

---

# **Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták egészségesekben és aggregációgátlót szedő betegekben**

Ph.D. tézis

---

**Dr. Ezer Erzsébet**

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor

Témavezető: Dr. Molnár Tihamér



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

Pécs, 2019

## 1. BEVEZETÉS

A modern prevenciós szemlélet terjedésével, az egyik leggyakrabban alkalmazott gyógyszer a vérlemezke-aggregációgátlók csoportjába tartozik. A kezelés ellenére fennálló magas reziduális vérlemezke-reaktivitás (HRPR= high residual platelet reactivity) háttere nem tisztázott. Az egyénre szabott kezelési elvek segítségével a trombo-vaszkuláris események száma csökkenthető lehet. Ezen elvek mentén fogtunk bele a vérlemezkek funkciójának és morfológiájának egy új megközelítésű komplex vizsgálatába. Ha eredményeink gyakorlatba ültetésével egy kicsit is sikerül javítani a betegek kimenetelén, akkor már elégedettek lehetünk.

A trombociták a megakariocitákból képződnek a csontvelőben. Egyik fő funkciójuk a hemosztázisban van. A trombociták átlagos élettartama a keringésben 7-10 nap. Kvantitatív értékben meghatározott normál tartomány 150-400 G/l. A vérlemezkek labordiagnosztikája széles palettát ölel fel: vérlemezke-szám, átlagos vérlemezke-térfogat, aggregometriai (funkcionális) vizsgálatok, áramlási citometria, ADP-t és szerotonint vizsgáló módszerek, valamint ide sorolható a vérlemezkek elektronmikroszkópos analízise is. A trombociták aktivációjuk során változást mutatnak méretükben, alakjukban és aggregációjukban. Trombo-inflammatorikus aktivitásuk a vaszkuláris betegségek kialakulásában jelentőséggel bír. Ezek tisztázása hozzájárulhat a személyre szabott gyógyszeres kezelési stratégia kialakításához. Az éretlen vérlemezkek az érett vérlemezkekhez viszonyítva pro-trombotikus aktivitást mutatnak. Az éretlen vérlemezke-frakció (IPF=immature platelet fraction) magasabb aránya a koronária és a stroke betegekben a kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke reaktivitás egyik oka lehet. A közelmúltban megjelent tanulmány szerint a clopidogrelre adott gyengített válaszkészség hátterében a megnövekedett IPF állhat.

A trombocitafelépítés karakterisztikájának megismerésében, illetve a morfológiai abnormalitások kimutatásában a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) tekinthető a gold standard módszernek. A vérlemezkek különböző típusú, mennyiségű granulomot tartalmaznak. Míg a dense-granulumok főleg az éretlen trombocitafrakcióra jellemzőek, addig az  $\alpha$ -granulumok száma elsősorban az aggregációs funkcióval hozhatók összefüggésbe. A kis  $\alpha$ -granulum sűrűséggel bíró vérlemezkek az aggregáció tekintetében kevésbé tűnnek aktívnak. Korábbi tanulmányok szerint nagyobb adhézions kapacitással bírnak a magas  $\alpha$ -granulum számmal rendelkező vérlemezkek. Az emelkedett vérlemezke-denzitás az akut koronária

szindrómák esetében is kimutatható volt. Ugyanakkor, a vérlemezkék denzitása a tromboinflammatorikus anyagok (pl. beta-tromboglobulin) szekréciójával csökken.

Korábban, intézetünkben Bogár L. és társai a fehérvérsejtek mozgását vizsgálva a teljes vér egyórás gravitációs szedimentációja során megalkották a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) fogalmát. Ennek klinikai alkalmazása az infekciók kialakulásának korai detektálásban hasznosnak bizonyult olyan kórállapotokban, mint például a szepszis, égésbetegség, valamint a poszt-stroke infekció előrejelzése. Logikusnak tűnt tehát, hogy más alakos elemek, így a vérlemezkék viselkedésének hasonló tanulmányozása klinikai relevanciákat hordozhat.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Hipotézisünk az volt, hogy a leukocitákhoz hasonlóan a vérlemezkék is szeparálódnak valamilyen fiziko-kémiai tulajdonságuk alapján, illetve aktivációjukkal arányosan. Mivel a teljes vér egyórás üleptése után két vérfrakciót (alsó és felső) választottunk szét, mind a teljes vérben, mind pedig a vérfrakciókban külön-külön megmértük a laborparamétereket (TCT szám, MPV, IPF stb), a vérlemezkék aggregációját (Multiplate aggregometria), illetve a morfológiai (TEM, AFM) jellemzőiket. Két tanulmányt terveztünk: egészséges egyéneknél (*Vérlemezkék funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken (Vizsgálat I.)*), illetve iszkémiás stroke miatt clopidogrelt szedő betegeknél (*Vérlemezkék funkcionális és morfológiai eltéréseinek vizsgálata clopidogrelt szedők esetében (Vizsgálat II.)*) a következő kérdésekre kerestünk választ:

### **2.1 Trombociták flotációjának vizsgálata**

Célunk az volt, hogy megnézzük, mi történik a vérlemezkékkel 1 órás üleptés során. A LAR mintájára képeztük a trombocita antiszedimentációs rátát (TAR).

2.1.1 TAR vizsgálata egészséges kontroll csoportban.

2.1.2 TAR vizsgálata clopidogrelt szedő betegek esetében.

2.1.3 A TAR értékek összehasonlítása a két csoport között.

### **2.2 Éretlen trombocitafrakció (IPF) és átlagos trombocitaterfogat (MPV) vizsgálata**

Vizsgálni kívántuk, hogy a trombocitaszám mellett az éretlen trombocitafrakció (IPF), az átlagos trombocitaterfogat (MPV), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR), valamint a magas

fluoreszcencia intenzitást mutató éretlen trombocitafrakció (H-IPF) mutat-e különbséget az ülepités után nyert alsó-és felső vérfrakcióban.

2.2.1 IPF, MPV, P-LCR és H-IPF értékeinek laboratóriumi kimutatása a kontroll csoportban.

2.2.2 IPF, MPV, P-LCR és H-IPF vizsgálata clopidogrelt szedő betegek esetében.

2.2.3 Kérdésünk az, hogy van-e különbség a szedimentálódott és felfelé szálló TCT-ák fenti értékeiben.

### **2.3 Trombocitaaggregáció (TAG) mérése**

Arra kerestük a választ, hogy a teljes vér aggregáció, valamint a szeparáció során kettéválasztott az alsó és felső részben mért aggregáció (AUC, aggregáció, velocity) mutat-e különbséget. Az irodalmi adatok alapján ismert tény, hogy az emelkedett IPF rizikófaktora a súlyos kardiovaszkularis események kialakulásának, így célunk volt azt is megnézni, hogy a clopidogrel hatása és az értetlen vérlemezke eredmények közt van-e összefüggés.

2.3.1 Teljes vér vs. alsó és felső frakció TAG vizsgálata kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegek esetében.

2.3.2 Alsó vs. felső frakció TAG vizsgálata kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegek esetében.

A clopidogrelt szedő betegeket a teljes vér TAG alapján reszponder és non-reszponder alcsoportokra osztottuk.

2.3.3 Kíváncsiak voltunk, hogy az IPF mutat-e különbséget a reszponder és non-reszponder alcsoportok között.

### **2.4 Trombociták morfológiai (TEM: Transzmissziós Elektronmikroszkópia) vizsgálata**

A képképző vizsgálatokkal azt szeretnénk tudni, hogy van-e különbség a szeparálódó trombocita szubpopulációk morfológiájában.

2.4.1 Össze kívántuk hasonlítani, hogy van-e eltérés az alsó és a felső frakcióban lévő vérlemezkék area, perimeter, convex area, convex perimeter tulajdonságaiban.

2.4.2 Vizsgálni kívántuk, hogy a két frakcióban látható sötét ( $\alpha$ -granulumok) és világos (dense-granulumok) granulumok számában van-e eltérés.

## **2.5 Atomerő-mikroszkópia (AFM: Atomic Force Microscopy)**

Ezzel a különleges képalkotó vizsgálatokkal arra szeretnénk volna választ kapni, hogy van-e különbség a szeparálódó trombociták atomerő-mikroszkópos morfológiájában.

## **3. ANYAG ÉS MÓDSZER**

A vizsgálati protokollt a Pécsi Tudományegyetem Klinika Központ Regionális és Intézményi Kutatás-Etikai Bizottsága jóváhagyta és engedélyezte a klinikai tanulmányt. (2017.06.10, ügyiratszám: 6735). A betegek alapos tájékoztatást követően a beleegyező nyilatkozat aláírásával adták hozzájárulásukat a vizsgálathoz.

Tanulmányunkat két időintervallumban végeztük.

### *Vérlemezek funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken (Vizsgálat I.)*

A periódus első szakaszába 21 egészséges egyén került vérvételre a trombocita flotációjának, az éretlen trombocitafrakció és az átlagos trombocitaterfogat meghatározására, valamint a vérlemezke aggregometriai vizsgálatára. Az elektronmikroszkópos és az atomerő mikroszkópos felvételekhez szükséges vérvételre 6-6 egészséges személyt vontunk be.

*Vérlemezek funkcionális és morfológiai eltéréseinek vizsgálata clopidogrelszedők esetében (Vizsgálat II.)* A második szakaszba 46 clopidogrelszedő beteg és 15 egészséges kontroll személy került bevonásra.

### **3.1. Beválasztási kritériumok**

#### **Vizsgálat I:**

- tanulmányba önként jelentkező, egészséges egyének kerültek vérvételre

#### **Vizsgálat II:**

- A betegcsoportba olyan krónikus cerebrovaszkuláris kórképpel kezelt felnőttek kerültek beválogatásra, akik már legalább 3 hónapja iszkémiás stroke miatt prevenció céljából napi 75 mg clopidogrel terápiában részesültek. A vizsgálathoz a betegek kiválasztása PTE Neurológiai Klinika Stroke Ambulanciáján kontroll vizsgálatra megjelent személyekből történt, akik időpont egyeztetést követően jelentkeztek vérvétel céljából a PTE Idegsebészeti Klinika Intenzív osztályán.
- Kontroll csoportba egészséges, önként jelentkező személyeket vontunk be.

### 3.2. Kizárási kritériumok mindkét tanulmányban résztvevők esetén:

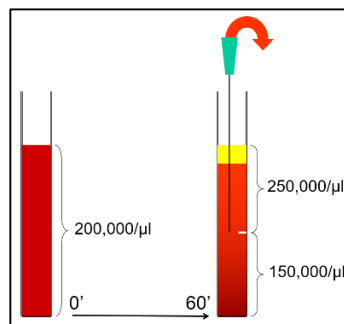
- akut vaszkuláris esemény
- trombocitopénia (PLT<50 G/L – a Multiplate-tel való mérés alsó határa )
- veleszületett trombocitafunkciós zavar
- veleszületett véralvadási zavar
- anémia
- hemorrheológiai paramétereket befolyásoló gyógyszer szedése (OAC, NOAC, NSAID, diuretikumok, antiglikémiás gyógyszer)

### 3.3. Trombocita flotációjának (TAR: trombocita antiszedimentációs ráta) vizsgálata

A tanulmányba bevont személyektől 2x3 ml vér kerül levételre az EDTA-s Vacutainer csőbe (REF: 368856, 5.4md EDTA). A mintavétel a kontroll és a beteganyag esetében a könyökhajlati vénából, rövid leszorítás után 21G-s tűvel, zárt vérvételi rendszerrel történt. Az egyik csőből vérsejtszámláló automatával (Sysmex XN 9000) a PTE Központi Laboratóriumában teljes vérkép meghatározása történt. A másik EDTA-s csőben lévő vért 1 óra hosszan ülepítettük, majd a csőben lévő véroszlop matematikai magasságának felső ½ részét átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe (TF: trombocita felső). Az eredeti cső alsó felében maradt ½ részből (TA: trombocita alsó) és a felső frakcióból (TF: trombocita felső) vérkép mérésével meghatározzuk a trombociták számát, majd „trombocita felső” (TF) – „trombocita alsó” (TA)/ TF+TA egyenlet szerinti értéket (a LAR analógiájára:  $[100*(TF-TA)/(TF+TA)]$ ). kiszámoltuk és százalékban adtuk meg. Az ebből képzett hányadost **Trombocita Antiszedimentációs Rátának (TAR)** neveztük el. A TAR az eredeti trombocitaszám százalékában adja meg azoknak a trombocitáknak a számát, amelyek az egyórás szedimentáció során felfelé átlépték a csőben lévő vérminta felezővonalát (**1. ábra**).

$$\text{TAR (\%)} = \frac{\text{felső rész TCT szám} - \text{also rész TCT szám}}{\text{felső rész TCT szám} + \text{also rész TCT szám}} \times 100$$

1.A ábra



1.B ábra

1. ábra: Az 1.A ábrán a trombocita antiszedimentációs ráta képlete ( $TAR = TCT(F-A)/TCT(F+A) \times 100$ ) látható. A 1.B sematikus ábrán a trombociták szeparálását mutatjuk a Westegren csőben való egy órás ülepítés után

### **3.4. Éretlen trombocitafrakció (IPF: Immature Platelet Fraction) és az átlagos trombocitaterfogat (MPV: Mean Platelet Volume) vizsgálata**

Az éretlen trombocitafrakció mérése a Sysmex XN 9000 integrált hematológiai automata analizátorral történt (Sysmex Co, Japan, 2017) az előző fejezetben leírt vérvételi és szeparációs módszerrel nyert alsó – és felső vérmintából. A trombocitaszám (PLT-F) és az éretlen trombocitafrakció (IPF) meghatározás a készülék fluoreszcens trombocitacsatornáján történt. Ezen a csatornán a trombociták speciális intracelluláris fluoreszcens festése történik, egy CELLPACK DFL reagenssel való előkezelés után, mely a sejtmembrán átjárhatóságát teszi lehetővé. A mérés áramlási citometriával az átmenő fény (FSC: forward scatter), az oldalra szórt fény (side scatter) és az oldalra szórt fluoreszcens (SFL: side fluorescent light) detektálásával történik. A trombocitaszám mellett az éretlen trombocitafrakció is meghatározható, a magas fluoreszcencia intenzitást mutató trombociták „kapuzásával” (az FSC/SFL plot-on az IPF területre eső, magas fluoreszcencia intenzitást mutató trombociták). A trombocitaszám és az éretlen trombocitafrakció (IPF) mellett, az átlagos trombocitaterfogat (MPV), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR), a trombocita görbeeloszlás szélessége (PDW), a trombocitokrit (PCT) valamint a magas fluoreszcencia intenzitást mutató éretlen trombocitafrakció (H-IPF: High-Immature Platelet Fraction) – származtatott paraméterek – is rögzítésre került.

### **3.5. Trombocitaaggregáció (TAG) mérése**

A tanulmányban résztvevőktől 2x3ml vénás vér vettünk egy Hirudin Blood Tube for Multiplate analysis Vacutainer csőbe (REF:06608311). Ezt követően az egyik hirudinos csőből elvégeztük a teljes vér trombocitaaggregációs vizsgálatot (TAG-teljes) a PTE Idegsebészeti Klinikán található készülékkel (Multiplate® Analyzer, Roche). A másik cső hirudinos vért ülepítettük 1 óra hosszan, majd a csőben lévő vér felső ½ részét (a véroszlop felső matematikai felét) átpipettázzuk egy üres hirudinos csőbe. Az így kapott két mintából (alsó-és felső rész) megmértük a tct-aggregációt (TAG-alsó és TAG-felső). Az így kapott eredményekből az **AUC**-t (area under the curve – görbe alatti terület), az **aggregációt** (az impedancia növekedése) és a **velocity**-t (aggregációs görbe maximális meredeksége) használtuk fel kutatásunkhoz. Az

értékek jelölése a következőként történt: AUC-teljes, AUC-alsó, AUC-felső, aggregáció-teljes, aggregáció-alsó, aggregáció-felső, velocity-teljes, velocity-alsó, velocity-felső.

