hematológiai automata által készített scattergram-on ezek a normál neutrofilektől elkülönülve ábrázolódtak. A 6. napra a neutrofil sejtpopuláció normális méretű volt, de a csökkent mieloperoxidáz festődés miatt balra tolódás volt megfigyelhető a mért értékek alapján. Az átlagos peroxidáz aktivitási index minden állatnál folyamatos csökkenést mutatott a kísérlet első 6 napja során [36].

Kutyák esetében a leggyakrabban használt gyulladásos marker a cCRP. A cCRP szint a szérumban azonban csak a gyulladásos reakció kezdete után az IL-6 és IL-8, illetve a TNF-alfa felszabadulás hatására kezd emelkedni. Ez az emelkedés a gyulladásos reakció kezdete után 4-24 órával lesz mérhető leghamarabb [37]. Lovak esetében a CRP helyett a Serum-amyloid-A szintjének változásából következtetnek a gyulladás súlyosságára, ez a paraméter szintén nem azonnal emelkedik meg a vérben, csak a gyulladásos stimulus után 6 órával lesz mérhető a változása (még be kell rakni referenciába [38]).

Lovak szisztémás gyulladással járó kórképei esetén a neutrofil aktiváció indikátoraként az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) és az átlagos fényabszorbancia középértéket (NXM) vizsgálták. Az egészséges, beteg, de nem szeptikus, és beteg szeptikus csikók vérmintáinak értékelése során gyenge negatív korrelációt találtak az MPXI és a neutrofilek száma, valamint a fényabszorbancia középértékek és a sávós neutrofilek százalékos aránya között. A szeptikus és csökkent neutrofil számmal rendelkező csikók esetében az MPXI értékek magasabbak voltak, mint a szeptikus, de megfelelő mennyiségű neutrofil granulocita számmal rendelkező, illetve a nem szeptikus és nem neutropeniás állatok esetében, emellett viszont nem különböztek jelentősen a kontroll állatokétól [39].

Kórházi kezelésre szoruló lovak esetében az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI), mint a szisztémás gyulladás diagnosztika mutatója vizsgálták. Az átlagos peroxidáz aktivitási index referencia intervallumát 8,5-10,4 között állapították meg. A szisztémás gyulladásos válasz szindrómában (SIRS) szenvedő lovak esetén az MPXI szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges, a lokális gyulladással kezelt, illetve a szepszisben szenvedő állatoknál. A szeptikus lovak MPXI értéke szintén alacsonyabb volt, mint az egészséges vagy a lokális gyulladással küzdő állatoké. A kapott eredmények ismeretében kijelenthető volt, hogy az állat ivara, fajtája nem befolyásolta a mérési eredményeket. A SIRS-es lovak a szeptikusokhoz képest alacsonyabb MPXI értékét magyarázza, hogy a szepszisben felszabaduló szérumszulfid A csökkenti a neutrofilek mieloperoxidáz leadását, tehát a neutrofil granulociták MPO tartalma magasabb lesz. A neutrofil granulociták 3 - 4 órával a gyulladásos stimulus után aktiválódnak, így ekkor már az MPXI változása is mérhető. A többi gyulladást jelző paraméter, mint az akut fázis fehérjék (pl. szérumszulfid A), a plazma fibrinogén és a szérumszulfid vas koncentráció csak a gyulladás későbbi fázisaiban kezd emelkedni, illetve disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC) kialakulása esetén a fibrinogén koncentráció még csökkenhet is. Összességében mivel az MPXI a gyulladásos reakció elején csökken, később a csontvelő hozzászokik a magasabb neutrofil szükséglethez, aminek következtében több éretlen neutrofil granulocita kerül a véráramba, egy idő után az MPXI növekedni kezd, ezért ez a paraméter a gyulladás diagnosztikájában, annak kezdetekor használható megfelelő markerként [40].

Kutyákban a kullancsok terjesztette Babesia rossi által okozott megbetegedés esetén az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) eredményeket hasonlították össze a fertőzött, a fertőzésben elhullott és az egészséges kontroll állatoknál. A mért értékeket összehasonlították a gyulladásos citokinek szintjének változásival is. Babesia rossi fertőzés esetén a kutya szervezetében szisztémás gyulladásos válaszreakció indul meg. A neutrofil granulociták a veleszületett immunválasz részét képezik. A neutrofil granulociták aktivációja során az azurofil granulomokban tárolt mieloperoxidáz kijut a sejtől, és részt vesz a kórokozó eliminációjában. Az eredmények alapján a MPXI a fertőzött kutyákban magasabb volt, mint a kontroll állatokban, de a fertőzöttek közül még magasabb értékeket mértek a fertőzésben elpusztult állatokban. A fertőzött kutyákban az MPXI pozitív korrelációt mutatott az IL-10, és negatív korrelációt az IL-8 szintekkel. Az MPXI az elpusztult kutyákban korrelált a gyulladást elősegítő („proinflammatory”) citokinekkel. A fertőzésben elhullott állatokban pozitív korrelációt találtak az MPXI és az IL-2, IL-6 és IL-18 között.

Összességében az átlagos peroxidáz aktivitási index mérése, és annak változása a gyulladás mértékének és a prognózis meghatározásának hasznos eszköze lehet [41].

Mieloperoxidáz deficiencia

Mieloperoxidáz deficiencia esetén a neutrofilek nem mutatnak MPO aktivitást, vagy csökkent a MPO szintjük. Ezt először 1969-ben írták le egy candidiázisban szenvedő cukorbeteg férfi esetében. A páciens normális granulocita asszociált enzimszinteket mutatott, a mieloperoxidáz szint viszont nem volt detektálható. A neutrophil granulociták normális fagocita aktivitás mellett sem tudták elpusztítani a kórokozót. A páciens testvérének neutrofil granulocitái szintén nem tartalmaztak mieloperoxidáz enzimet, a fiaiból vett fehérvérsejtek esetén a mieloperoxidáz szint a harmada volt csak a normális értékeknek [42]. Ekkor még ritkán előforduló problémának tartották a mieloperoxidáz deficienciát. Ma már a hematológiai automaták új generációja rutin vérképek során is mér mieloperoxidáz aktivitást, így tudjuk, hogy nem is annyira ritka a probléma, csak általában nem okoz tüneteket, így észrevétlen maradhat. A frissebb adatok szerint az USA-ban nagyjából 2-4000 személyből 1-nél van jelen a probléma, Japánban 55 000 ember közül 1-nél [22].

A mieloperoxidáz deficienciának alapvetően két formája ismert, az elsődleges, vagy örökletes forma és a másodlagos, vagy szerzett. Az örökletes forma esetén az egyedek mieloperoxidáz aktivitása lehet csökkent vagy teljesen hiányozhat is. A mieloperoxidáz enzimet kódoló gén emberben a 17-es kromoszóma 17q22-23 lókuszában található. A teljes mieloperoxidáz deficiencia autoszomális recesszív öröklésmenetet mutat. A mutáció az eosinofil granulocitákat nem érinti, mivel az eozinofil peroxidáz termeléséért felelős génszakasz máshol kódolódik [22]. A mieloperoxidáz deficienciában szenvedő emberek körében csak nagyon alacsony számban találtak gyakoribb előfordulást a fertőző betegségeknek, ez valószínűleg annak köszönhető, hogy más MPO független mechanizmusok kompenzálják az immunrendszer hiányzó első vonalas celluláris védekező funkcióját. Azok a betegek, akik rendelkeznek az örökletes mutációval és mellette egyéb háttérbetegséggel bírnak, (mint pl. cukorbetegség) gyakrabban mutatnak tünetet.

A neutrofil granulocitáknak szüksége van a mieloperoxidáz enzim jelenlétére a neutrofil extracelluláris csapdák létrehozásához is. Teljes mieloperoxidáz deficiencia esetén a neutrofilek nem képesek NET-et formálni, részleges deficiencia esetén a folyamat csak lassabb, mint az egészséges szervezetben. A NET formáció gátlása miatt a deficiens egyedek fogékonyabbak számos mikrobiális fertőzésre, különösen *Candida albicans* esetén [23].

A mieloperoxidáz deficiencia hatását az immunrendszer működésére mesterségesen létrehozott mieloperoxidáz deficiens mutáns Zebradániókban is vizsgálták. A mutáns embriók esetében a *Candida albicans* fertőzés gyorsabb terjedést tapasztaltak, de az egyedek nem pusztultak el, mivel egy idő után a fertőzés terjedése lelassult. Ez valószínűsíti, hogy amennyiben a mieloperoxidáz-hidrogén-peroxid rendszer nem működik a szervezetben, az egyéb védekező mechanizmusok képesek valamilyen szinten átvenni annak funkcióját.

Ugyanakkor egy másik kísérletben, ahol mieloperoxidáz deficiens egereket fertőztek *C. albicans*-sal, a deficiens egyedek körében magas mortalitást tapasztaltak. Igaz ebben az esetben szisztémásan fertőzték az állatokat, a zebradániók esetében csak az embriók felületén vizsgálták a terjedést [43].

Kutyában az örökletes formát egy olasz kopó esetében írták le első alkalommal. Az állat tünetmentes volt, a mieloperoxidáz deficiens neutrofil granulocitákat az ADVIA 2120i hematológiai automatával mutatták ki rutin vérvizsgálat során. A mieloperoxidáz gén vizsgálata során kiderült, hogy az érintett állat esetében egy nonszensz mutáció okozta a deficienciát [44].

A másodlagos, vagy szerzett mieloperoxidáz deficiencia nem az egyén teljes egész életét kíséri végig. Ekkor valamilyen egyéb betegség miatt másodlagosan alakul ki a kórkép, a legtöbb esetben nem minden neutrofil granulocita érintett és az alapbetegség sikeres kezelése után ez az enzimatis funkció normalizálódik [45].

Az MPO deficiencia nem minden téren káros az ebben szenvedő betegek számára. Kimutatták, hogy az MPO deficiens egyedekben nehezebben alakul ki myocardialis infarktus és cardiovascularis artheroma. Ez annak köszönhető, hogy a mieloperoxidáz rendszer működésekor képződő hypoklorit antioxidánsként működik, ami részben felelős az LDL oxidációért is. Az oxidált LDL fontos szerepet tölt be az artheroma kialakításában, így a deficiens egyedek kevésbé hajlamosak ennek kialakulására [46].

A humán gyógyászattal ellentétben a mieloperoxidáz hiány kutyákban ritkán vizsgált jelenség.

Egy kutatás során a mieloperoxidáz deficienciát mutató állatokat vizsgálták, illetve az ebből következő átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) értékének változásait. A vizsgálatokat az ADVIA 120 hematológiai analizátorral végezték. Az eredmények alapján az állatokat három csoportba osztották, annak függvényében, hogy milyen súlyos volt a mieloperoxidáz deficienciájuk. A mieloperoxidáz deficienciát mutató állatok legtöbbször, valamilyen a neutrofil granulocyták fogyásával járó betegségben szenvedtek. Leggyakrabban a parvovírussal (CPV) fertőzött állatok mintáiban jelentkezett a mieloperoxidáz deficiencia,

de gyakori volt a disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC), a sepsis, a pyometra és a pyothorax, illetve a tüdőgyulladás, hasnyálmirigy-tályog, és húgyhólyaghurut esetén is. Az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) a súlyosabb mieloperoxidáz deficienciát mutató állatok esetében alacsonyabb volt, de gyakori volt a csoportok közötti átfedés is, így az eredmények alapján az MPXI önmagában nem alkalmas a mieloperoxidáz deficiencia diagnosztikájához, erre biztosabb módszer az automata által készített citogram [24].

Kutyák esetében mieloperoxidáz deficienciát figyeltek meg különböző vérparazita fertőzöttségek esetén is. A *Hepatozoon canis* fertőzött állatok esetében, a parazitát tartalmazó neutrofil granulociták mieloperoxidáz aktivitást szinte alig mutattak [47].