### **3.6. A trombociták transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálata**

A trombocitadús plazma nyérése céljából 6 egészséges személytől történt vérvétel EDTA-s csőbe, az előző részekben ismertetett módszerrel. Egyórás üleptetés után a felső részt átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe, majd az alsó és a felső részt 5 percig 200 G –n centrifugáltuk. Ezt követően mindkét cső felülúszóját egy új natív csőbe tettük, s ezt 1200G fordulattal 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a két csőben alul maradt a trombocitadús plazma, melyet azonnal az elektronmikroszkópos laborba vittük további feldolgozás céljából.

A trombociták fixálása 2.5%-os glutár-aldehiddel történt 4C-on, „overnight”. Eppendorf csőben történt centrifugálás után az üledék postfixálása következett 1%-os ozmium –tetroxiddal 4C-on 60 percig. A fixált szediment 3%-os agarba került, majd 1 mm<sup>3</sup> blokk kivágása és 3x10 percig 0.1M-os foszfát pufferben való mosása következett. Az etil-alkoholos dehidráció és mosás után propilén-oxidba helyeztük és beágyasztuk Durcupan gyantába (Sigma, Budapest, Hungary). A félvékony metszeteket toluidine-kékkel megfestettük és fénymikroszkóppal megvizsgáltuk. Az ultravékony rétegeket rácsokra helyeztük és ólom-citrát és uranyl-acetát „contrasted) és a JEOL JEM 1200EX transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) megvizsgáltuk. A digitális fényképek az iTEM szoftver (Olympus, Japan) segítségével készültek. Az elektronmikroszkópos felvételekkel készült trombocitákról a következő vizsgálatok készültek:

- 1., TEM kép az alsó – és felső részben lévő trombocitákról
- 2., iTEM program segítségével (interpolált polygon) megmértük a felső – és alsó részben lévő 21-21 vérlemezke (50000x nagyítás) platelet area, platelet perimeter, convex area, convex perimeter tulajdonságait.
- 3., Meghatároztuk az alsó – és felső részben lévő 70-70 közel azonos nagyságú (2µm) vérlemezkében (50000x nagyítás) látható sötét (α-granulumok) és világos (dense-granulumok) granulumok számát.



### 3.7. Atomerő mikroszkópia (AFM, atomic force microscopy)

#### Minta és előkészítése

A vizsgálatokhoz a vér egészséges egyének antecubitális vénájából volt levéve, K-EDTA-t tartalmazó csőbe (N=6). Egy órás, szobahőn történő ülepitést követően a vér felső felét azonnal egy másik csőbe pipettáztuk és mindkét felet 150 g-n, 8 percig centrifugáltuk szobahőn, 2-es leállási sebességgel. A trombociták aktiválódásának minimalizálása miatt 0,1 mL felső trombocitadús plazmaréteget pipettáztunk 10 mL of HBS pufferbe (HEPES buffered physiological saline), amely 0,001 M EDTA-t és 0,1 % glukózt is tartalmazott, minkét fél centrifugálása után. Az óvatos fel-leforgatással a mosott trombocitákat a cső aljára centrifugáltuk (szobahő, 2000g, 5 perc). A mosópuffer leöntése és a cső faláról való óvatos leitatása után tiszta mosópufferben szuszpendáltuk a trombocitákat, úgy hogy a trombocitaszám 100 G/l legyen.

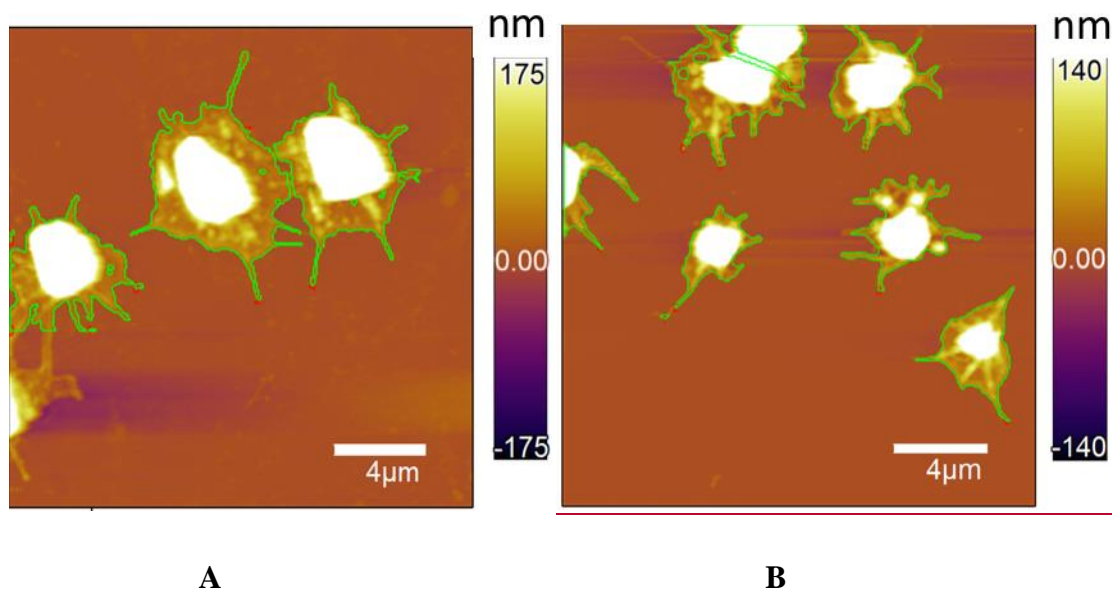
A szuszpenziókból frissen hasított csillámpala korongra (d=12mm) 0,025 mL-t cseppentettünk, nedves kamrában 20 percig hagytuk ülepedni, majd 0,025 mL 2%-os glutaraldehyd oldatot adtunk hozzá, körkörös döntögetéssel kevertük és 30 percig hagytuk fixálódni. Végül a felszínt Milli-Q vízzel mostuk és áramló N<sub>2</sub> gázzal szárítottuk.

#### AFM fotók

A csillámpala felszínre ülepedett, fixált és szárított trombocitákat Cypher ES atomi erő mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA), tapogató módban (AC) pásztáztuk, AR16 programmal. A pásztázáshoz szilikon-nitrid rugólapkát használtunk, amelynek a rugó állandója ~42N/m és a rezonancia frekvenciája ~300kHz (OTESPA-R3, Bruker, Billerica, MA). A szabad amplitúdót 1V-ra állítottuk, 0,5-0,7 V-ra a pásztázási amplitúdót, az erősítést 7-170 - szerezre.

#### AFM adatok analízise

A pásztázás során alkotott képet az AFM AR16 programjával analizáltuk (Igor Pro 6.34 A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR). A pásztázott terület 20x20 µm-es volt, amelyen a programmal megfelelő élesen körbe határuztuk a trombociták területét (**2. ábra**).



**2. ábra** A trombociták kijelölése képanalízisre AFM-mel készült magasság képen. Statisztikai analízisre csak a teljes trombocitákat használtuk. Az ábra A része felső-, a B része az alsó fázisból származó trombocitákat mutatja

A trombociták analízise 18 paramétert eredményezett, amelyek közül felszínen rögzített, diszkoid alakú celluláris elemeket feltételezve a következők lehetnek hasznosak: magasság maximum (Z max), a középpontban (Z Center), átlagmagasság (Z Average); terület (Area), térfogat (Volume), kerület (Perimeter), hossz (Length) és szélesség (Width).

## 4. EREDMÉNYEK

Az alábbiakban a két külön tanulmány eredményeit foglaljuk össze (**Tanulmány I:** *Vérlemezek morfológiai és funkcionális vizsgálata egészségesekben* és **Tanulmány II:** *Clopidogrel szedő és egészséges kontroll csoport vizsgálata*) A két tanulmányban szereplő egészséges kontroll csoport nem azonos.

### 4.1 Vérlemezek funkcionális és morfológiai eredménye egészségesekben

#### 4.1.1 Vérlemezek funkcionális vizsgálatának eredményei

A vizsgálati periódusunk első felében összesen 21 nem dohányzó, egészséges személyt (életkor:  $36 \pm 12$  year, nő/férfi: 12/9) vontunk be kontroll csoportként. A módszertani fejezetben ismertetett módon levett vérminta egyórás szedimentációt követően a felső frakcióban

szignifikánsan több trombocitát találtunk, mint az ülepedett alsó frakcióban. ( $p < 0.001$ ). Az egészségesekben a vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR) átlaga  $50.8 \pm SD: 18.7\%$  volt.

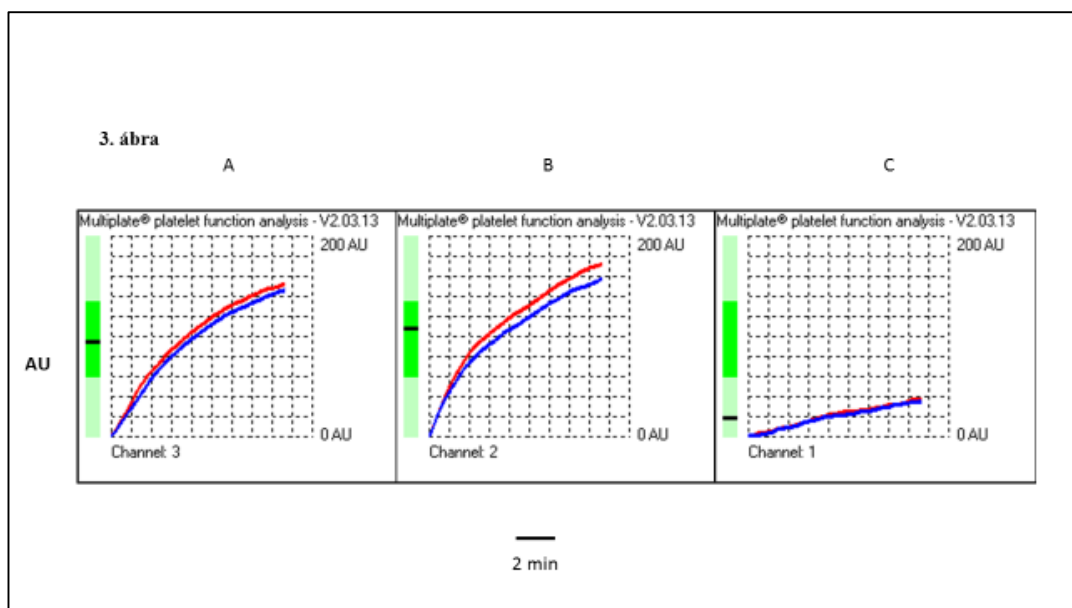
Az átlagos vérlemezke-térfogat (MPV), az abszolút értékű éretlen trombocitafrakció (IPF), valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.005$ ) (**1. táblázat**).

	teljes vér	felső rész	alsó rész	$p^*$
trombocitaszám (G/l)	$239 \pm 76$	$285 \pm 132$	$85 \pm 33$	0,003
MPV (fl)	$10,4 \pm 1,2$	$10,3 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,6$	0,644
IPF (abs)	$8,8 \pm 4,4$	$7,6 \pm 5,3$	$3,5 \pm 2,2$	0,003
H-IPF (%)	$1,5 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,9$	0,021
LCR	$27,5 \pm 4,0$	$26,9 \pm 5,1$	$26,9 \pm 4,9$	1,000

MPV= mean platelet volume, IPF= immature platelet fraction, H-IPF= high-fluorescent IPF, LCR= large cell ratio. Az adatokat, mint átlag $\pm$ SD ábráztuk.  $p^*$  a felső vs alsó rész között.

**1. táblázat: Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke paraméterek**

A vérlemezke aggregometria során a Multiplate analízátor által készített reprezentatív görbéket mutatjuk az **3. ábrán** (A: teljes vér, egy óras szedimentáció után szeparált B: felső illetve C: alsó vérfrakció AUC görbéje).



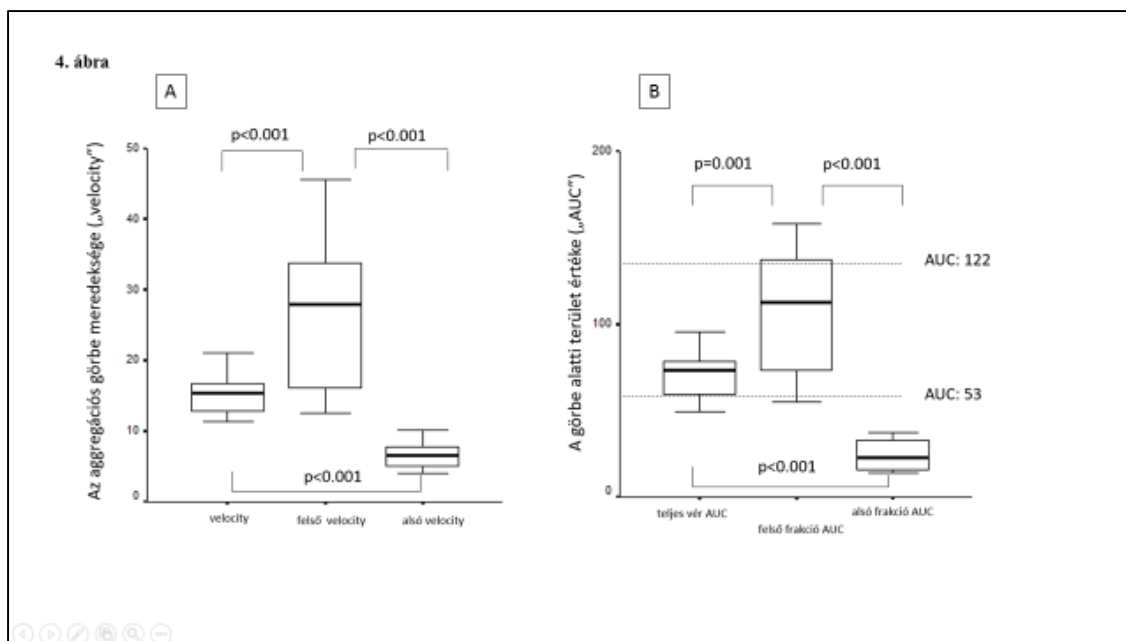
**3. ábra.** A vérlemezke aggregometria során nyert görbék egy egészséges egyénben. Teljes vér (A), a felső frakció (B) és az alsó frakció (C) Multiplate analízátor által készített görbéje.

Impedancia-aggregometria				
	teljes vér	felső rész	alsó rész	p*
AUC	69,9±13,1	103,3±35,8	26,1±9,6	<0,001
aggregáció	130,9±23,7	174,3±53,0	52,2±16,2	<0,001
velocity	15,5±3,8	26,5±10,9	6,5±1,7	<0,001

Az adatokat, mint átlag±SD ábráztuk. p\* a felső vs alsó rész között. AUC= area under the curve

**2. táblázat: Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke-aggregabilitási adatok**

Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk az alsó (átlag AUC: 69,9±SD: 13,1 vs 26,1±9,6) és a felső frakció (69,9±13,1 vs 103,3±35,8) görbe alatti terület (AUC) értékei között a vér egyórás szedimentációját követően (**2. táblázat**). A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek szignifikáns különbséget mutattak mind a teljes vér vs felső illetve alsó, mind pedig a felső vs alsó vér frakciók összehasonlításakor (valamennyi, p<0,001) (**4. ábra A**). Az AUC értékek a felső és az alsó frakcióban szignifikánsan eltértek egymástól (p<0,001). Kiemelendő, hogy a felső frakcióban mért AUC értékek az egészséges kontrollok 38%-ban (n=8) túllépték a normál tartomány felső határát (AUC: 53-122), mely arra enged következtetni, hogy a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében (**4. ábra B**). Annak ellenére, hogy az egészséges kontroll csoport nem részesült antitrombotikus kezelésben, az AUC értékek az alsó frakcióban az effektív antithrombotikus kezelés során várt tartományban voltak (AUC: 0-53) Ez arra enged bennünket következtetni, hogy a szedimentálódott trombociták *ex vivo* nem aktiválhatók ADP hozzáadásával, olyan, „mintha clopidogrel hatásban lennének” (**4. ábra**).



4. ábra A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek a teljes vérben, valamint az 1 óras szedimentáció után szeparált felső illetve alsó frakcióban (A). A görbe alatti terület (AUC) a teljes vérben, valamint az 1 óras szedimentáció után szeparált felső illetve alsó frakcióban (B).

Fontos továbbá, hogy a TAR szignifikáns negatív korrelációt mutatott az AUC, az aggregáció, valamint a görbe meredekségét jelző „velocity” értékekkel az alsó frakcióban ( $r=-0,661$ ,  $p<0,05$ ,  $r= -0,700$ ,  $p=0,01$ ,  $r=-0,636$ ,  $p<0,05$ ). Hasonlóan az előbbihez, a résztvevők kora is negatív korrelációt eredményezett az alsó frakció AUC, aggregációs és a velocity adataival ( $r=-0.553$ ,  $p<0.05$ ,  $r= -0.553$ ,  $p<0.05$ ,  $r= -0.535$ ,  $p<0.05$  respectively). Mindazonáltal a vizsgálati csoportunkban nem találtunk korrelációt az életkor és a vérlemezke antiszedimentációs ráta értékei között.

#### 4.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálat

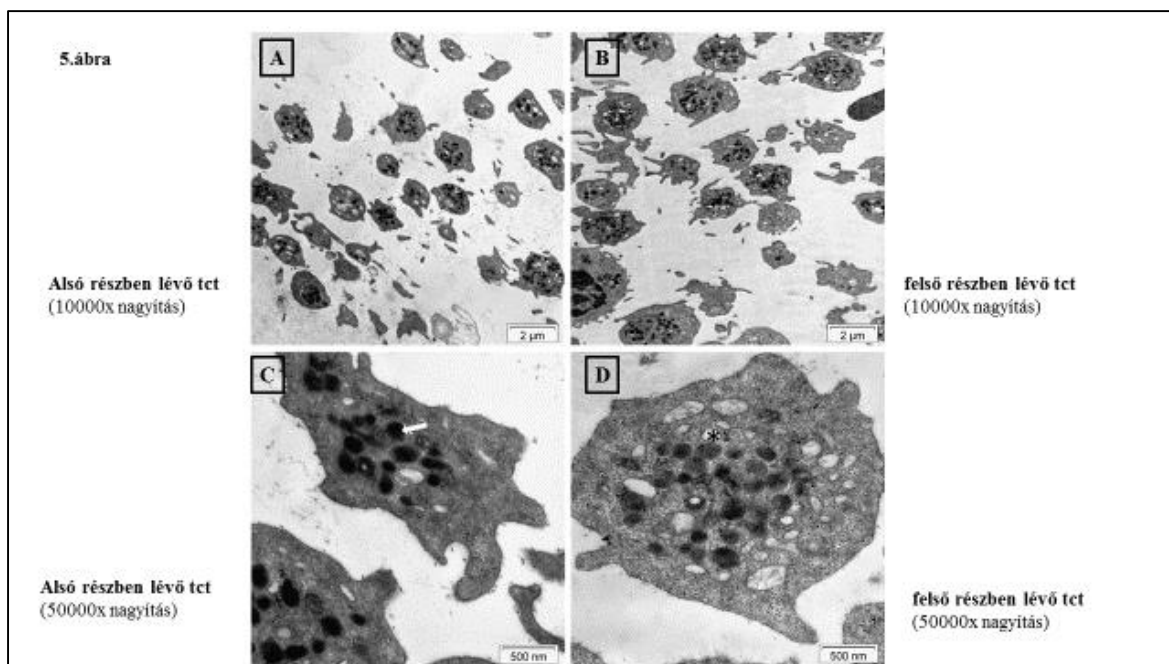
Az egészséges egyének véreből nyert, alsó és felső frakcióból származó trombocitákat transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, morfológiai információk nyerésének céljából. Kis nagyítás során különbséget tapasztaltunk a különböző vérfrakciók mind morfológiai megjelenésében, mind pedig számukban. A trombociták területe és kerülete szignifikánsan nagyobb volt a felső frakcióból származó trombociták esetében az alsó frakcióban mért értékekkel összehasonlítva ( $<0,001$ ). Méréseinket a korábban részletezett iTEM program segítségével végeztük (3. táblázat) Nagyobb nagyítás során határoztuk meg a

trombocitákban lévő  $\alpha$ - és dense granulumok számát. A felső frakcióban elhelyezkedő trombocitákban 1,6-szor több  $\alpha$ - granulumot találtunk az alsókhöz képest (**5. ábra**).

	alsó rész	felső rész	<i>p</i>
<b>vérlemezke-terület (nm<sup>2</sup>)</b>	$2,26 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^5$	$3,69 \times 10^6 \pm 9,3 \times 10^5$	<0,001
<b>vérlemezke-kerület (nm)</b>	$7,21 \times 10^3 \pm 1,55 \times 10^3$	$9,17 \times 10^3 \pm 1,42 \times 10^3$	<0,001

Az adatokat, mint átlag $\pm$ SD ábráztoltuk.

### 3. táblázat Transzmissziós elektronmikroszkóppal nyert adatok egészségesekben

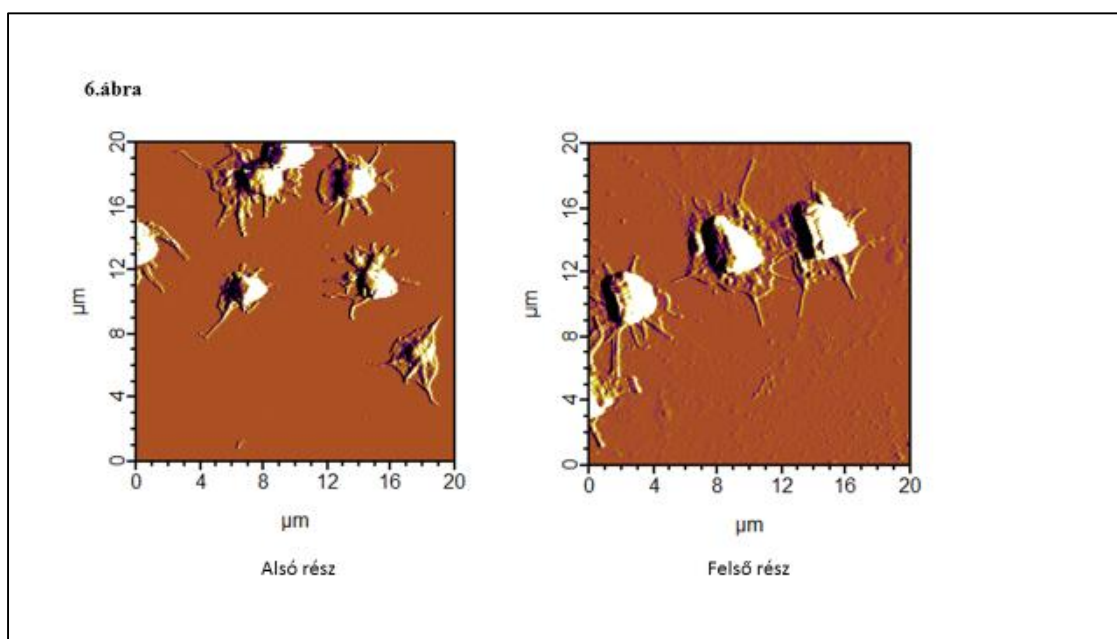


**5. ábra.** Az alsó (A és C) és felső frakció (B és D) trombocitáinak elektronmikroszkópos felvételei. A kis nagyítású képek az alsó (A) és felső (B) frakcióban lévő vérlemezkek számát és méretét mutatja. A C és D jelzés alatt nagy nagyításban megjelenített vérlemezke látható. A nyíl a C jelzésű felvételen egy  $\alpha$ -granulátumra mutat, míg a D-ben lévő csillag egy sűrű granulátumot jelöl. A skála értékek A és B tartományban 2  $\mu$ m, C és D 500 nm.

#### 4.1.3. Atomerő-mikroszkópos felvételek eredménye

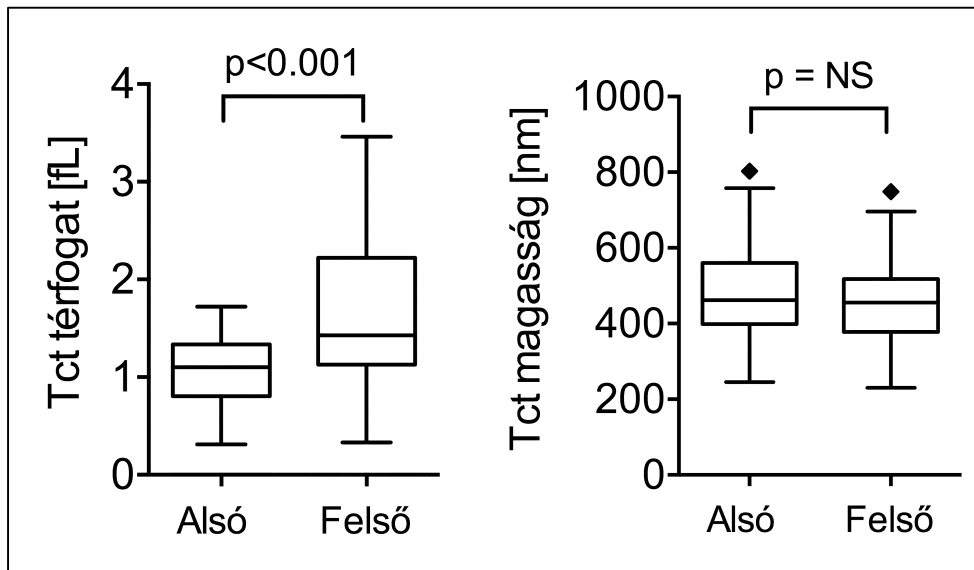
Az egészséges egyének véréből nyert, alsó és felső frakcióból származó trombociták morfológiáját atomi erő mikroszkóppal is vizsgáltuk, mivel az AFM vizsgálathoz az előkészítés a trombocitákat sokkal kevésbé befolyásolja, mint az EM vizsgálatokhoz szükséges előkészítés. Rutin szerint az alap hematológiai paramétereket K<sub>2</sub>-EDTA-s vérből határoztuk meg, ezért a morfológiai vizsgálatokhoz is ilyen vért használtunk.

Az AFM-mel a felszínhez kötődő trombocitákat vizsgáljuk, azonban EDTA-s vérből csak mosott trombociták rögzültek a mica felszínen, 20 perces üleptetés és 30 perc glutáraldehid fixálás után. Azonban ezek is elmozdultak a pásztázás során, így dehidrált trombocitákkal dolgoztunk továbbiakban. A magasság, az amplitúdó, a fázis és a Z szenzor képek egyaránt azt mutatták, hogy mindkét fázis trombocitái rögzülés közben gömb alakot vehettek fel, kiterültek felszínen, majd különböző mértékben összehúzódtak (**6. ábra**). Az összehúzódás mértékére jellemzően látszik a kiterült membrán és annak összehúzódásakor a felszínen kapaszkodó állabak. A képen jól látszik, hogy az alsó fázis trombocitái kiterjedésükben és összehúzódtott formájukban is kisebbségben.



**6. ábra** Trombociták AFM képe a szedimentált vérből

Az AFM programja a felszínen rögzített trombociták magasságáról és kiterjedéséről szolgáltat képanalízisre alkalmas adatokat. A analízishez a fixált és szárított trombocita minták magasság képén kijelöltük az egyedi trombocitákat és a programmal elvégeztettük azok analízisét. Az alsó és felső fázisban lévő trombociták összehasonlításra a térfogatot és a középpontban mért magasságot mutatja az **7. ábra**. Az összehasonlító statisztikai analízis szerint (páratlan t teszt) a felső fázis trombocitáinak térfogata nagyobb volt, mint az alsó fázisé ([fL] átlag±SE:  $1,7 \pm 0,12$  és  $1,1 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ). A közép magasságok nem különböztek szignifikánsan ([nm] átlag±SE:  $456 \pm 20$  és  $484 \pm 0,20$ ). A maximum minimum értékeit adjuk itt meg a magasság maximum- ([nm] 351-885), terület- ( $\mu\text{m}^2$  8-25), kerület- ([ $\mu\text{m}$ ] 12-25), hossz- ([ $\mu\text{m}$ ] 3-7) és szélesség adatokra ([ $\mu\text{m}$ ] 3-5), mert nem különböztek ezek sem.



**7. ábra Trombociták AFM paramétereinek box és whiskers Tukey szerinti grafikus ábrázolása.** Az adatok négy negyedes eloszlásának középső két negyedét mutatja doboz (IQR, interkvartilis tartomány), benne a keresztvonal az adatok mediánját jelzi. A felső és alsó szórás vonalak az  $\text{IQR} \pm 1,5 \times \text{IQR}$  értékeket, az egyedi jelek az ezen kívüli értékeket mutatják.

## 4.2 Clopidogrelt szedők és a kontroll csoport vizsgálati eredményei

### 4.2.1 Demográfiai és laboratóriumi eredmények

Prospektív vizsgálatunkban első lépéseként összesen 46 stroke szekunder prevenció miatt gyógyszeres antitrombotikus kezelésben részesülő beteg adatait (átlag életkor:  $66 \pm 8$ , férfi: 31) hasonlítottuk össze 15 egészséges egyén adataival (átlag életkor:  $40 \pm 13$  év, férfi: 6). A csoportok demográfiai jellemzőit, kiindulási laborértékeit táblázatban összegeztük (**4. táblázat**). Az eritrocita szedimentációs ráta (ESR) szignifikánsan magasabb volt a betegpopulációban ( $p < 0,001$ ), a CRP tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Sem a teljes trombocitaszámban, sem pedig az MPV értékben nem észleltünk szignifikáns különbséget annak ellenére, hogy a kontroll csoport tagjai jelentősen fiatalabbak voltak ( $p < 0,001$ ). Hasonlóan nem találtunk különbséget a BMI, a haematocrit és a leukocytaszám értékében sem. A clopidogrel csoportban a dohányosok száma több, mint négyszerese a kontrollhoz képest. (**4. táblázat**).



	Kontroll (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	p
Életkor	40±13	66±8	<0,001
Nem (férfi/nő)	6/14	31/15	0,06
BMI	25±3	27±4	0,119
Dohányzás (%)	2 (18)	9 (19)	0,586
CRP (mg/l)	1,70 (0,8-3,1)	1,75 (0,7-3,5)	0,237
ESR (mm/óra)	2 (1-4)	10 (6-18)	<0,001
Hematocrit (%)	42,8±0,9	43,6±0,7	0,416
Leukocita (G/l)	6,3±1.2	8,3±1.7	0,251
Vérlemezke (G/l)	282±75	239 ± 65	0,098
MPV (fl)	10,2±1.6	10,7±0.9	0,528

BMI= body mass index, CRP= C-reaktív protein, ESR= eritrocita szedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume. Az adatokat mint átlag±SD illetve abszolút érték (%), kivéve CRP és ESR, melyeket medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk

**4. táblázat: A kontroll csoport és a clopidogrelt szedő egyének demográfiai és laboratóriumi adatai**

#### 4.2.2 Vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR)

A trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoport, valamint a beteg populáció értékei között, azonban a betegcsoportban magasabb TAR tendencia volt megfigyelhető (**5. táblázat**). Mindkét csoportban meghatározásra került az MPV. Ezt összehasonlítottuk a különböző alcsoportokban (teljes vér, alsó frakció, felső frakció). Az MPV értékben (**5. táblázat**) nem találtunk szignifikáns különbséget sem a betegpopulációt összehasonlítva az egészségesekkel, sem pedig a csoportokon belüli összehasonlító elemzések során (teljes vér vs. felső frakció, teljes vér vs. alsó frakció, felső vs. alsó frakció).