Kutyák ólommérgezése esetén a neutrofil granulociták mieloperoxidáz aktivitásának vizsgálata során azt találták, hogy a mieloperoxidáz enzimaktivitás jelentősen csökken az ólommérgezett állatok esetében, a csökkenés mértéke korrelál a vér ólomszintje és az ólommérgezés klinikai tüneteinek súlyosságával. Mivel az ólom megzavarja az eritrociták hem szintézisét, így a két hem proteint tartalmazó mieloperoxidáz enzim szintézisét is akadályozza. A mérgezett állatok MPO aktivitásán kívül vizsgálták még ezen állatok neutrofil granulocitáinak baktericid aktivitást is. Az ólom vegyületekkel etetett állatok granulocitái csökkent baktericid aktivitással rendelkeztek in vitro. Az ólom adagolásának abbahagyása után az állatok mieloperoxidáz aktivitása helyreállt [48].

Anyag és módszer

Munkánk során olyan vérmintákat vizsgáltunk, melyek mieloperoxidáz deficiens neutrofil granulocitákat tartalmaztak. Az eredményeket egészséges állatokból származó negatív kontroll mintákkal, illetve mieloperoxidáz deficienciát nem mutató akut gyulladásban szenvedő állatokból származó vérmintákkal hasonlítottuk össze. A elvégzett retrospekív vizsgálatban szereplő állatok az Állatorvostudományi Egyetem klinikáin 2022-ben és 2023-ban kezelt betegek közül kerültek ki.

A méréseket az Állatorvostudományi Egyetemen Kóréletteni és Onkológiai Tanszékének (KONK) laborjában végeztük. A vizsgálatok során a hematológiai méréseket alvadásban gátolt vérből végeztük, a felhasznált alvadásgátló K₃-EDTA volt. A biokémiai mérések gélt nem tartalmazó mikrocentrifuga csövekbe vett vérmintákból történtek. A vizsgált vérmintákat az alapján választottuk ki, hogy az elkészített gépi hematológiai eredmények és a kenetelemzés során jelentezett-e legalább 10%-os eltérés a monociták és a neutrofil granulociták számolt értékeiben, illetve, hasonlóan a Klenner et. al. kutatásához [24] a monocita arány minimum 17% volt az automata sejtdifferenciáció során. A minták szállítás során és a mérések elvégzéséig tartó rövid idő alatt mind 4 Celsius fokon hűtve voltak tárolva. Haemolitikus, illetve egyéb preanalitikai hibát mutató minták kizárásra kerültek. A mérésekre a mintavételtől számított 4 órán belül sor került minden minta esetében, tehát a vizsgált vérminták mindegyike frissnek tekinthető. A gépi hematológiai elemzést az ADVIA 2120i hematológiai automatával végeztük. Ez a hematológiai automata a fehérvérsejtek differenciációját két csatornán végzi. A BASO csatornán méri a bazofil granulocitákat, a PEROX csatornán pedig a többi fehérvérsejt populációt különíti el. Ennek pontos mechanizmusát az analitikai módszerek fejezetben részleteztem. A mieloperoxidáz hiányos neutrofil granulocitákat a rendszer nem a neutrofil frakcióba sorolja, ezek a sejtek, vagy a monocita frakcióban vagy a LUC frakcióban jelennek meg. Emiatt ilyen esetekben a gép által kiadott eredményekre jellemző az átlagosnál magasabb LUC szám, vagy gyakrabban a monocitózis. Az automata által készített felhő diagramon ilyenkor a neutrofil felhő kisebb az átlagosnál és a monocita, illetve a LUC sejtek által alkotott felhő nagyobb.

A BASO csatornán végzett mérés során a gép a sejteket két csoportba osztja. A basofil rezisztens és az egyéb nem rezisztens sejtípusra. A ftálsavra érzékeny fehérvérsejteket tovább csoportosítja a sejtmag mérete és konfigurációja alapján. A polimorfonukleáris sejt frakciót a neutrofil és az eozinofil granulociták alkotják, a monomorfonukleáris sejtek pedig

a monocitákból és a limfocitákból állnak. A gép által számított polimorfonukleáris sejt frakció százalékban megadott értékéből kiszámítható a BASO csatornán mért neutrofil granulocita százalék. Ehhez a PMN-ből kivontuk a PEROX csatorna által számított eozinofil granulocita százalékot, így megkapva a neutrofil százalékot.

A mikroszkópos kenetelemzéshez, a vérkenetet 3-5 mikroliter közötti vérmennyiségből készült, a kenet száradása után a minta festése Diff-Quick festékkel történt. Ennek során a kenetet először fixáló oldatba helyeztük, majd száradás után 3-5-ször a piros (eosinophil) reagensbe mártottuk. Ezután tiszta vízzel való öblítés következik, majd 25-30 alkalommal a kenetet kék (basophil) reagensbe mártottuk. Ismételt vizes öblítést követően, a kenet végső száradása után kerül vizsgálatra. A vizsgálat során mind a széli részeken, mind a közepén számlálásra kerülnek a sejtek, mininálisan 100 db, vagy ennek egész számú többszöröse. A sejszámlálás 100x-os nagyításon immerziós olaj alatt történik. A kenetelemzés során a különböző fehérvérsejt frakciók, az eritrociták, és a trombociták számán kívül a különböző rendellenes sejtalakok, és a sejteken belüli kóros képletek is értékelésre kerülnek (pl. toxikus alakok, Döhle-testek, paraziták, festődés beli eltérések, agglutináció, stb.).

A KONK laborban minden vérminta esetében sor kerül a manuális kenetelemzés elvégzésére. A kiválasztott vérminták esetén összehasonlítottuk a kenetelemzésből számolt és a gép által mért értékeket, illetve megnéztük azt is, hogy ezeknek a mintáknak mekkora az MPXI értéke. A Dokiforvets rendszerből kigyűjtöttük a kiválasztott állatok adatait (fajta, kor, nem, betegség) (1. táblázat).

1. táblázat: A résztvevő állatok adatai

Azonosító	ivar	kor év	Fajta	Betegség
2022/9338	Nőstény	5 éves	Yorkshire terrier	Akut pancreatitis
2022/9089	Nőstény	1 éves	Yorkshire terrier biewer	Paralitikus ileus
2022/9068	Nőstény	11 éves	Közepes testű keverék	AKI
2022/8291	Nőstény	5 éves	Német juhászkutya	Lymphadenopathia, Abscessus, Neoplasia
2022/6115	Nőstény	10 éves	Yorkshire terrier	Allergodermatitis
2022/6080	Hím	6 éves	Kistestű keverék	Haemorrhagiás enteritis
2022/5971	Nőstény	13 éves	Szálkás szőrű törpe tacsó	AKI

Azonosító	ivar	kor év	Fajta	Betegség
2022/5974	Hím	14 éves	Yorkshire terrier	Haemorrhagiás enteritis
2022/5965	Nőstény	4 éves	Máltai selyemkutya	AKI
2022/5776	Hím	1 éves	Közepes testű keverék	Ileus
2022/4413	Hím	11 éves	Bichon frisé	Akut pancreatitis
2022/10964	Hím	4 éves	Nem ismert	Sepsis
2022/11294	Hím	11 éves	Foxterrier	Akut pancreatitis
2022/11394	Hím	10 éves	Bulldog	Gastroenteritis
2022/11485	Hím	8 éves	Nem ismert	Anaplasmosis
2022/11681	Hím	12 éves	Magyar vizsla	Gastroenteritis
2022/12711	Nőstény	12 éves	Yorkshire terrier	Pyometra
2022/13662	Hím	3 éves	Yorkshire terrier	ARDS
2022/14227	Nőstény	13 éves	Bichon havanese	Anterior cruciate ligament. ruptura
2022/14626	Hím	2 éves	Német dog	Gastroenteritis
2022/14898	Nőstény	14 éves	Pomerániai	Anaemia
2022/16384	Hím	4 éves	Francia bulldog	Megaesophagus
2023/1891	Nőstény	6 éves	Máltai selyemkutya	Allergodermatitis
2023/4685	Nőstény	2 éves	Francia bulldog	Aspirációs pneumonia
2023/5140	Hím	6 éves	Bichon havanese	Aut vérzéses bélgyulladás szindróma
2023/14995	Hím	3 éves	Francia bulldog	Gastroenteritis, AKI
2023/15007	Hím	4 éves	Nem ismert	Sepsis
2023/15031	Hím	3 éves	Francia bulldog	Gastroenteritis, AKI
2023/15077	Hím	6 éves	Keverék	Sepsis
2023/17203	Nőstény	11 éves	Mini bull terrier	Abscessus hepatis, abscessus pancreatis, peritonitis purulenta
2023/9772	Hím	1 éves	Yorkshire terrier	Egyéb
2023/11628	Nőstény	4 éves	Francia bulldog	Sepsis
2022/9008	Nőstény	1 éves	Yorkshire terrier	Paralitikus ileus
2022/6929	Nőstény	1 éves	Maltipoo	Sepsis
2022/10994	Nőstény	1 éves	Labrador retriever	CPV

Azonosító	ivar	kor év	Fajta	Betegség
2022/11127	Nőstény	1 éves	Kistestű keverék	CPV
2022/11706	Hím	1 éves	Kistestű keverék	CPV
2022/16444	Hím	5 éves	Francia bulldog	Babesiosis
2023/11976	Nőstény	8 éves	Papillon	Akut pancreatitis
2023/9648	Hím	1 éves	Yorkshire terrier	Egyéb

Rögzítettük a mintákból mért összfehérvérsejt számot, a gép által mért, illetve a kenetelemzés során számolt százalékos és abszolút mennyiségi értékeket. A gép által számított értékek közül még minden állat esetében rögzítettük az átlagos peroxidáz aktivitási index (MPXI) értékeket, illetve amennyiben az adott minta esetén történt cCRP mérés, annak eredményét is (az adattábla a terjedelmes mérete miatt nem képezi a dolgozat részét).

Mivel macskák esetében élettani állapotban is sokkal alacsonyabb a neutrofil granulociták peroxidáz aktivitása, ezért a mieloperoxidáz deficienciát mutató kutya mintákat az ADVIA 2120i hematológiai automata macskákra fejlesztett beállításával is lefuttattuk. Ezzel azt vizsgáltuk, hogy az alacsonyabb mieloperoxidáz aktivitást mutató kutyából származó neutrofil granulocitákat hatékonyabban képes-e a rendszer azonosítani ezen beállítás felhasználásával.

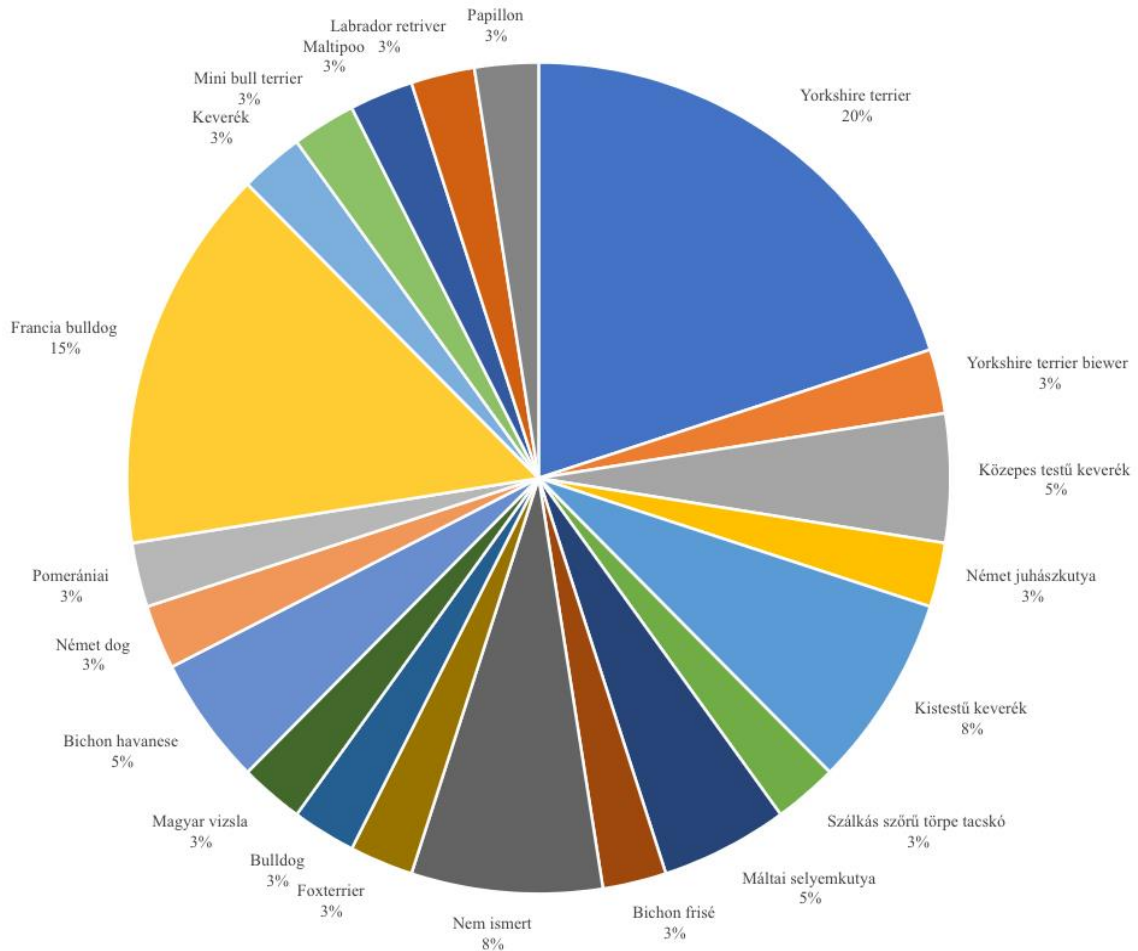
A minták egy részéből nemcsak az ADVIA hematológiai automatával végeztünk méréseket, hanem egy másik automatával is, amely nem peroxidáz festéssel különíti el a fehérvérsejt populációkat. Ezeket a méréseket a Sysmex XT-2000i hematológiai automatával végeztük az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ (ÁHOK) laboratóriumában. Ez a hematológiai automata a sejtek DNS és RNS tartalma, illetve a sejt mérete alapján különíti el a fehérvérsejteket. A Sysmex automata által kiadott eredményeket szintén összehasonlítottuk a kenetelemzés során kapott értékekkel, ez alapján azt vizsgáltuk, hogy a mieloperoxidáz hiányos neutrofil granulociták hatékonyabban azonosíthatók-e ezzel a sejt differenciáló technikával.