	Kontrol (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	p
Felső tct szám (G/L)	316 (218-478)	345 (301-428)	0,68
Alsó tct szám (G/L)	88 (51-124)	71 (54-86)	0,43
TAR (%)	58,5 (45,0-67,5)	67,7 (61,7-72,9)	0,15
MPV (fl) felső	10,7 (10,0-10,8)	10,8 (10,2-11,6)	0,30
MPV (fl) alsó	10,0 (9,8-10,6)	10,5 (9,8-11,2)	0,47
LCR felső (%)	28,9 (24,5-30,6)	33,0 (26,8-38,9)	0,14
LCR alsó (%)	25,5 (22,7-28,7)	30,5 (24,2-36,2)	0,14

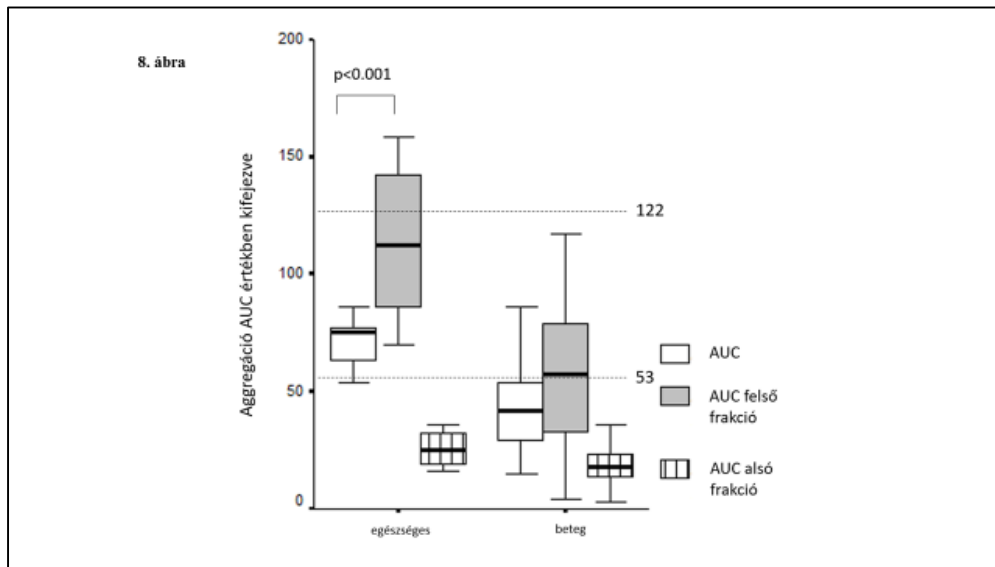
Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. tct=trombocita, TAR=trombocita antiszedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume, LCR= large cell ratio

5. táblázat: Vérlemezke adatok egészségesekben és clopidogrel szedőkben

#### 4.2.3. Impedancia aggregometria betegekben és egészségesekben

Az aggregometriai vizsgálat során (Multiplate<sup>®</sup> Analyzer) szignifikáns különbséget tapasztaltunk a betegek alsó és a felső frakcióiban mért AUC értékek között a vér egyórás ülepítését követően (teljes vér vs. alsó frakció: median 41,5, IQR: 29,0-5,0 vs median 18,0, IQR: 14,0-23,0; teljes vér vs. felső frakció: 41,5, 29,0-54,0 vs 57,5, 33,0-79,0;  $p < 0,001$ ) (**8. ábra**). Szembetűnő, hogy a mért AUC értékek a felső frakcióban a clopidogrelt szedő betegek 59%-ában (n=27) meghaladták a terápiás tartomány felső határát (AUC: 0-53). Kérdés volt, hogy a clopidogrel kezelésre nem reagáló (teljes vér Multiplate alapján non-reszponderek, n=12) betegek és a felső frakcióban mért 53 feletti AUC értékkel rendelkező betegek átfedést mutatnak-e? A 12 non-reszponderből 11-nek a felső frakcióban is 53 feletti AUC értéket mértünk, így a két csoport közötti közötti koincidencia szignifikáns volt ( $P=0,001$ ). Hasonlóképp, a teljes vérből mért AUC értékek a kontroll csoportban szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC értékekhez képest (teljes vér: median 73,5, IQR: 59,5-78,5 vs. felső frakció: 112,5, 73,0-137; teljes vér: 73,5, 59,5-78,5 vs. alsó frakció: 23,0, 16,0-35,0,  $p=0,005$ ) (**8. ábra**). A teljes vér AUC értékek és a felső frakcióban mért AUC értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a gyógyszert nem szedő egészségesekben a clopidogrel szedő betegekkel összehasonlítva ( $p < 0,001$ ) (**6. táblázat**). A felső frakcióban mért AUC értékek az egészséges populáció 40%-ában (n=6) magasabb volt a normál tartomány felső értékénél (AUC: 53-122) (**8. ábra**). Mindeközben, az alsó frakcióban

mért AUC értékek szignifikáns különbséget nem mutattak az egészséges és a betegcsoport között (egészséges vs. beteg: 23,0, 16,0-35,0 vs 18,0, 14,0-23,0). Ezek az értékek a hatásos antitrombotikus terápiás tartományban voltak (AUC: 0-53), még az egészségesekben is (**8. ábra**). Az aggregáció (AU) és a velocity is szignifikáns eltérést (<0,001) mutatott a csoportok közt a teljes vérben és a felső frakcióban egyaránt. Az alsó rész aggregációja és a velocity közt ilyen összefüggés nem volt kimutatható (**6. táblázat**).



**8. ábra** A Multiplate-el mért aggregáció (AUC) a teljes vérben és a felső és alsó frakcióban, az egészséges és clopidogrel szedő csoportokban

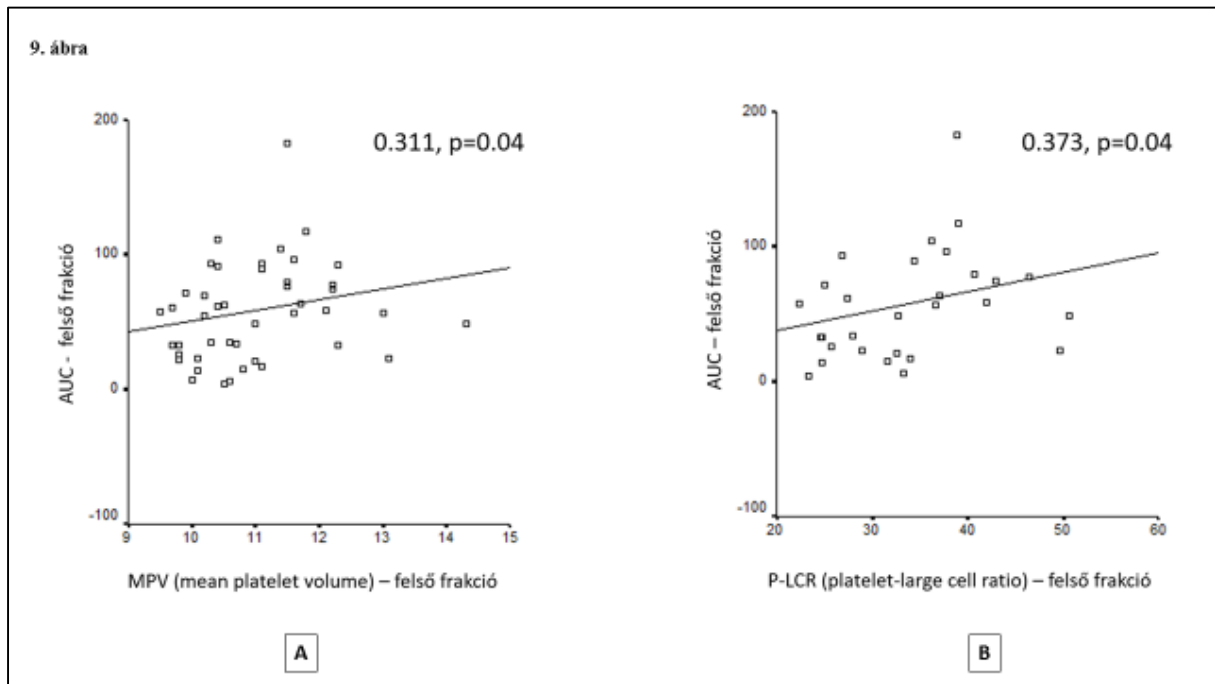
	Kontroll (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	p
AUC	73,5 (59,5-78,5)	41,5 (29,0-54,0)	<0,001
AUC felső	112,5 (73,0-137)	57,5 (33,0-79,0)	0,003
AUC alsó	23,0 (16,0-35,0)	18,0 (14,0-23,0)	0,26
Aggregáció, AU	135 (105-146)	76,3 (59,3-107,3)	<0,001
Aggregáció felső AU	164 (131-203)	100,1 (48,8-138)	<0,001
Aggregáció alsó AU	39,8 (34,1-60,4)	37,4 (30,8-45,8)	0,200
Velocity	15,1 (12,2-16,6)	9,4 (7,4-11,4)	<0,001
Velocity felső	27,5 (17,5-33,6)	12,3 (6,5-21,1)	<0,001
Velocity alsó	5,3 (5,0-7,0)	5,1 (4,3-6,5)	0,254

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. AUC= area under the curve, AU= aggregation unit

**6. táblázat: Impedancia aggregometriai adatok egészségesekben és clopidogrel szedőkben**

#### 4.2.4. Vérlemezke-paraméterek és impedancia aggregometria betegeknél

A vérlemezke-aggregációgátló gyógyszert (75mg clopidogrelt) szedő betegeknél, mind a felső frakcióban mért MPV ( $r=0,311$ ,  $p=0,04$ ) (9.A ábra), mind pedig a felső frakcióból meghatározott PLCR (%) érték ( $r=0,373$ ,  $p=0,04$ ) pozitívan korrelált a felső frakcióban mért AUC értékekkel (9.B ábra).

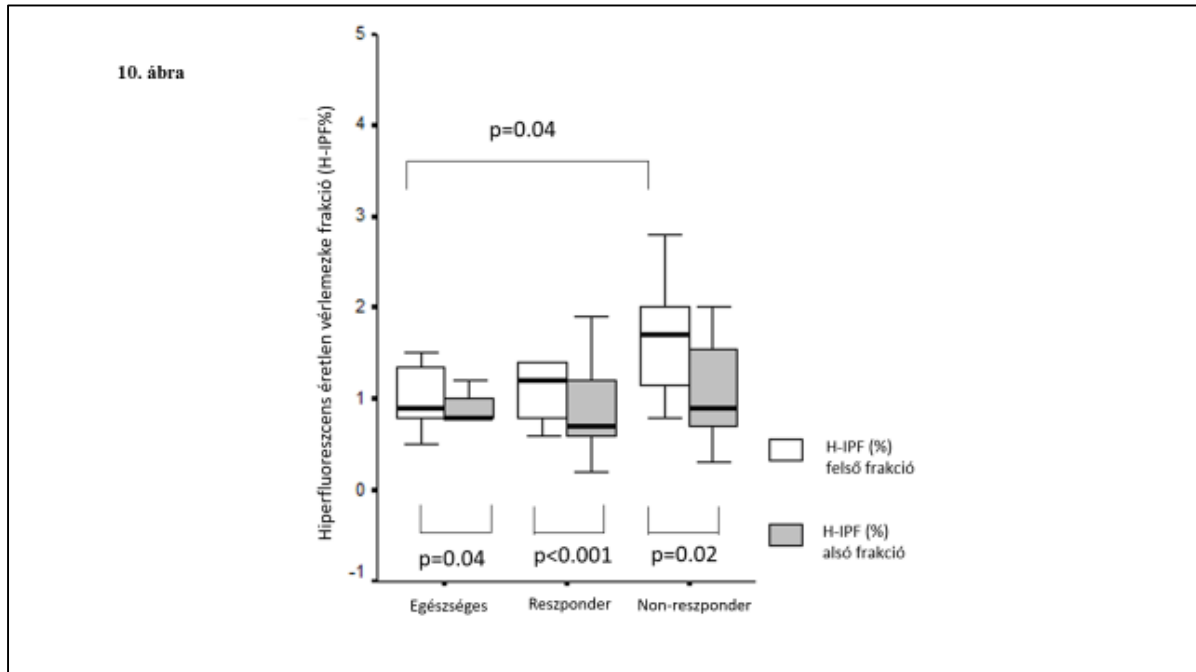


9. ábra A felső frakció AUC eredményének összefüggése a felső rész MPV(A) illetve PLCR% (B) értékével

#### 4.2.5 Reszponder vs non-reszponder betegek

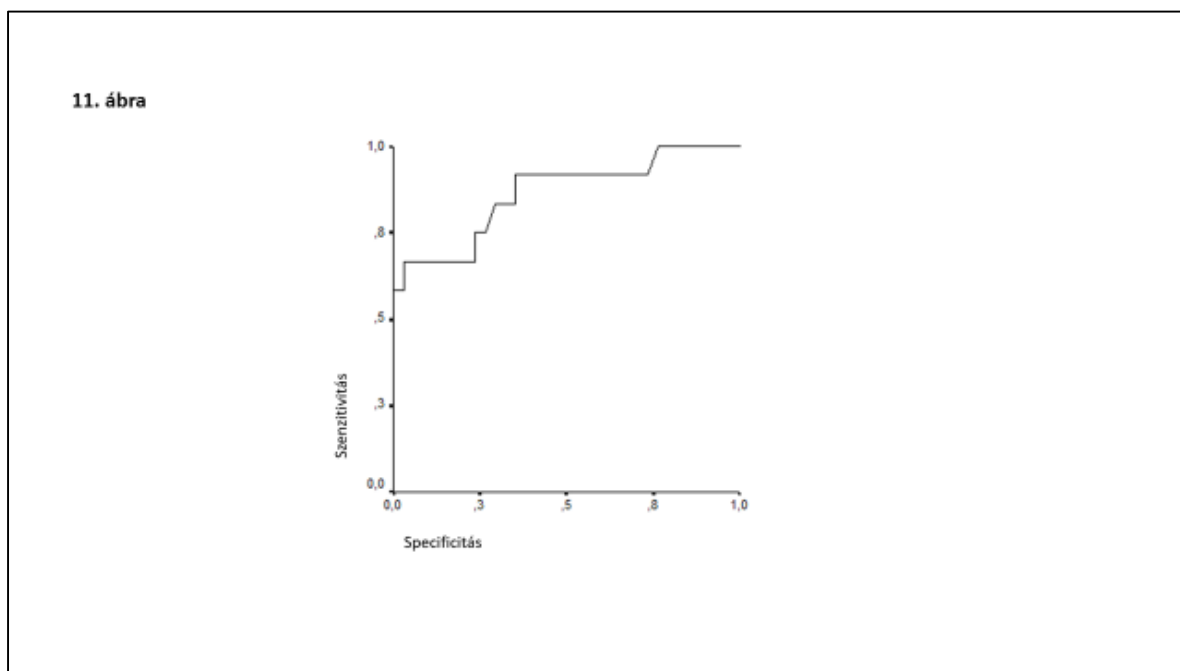
A 75mg clopidogrelt szedő betegeket a Multiplate<sup>®</sup> analízátor segítségével reszponder ( $AUC < 53$ ,  $n=34$ ) és non-reszponder ( $53 \leq AUC$ ,  $n=12$ ) alcsoportokra osztottuk. Ezt követően összevetettük a H-IPF (%) értékét az alsó és a felső frakcióban a hirudinnal antikagulált teljes vér egy órás szedimentációját, majd szeparációját követően az egészséges csoport és a clopidogrel szedő reszponder és non-reszponder alcsoportokban. A felső frakcióban a H-IPF aránya szignifikánsan magasabb a non-reszponder alcsoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva (median: 1,7, 25-75 percentilis: 1,15-2,0 vs 0,9, 0,8-1,35,  $p=0,04$ ). A non-reszponder és a reszponder alcsoport értékeinek összevetésekor a különbség nem szignifikáns, azonban a trend hasonló, mint a fentiekben. A felső és az alsó frakció összehasonlításakor, a H-IPF (%) minden egyes alcsoportban magasabbnak bizonyult a felső frakcióban (egészséges

csoport: 0,9, 0,8-1,35 vs 0,8, 0,8-1,0,  $p=0,04$ ; reszponderek: 1,2, 0,8-1,4 vs 0,7, 0,6-1,2,  $p<0,001$ ; non-reszponderek: 1,7, 1,15-2,0 – 0,9, 0,7-1,55,  $p=0,02$ ) (10. ábra).



10. ábra H-IPF (%) az alsó és a felső frakciókban egészséges kontroll csoportban és a clopidogrel reszponder és non-reszponder alcsoportokban.

Hasonlóképp, a TAR értékek magasabbnak bizonyultak a „non-reszponder” csoportban a reszponderekhez viszonyítva (median: 71,9, 25-75 percentilis: 63,6-74,3 vs. 67,2, 60,3 –71,0,  $p=0,20$ ). A TAR pozitív korrelációt mutat a teljes frakcióból meghatározott MPV értékekkel a teljes betegcsoportban (Spearman korreláció:  $r=0,300$ ,  $p=0,04$ ) és a reszponder alcsoportban ( $0,364$ ,  $p=0,04$ ), azonban ez a korreláció nem volt kimutatható a non-reszponder csoport tagjai között. Az életkor, a TAR, az ESR és a CRP, valamint a felső frakcióban mért H-IPF, LCR, MPV, AUC értékek bevonásával bináris logisztikus regressziót végeztünk a clopidogrel kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke aggregáció (HRPR, non-reszponder státusz) független prediktorának keresése céljából. Ez alapján egyedül a felső rész AUC értéke tekinthető a kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás független rizikófaktorának (OR: 1,06, 95%CI: 1,007-1,120,  $p=0,027$ ). ROC analízis során meghatároztuk, hogy a felső frakcióban mért  $AUC>62$  érték 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással képes előre jelezni a non-reszponder status fennállását (Area: 0,863, 95% CI: 0,728-0,998,  $p<0,001$ ) (11. ábra).



**11. ábra** A felső frakcióban mért AUC érték ROC görbéje a non-responder status előrejelzésére (ROC analízis).

## 5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, ÖSSZEGZÉSEK

### 5.1. Új megállapítások

#### **Trombociták flotációjának vizsgálata**

1. Egy eddig még nem használt új módszer – trombocita antisztedimentációs ráta (TAR) – került bevezetésre a vérlemezke tulajdonságainak vizsgálatára. A vizsgálatok során megállapítást nyert, hogy a szeparációs technikával kettéválasztott vérlemezkek számos tulajdonságukban (lásd az eredmények fejezetet) különböznek egymástól.
2. A TAR a clopidogrelt szedő betegekben, bár nem szignifikánsan, de magasabb, mint egészséges kontrollban (medián: 67,7 vs 58,5%), viszont az életkori átlaguk szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva (66 vs 40 év,  $p < 0,001$ ). További vizsgálatokat indokol annak eldöntése, hogy a biológiai öregedés vagy más tényezők (trombociták öregedése, szisztémás gyulladással vagy vaszkuláris betegség) áll-e a jelenség hátterében?

## **A trombociták morfológiai vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal és atomerő mikroszkóppal**

1. Elektronmikroszkópos vizsgálat először történt antiszedimentációval szeparált trombocitákon. Sikerült kimutatni, hogy a felső frakcióban 1,6x több az  $\alpha$ -granulum, illetve ezen vérlemezkék kerülete, területe is szignifikánsan nagyobb, mint az alsó részben találhatóaké.
2. Az irodalomban eddig nem jelent meg közlemény szeparált trombociták AFM vizsgálatáról. Megállapítottuk, hogy a felső fázisban a trombociták térfogata szignifikánsan nagyobb.

## **Az éretlen trombocitafrakció (IPF), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR) és az átlagos trombocitaterfogat (MPV) vizsgálata**

1. Megállapítottuk, hogy a szeparációt követően nyert felső frakcióban a H-IPF %-os aránya legmagasabb a non-reszponder alcsoportban, mely különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult (median: 1,7 vs 0,9%,  $p=0,04$ ).
2. A felső és az alsó frakció összehasonlításakor a H-IPF (%) minden egyes alcsoport esetén a felső frakcióban bizonyult magasabbnak, tehát a nagyon éretlen trombociták a szedimentáció során felfelé mozognak ( $p=0,04$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,02$ ).
3. A TAR pozitív korrelációt mutatott a teljes vérből meghatározott MPV értékekkel a teljes betegcsoportban ( $r=0,300$ ,  $p=0,04$ ) és a reszponder alcsoportban ( $0,364$ ,  $p=0,04$ ). Ez a korreláció azonban nem volt kimutatható a non-reszponder csoport tagjai között.
4. A második periódusban vizsgált egészséges csoportban az átlagos vérlemezke-térfogat (MPV), az abszolút értékű éretlen trombocitafrakció (IPF), valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva.

## **Trombocitaaggregáció (TAG) mérése a két vizsgálati periódusban**

### I. Egészséges csoport vizsgálati eredményeinek megállapítása:

1. Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk az alsó és a felső frakció görbe alatti területértékei (AUC) között.

2. A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek szignifikáns különbséget mutattak mind a teljes vér vs felső illetve alsó, mind pedig a felső vs alsó vérfrakciók összehasonlításakor.
3. Kiemelendő, hogy a felső frakcióban mért AUC-értékek az egészséges kontrollok 38%-ában túllépték a normál aggregációs tartomány (53-122) felső határát, mely arra enged következtetni, hogy a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében.
4. Az alsó frakcióban mért AUC-értékek olyan tartományban voltak, „mintha effektív aggregációgátlás állna fenn”. Ez arra enged bennünket következtetni, hogy a szedimentálódott trombociták nem aktiválhatók *ex vivo* ADP hozzáadásával.
5. A TAR az alsó frakcióban szignifikáns negatív korrelációt mutatott az AUC, az aggregáció nagysága (AU), valamint a görbe meredekségét jelző „velocity” értékekkel.

## II. Clopidogrelt szedő és egészséges kontroll vizsgálati eredményének megállapítása:

1. Az aggregometriai vizsgálat során a teljes vérből mért AUC-értékek szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC-értékekhez képest.
2. A clopidogrelt szedő betegek felső frakciójában mért AUC-értékek 59%-ban meghaladták a terápiás tartomány felső határát. A felső frakcióban mért 53 feletti AUC-értékkal rendelkező esetek és a clopidogrel kezelésre nem reagálók (non-reszponder betegek) közötti ko incidencia szignifikáns volt ( $p=0,001$ ).
3. Az egészséges populáció 40%-ban a felső frakcióban mért AUC-érték magasabb volt a normál aggregációs tartomány felső értékénél (AUC: 53-122), melyből arra következtethetünk, hogy a felfelé vándorló vérlemezkék *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében. Az alsó frakcióban mért AUC-értékek azonban nem mutattak szignifikáns különbséget az egészséges és a betegcsoport között.
4. Mind a teljes vérben, mind a felső frakcióban, a függőleges tengelyen ábrázolt aggregációs egység (aggregation unit, AU) és a görbe meredekségét jelző „velocity” szignifikánsan alacsonyabb volt a clopidogrel szedőkben, mint egészséges kontrollokban (valamennyi,  $p<0,001$ ). Ezzel szemben az alsó frakcióban mért AU és „velocity” értékek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ez utóbbi



eredményeink azt sugallják, hogy a szedimentálódó (vagy flotációt nem mutató) vérlemezkék az aggregációban nem vesznek részt.

5. Clopidogrelt szedő betegek esetén a felső frakcióban mért MPV és PLCR (%) pozitív korrelációt mutatott a felső frakcióban mért AUC értékkel.

6. A felső rész AUC-értéke tekinthető a kezelés ellenére fennálló reziduális magas tromboticitareaktivitás (HRPR) független rizikófaktorának. A felső frakcióban mért 62 fölötti AUC érték 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással képes előre jelezni a „non-reszponder” status fennállását.

## 5.2. Összegzés

1. Megállapíthatjuk, hogy a teljes vér egyórás szedimentációjával kettéválasztott vérfrakciók vérlemezkéi számos tulajdonságukban (lásd az eredmények fejezetet) különböznek egymástól.

2. Az általunk először leírt új módszer – trombotocita antiszedimentációs ráta (TAR) – az életkorral és bizonyos patológiás változásokkal állhat összefüggésben.

3. A TAR-érték diagnosztikus szerepe a kezelés ellenére fennálló reziduális magas tromboticitareaktivitás (HRPR) további vizsgálatot igényel nagyobb betegszám bevonásával.

4. A teljes vér egyórás szedimentációjával elválasztott felső frakció Multiplate aggregometriával mért AUC-értéke független prediktora a HRPR állapotnak.

5. A teljes vér egyórás szedimentációjával elválasztott felső frakció H-IPF (%) értéke szintén alkalmas lehet a HRPR elkülönítésében.

6. A HRPR a legéretlenebb vérlemezke-alakok számával, flotációjával és fokozott aggregációs tulajdonságaival állhat összefüggésben, ezt morfológiai (EM és AFM) eredmények is alátámasztani látszanak.

7. A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken a felső frakcióban lévő trombotociták területe, kerülete nagyobb volt, mint az alsó rész trombotocitáké, valamint több  $\alpha$ -granulum volt kimutatható bennük.

8. Az AFM tovább pontosítja a szedimentálódott vérlemezkék morfológiai analizisét

## 6. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemény*

**Ezer E**, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. Clin Hemorheol Microcirc. 2019 May 28. doi: 10.3233/CH-190580

**IF: 1,642**

**Cit: 1**

Csecsei P, Pusch G, **Ezer E**, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T.: Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 27(4):951-956. (2018)

**IF: 2,881**

**Cit: 3**

### *Az értekezés alapjául szolgáló, elbírálás alatt álló közlemény*

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M<sup>2</sup>, Ábraham Á, Koller Á, Kellermayer M, Hársfalvi J, Bogár L, Molnár T. Gravity sedimentation reveals functionally and morphologically different platelets in healthy subjects

### *Más témában megjelent közlemények*

Büki A, Barzó P, Demeter B, Kanizsai P, **Ezer E**, Tóth P, Horváth P, Varga C.: [Guidelines for the treatment of traumatic brain injury - 2017]. Ideggyógy Sz.;70(7-8):223-245. (2017)

**IF: 0,252**

**Cit: 3**

Toth P, Szarka N, Farkas E, **Ezer E**, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A. Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 311(5):H1118-H1131 (2016)

**IF: 3,351**

**Cit: 24**

Toth A, Kovacs N, Perlaki G, Orsi G, Aradi M, Komaromy H, **Ezer E**, Bukovics P, Farkas O, Janszky J, Doczi T, Buki A, Schwarcz A. Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? J Neurotrauma. 1;30(1):2-10 (2013)

**IF: 3,968**

**Cit: 67**

Czeiter E, Mondello S, Kovacs N, Sandor J, Gabrielli A, Schmid K, Tortella F, Wang KK, Hayes RL, Barzo P, **Ezer E**, Doczi T, Buki A. Brain injury biomarkers may improve the predictive power of the IMPACT outcome calculator. J Neurotrauma. 10;29(9):1770-8 (2012).

**IF: 4,295**

**Cit: 87**

Auer T, Schwarcz A, **Ezer E**, Czeiter E, Aradi M, Hudvágner S, Janszky J, Büki A, Dóczi T.: [Diffusion tensor and functional MR imaging of severe traumatic craniocerebral injury at low magnetic field]. Ideggyogy Sz. 30;60(11-12):480-8 (2007).

**Cit: 0**

Kasó G, Horváth Z, Kövér F, **Ezer E**, Dóczi T. Application of vertebroplasty, neuronavigation and kyphoplasty in the treatment of multiplex osteoporotic vertebral fractures--case report]. Ideggyogy Sz. 20;59(7-8):282-7 (2006).

**Cit: 1**

Ertl T, Sulyok E, **Ezer E**, Sárkány I, Thurzó V, Csaba IF.: The influence of metoclopramide on the composition of human breast milk. Acta Paediatr Hung. 31(4):415-22 (1991).

**Cit: 24**

Hanley DF, et al. MISTIE III Investigators. Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial. Lancet.; 393(10175):1021-1032 (2019).

**Cit: 35**

van Essen TA, den Boogert HF, Cnossen MC, de Ruiter GCW, Haitsma I, Polinder S, Steyerberg EW, Menon D, Maas AIR, Lingsma HF, Peul WC; CENTER-TBI Investigators and Participants.: Correction to: Variation in neurosurgical management of traumatic brain injury: a survey in 68 centers participating in the CENTER-TBI study. Acta Neurochir (Wien). 161(3):451-455 (2019).

**Cit: 2**

Vande Vyvere T, Wilms G, Claes L, Martin Leon F, Nieboer D, Verheyden J, van den Hauwe L, Pullens P, Maas AIR, Parizel PM; Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI) Investigators and Participants: Central versus Local Radiological Reading of Acute Computed Tomography Characteristics in Multi-Center Traumatic Brain Injury Research. J Neurotrauma. 1;36(7):1080-1092 (2019).

**Cit: 0**

van Veen E, van der Jagt M, Cnossen MC, Maas AIR, de Beaufort ID, Menon DK, Citerio G, Stocchetti N, Rietdijk WJR, van Dijk JTJM, Kompanje EJO; CENTER-TBI investigators and participants. Brain death and postmortem organ donation: report of a questionnaire from the CENTER-TBI study. Crit Care. 16;22(1):306 (2018) (cit:1).

**Cit: 1**

.....  
**Összesített IF: 16,389**

**Összesített Cit: 24**

**Könyvfejezet magyar:**

**Ezer Erzsébet:** Intracranialis nyomásmérés, liquordrenázs. In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 175-179.

**Ezer Erzsébet:** Intracranialis katasztrófák intenzív terápiája In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 317-332.

**Ezer Erzsébet:** Nyaki gerincsérültek intenzív terápiája In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 326-331.

**Ezer Erzsébet:** Az intracranialis nyomás (ICP) mérése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 51-54.

**Ezer Erzsébet:** Sztereotaktikus beavatkozások érzéstelenítése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 157-165.

**Ezer Erzsébet:** Craniocerebrális sérülést szenvedett betegek anesztéziája In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 51-54

**Ezer Erzsébet,** Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Súlyos koponyasérültek primer ellátása In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Emberi életfolyamatok idegi szabályozása – a neurontól a viselkedésig. Interdiszciplináris tananyag az idegrendszer felépítése, működése és klinikuma témáiban orvostanhallgatók, egészség- és élettudományi képzésben résztvevők számára Magyarországon. 2299 p Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1900-1919.

***Könyvfejezet angol:***

Endre Czeiter, Zsuzsanna Ursprung, Noemi Kovacs, **Erzsebet. Ezer**, Ferenc Kover, Janos Sandor, Tamas Doczi and Andras Buki: Outcome Prediction with Marshall CT-classification and Rotterdam Score in Severe Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 978-88-7587-385-1 2007; 353-356.