Az adatokat microsoft Excel táblázatkezelő szoftverben az “Analyse it” program segítségével dolgoztuk fel. A statisztikai elemzés során két mintás t próbát és Pearson-féle korrelációs vizsgálatot, valamint Passing-Bablok regressziót és Bland-Altman analízist használtunk.

Eredmények

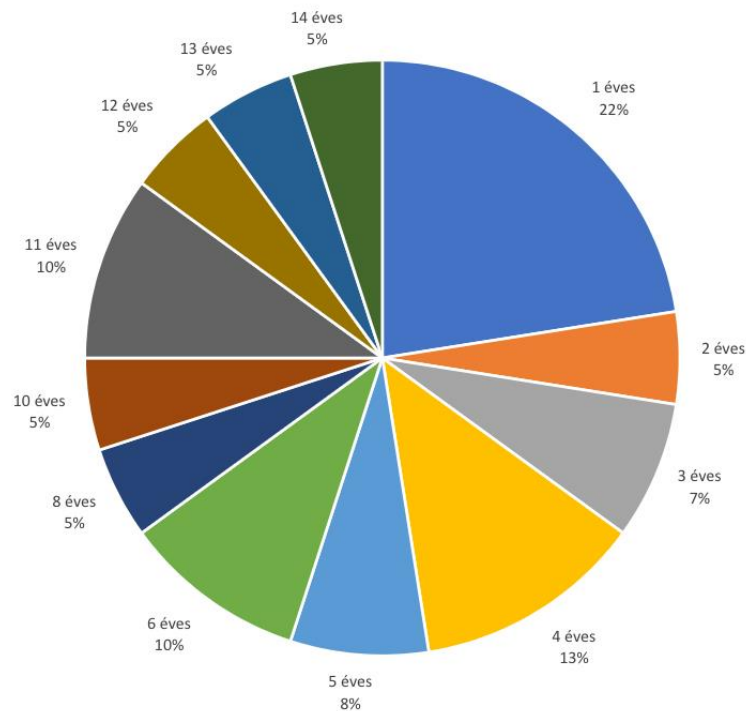
Betegpopuláció elemzése

A mieloperoxidáz deficienciát mutató egyedek között összesen 21 fajta fordult elő, a keverék kutyákat, amennyiben rendelkezésre állt adat, méret szerint kategorizáltuk (kistestű, közepes testű és nagytestű). Két esetben az állat fajtája nem volt ismert. A fajtabeli eloszlást az 4. diagram szemlélteti.



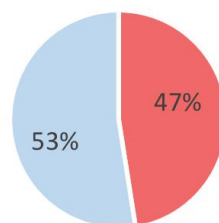
4. diagram: A betegpopuláció fajta beli megoszlása

Az állatok kora 1 évtől 13 éves korig változott. A vizsgált állatok kor szerinti megoszlását a 5. diagram szemlélteti.



5. diagram: A betegpopuláció korbeli megoszlása

A vizsgált állatok között 19 nőstény és 21 hím fordult elő. A két nem közötti előfordulás gyakorisága nem mutatott eltérést. A nemi eloszlást a 6. diagram szemlélteti.

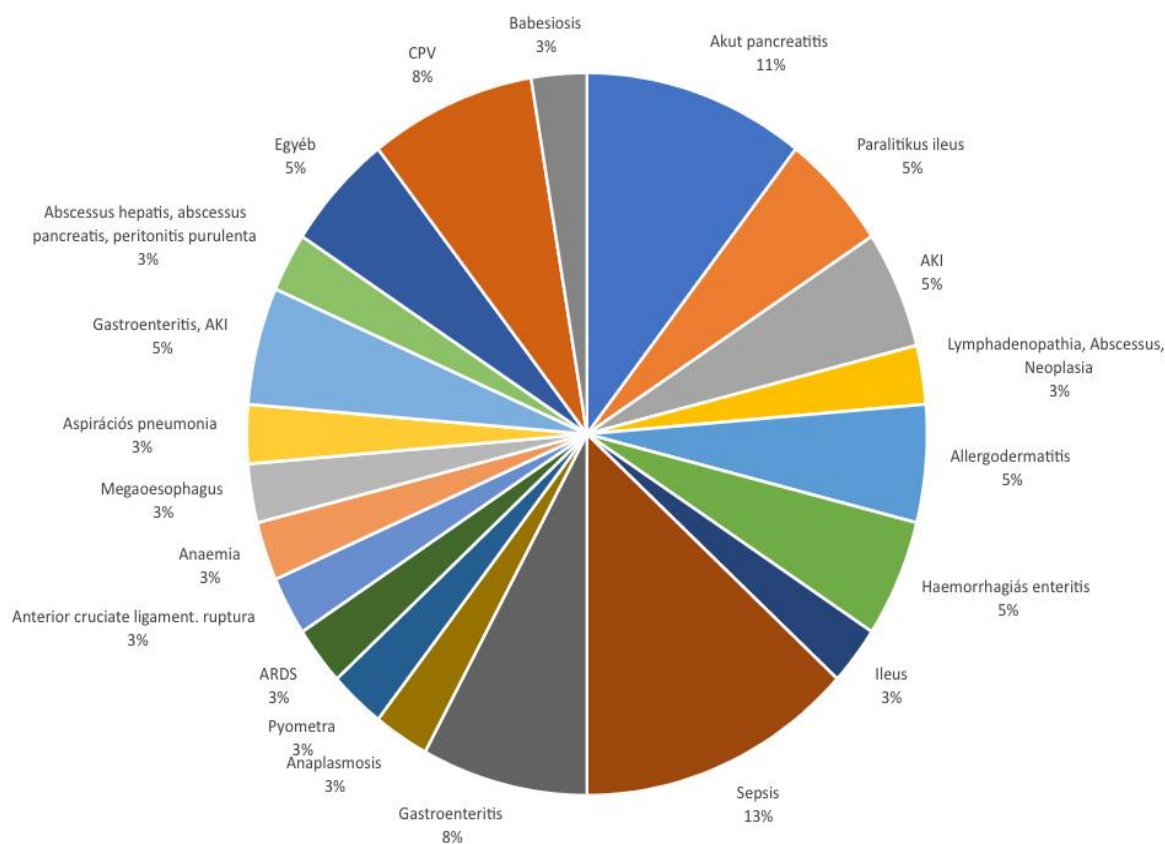


■ nőstény ■ hím

6. diagram: A vizsgált állatok nemi eloszlása

A mieloperoxidáz deficienciában szenvedő állatok között összesen 21 különböző alap betegség fordult elő, ami feltételezhetően felelős a mieloperoxidáz hiányos állapot létrejöttéért. A betegségek leggyakrabban valamilyen az emésztő szervrendszert érintő problémák voltak (akut pancreatitis, haemorrhagiás enteritis, gastroenteritis, CPV fertőzés, ileus, paralitikus ileus). Több esetben fordult elő valamilyen okból kialakult szeptikémiában szenvedő betegnél, illetve egy esetben a szepsziszhez asszociált probléma (ARDS) esetén is. Két betegnél fordult elő a vérésejtekert érintő parazitózisban (anaplasmosis, babesiosis).

Alapvetően minden beteg esetén elmondható, hogy az állatok valamilyen súlyosabb szisztémás gyulladást okozó kórképben szenvedtek. A különböző kórképek előfordulását a 7. diagram szemlélteti.



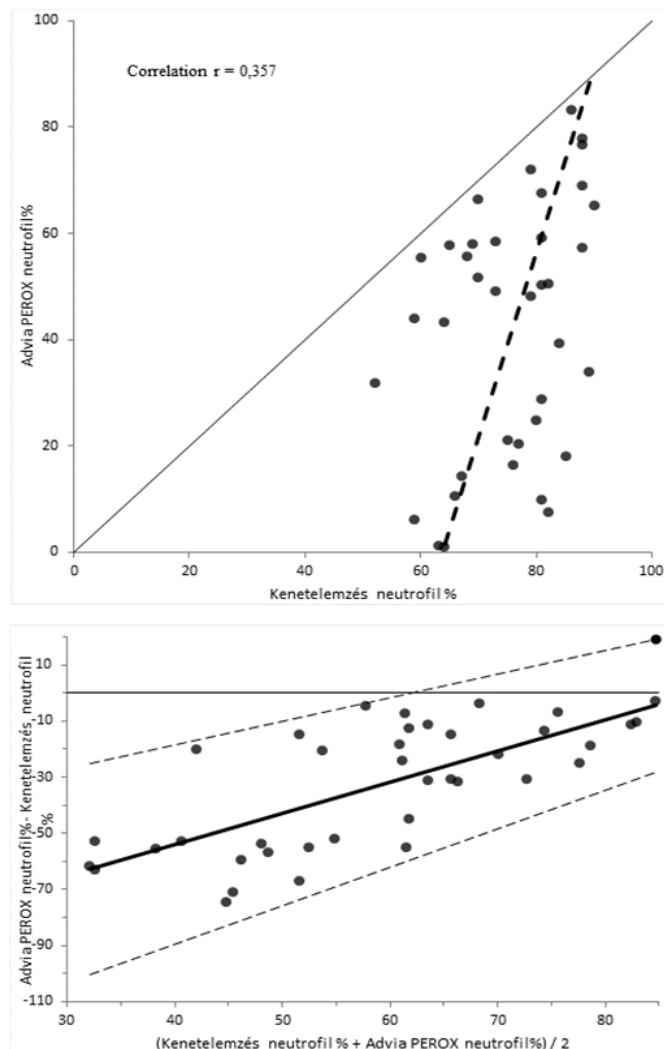
7. diagram: A betegségek megoszlása a vizsgált populációban

Az utánkövetés sokszor nehézségbe ütközik, mivel az egyetemi klinikán a betegségük csak egy szakaszában kezelték az állatokat. Az elhullás gyakorisága az egyetemi klinikán eltöltött kezelési idő alatt alacsony volt. Az adott betegségben rövid időn belül ténylegesen elhullott állatok számáról nem rendelkezünk megfelelő információval, ezért túlélésre vonatkozó elemzések nem készültek.

Mieloperoxidáz deficiencia megjelenése ADVIA 2120i automatával végzett hematológiai vizsgálatokban

A vizsgált mintákat három csoportra osztottuk: mieloperoxidáz deficienciát mutató betegek, akut gyulladáshoz betegségekben szenvedő, de mieloperoxidáz hiányt nem mutató paciensek és tünetmentes, egészséges kutya populáció.