Büki András, Czeiter Endre, Dán Livia, **Ezer Erzsébet** Haematomas in anticoagulated patients. In: **EANS Training Course Book**: Second EANS Course In Spinal Surgery, Opatija, Croatia, November 6 - 8, 2008. pp. 178-182. Opatija: 2009.

**Ezer Erzsébet**, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primary treatment of severe neurotrauma In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Neural regulation of human life processes – from the neuron to the behaviour. Interdisciplinary teaching material concerning the structure, function and clinical aspects of the nervous system for students of medicine, health and life sciences in Hungary. 2266 p. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1876-1895.

#### ***Könyvfejezet német:***

**Ezer Erzsébet**, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primäre Versorgung nach schweren Schädeltraumata In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Neurologische Regulierung humaner Lebensprozesse – vom Neuron zum Verhalten. Interdisziplinärer Lernstoff zum Thema Aufbau, Funktion und Klinik des Nervensystems für Studierende der Medizin, Gesundheits- und Biowissenschaften in Ungarn. 2453 p. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 2032-2053.

#### ***Magyar folyóiratban megjelent közlemények:***

Ertl, T., Sulyok, E., Hartmann, G., **Ezer, E.**, Sárkány, I., Thurzó, V.: Az anyatej prolaktin és dopamin szintjének változása metoclopramide kezelés hatására. Magyar Nőrv. L. 55: 360-363, 1992.

Decsi, T., Volker Veil, Szász, M., **Ezer, E.**, Méhes, K.: Az anyatej és három különböző tápszer összehasonlító vizsgálata érett újszülöttek táplálásában. Orv. Hetil., 133. 2087-2091. 1992.

**Ezer, E.**, Soponyai, J., Láng, Á.: Fentanyl alkalmazása a szülészeti peridurál anaesthesiában. Magyar Nőrv. L. 57. 133-138. 1994.

**Ezer Erzsébet**, Büki András: Az akut koponyatrauma intenzív osztályos kezelése Aneszteziológia és intenzív terápia 37(4)2007, 193-200

**Ezer E.**, Vámos Z.: Az agyi keringés szabályozása (az agyi autoreguláció élettani és klinikai aspektusai). Aneszteziológia és intenzív terápia 42.(3) 2012, 162-166.

#### ***Kongresszusi előadások/poszterek nyomtatásban megjelent összefoglalói***

Szellár Dóra, Czeiter Endre, Péterfalvi Ágnes, Sándor János, Mezősi Emese, Kövér Ferenc, Kosztolányi Péter, Angyal Miklós, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Dóczi Tamás, Büki András The Pécs Traumatic Brain Injury Databank Clin Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2005;58(5-6):212.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Büki András, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. Clin Neurosci/Idegy Szle 2005;58(5-6):210-1.

Czeiter Endre, Szellár Dóra, **Ezer Erzsébet**, Meszaros István, Kövér Ferenc, Auer Tibor, Schwarcz Attila, Dóczi, Tamás, Büki, András; Analysis of the Pecs severe traumatic brain injury database: the effect of guideline implementation on outcome Journal of Neurotrauma. 2006 May;23(5):758.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, **Büki András**, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. Journal of Neurotrauma. 2006 May;23(5):752

Czeiter Endre; Kovács Noémi; Ursprung Zsuzsanna; **Ezer Erzsébet**; Kövér Ferenc; Sándor János; Dóczi Tamás; Büki András: Prediction of outcome in severe traumatic brain injury based on computed tomographic examinations Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2007;60(S1):14.

Hudak Istvan, Botz Lajos, **Ezer Erzsébet**, Dóczi Tamás.: A novel strategy in the treatment of high grade brain AVMs: combined transarterial and transvenous embolisation by means of a polyurethane based new embolizing agent. WFITN Congress, Beijing, 2007 szept.

Zsuzsanna Ursprung, Endre Czeiter, Janos Sandor, Noemi Kovacs, **Erzsebet Ezer**, Tamas Doczi, Andras Buki :Outcome Prediction in Severe Traumatic Brain Injury: Does Conventional CT Matter? Journal of Neurotrauma. 2008 Jul;25(7):913.

Czeiter Endre, Sándor János, Kovács Noémi, **Ezer Erzsebet**, Dóczi Tamás, Büki András. : The „Pécs severe traumatic brain injury database”: treatment and outcome estimation in case of severe head injury in Hungary Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2008;61(9-10):330.

Kovács Noémi, Ursprung Zsuzsanna, Czeiter Endre, **Ezer Erzsebet**, Demeter Béla, Szabó József, Sándor János, Dóczi Tamás, Büki András. :Outcome prediction in severe traumatic brain injury: does conventional CT matter? Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2008;61(9-10):334.

Molnár Tihamér, Pálinkás Dániel, Pisztrai Levente, Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Büki András. Effect of different fluid resuscitation on brain tissue oxygen depth in patients with severe traumatic brain injury Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2008;61(9-10):337.

**Erzsebet Ezer**, Csaba Loibl, Katalin. Szenohradszki, István Hudák, Tamas Dóczi: Hemodynamic aspects of the endovascular treatment of cerebral arterio-venous malformations and their perioperative care (preliminary study) European Journal of Anaesthesiology, Volume 25, Supplement 44, 2008

Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Sándor János, Kovács Noémi, Geider Attila, Szabó József, Demeter Béla, Dóczi Tamás, Büki András Coagulopathy in severe head injury: a deadly combination? Journal of Neurotrauma 26:(8) p. A99. (2009)

**E. Ezer**, S. Mondello, S. Robicsek, A. Gabrielli, G. Brophy, Linda Papa, J. Tapas, C. Robertson, E. Czeiter, A. Buki, R.L.Hayes, K.K.W.Wang: Brain Tissue oxygenation and putative biomarkers in severe traumatic brain injury Intensive Care Medicine, Volume 36, Supplement 2, September 2010

S. Mondelo, A. Buki, R. Bullock, C.Robertson, P.Barzo, E.Czeiter, **E.Ezer**, J.Streeters, K.Schmidt, F.Tortella, K.Wang, R.Hayes: Elevated Serum Biomarkers Associated with Increased Intracranial Pressure after Severe Traumatic Brain Injury International Conferenc on Intracranial Pressure and Brain Monitoring, September 12-16, 2010, Tübingen/Germany

András Büki, Endre Czeiter, Noémi Kovács, Krisztina Amrein, **Erzsébet Ezer**, János Sándor, Tamás Dóczi: Geriatric Traumatic Brain Injury with special focus on Eastern Europe Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2013;66(3-4):130

**Ezer E**, Csabai L, Cseplo P., Kanizsai P., Szenohradszki K, Vamos Z: Effect of Intravenous administration of NSAIDs on platelet aggregation after herniated disc surgery International Neurotrauma Society (INTS 2014), Budapest, március 19-23., 2014.Journal of Neurotrauma, in press

**Erzsebet Ezer**, Noémi Kovács, Endre Czeiter, Krisztina Amrein, Andras Büki: A fallen elderly patient with coagulopathy – a new dominant type of severe traumatic brain injury? (Analysis of the „Pécs severe head injury database”) International Neurotrauma Society (INTS 2016), Cape Town, 1-4 February 2016. Journal of Neurotrauma,

---

# **Platelets with functional and morphological differences in healthy subjects and patients receiving anti-aggregation therapy**

Ph.D. thesis

---

**Dr. Erzsébet Ezer**

Head of Doctoral School: Prof. Dr. Lajos Bogár

Programme leader: Dr. Gábor Jancsó

Thesis supervisor: Dr. Tihamér Molnár



University of Pécs

Faculty of Medicine

Department of Anesthesiology and Intensive Care

Pécs, 2019

## 1. INTRODUCTION

With the spread of the modern prevention approach, one of the most commonly used drugs belongs to the group of platelet aggregation inhibitors. The mechanism of high on-treatment residual platelet reactivity (HRPR) is unclear. Individualized treatment principles may reduce the number of thrombotic events. Along these lines, we embarked on a novel approach to investigate the function and morphology of platelets. If we put our results into practice to improve patient outcomes a bit, we can be satisfied.

Platelets are formed from megakaryocytes in the bone marrow. One of their main functions is hemostasis. The average platelet life in the circulation is 7-10 days. The normal range is 150-400 G / l. Numerous lab diagnostics used for analysis of platelets such as platelet counts, mean platelet volume, aggregometric (functional) tests, flow cytometry, ADP and serotonin assays, as well as electron microscopy. Activated platelets exhibit changes in size, shape, and aggregation. Their thrombo-inflammatory activity is important in the development of vascular diseases. Clarifying these can contribute to the development of a personalized drug treatment strategy. Immature platelets show pro-thrombotic activity relative to mature platelets. The higher proportion of immature platelet fraction (IPF) may be one of the causes of residual platelet reactivity in coronary and stroke patients despite treatment. A recent study suggests that reduced responsiveness to clopidogrel may be due to increased IPF.

Transmission electron microscopy (TEM) is the gold standard method for understanding the characteristics of platelet ultrastructure and for detecting morphological abnormalities. Platelets contain different types of granules. While the dense granules are mainly characterized by the immature platelet fraction, the number of alpha granules is primarily related to the aggregation function. Platelets with low alpha granule density appear to be less active in aggregation. Previous studies have shown that platelets with a high alpha-granule count have higher adhesion capacity. Elevated platelet density was also detectable in acute coronary syndromes. Importantly, platelet density is decreased by secretion of thrombin-inflammatory substances (eg beta-thromboglobulin).

Earlier, Bogar et al from our institute, who studied the movement of white blood cells during one-hour gravity sedimentation of whole blood, coined the concept of leukocyte antisedimentation rate (LAR). Its clinical application has proven useful in the early detection of the development of infections in conditions such as sepsis, burns, and in the prediction of post-stroke infection. Thus, it seemed logical that similar studies of other blood cells, such as platelets, may have clinical relevance.



## **2. AIMS IN GENERAL**

Similarly to leukocytes, platelets are hypothetically separating based on some physical-chemical properties and this can be proportional with their activation. Therefore, we examined the motion of platelets during one-hour gravity sedimentation (similarly to ESR or LAR). Thus, the aim of the present study were: (i) to describe the motion of platelets during 1-hour gravity sedimentation; (ii) to explore platelet characteristics (e.g. platelet count, MPV, IPF); (iii) to analyse morphological properties (granule constituent and size etc.); and (iv) to investigate their function based on aggregability measurements in the whole blood as well as in the separated upper and lower fraction of samples following 1-hour gravity sedimentation. Two independent studies were carried out: one in healthy volunteers (I. Functional and morphological analysis of platelets in healthy volunteers); another one in patients taking clopidogrel (75mg daily) following acute ischemic stroke (II. Functional and morphological analysis of platelets in post-stroke patients taking clopidogrel vs healthy controls). The specific aims are listed below:

### **2.1 Motion of platelets during 1-hour sedimentation**

What happens to platelets during gravity sedimentation? A modified whole blood gravity sedimentation technique was developed for studying platelet sedimentation properties as calculated platelet antisedimentation rate (PAR).

2.1.1 PAR in healthy volunteers

2.1.2 PAR in post-stroke patients taking clopidogrel

2.1.3 Comparison of PAR between patients and healthy subjects

### **2.2 Immature platelet fraction (IPF) and mean platelet volume (MPV)**

2.2.1 IPF, MPV, P-LCR and H-IPF in healthy volunteers

2.2.2 IPF, MPV, P-LCR and H-IPF in post-stroke patients taking clopidogrel

2.2.3 Comparison of IPF, MPV, P-LCR and H-IPF between patients and healthy subjects

### **2.3 Platelet aggregatio test**

We investigated whether total blood aggregation and segregated lower and upper aggregation (AUC, aggregation, velocity) differed following separation?

2.3.1 Aggregometry of platelets in whole blood vs lower and upper blood samples in patients taking clopidogrel and healthy controls.

- 2.3.2 Aggregometry of platelets in lower vs upper blood samples in patients taking clopidogrel and healthy controls.

Patients taking clopidogrel were divided into responders and non-responders based on whole blood aggregometry.

- 2.3.3 We aimed to explore whether the IPF showed a difference between the responder and non-responder subgroups.

## **2.4 Analysis of platelet morphology**

Imaging studies we wanted to find out if there is a difference in the morphology of the separating platelet subpopulations?

- 2.4.1 We wanted to compare whether there is a difference in the area, perimeter, convex area, convex perimeter properties of the platelets in the lower and upper fractions?
- 2.4.2 We wanted to examine whether there was a difference in the number of dark (alpha-granules) and light (dens-granules) granules in the two fractions?

## **2.5 Atomic Force Microscopy**

With this special imaging study, we wanted to find out if there is a difference in the atomic force morphology of the separating platelets.

# **3. MATERIAL AND METHODS**

Our study was conducted in two phases.

### *Functional and morphological examination of platelets in healthy subjects (Study I)*

In the first phase of the period, 21 healthy individuals were sampled to determine platelet flotation, immature platelet fraction, mean platelet volume, and platelet aggregometry. 6-6 healthy subjects were enrolled for electron microscopic and atomic force microscope imaging.

### *Functional and morphological differences in platelets in patients taking clopidogrel (Study II)*

In the second phase, 46 patients taking clopidogrel and 15 healthy controls were enrolled.

### 3.1. Inclusion criteria

#### Study I.

- Blood samples were taken from healthy volunteers.

#### Study II.

- The patient population included adults with chronic cerebrovascular disease who had been receiving clopidogrel 75 mg daily for prophylaxis for at least 3 months due to ischemic stroke. Patients from the UP Stroke Outpatient Clinic who had been scheduled for appointment at the Intensive Care Unit of the Neurosurgery Clinic of the University of Pécs were selected for the study.
- We included healthy volunteers in the control group.

### 3.2. Exclusion criteria

- acute vascular event
- thrombocytopenia (PLT <50 G / L - lower limit of multiplate measurement)
- congenital platelet dysfunction
- congenital blood clotting disorder
- anemia
- taking a medicine that affects rheological parameters (OAC, NOAC, NSAIDs, diuretics, anti-glycemic medicine)

### 3.3 Platelet antisedimentation rate (PAR)

2x3 ml of blood was drawn from the subjects included into the EDTA Vacutainer tube. Blood was sampled from the elbow vein after a short press with a 21G needle and a closed blood collection system. From one of the tubes a complete blood count was determined at the UP Department of Laboratory of Medicine by a blood cell counting machine (Sysmex XN 9000). The blood in the other EDTA tube was sedimented for 1 hour and the upper half of the mathematical height of the blood column was pipetted into another EDTA tube (PU: platelet upper). Platelet counts were determined from the lower half of the original tube (PL: platelet lower) and the upper fraction (PU: platelet upper) and then calculated and expressed as a percentage of the  $PU - PL / PU + PL$  equation. The resulting quotient is called the Platelet Antisedimentation Rate (PAR). PAR represents the number of platelets that have crossed the half-line of the blood sample during the one-hour sedimentation as a percentage of the original platelet count (**Figure 1**)

$$\text{PAR (\%)} = \frac{\text{platelet count upper} - \text{platelet count lower}}{\text{platelet count upper} + \text{platelet count lower}} \times 100$$

Figure 1.A

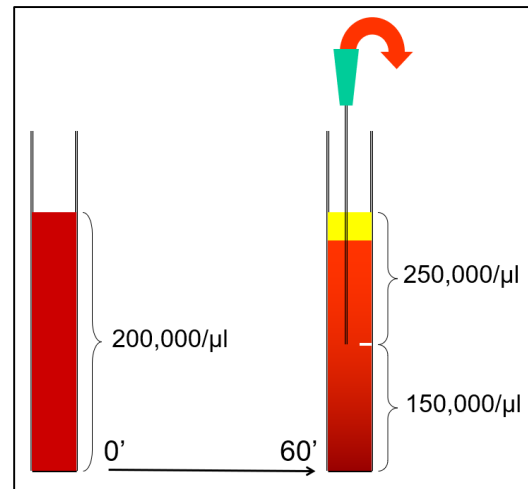


Figure1.B

Figure 1. A Equation of platelet antisedimentation rate,  $\text{PAR} = \text{PU} - \text{PL} / \text{PU} + \text{PL} \times 100$ ). Figure1.B Schematic diagram shows the separation of platelets after one hour of sedimentation in the tube.