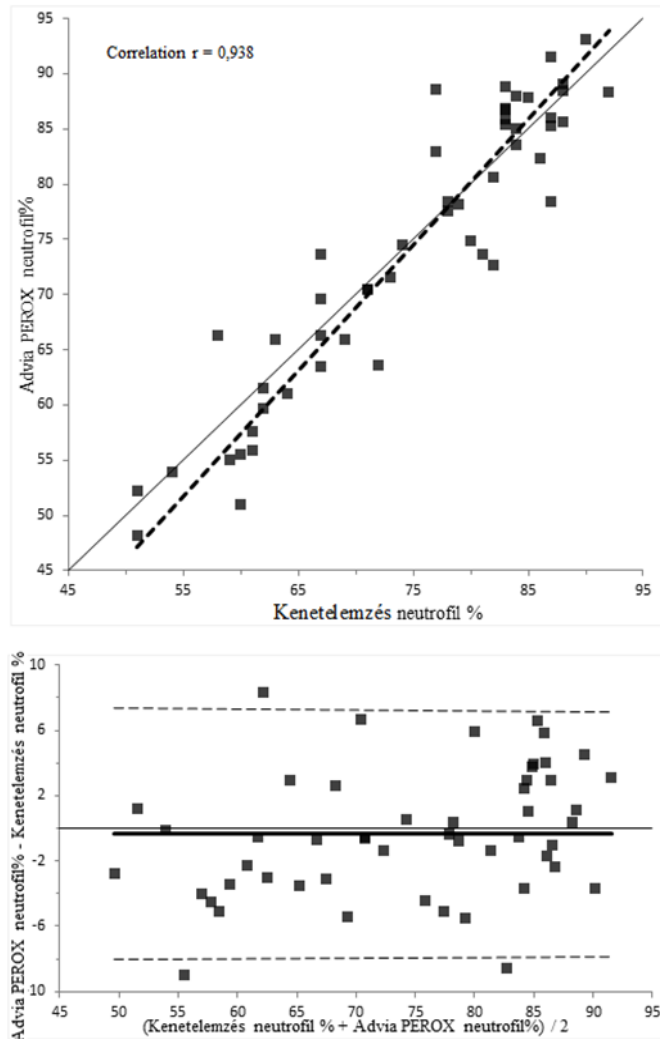
Összehasonlító elemzést végeztünk az egyes csoportokban az ADVIA 2120i által neutrofilként definiált és a kenet elemzés során neutrofil granulocitaként jellemzett sejtek százalékos arányát tekintve. A mieloperoxidáz deficienciát mutató csoportban a kenetelemzés és az ADVIA PEROX csatorna által meghatározott neutrofil granulocita százalékos arányok között nem állapítható nem lineáris kapcsolat, illetve a két módszerrel kapott eredmények szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,0001$) (8. diagram).



8. diagram

ADVIA 2120i PEROX módszerrel meghatározott és a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita %-os értékeinek összehasonlítása mieloperoxidáz hiányt mutató egyedekben

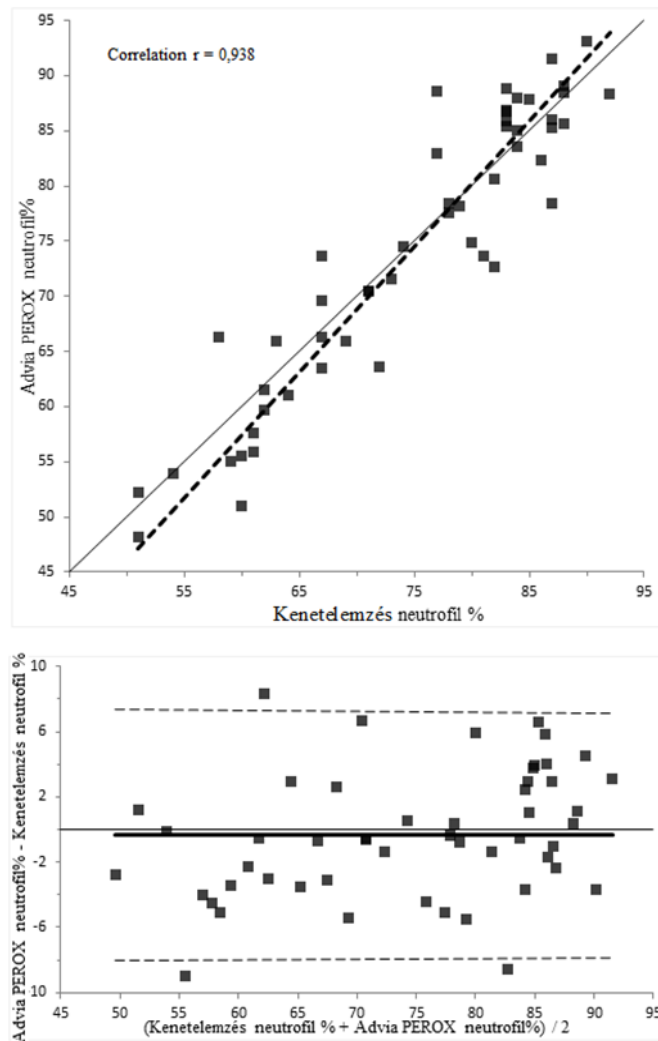
A második vizsgált populációt olyan állatok alkották, amelyek valamilyen akut gyulladással kórképben szenvedtek, de az átlagos mieloperoxidáz aktivitásuk normális volt. Ebben a csoportban a gép által mért neutrofil granulocita százalékos értékek és a kenetelemzés során kapott eredmények között szoros korreláció mutatkozott, a két módszerrel kapott eredményekben nem volt szignifikáns eltérés ($p = 0,52$) (9. diagram).



9. Diagram

ADVIA 2120i PEROX módszerrel meghatározott és a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita %-os értékeinek összehasonlítása mieloperoxidáz hiányt nem mutató akut gyulladással betegségekben szenvedő egyedekben

Az előző két csoporthoz hasonlóan elvégeztük az összehasonlító elemzéseket egy egészséges kutyákból álló csoporton is. A vizsgálat hasonló eredményt hozott, mint a mieloperoxidáz hiányt nem mutató betegcsoportnál. Szoros lineáris kapcsolat látható a gép által mért neutrofil granulocita százalékos értékek és a kenetelemzés során kapott eredmények között. A két módszerrel kapott eredmények között az egészséges populációban majdnem tökéletes egyezés mutatkozott. (10. diagram)



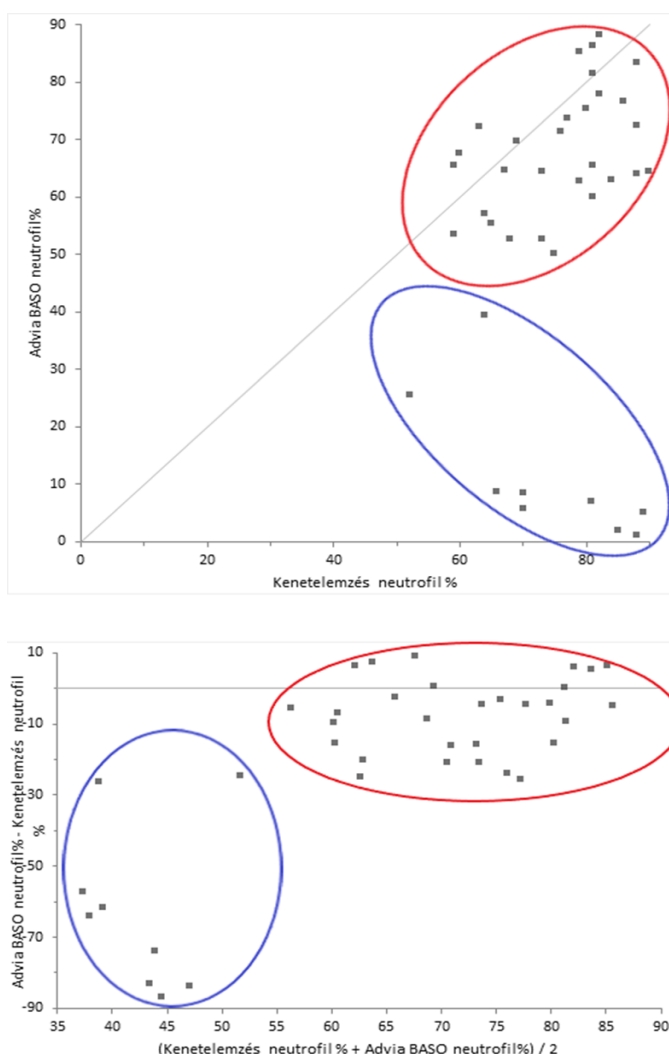
10. Diagram

ADVIA 2120i PEROX módszerrel meghatározott és a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita %-os értékeinek összehasonlítása egészséges egyedekben

Mieloperoxidáz deficiencia elemzési lehetőségei Advia 2120i automatával

A BASO csatorna alkalmazhatóságának vizsgálata

Megvizsgáltuk, hogy az ADVIA 2120i hematológiai automata BASO csatornája által szolgáltatott információk használhatók-e a mieloperoxidáz hiányt mutató esetek elemzéséhez. Ehhez a gép által mért polimorfonukleáris sejt százalékból kivontuk az eozinofil és basofil százalékot, megkaphatuk a BASO csatorna által mért neutrofil százalékot. A mieloperoxidáz hiányt mutató minták esetében az így kapott neutrofil számokat összehasonlítottuk a kenetelemzés során kapott értékekkel. Ennek alapján a BASO csatorna által megadott neutrofil százalék és a kenetelemzés eredményei között nincs lineáris kapcsolat és a vizsgált betegekben mért neutrofilek két populációra oszlottak (11. diagram).

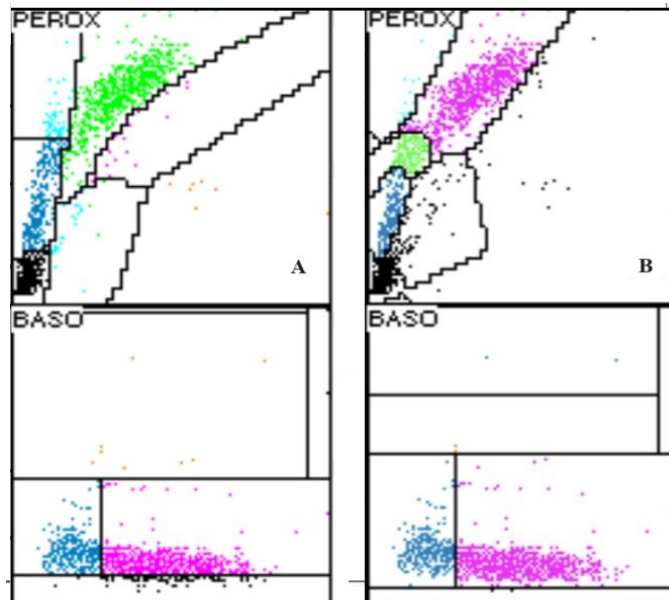


11. Diagram

ADVIA 2120i BASO módszerrel meghatározott és a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita %-os értékeinek összehasonlítása mieloperoxidáz deficiens egyedekben

Macska állatfajhoz kapcsolódó kapuzás alkalmazhatóságának vizsgálata

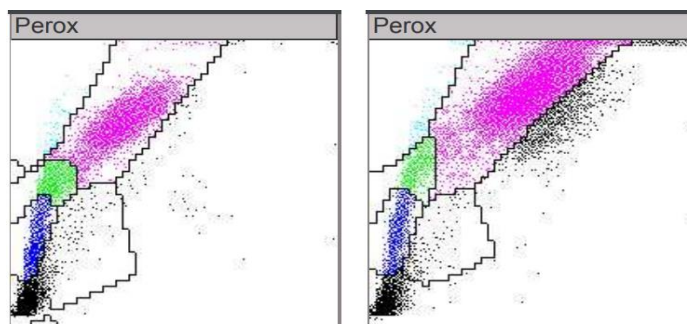
Az ADVIA 2120i automata nem teszi lehetővé az elkülönített fehérvérsejt populációk manuális analizését. Viszont lehetőség van a már lemért minták más állatfajhoz rögzített beállításainak használatára. Jelen vizsgálatban az élettani körülmények között is alacsony neutrofil mieloperoxidáz aktivitással rendelkező macska fajt választottuk. (12. diagram)



12. diagram

Fehérvérsejt populációk meghatározása ADVIA 2120i PEROX módszerrel kutya (A) és macska (B) fajkhoz kapcsolt kapuzással a 2023/15031 számú mintában

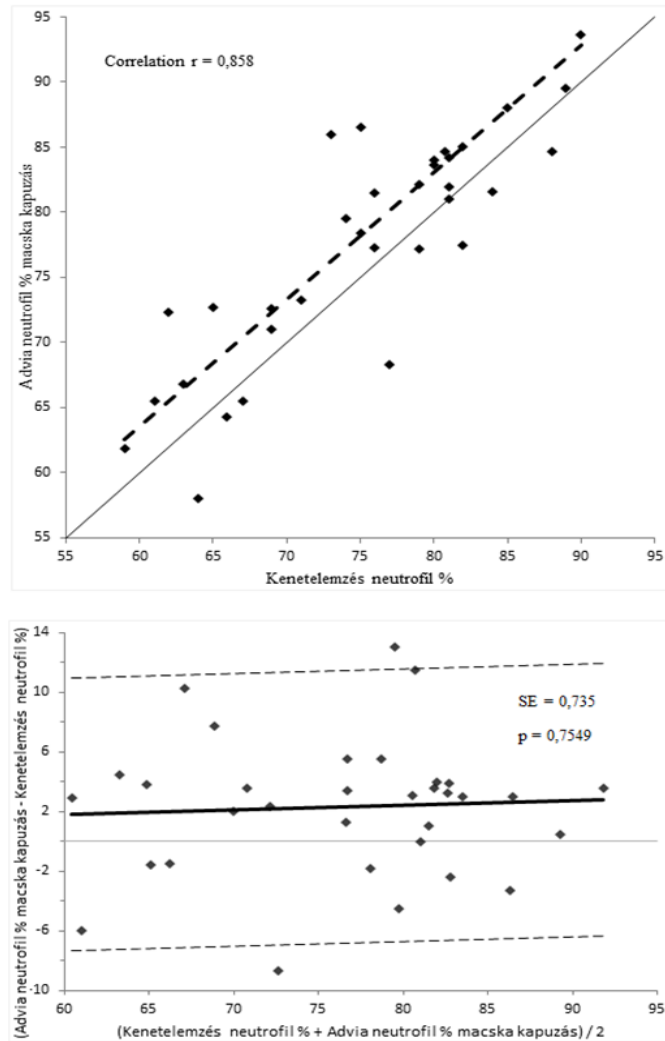
Limitáló tényező a részleges mieloperoxidáz hiány, amely során az automata a klaszteranalízis során nem fehérvérsejtként értékeli a magas enzimaktivitású leukocitákat (13. diagram). Ezt a hibát úgy tudtuk kiküszöbölni, hogy figyelembe vettük a PEROX és BASO csatornán mért össz fehérvérsejtszámot. Az illesztést akkor tekintettük elfogadhatónak, ha a két eredmény eltérése maximum 15% volt, ami a hematológiai vizsgálatoknál a TE_a értéke a fehérvérsejtszám esetén.



13. diagram

Kutya minták fehérvérsejt populációinak meghatározása ADVIA 2120i PEROX módszerrel macska kapuzással

A mieloperoxidáz hiányos populáció kenetelemzésének értékeit összehasonlítottuk, ugyanezen minták macskára fejlesztett beállításon mért értékeivel is (14. diagram). A neutrofil granulociták százalékos aránya a macskához tartozó beállításon és a kenetelemzés során számolt érték nem térnek el egymástól és közöttük szoros korrelációt figyeltünk meg.

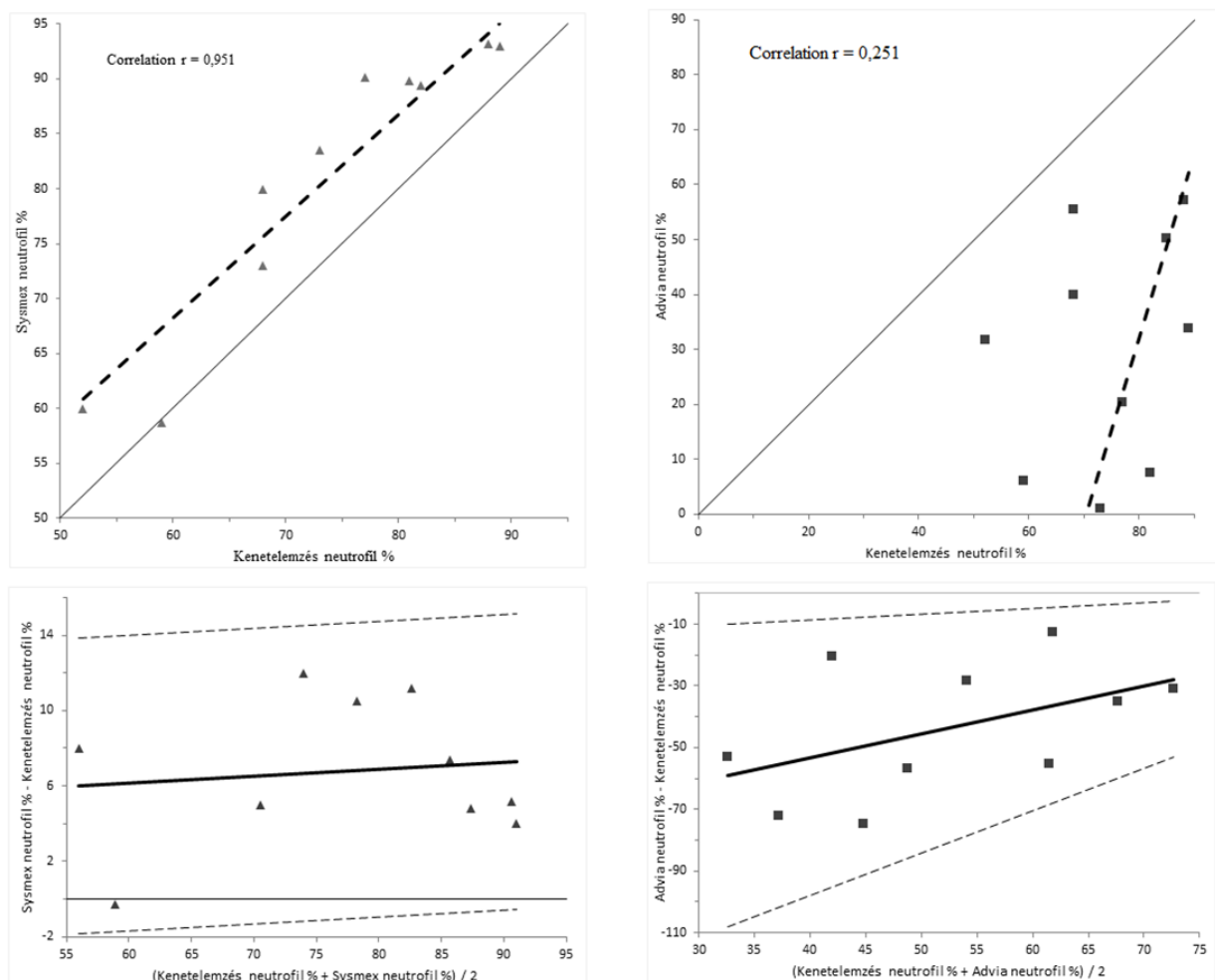


14. diagram

ADVIA 2120i macska állatfajhoz tartozó kapuzással meghatározott és a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita %-os értékeinek összehasonlítása mieloperoxidáz deficiens egyedekben

Mieloperoxidáz hiányt mutató minták összehasonlító vizsgálata ADVIA 2120i és Sysmex XT2000i automatákon

A mieloperoxidáz deficienciában szenvedő állatokból származó mintákból tíz esetben történt mérés a Sysmex XT2000i hematológiai automatával. Ezeket a mérési eredményeket összehasonlítottuk, a kenetelemzés során kapott neutrofil granulocita értékekkel. Ugyanazon mintákból származó mérések alapján elmondhatjuk, hogy míg az ADVIA értékei és a kenetelemzés között az eltérés jelentős volt ($p < 0,0001$), addig a Sysmex értékei nem mutattak jelentős különbséget ($p = 0,32$). (15. diagram). A Sysmex hematológiai automatával is vizsgálat vérminták elemzése jól korrelált a kenetelemzéssel, míg az ADVIA esetén nem volt lineáris kapcsolat.



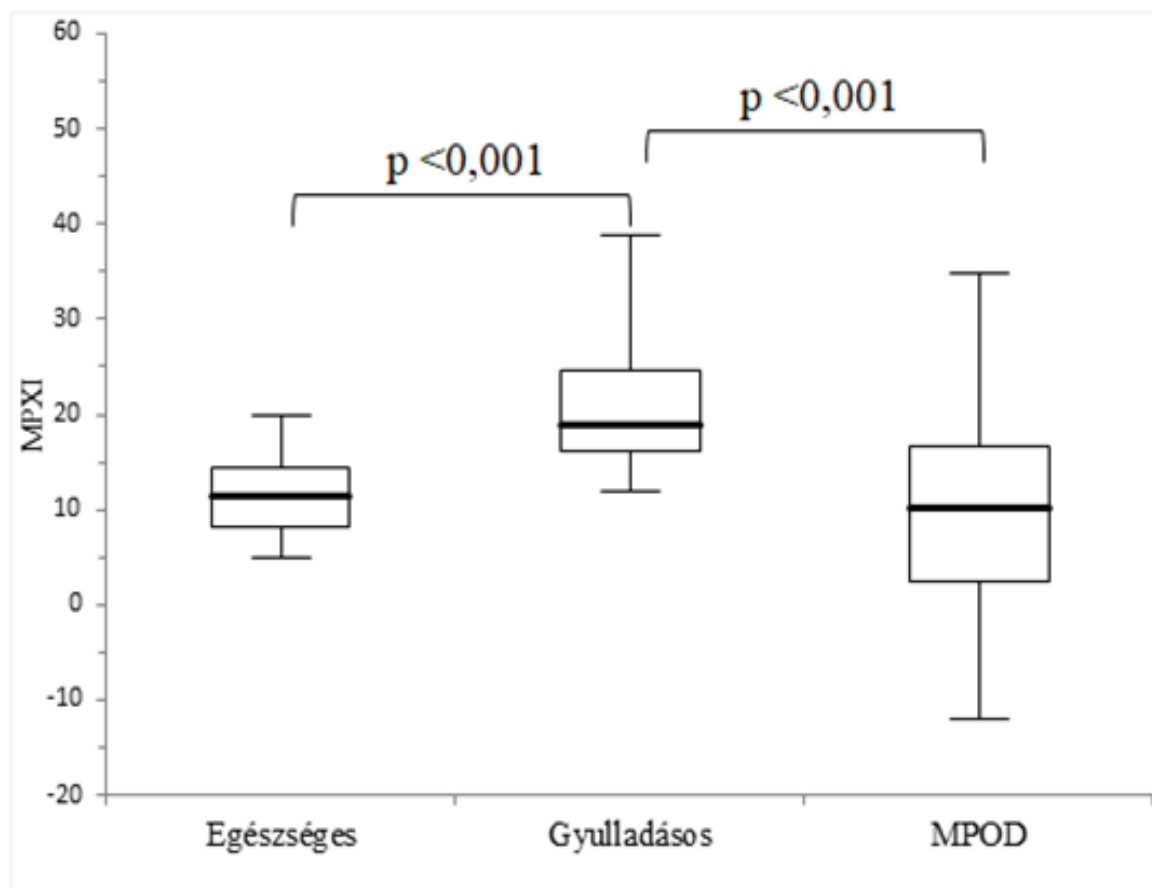
15. diagram

Mieloperoxidáz deficiens egyedek ADVIA 2120i PEROX csatornán mért és Sysmex XT 2000i DIFF csatornán mért adatainak összehasonlító analízise