### 3.4. Immature Platelet Fraction and Mean Platelet Volume

Immature platelet fraction was measured with the Sysmex XN 9000 Integrated Hematology Automatic Analyzer (Sysmex Co, Japan, 2017) from the lower and upper blood samples obtained by the blood collection and separation method described in the previous section.

Platelet count (PLT-F) and immature platelet fraction (IPF) were determined on the fluorescent platelet channel of the device. In this channel, platelets undergo special intracellular fluorescence staining after pretreatment with CELLPACK DFL reagent, which allows cell membrane permeability. Flow cytometry is performed by detecting transmitted light (FSC: forward scatter), side scatter light (SSC) and side fluorescent light (SFL). In addition to platelet count, the immature platelet fraction can also be determined by gating platelets with high fluorescence intensity (platelets with high fluorescence intensity in the IPF region on the FSC / SFL plot). In addition to platelet count and immature platelet fraction (IPF), mean platelet volume (MPV), large platelet ratio (P-LCR), platelet distribution width (PDW), plateletcrit (PCT), and high fluorescence IPF (H-IPF) - parameters were also recorded.

### **3.5. Platelet aggregometry**

2x3ml venous blood was drawn from participants in the study in a Hirudin Blood Tube for Multiplate Analysis Vacutainer. Subsequently, a whole blood platelet aggregation assay was performed on one of the hirudin tubes using a device (Multiplate® Analyzer, Roche) at the UP Department of Neurosurgery. The other tube of hirudin blood was settled for 1 hour and the upper ½ of the blood in the tube (the upper half of the blood column) pipetted into an empty hirudin tube. From the two samples thus obtained (bottom and top), tct aggregation (TAG-lower and TAG-upper) was measured. From these results, we used AUC (area under the curve), aggregation (increase in impedance), and velocity (maximum slope of aggregation curve) for our study. Values were labeled as: AUC-complete, AUC-lower, AUC-upper, aggregation-full, aggregation-lower, aggregation-upper, velocity-full, velocity-lower, velocity-upper.

### **3.6. Analysis of platelets by Transmission Electronmicroscopy (TEM)**

Blood was collected from 6 healthy subjects in EDTA tubes to obtain platelet-rich plasma as described in the previous sections. After settling for one hour, the supernatant was pipetted into another EDTA tube and the supernatant was centrifuged for 5 minutes at 200 G. Subsequently, the supernatants of both tubes were transferred to a new native tube and centrifuged at 1200G for 5 minutes. After supernatant removal, platelet-rich plasma remained below the two tubes and was immediately transferred to the electron microscope laboratory for further processing.

Platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde at 4C, "overnight." After centrifugation in an Eppendorf tube, the pellet was post-fixed with 1% osmium tetroxide at 4 ° C for 60 minutes. The fixed sediment was added to 3% agar, followed by excision of 1 mm<sup>3</sup> block and washing in 0.1M phosphate buffer for 3x10 minutes. After dehydration with ethyl alcohol and washing, it was placed in propylene oxide and embedded in Durcupan resin (Sigma, Budapest, Hungary). Semi-thin sections were stained with toluidine blue and examined under a light microscope. The ultrathin layers were placed on grids and examined with lead citrate and uranyl acetate contrasted and JEOL JEM 1200EX transmission electron microscope (TEM). Digital photos were taken using the iTEM software (Olympus, Japan). The following tests were performed on platelets prepared by electron microscopy:

1. TEM image of lower and upper platelets.

2. Using the iTEM program (interpolated polygon) we measured the platelet area, platelet perimeter, convex area, convex perimeter properties of the 21-21 platelets (50000x magnification) in the upper and lower sample of blood.
3. We determined the number of dark (alpha-granules) and light (dens granules) visible in the lower and upper 70-70 platelets of approximately the same size (2 $\mu$ m) (50000x magnification).

### **3.7. Atomic force microscopy (AFM)**

#### *Sampling and preparation*

Blood was drawn from the antecubital vein of healthy subjects into a tube containing K-EDTA (N = 6). After settling for one hour at room temperature, the upper half of the blood was immediately pipetted into another tube and each half was centrifuged at 150 g for 8 minutes at room temperature with a stop rate of 2. To minimize platelet activation, 0.1 mL of upper platelet rich plasma was pipetted into 10 mL of HBS buffer (HEPES buffered physiological saline) containing 0.001 M EDTA and 0.1% glucose after centrifugation on both sides. By gently inverting, the washed platelets were centrifuged at the bottom of the tube (room temperature, 2000g, 5 minutes). After pouring the wash buffer and carefully removing it from the tube wall, the platelets were suspended in clean wash buffer so that the platelet count was 100 G / L.

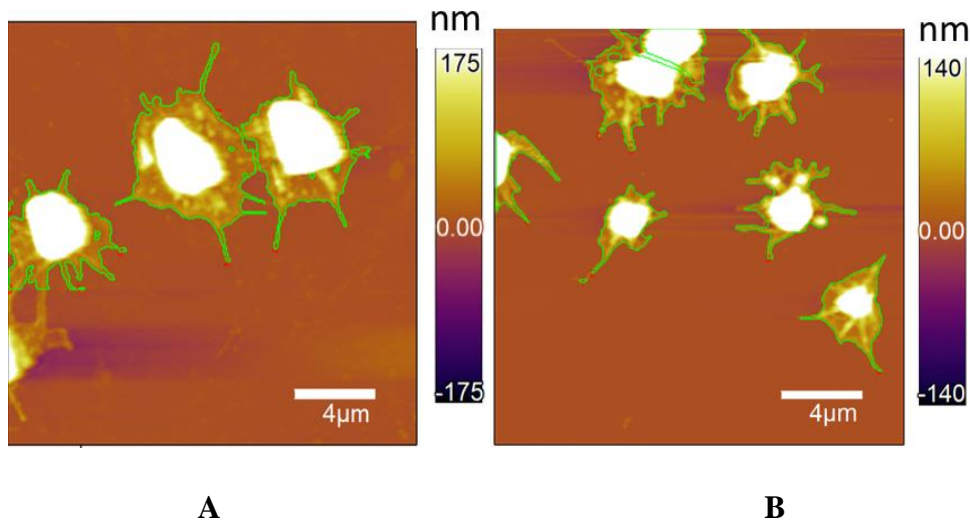
0.025 mL of freshly sliced mica slurry was suspended in suspension (d = 12mm), allowed to settle in a humid chamber for 20 minutes, then 0.025 mL of 2% glutaraldehyde solution was added, stirred by rotation and allowed to fix for 30 minutes. Finally, the surface was washed with Milli-Q water and dried with flowing N<sub>2</sub> gas.

#### *AFM images*

Mica sedimented, fixed, and dried platelets were scanned using Cypher ES atomic force microscope (Asylum Research, Santa Barbara, CA) in tactile mode (AC) using AR16 software. A silicon nitride spring insert having a spring constant of ~ 42N / m and a resonance frequency of ~ 300kHz (OTESPA-R3, Bruker, Billerica, MA) was used for scanning. The free amplitude was set to 1V, the scanning amplitude to 0.5-0.7V, the gain to 7-10 times.

### Analysis of AFM data

Scanning images were analyzed with AFM AR16 (Igor Pro 6.34 A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR). The scanned area was 20x20  $\mu\text{m}$ , where the platelet area was circumscribed with the program (**Figure 2**).



**Figure 2. Selection of platelets for image analysis in AFM height image. Only whole platelets were used for statistical analysis. In the figure, platelets from the upper part of A and B from the lower phase are shown.**

Platelet analysis yielded 18 parameters, of which, assuming surface-fixed, discoid-shaped cellular elements, the following may be useful: height maximum (Z max), center (Z Center), average height (Z Average); Area, Volume, Perimeter, Length, and Width.

## **4. RESULTS**

The following is a summary of the results of two separate studies (Study I: Morphological and functional examination of platelets in healthy subjects and Study II: Study of Clopidogrel in healthy controls) The two healthy controls in the two studies are not the same.

### **4.1 Functional and morphological results of platelets in healthy subjects**

#### **4.1.1 Results of functional examination of platelets**

In the first study period, a total of 21 non-smoker healthy subjects (age  $36 \pm 12$  year, female/male:12/9) were enrolled as controls. After one hour of sedimentation, as described in the methodological chapter, significantly more platelets were found in the upper fraction than

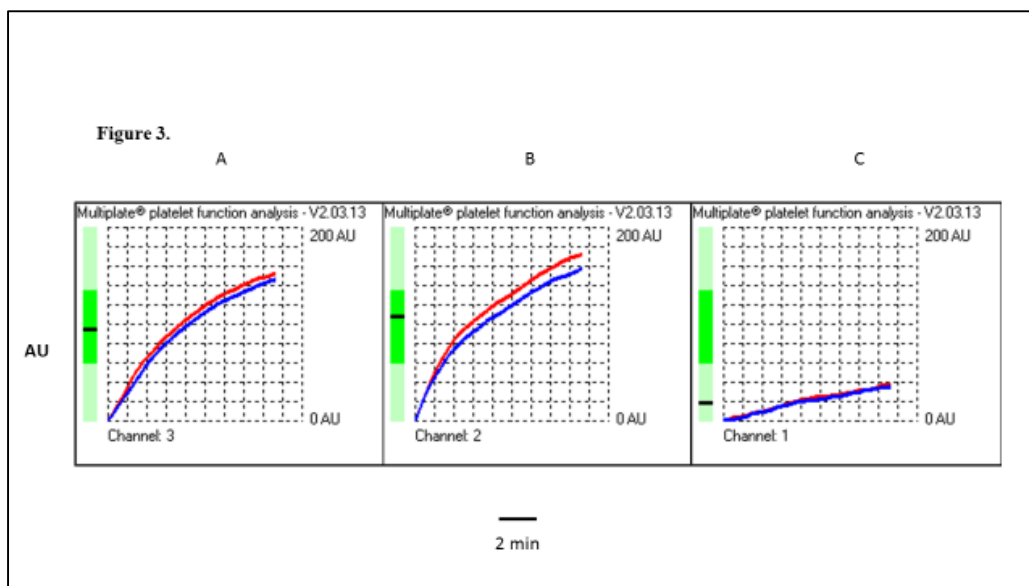
in the lower sedimented fraction. ( $P < 0.001$ ). In healthy subjects, the mean platelet antisedimentation rate (PAR) was  $50.8 \pm \text{SD: } 18.7\%$ . Mean platelet volume (MPV), absolute immature platelet fraction (IPF), and percentage H-IPF were significantly higher in the upper fraction than in the lower fraction ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.005$ ) (**Table 1**).

	whole blood	upper	lower	<i>p</i>
<b>Platelet count (G/L)</b>	239±76	285±132	85 ±33	0,003
<b>MPV (fl)</b>	10,4±1,2	10,3±0,6	1,2±0,6	0,644
<b>IPF (abs)</b>	8,8±4,4	7,6±5,3	3.5±2,2	0,003
<b>H-IPF (%)</b>	1,5±1,0	1,4±0,8	1,3±0,9	0,021
<b>LCR</b>	27,5±4,0	26,9±5,1	26,9±4,9	1,000

Data are shown as mean ± SD.

**Table 1. Platelet parameters in healthy volunteers**

Representative curves generated by the Multiplate analyzer during platelet aggregometry are shown in **Figure 3** (AUC curve of **A**: whole blood, **B**: upper and **C**: lower blood fraction separated after 1-hour of sedimentation).



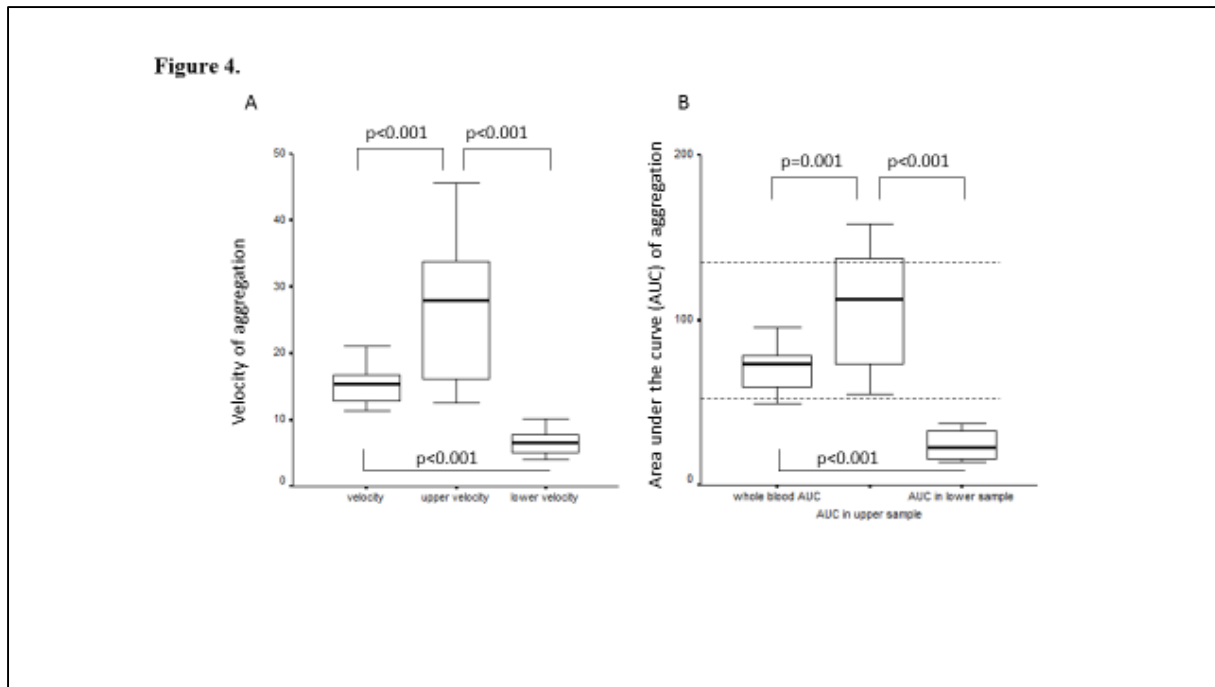
**Figure 3. Curves obtained from platelet aggregometry in a healthy individual. Plot of whole blood (A), upper fraction (B) and lower fraction (C) by Multiplate analyzer**



Impedance aggregometry				
	whole blood	upper	lower	p
AUC	69,9±13,1	103,3±35,8	26,1±9,6	<0,001
aggregation	130,9±23,7	174,3±53,0	52,2±16,2	<0,001
velocity	15,5±3,8	26,5±10,9	6,5±1,7	<0,001

**Table 2. Platelet aggregation data in healthy volunteers**

By Multiplate analysis, a significant difference was found between the lower (mean AUC:  $69.9 \pm SD: 13.1$  vs.  $26.1 \pm 9.6$ ) and upper ( $69.9 \pm 13.1$  vs.  $103.3 \pm 35.8$ ) area under the curve (AUC) after one-hour of blood sedimentation (Table 2). The velocity values indicating the slope of the curve showed significant differences when comparing both whole blood vs upper and lower, and upper vs lower blood fractions (all,  $p < 0.001$ ) (**Figure 4A**). The AUC values were significantly different in the upper and lower fractions ( $p < 0.001$ ). It should be noted that AUC values in the upper fraction exceeded the upper limit of the normal range in 38% ( $n=8$ ) of healthy controls, suggesting that floating platelets exhibit *ex vivo* hyperaggregation. presence (**Figure 4B**). Despite the absence of antithrombotic treatment in the healthy control group, the AUC values in the lower fraction were within the expected range of effective antithrombotic treatment (AUC: 0-53). This suggests that sedimented platelets cannot be activated *ex vivo* by the addition of ADP. , "as if they were acting on clopidogrel" (**Figure 4**).