Az átlagos mieloperoxidáz index (MPXI) informatikai értéke

A mieloperoxidáz szintjének változása a neutrofil granulocitákban

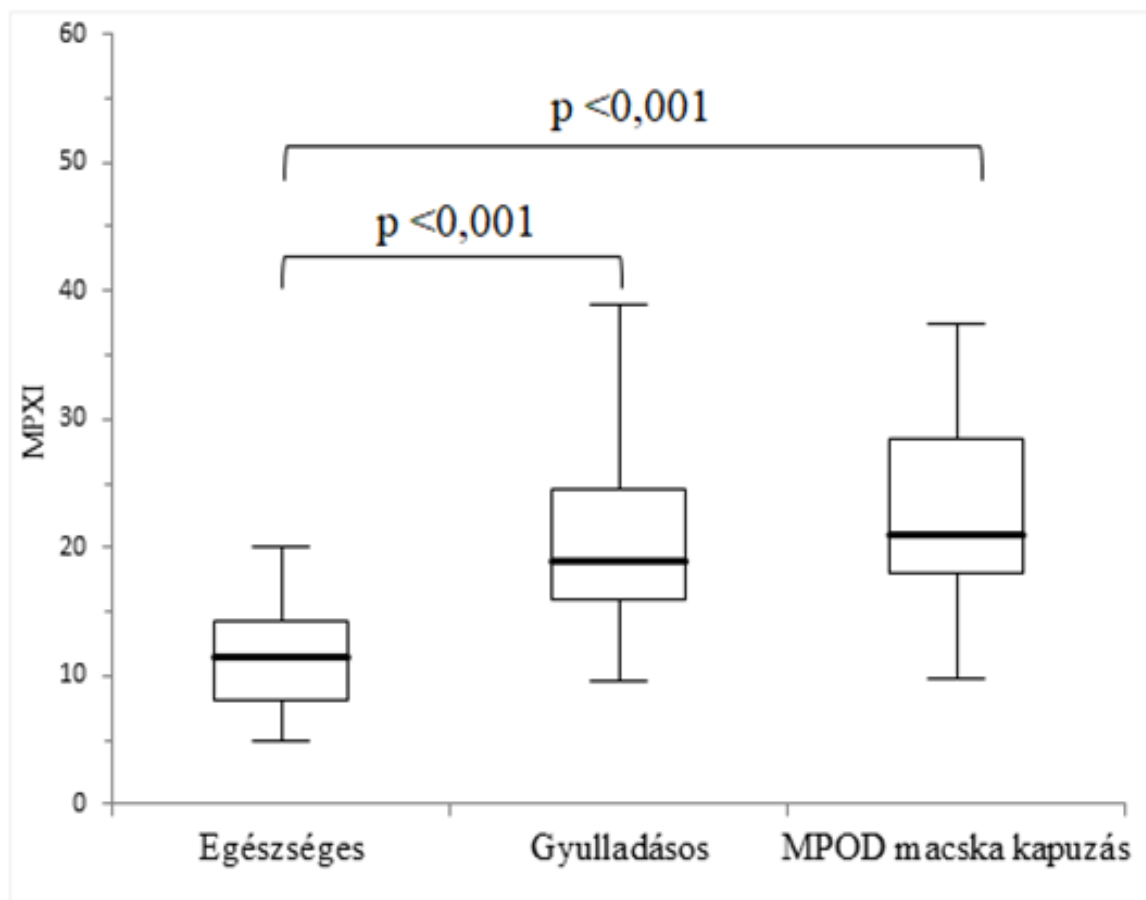
Az MPXI értékek a mieloperoxidáz hiányos populációban negatív, illetve pozitív irányban is eltértek a normális peroxidáz aktivitástól, ez azzal magyarázható, hogy a gép az általa neutrofil granulocita frakcióba sorolt sejtek peroxidáz aktivitását méri, tehát a deficiens neutrofilek, melyek nem kerülnek a megfelelő frakcióba, ebbe az értékbe nem számítódnak bele. Az akut gyulladáshoz vezető állatok esetében az MPXI minden mintában magasabb volt a normál értékeknél. Ebben a populációban negatív MPXI nem fordult elő. A három populáció MPXI értékei között szignifikáns eltérés az egészséges és mieloperoxidáz deficiens, illetve az akut gyulladáshoz vezető és a mieloperoxidáz deficienciában szenvedő állatok értékei között van ($p < 0,001$) (16. diagram). Az egészséges és a mieloperoxidáz deficiens populáció MPXI értékei nem különböztek egymástól.



16. diagram

Átlagos mieloperoxidáz index alakulása egészséges, valamint mieloperoxidáz deficiens és normál mieloperoxidáz készlettel rendelkező akut gyulladáshoz vezető betegcsoportok között

A macska állatfajon újra kapuzott mintáknál is elvégeztük az MPXI közötti különbségek vizsgálatát (18. diagram). Az előző fejezetben leírt elemzést tekintve így a neutrofil klaszterbe sorolódnak a mieloperoxidáz deficiens sejtek is. A fajok közötti különbségek először meghatároztuk az egészséges kutya és macska minták átlagos mieloperoxidáz értékei közötti eltérés mértékét, amely 0,6-nek adódott. Ezt a faktort alkalmaztuk a mieloperoxidáz hiányos csoport MPXI értékeinek számításához. Ebben az esetben már jól látható az MPXI értékek növekedése az összes akut gyulladási csoportban az egészségeshez képest ($p = 0,0001$)

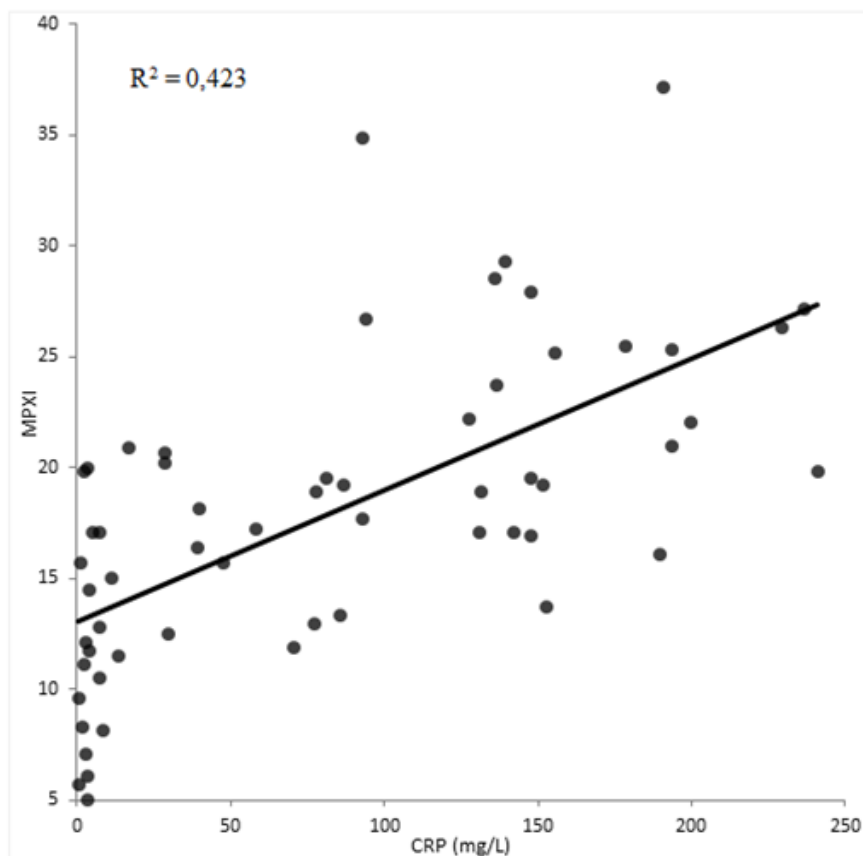


18. diagram

MPXI alakulása egészséges, valamint macska kapuzással értékelt mieloperoxidáz deficiens és normál mieloperoxidáz készlettel rendelkező akut gyulladási betegcsoportok között

Az MPXI és a CRP kapcsolata

Megvizsgáltuk, hogy a kiválasztott populációkban a CRP akut fázis fehérjéhez hasonlóan változik-e az MPXI értéke. A mieloperoxidáz hiányos egyedeknél a macska fajnál alkalmazott kapuzással kapott értékeket használtuk. A CRP és az MPXI értékei között gyenge korreláció látható. Jelentős mértékű szórás látható a normál CRP régióhoz tartozó MPXI értékek esetében.



12. diagram
MPXI és a CRP kapcsolata az összes vizsgált kutyában

Következtetések

Az akut gyulladási folyamatok esetén, mivel ilyenkor a fehérvérsejt felhasználás nő, gyakran találkozunk mieloperoxidáz hiányban szenvedő állatokkal [24]. Mivel a gyulladási folyamatok kezdeti szakaszán elsődlegesen a neutrofil granulociták aktiválódnak [23], és kezdik meg a kórokozó eliminálását, emiatt ezeknek a sejteknek a felhasználása a legjelentősebb [3]. A neutrofil granulocitákban található mieloperoxidáz enzim fontos szerepet tölt be a kórokozók elleni küzdelemben, ezért a sejtekben található enzimmészlet nagyobb mértékben használandó fel [23]. Alapvetően a mieloperoxidáz felhasználó aktivált neutrofil granulociták helyére az egészséges szervezetben, új normális mieloperoxidáz szinttel rendelkező neutrofilek kerülnek [4]. Élettani esetben tehát, akut gyulladási kórképek esetén a neutrofil granulociták aránya nő. A mieloperoxidáz deficiens állatok esetében azonban ez az utánpótlás hiányt szenved, emiatt a keringésben mieloperoxidáz hiányos neutrofil granulociták jelennek meg, amelyek a hematológiai mérések során detektálhatók. Ilyen esetben az ADVIA 2120i hematológiai automata által végzett fehérvérsejt differenciáció során a neutrofil arány általában a referencia intervallumon belüli, vagy enyhén emelkedett. Lilliehöök et. al. kutatása alapján a vérbe juttatott endotoxin a csontvelőből a keringésbe kerülő neutrofil granulocitákban MPO hiányt okozott lovak esetében [36]. Ez magyarázhatja, hogy a gyulladási folyamatok során miért találkozhatunk bizonyos állatok esetén MPO hiányos neutrofil granulocitákkal.

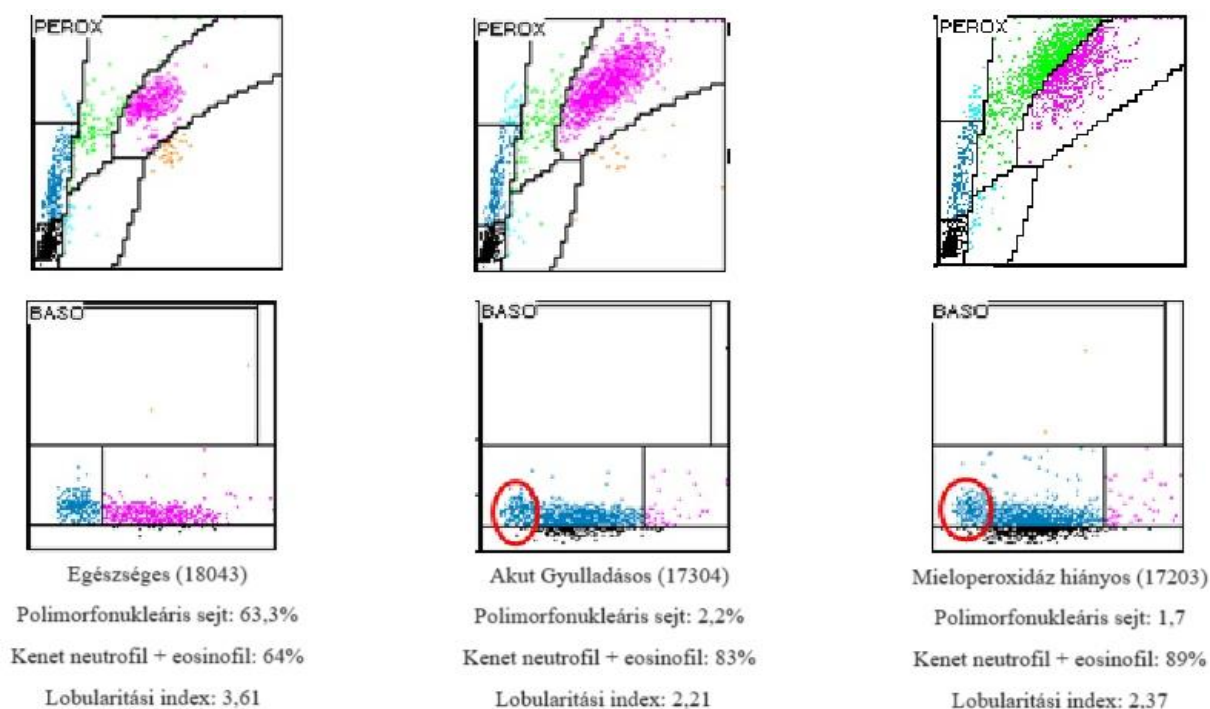
A mieloperoxidáz hiány nem konkrét betegséghez kötődik, szinte bármilyen szisztémás gyulladással küzdő állat esetén megjelenhet. Az általunk vizsgált mieloperoxidáz deficiens populációban előforduló betegségek leggyakrabban az emésztő szervrendszert érintették. Ahogy azt a szakirodalmi adatok is alátámasztják, az állatok kora, illetve neme nem befolyásolta a MPO hiány megjelenésének gyakoriságát [24]. A mieloperoxidáz deficiens populációban viszont az adataink alapján gyakrabban fordultak elő kistestű fajták.

A vizsgált mieloperoxidáz deficienciát mutató vérminták esetében az ADVIA 2120i hematológiai automata által végzett fehérvérsejt differenciáció során a deficiens neutrofil granulociták nem a megfelelő frakcióba sorolódnak. Ezt a jelenséget szakirodalmi adatok is alátámasztják [24]. A deficiens neutrofileket az eredményeink alapján a gép általában a monocita frakcióba sorolja. Ezt bizonyították a kenetelemzés eredményei, illetve a retrospektív vizsgálatok során kapott statisztikai eredmények is. A mieloperoxidáz deficiens populációban a peroxidáz festődés alapján történő neutrofil szám meghatározás eredményei és a kenetelemzés során kapott eredmények között nincs korreláció. A negatív kontroll és az

enzimhiányt nem mutató akut gyulladással esetekben a kenetelemzés és az automata által számított neutrofil arány szoros korrelációt mutat.

A mieloperoxidáz deficiencia jeleit mutató vérminták esetén a laboratóriumi diagnosztikában nem lehet csak a peroxidáz festést alkalmazó automata által kiadott eredményekre hagyatkozni, hanem szükséges a manuális kenetelemzés elvégzése.

A kenetelemzés eredményei és a BASO csatornán mért neutrofil arány között sem találtunk korrelációt. Ez alapján az ADVIA hematológiai automata BASO csatornáján történt mérési adatokból számított neutrofil arány a deficienciát mutató neutrofil granulociták azonosítására nem alkalmas. A deficienciát nem mutató betegek esetében a kenet és a BASO csatorna eredményei szintén csak gyenge korrelációt mutatnak. Ezt magyarázhatja, hogy a BASO csatorna által vizsgált lebonyozottságot, illetve a sejt méretet a degranuláció mellett befolyásolhatja mind a neutrofil granulociták fiatal sejtalakjainak megjelenése, illetve a különböző gyulladással kórképek során a neutrofileket érintő egyéb toxikus változások is. Akut gyulladással kórképek esetén szintén több esetben tapasztalható diszkrépancia a PEROX és a BASO analízis eredménye között (19. diagram).



19. diagram: A PEROX és a BASO csatorna összehasonlítása a vizsgált populációban.

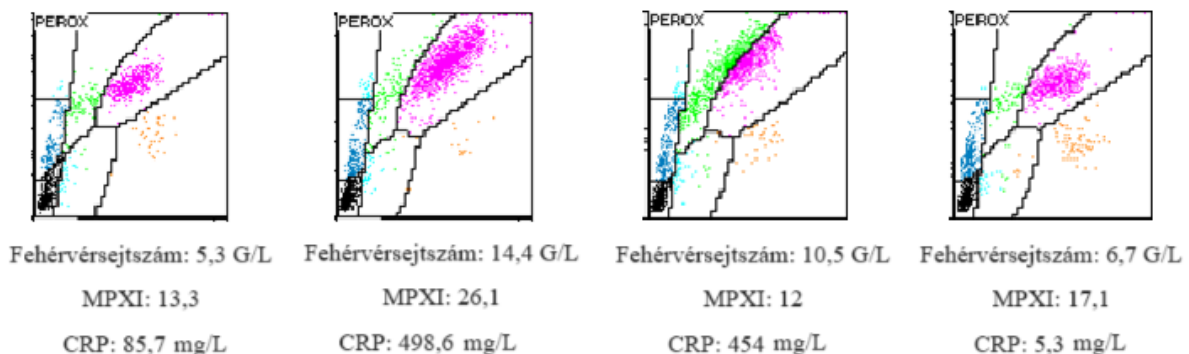
Az ADVIA macskákra optimalizált beállításán végzett mérések eredményei szoros összefüggést mutatnak a kenetelemzéssel. Ennél az állatfajnál alkalmazott kapuk használatával hatékonyabban differenciálhatóak a mieloperoxidáz hiányban szenvedő kutyák fehérvérsejtjei.

Technikailag könnyen kivitelezhető a leletek módosítása, a könnyebb megértés érdekében, a limitáló tényezőket figyelembe véve.

A SysmexXT 2000i hematológiai automatával végzett mérések és a kenet elemzés közötti szoros összefüggés alapján elmondhatjuk, hogy a magfestésen alapuló sejt differenciálási technikának [32] köszönhetően a mieloperoxidáz hiányból adódó mérési hibák nagy része kiküszöbölhető, ugyanakkor a mieloperoxidáz hiányos állapotok nem felderíthetőek egyértelműen. Azonban felmerül a kérdés, hogy a mieloperoxidáz hiány, mint információ elvesztése okoz-e nehézséget a hematológiai eredmények megfelelő értékelésében, illetve a későbbi klinikai döntések meghozatalában.

Mivel jelen szakdolgozathoz klinikai betegek vérmintáit használtuk fel, ezért a betegek utókövetésére nem volt lehetőség. Emiatt azt nem tudtuk megállapítani, hogy az esetlegesen mieloperoxidáz deficiens állatok közül hány olyan fordult elő, ahol nem az adott betegség okozta az ideiglenes mieloperoxidáz hiányt, hanem esetlegesen genetikai enzimhiányos állapot felel a laboratóriumi eltérésekért. Ez az enzimhiányos állapot hozzájárult esetlegesen az állat alapbetegségének romlásához és a kórházi ellátás szükségességéhez.

A 20. diagramon is jól látható, hogy a mieloperoxidáz hiány a gyulladásos folyamat adott szakaszában jelentkezik átmeneti jelleggel. A jelenlévő mieloperoxidáz hiány minden esetben a fennálló gyulladásos folyamatra utal.



20. diagram: Mieloperoxidáz hiányos állat scattergram, MPXI és CRP értékei a gyulladás különböző fázisaiban

Annak ellenére, hogy a neutrofil granulociták egy részét a gép a monocita frakcióba sorolta, a neutrofil szám a gép által mért értékek alapján referencia intervallumon belülinek adódott.

Ez magyarázható azzal, hogy az aktivált neutrofil granulocitákból a degranuláció során kiszabaduló mieloperoxidáz enzim a még keringésben lévő neutrofilek élettartamát meghosszabbítja [5]. Ehhez hozzájárul még, hogy a gyulladós folyamatok során a neutrofil granulociták jelentősen nagyobb számban vannak jelen a keringésben, tehát, ha egy részüket nem is azonosítja megfelelően a rendszer, a normál értéket elérheti a számuk. Ettől függetlenül ilyen esetekben a kenetelemzéshez képest mindig alacsonyabb neutrofil arányt számít a gép.

Az átlagos mieloperoxidáz aktivitási index alapvetően gyulladós folyamatokban tér el a normális értéktől, az eltérés lehet negatív vagy pozitív irányú is. Az eredmények értékeléséhez azonban fontos tudni, hogy az MPXI-t a gép az általa már neutrofil frakcióba sorolt sejtek peroxidáz aktivitásából számítja. Ez alapján tehát, hiába van jelen mieloperoxidáz hiány, ha a neutrofil frakcióba sorolt sejtekben a peroxidáz aktivitás normál, akkor ez az érték ugyanúgy magasabb lesz, mint egy nem mieloperoxidáz deficiens akut gyulladásban szenvedő állat esetén.

Lovakban Schwarz et al. tanulmánya alapján a gyulladós folyamatok kezdeti szakaszában alkalmazható markernek találták az MPXI-t [40]. Egy *Babesia rossi* fertőzött állatokat vizsgáló tanulmányban pozitív korrelációt találtak az IL-10 szintekkel, és a fertőzött állatokban az MPXI magasabbnak adódott az egészséges állatokhoz képest [41]. A saját eredményeink alapján negatív MPXI szintek csak a mieloperoxidáz deficienciát mutató vérminták esetében jelentek meg, kis számban. Magasabb MPXI mind az akut gyulladós, mind a mieloperoxidáz deficiens neutrofil granulocitákat tartalmazó minták esetében előfordult. A szakirodalommal ellentétben az általunk mért MPXI értékek egyértelmű korrelációt nem mutattak, sem az általános gyulladós markerként használt cCRP-vel, sem a gép által számolt neutrofil granulocita aránnyal. Mivel jelen szakdolgozathoz olyan vérmintákat használtunk fel, melyeket a klinikára érkező betegekből, a gyulladós kórképek különböző fázisaiban vettek le, ezért valóban lehetséges, hogy a gyulladás kezdeti szakaszán az eredményeink ellenére az MPXI használható lenne markerként, de ez az általunk kapott eredményekből ez nem megítélhető. Az eredmények alapján tehát a csak egy időpillanatban vett vérmintából mért MPXI sem a gyulladós folyamatok, sem a mieloperoxidáz deficiencia jelenlétének markereként nem használható.

A mieloperoxidáz enzim szérumból mért értéke önmagában humán gyógyászatban több betegség esetén használatos prognosztikai markerként [25]. Az állatgyógyászatban a mieloperoxidáz szintek ilyen jellegű vizsgálatáról még szakirodalmi adat nem áll rendelkezésre. Ahhoz, hogy bizonyos betegségek esetén a szérum mieloperoxidáz szintek az

állatgyógyászatban is alkalmazhatóak legyenek prognosztikai markerként, további vizsgálatok szükségesek.

A hematológiai mérések értékelésekor figyelembe kell venni, hogy a fehérvérsejt differenciációban bekövetkező pontatlanság és az MPXI érték változásai nemcsak a mieloperoxidáz deficiencia következményi lehetnek. A vérminta minősége, a tárolás hossza, a tárolási hőmérséklet, és egyéb preanalitikai hibák is befolyásolhatják az eredményeket. Ezen kívül a gyulladássos folyamatokban a sejtekben gyakran megjelenő toxikus változások szintén befolyásolhatják a hematológiai automata által mért értékeket [34, 35].

Összefoglalás

A neutrofil granulociták fontos részét képezik a szervezet celluláris immunitásának. A mieloperoxidáz a neutrofil granulociták azurofil granulumaiban tárolódik és a különböző kórokozók elpusztításában tölt be fontos szerepet. Gyulladásos megbetegedések esetén a mieloperoxidáz vagy a sejten belül, vagy extracellulárisan használódik fel. Mieloperoxidáz deficiens állatokban a gyulladásos reakció során a neutrofil granulociták MPO tartalma jelentősen alacsonyabb, vagy akár teljesen hiányzik.

Az ADVIA 2120i hematológiai automata a fehérvérsejtek differenciációjához peroxidáz festést alkalmaz. mieloperoxidáz deficiencia esetén az automata által kiadott eredmények jelentősen különböznek a kenetelemzés eredményeiről. A mieloperoxidáz hiányos neutrofil granulocitákat a gép nem a neutrofil frakcióba sorolja, hanem javarészt a monociták közé.

A mieloperoxidáz deficiencia detektálásához és gyulladásos markerként az MPXI értékek nem bizonyultak hatékonyak. A deficiens neutrofilek jelenlétét leginkább a gép által számított értékek és a kenetelemzés közötti különbség, illetve a gép által mért 17% feletti fals-monocitózis mutatta meg.

A deficiens egyedek esetében a fehérvérsejtek pontosabb differenciációjához más módszert kell alkalmazni. Az egyik lehetőség a kenetelemzés, amely során nemcsak a deficiens neutrofil granulociták számlálhatóak le megfelelően, de ezzel a módszerrel a fiatal és toxikus alakok is azonosíthatóak. A kenetelemzés mellett az eredményeink alapján hatékonyan azonosíthatóak a deficiens neutrofil granulociták az ADVIA 2120i hematológiai automata macskákra optimalizált beállításában.

Vizsgálataink alapján a Sysmex XT-2000i hematológiai automata, amely a peroxidáz festés helyett nukleotid festési eljárással differenciálja a fehérvérsejteket, szintén hatékonyan identifikálta a deficiens neutrofil granulocitákat. Ezzel a módszerrel azonban a mieloperoxidáz deficiencia, mint állapot nem megítélhető.

Kutyák esetében jelentősen kevés esetben vizsgálták az akár örökletes, akár a szerzett mieloperoxidáz deficiencia hatását a különböző betegségek lefolyása szempontjából. Tehát azt, hogy a mieloperoxidáz deficiencia megállapítása mennyiben járul hozzá a klinikai döntések meghozatalához, illetve a kórlefolyás súlyosságához, jelen adatok alapján nem tudtuk megállapítani. Ehhez további vizsgálatok szükségesek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Szabó Bernadettnek, hogy minden kérdésre türelmesen válaszolt, rengeteg időt és energiát fordított arra, hogy segítsen jelen szakdolgozat elkészítésében.

Köszönöm a Kóréletani és Onkológiai Tanszék munkatársainak, hogy mindig szívesen fogadtak a laborban, és kérdéseimre mindig választ kaptam. Szintén szeretném megköszönni az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai központ munkatársainak, hogy lehetőséget nyújtottak az ottani mérések elvégzésére.

Köszönöm ezen kívül családomnak és barátaimnak, hogy segítettek a szakdolgozat elkészítésében.

Irodalom jegyzék

1. Jones CN, Hoang AN, Martel JM, Dimisko L, Mikkola A, Inoue Y, Kuriyama N, Yamada M, Hamza B, Kaneki M, Warren HS, Brown DE, Irimia D (2016) Microfluidic assay for precise measurements of mouse, rat, and human neutrophil chemotaxis in whole-blood droplets. *J Leukoc Biol* 100:241–247. <https://doi.org/10.1189/jlb.5TA0715-310RR>
2. Victor Hoffbrand, David P. Steensma (2019) Hoffbrand's Essential Haematology, 8th Edition, 8th ed
3. Ishimine N, Honda T, Yoshizawa A, Kawasaki K, Sugano M, Kobayashi Y, Matsumoto T (2013) Combination of white blood cell count and left shift level real-time reflects a course of bacterial infection. *J Clin Lab Anal* 27:407–411. <https://doi.org/10.1002/jcla.21619>
4. Cowland JB, Borregaard N (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 273:11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
5. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon H-U (2013) Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34:398–409. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.002>
6. Thomas CJ, Schroder K (2013) Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol* 34:317–328. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.008>
7. Futosi K, Fodor S, Mócsai A (2013) Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 17:1185–1197. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.010>
8. Gideon HP, Phuah J, Junecko BA, Mattila JT (2019) Neutrophils express pro- and anti-inflammatory cytokines in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques. *Mucosal Immunol* 12:1370–1381. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0195-8>
9. Ethuin F, Gérard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo M-A, Jacob L, Chollet-Martin S (2004) Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest* 84:1363–1371. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700148>
10. Arnhold J (2020) The Dual Role of Myeloperoxidase in Immune Response. *Int J Mol Sci* 21:8057. <https://doi.org/10.3390/ijms21218057>
11. Yaseen K, Mandell BF (2023) ANCA associated vasculitis (AAV): a review for internists. *Postgrad Med* 135:3–13. <https://doi.org/10.1080/00325481.2022.2102368>
12. Mancho C, Sainz A, García-Sancho M, Villaescusa A, Tesouro MA, Rodríguez-Franco F (2010) Detection of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and antinuclear antibodies in the diagnosis of canine inflammatory bowel disease. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 22:553–558. <https://doi.org/10.1177/104063871002200409>
13. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in dogs with immune-mediated inflammatory diseases - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242718302848?via%3Dihub>. Accessed 24 Aug 2023
14. Böhm M, Basson S (2015) Erosive rhinitis resembling granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis) in an Anatolian shepherd dog. *J S Afr Vet Assoc* 86:1187. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1187>
15. Toxic change. In: eClinpath. <https://eclinpath.com/hematology/morphologic-features/white-blood-cells/toxic-change/>. Accessed 26 Sep 2023
16. Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77:598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
17. Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH (1961) Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature*

- 192:535–541. <https://doi.org/10.1038/192535a0>
18. Klebanoff SJ (1967) IODINATION OF BACTERIA: A BACTERICIDAL MECHANISM. *J Exp Med* 126:1063–1078. <https://doi.org/10.1084/jem.126.6.1063>
 19. Thomas EL, Fishman M (1986) Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. *J Biol Chem* 261:9694–9702
 20. Loughran NB, O’Connor B, Ó’Fágáin C, O’Connell MJ (2008) The phylogeny of the mammalian heme peroxidases and the evolution of their diverse functions. *BMC Evol Biol* 8:101. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-101>
 21. Daiyasu H, Toh H (2000) Molecular Evolution of the Myeloperoxidase Family. *J Mol Evol* 51:433–445. <https://doi.org/10.1007/s002390010106>
 22. Pahwa R, Modi P, Jialal I (2022) Myeloperoxidase Deficiency. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
 23. Rizo-Téllez SA, Sekheri M, Filep JG (2022) Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants* 11:2302. <https://doi.org/10.3390/antiox11112302>
 24. Klenner S, Richartz J, Bauer N, Moritz A (2010) Myeloperoxidase deficiency in dogs observed with the ADVIA®120. A retrospective study. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 38:139–146
 25. Siraki AG (2021) The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biol* 46:102109. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102109>
 26. Villiers E, Baines S, Law A-M, Mallows V (2006) Identification of acute myeloid leukemia in dogs using flow cytometry with myeloperoxidase, MAC387, and a canine neutrophil-specific antibody. *Vet Clin Pathol* 35:55–71. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00089.x>
 27. Tafazoli S, O’Brien PJ (2005) Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Drug Discov Today* 10:617–625. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03394-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03394-5)
 28. Şenol A, Ö Balin Ş (2023) Relationship between disease severity and myeloperoxidase in chronic viral hepatitis: a prospective study. *Biomark Med* 17:319–324. <https://doi.org/10.2217/bmm-2022-0884>
 29. Historical perspectives in hematology laboratory automation: The barriers and breakthroughs. <https://scopiolabs.com/lab-workflow/historical-perspectives-in-hematology-laboratory-automation-the-barriers-and-breakthroughs/>. Accessed 13 Sep 2023
 30. Optimizing Optical Technology for Automated Hematology Analyzers | Technology Networks. <https://www.technologynetworks.com/diagnostics/articles/optimizing-optical-technology-for-automated-hematology-analyzers-322252>. Accessed 13 Sep 2023
 31. VÉRsejtek laboratóriumi mérése vérkép automaták és a Flow cytometria klinikai laboratóriumi alkalmazása - PDF Ingyenes letöltés. <https://docplayer.hu/3264999-Versejtek-laboratoriumi-merese-verkep-automatak-es-a-flow-cytometria-klinikai-laboratoriumi-alkalmazasa.html>. Accessed 27 Aug 2022
 32. Hill VL, Simpson VZ, Higgins JM, Hu Z, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M (2009) Evaluation of the Performance of the Sysmex XT-2000i Hematology Analyzer With Whole Bloods Stored at Room Temperature. *Lab Med* 40:709–718. <https://doi.org/10.1309/T0FJYP2RBXEHX4>
 33. Stirn M, Moritz A, Bauer N (2014) Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms. *BMC Vet Res* 10:125. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-125>

34. Chu SAA, Stokol T (2021) Assay variability and storage stability of the myeloperoxidase index of the ADVIA 2120i hematology analyzer in canine and equine whole blood samples. *Vet Clin Pathol* 50:28–36. <https://doi.org/10.1111/vcp.12981>
35. Bau-Gaudreault L, Grimes CN (2019) Effect of time and storage on toxic or pseudo-toxic change in canine neutrophils. *Vet Clin Pathol* 48:400–405. <https://doi.org/10.1111/vcp.12755>
36. Lilliehöök I, Tvedten HW, Bröjer J, Edner A, Nostell K (2016) Time-related changes in equine neutrophils after experimental endotoxemia: myeloperoxidase staining, size, and numbers. *Vet Clin Pathol* 45:66–72. <https://doi.org/10.1111/vcp.12334>
37. Malin K, Witkowska-Piłaszewicz O (2022) C-Reactive Protein as a Diagnostic Marker in Dogs: A Review. *Animals* 12:2888. <https://doi.org/10.3390/ani12202888>
38. Witkowska-Piłaszewicz OD, Żmigrodzka M, Winnicka A, Miśkiewicz A, Strzelec K, Cywińska A (2019) Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet J* 51:293–298. <https://doi.org/10.1111/evj.13062>
39. Piviani M, Segura D, Monreal L, Bach-Raich E, Mesalles M, Pastor J (2011) Neutrophilic myeloperoxidase index and mean light absorbance in neonatal septic and nonseptic foals. *Vet Clin Pathol* 40:340–344. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00343.x>
40. Schwarz BC, van den Hoven R, Schwendenwein I (2012) Diagnostic value of the neutrophil myeloperoxidase index in horses with systemic inflammation. *Vet J Lond Engl* 197:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.010>
41. Celliers A, Rautenbach Y, Hooijberg E, Christopher M, Goddard A (2020) Neutrophil Myeloperoxidase Index in Dogs With Babesiosis Caused by *Babesia rossi*. *Front Vet Sci* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00072>
42. Lehrer RI, Cline MJ (1969) Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* 48:1478–1488. <https://doi.org/10.1172/JCI106114>
43. Wang K, Fang X, Ma N, Lin Q, Huang Z, Liu W, Xu M, Chen X, Zhang W, Zhang Y (2015) Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish Shellfish Immunol* 44:109–116. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.038>
44. Gentilini F, Zambon E, Mancini D, Turba ME (2016) A nonsense mutation in the myeloperoxidase gene is responsible for hereditary myeloperoxidase deficiency in an Italian hound dog. *Anim Genet* 47:632–633. <https://doi.org/10.1111/age.12463>
45. Lanza F (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med Berl Ger* 76:676–681. <https://doi.org/10.1007/s001090050267>
46. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A (2000) Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol* 104:10–15. <https://doi.org/10.1159/000041062>
47. Ibrahim ND, Rahamathulla PM, Njoku CO (1989) Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with canine hepatozoonosis. *Int J Parasitol* 19:915–918. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90119-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90119-7)
48. Caldwell KC, Taddeini L, Woodburn RL, Anderson GL, Lobell M (1979) Induction of Myeloperoxidase Deficiency in Granulocytes in Lead-Intoxicated Dogs. *Blood* 53:588–593. <https://doi.org/10.1182/blood.V53.4.588.588>



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Szegedy-Maszák Flóra

Neptun-kódja: KN8W8V

A témavezető neve és beosztása: Szabó Bernadett, tanszéki mérnök

Tanszék: Kórélettani és Onkológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: A myeloperoxidáz hiány vizsgálata kutyákban ADVIA2120 i Hematológiai automatával

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	03	09	utómunka ismertetése	Kabó Bernadett
2.	2023	03	30	irodalom megbeszélés	Kabó Bernadett
3.	2023	04	13	leletértelmezés	Kabó Bernadett
4.	2023	04	27	összehasonlító vizsg. labor	Kabó Bernadett
5.	2023	05	11	adatgyűjtés, probléma	Kabó Bernadett

Érdemjegy az első félév végén: 5 „j” jelsz. 4

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	09	12	dolgozat vázlat	Kabó Bernadett
2.	2023	09	26	kontroll minták értékelés	Kabó Bernadett
3.	2023	10	10	eredményes értékelése	Kabó Bernadett
4.	2023	10	19	konklúzió, irodalmi összef.	Kabó Bernadett
5.	2023	10	24	reglenszabály, irodalom megbesz.	Kabó Bernadett

Érdemjegy a második félév végén: 5 „j” jelsz. 11

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Mabó' Bauadits
.....

témavezető aláírása

Hallgató aláírása:

Tanszéki előadó aláírása: *Bóvi Állós* Átvétel dátuma:

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!