**Figure 4.** Velocity values indicating the slope of the curve in whole blood and in the upper and lower fractions separated after 1 hour of sedimentation (A). Area under the curve (AUC) in whole blood and in the upper and lower fractions separated after 1-hour of sedimentation (B).

Importantly, PAR showed a significant negative correlation with AUC, aggregation, and velocity values for the slope of the curve in the lower fraction ( $r = -0.661$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = -0.700$ ,  $p = 0.01$ ).,  $r = -0.636$ ,  $p < 0.05$ ). Similarly to the former, participants' age resulted in a negative correlation with lower fraction AUC, aggregation and velocity data ( $r = -0.553$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = -0.553$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = -0.535$ ,  $p < 0.05$  respectively). However, there was no correlation between age and platelet antisedimentation rates in our study group.

#### 4.1.2. Electron microscopy

Platelets from the lower and upper fractions obtained from the blood of healthy subjects were examined by transmission electron microscopy to obtain morphological information. At low magnification we observed differences in the morphological appearance and number of platelets of different blood fractions. The area and circumference of platelets were significantly higher in platelets from the upper fraction compared to the lower fraction ( $p < 0.001$ ). Measurements were performed using the previously detailed iTEM program (Table 3). At higher magnification, the number of alpha and dense granules was determined in platelets. Platelets in the upper fraction contained 1.6 times more alpha granules than the lower ones (Figure 5).

	lower	upper	<i>p</i>
area of platelets (nm <sup>2</sup> )	2,26x10 <sup>6</sup> ± 6,3x10 <sup>5</sup>	3,69 x10 <sup>6</sup> ± 9,3 x10 <sup>5</sup>	<0,001
perimeter of platelets (nm)	7,21x10 <sup>3</sup> ± 1,55x10 <sup>3</sup>	9,17x10 <sup>3</sup> ± 1,42x10 <sup>3</sup>	<0,001

Table 3. Transmission electron microscope data in healthy subjects

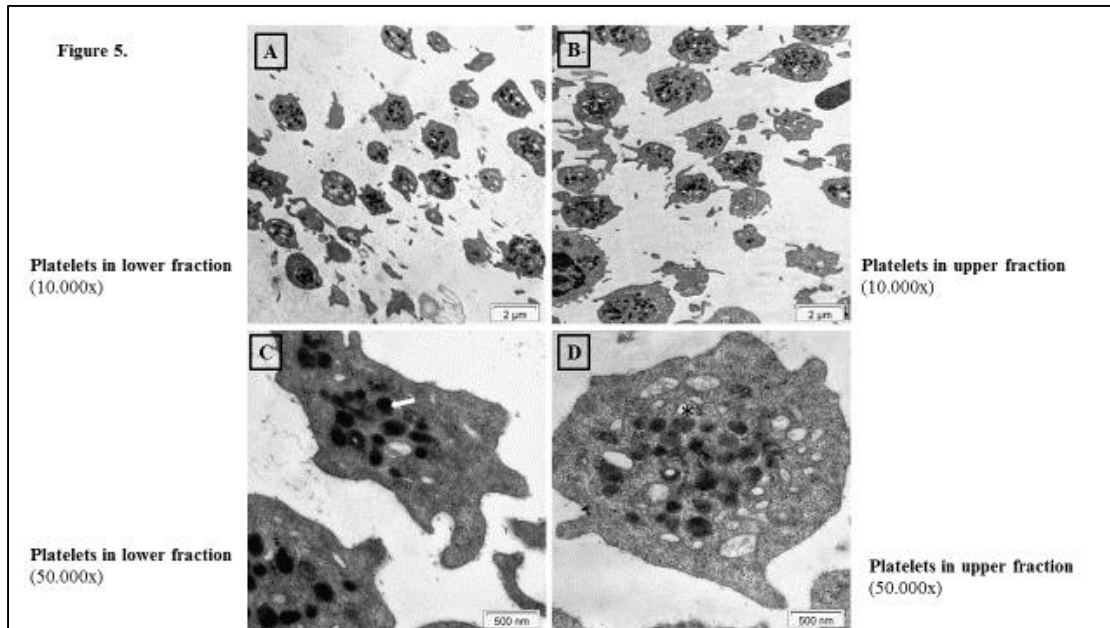
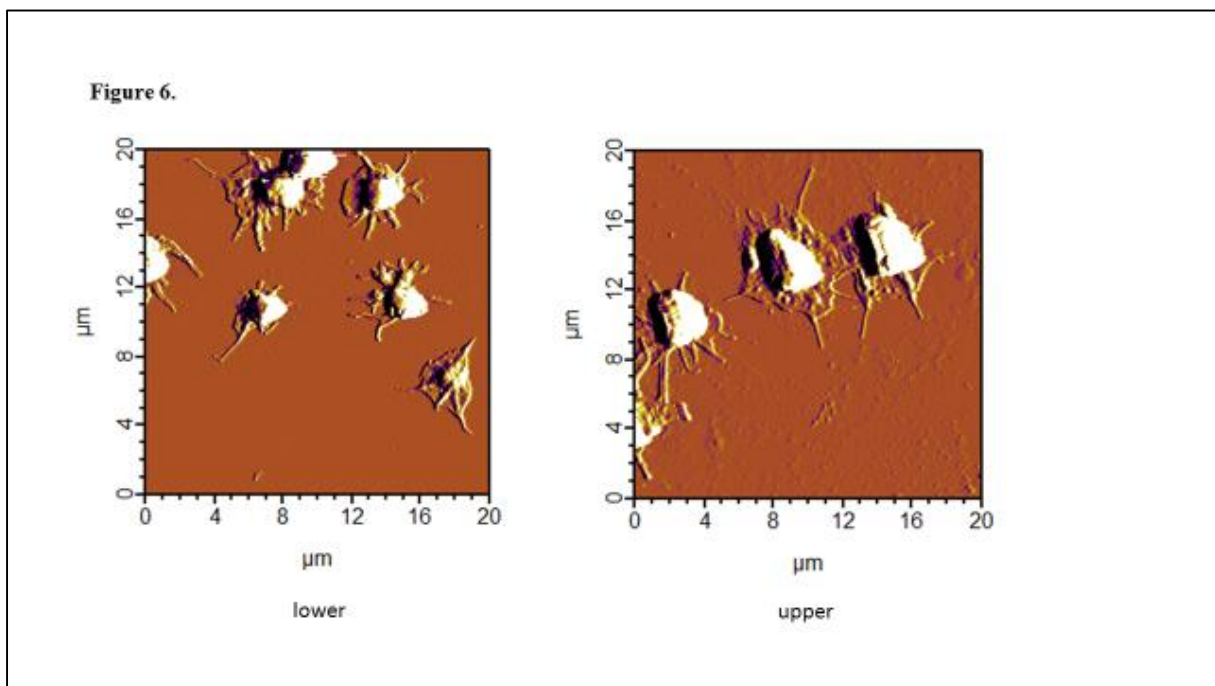


Figure 5. Electron microscopy of platelets of lower (A and C) and upper fraction (B and D). The low magnification images show the number and size of platelets in the lower (A) and upper (B) fractions. Platelets are displayed at high magnification (C) and (D). The arrow in image C points to an alpha granulate, while the star in D indicates a dense granule. Scale values in A and B range are 2 µm, C and D are 500 nm.

#### 4.1.3. Results of atomic force microscopy

The morphology of platelets from the lower and upper fractions obtained from the blood of healthy subjects was also examined by atomic force microscopy, since preparation for the AFM assay has a much lesser effect on platelets than preparation for the EM assay. According to routine, baseline haematological parameters were determined from K2-EDTA blood, and therefore such blood was used for morphological examinations.

Surface-bound platelets are examined with AFM, but only washed platelets from EDTA blood are adhered to the cat's surface after 20 minutes of sedimentation and 30 minutes of glutaraldehyde fixation. However, they also moved during the scan, so we continued working with dehydrated platelets. Height, amplitude, phase, and Z sensor images showed that platelets of both phases may be spherical in shape during fixation, extended to the surface, and then contracted to varying degrees (**Figure 6**). The degree of contraction typically shows the expanded membrane and the jaws that cling to the surface when it contracts. The picture clearly shows that the platelets of the lower phase are smaller in size and in contracted form.



**Figure 6. AFM image of platelets from the lower and upper samples after 1-hour gravity sedimentation**

The AFM program provides data on the height and extent of platelets fixed on the surface for image analysis. For analysis, individual platelets were plotted on the height of the fixed and dried platelet samples and analyzed using the program. Figure 7 shows the volume and center

height for comparison of the platelets in the lower and upper phases. Comparative statistical analysis (unpaired t test) showed that the volume of platelets in the upper phase was greater than that in the lower phase ([fL] mean  $\pm$  SE:  $1.7 \pm 0.12$  and  $1.1 \pm 0.06$   $\div$   $p < 0.001$ ). Mean heights did not differ significantly ([nm] mean  $\pm$  SE:  $456 \pm 20$  and  $484 \pm 0.20$ ). The minimum values for the maximum are given here for height maximum ([nm] 351-885), area ([ $\mu\text{m}^2$ ] 8-25), circumference ([ $\mu\text{m}$ ] 12-25), length ([ $\mu\text{m}$ ] 3- 7) and width data ([ $\mu\text{m}$ ] 3-5) because they were not different either.

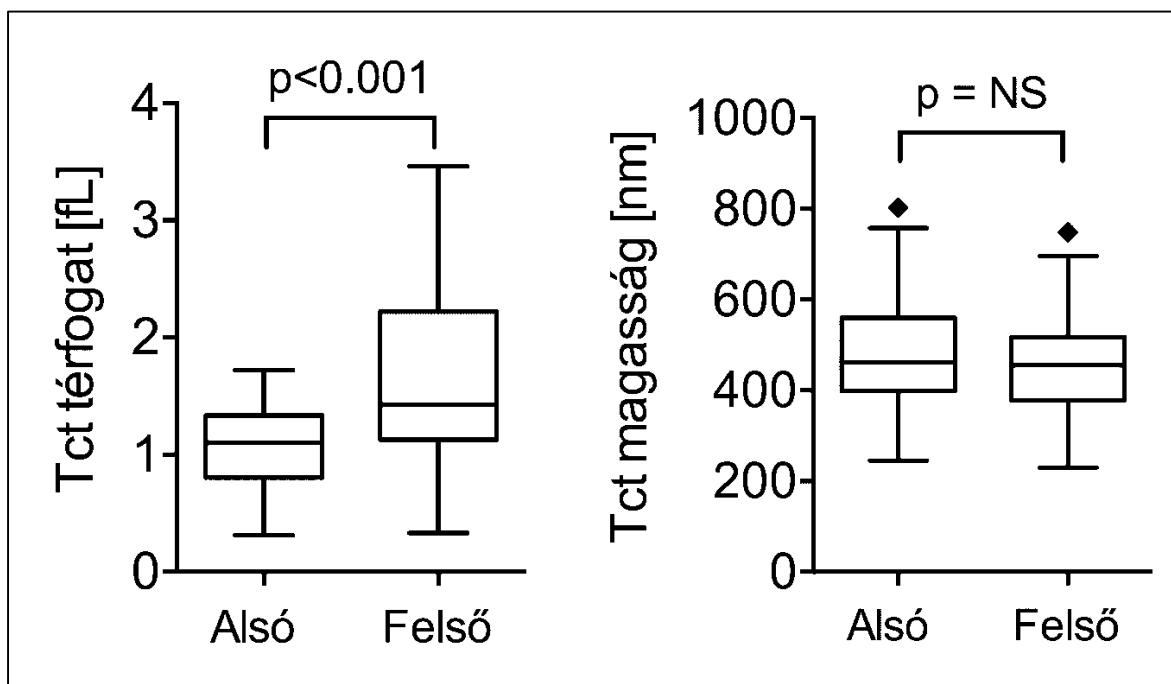


Figure 7. AFM parameters of platelets represented by box and whiskers according to Tukey. A box (IQR, Interquartile Range) shows the median two quarters of the four-quarter distribution of the data. The upper and lower scatter lines represent  $IQR \pm 1.5 \times IQR$  values, and the individual marks indicate values outside this range.

## 4.2 Results of studies with clopidogrel and the control group

### 4.2.1 Demography and laboratory data

As a first step in our prospective study, we compared data from a total of 46 patients (median age:  $66 \pm 8$ , male: 31) on antithrombotic medication for secondary prevention of stroke with data from 15 healthy subjects (mean age:  $40 \pm 13$  years, male: 6). The demographic characteristics and baseline laboratory values of the groups were summarized in a table (**Table**

4). The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was significantly higher in the patient population ( $p < 0.001$ ), and there was no significant difference in CRP between the two groups. There was no significant difference in either total platelet count or MPV, despite the fact that the control group was significantly younger ( $p < 0.001$ ). Similarly, no difference was found in BMI, hematocrit, and leukocyte count. The number of smokers in the clopidogrel group was more than four times that of the control group. (Table 4).

	<b>Healthy controls (n=15)</b>	<b>Patients on clopidogrel (n=46)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Age</b>	40±13	66±8	<0,001
<b>Gender (M/F)</b>	6/14	31/15	0,06
<b>BMI</b>	25±3	27±4	0,119
<b>Smoking (%)</b>	2 (18)	9 (19)	0,586
<b>CRP (mg/l)</b>	1,70 (0,8-3,1)	1,75 (0,7-3,5)	0,237
<b>ESR (mm/hour)</b>	2 (1-4)	10 (6-18)	<0,001
<b>Hematocrit (%)</b>	42,8±0,9	43,6±0,7	0,416
<b>WBC (G/l)</b>	6,3±1.2	8,3±1.7	0,251
<b>Platelet (G/l)</b>	282±75	239 ± 65	0,098
<b>MPV (fl)</b>	10,2±1.6	10,7±0.9	0,528

Data are mean ± SD and absolute values (%), except for CRP and ESR, which are shown as medians and 25-75 percentiles.

**Table 4 Demographic and laboratory data of the control group and patients taking clopidogrel**

#### 4.2.2 Platelet antisedimentation rate (PAR)

Platelet antisedimentation rate (PAR) showed no significant difference between the control group and the patient population, but a higher PAR tendency was observed in the patient group (**Table 5**). The MPV was determined in both groups. This was compared in the different subgroups (whole blood, lower fraction, upper fraction). There was no significant difference in MPV (**Table 5**) between the patient population and healthy subjects and within group comparisons (whole blood vs. upper fraction, whole blood vs. lower fraction, upper vs. lower fraction).

	Healthy controls (n=15)	Patients on clopidogrel (n=46)	<i>p</i>
PLT count upper (G/L)	316 (218-478)	345 (301-428)	0,68
PLT count lower (G/L)	88 (51-124)	71 (54-86)	0,43
PAR (%)	58,5 (45,0-67,5)	67,7 (61,7-72,9)	0,15
MPV (fl) upper	10,7 (10,0-10,8)	10,8 (10,2-11,6)	0,30
MPV (fl) lower	10,0 (9,8-10,6)	10,5 (9,8-11,2)	0,47
LCR (%) upper	28,9 (24,5-30,6)	33,0 (26,8-38,9)	0,14
LCR (%) lower	25,5 (22,7-28,7)	30,5 (24,2-36,2)	0,14

Data are shown as medians and 25-75 percentiles.

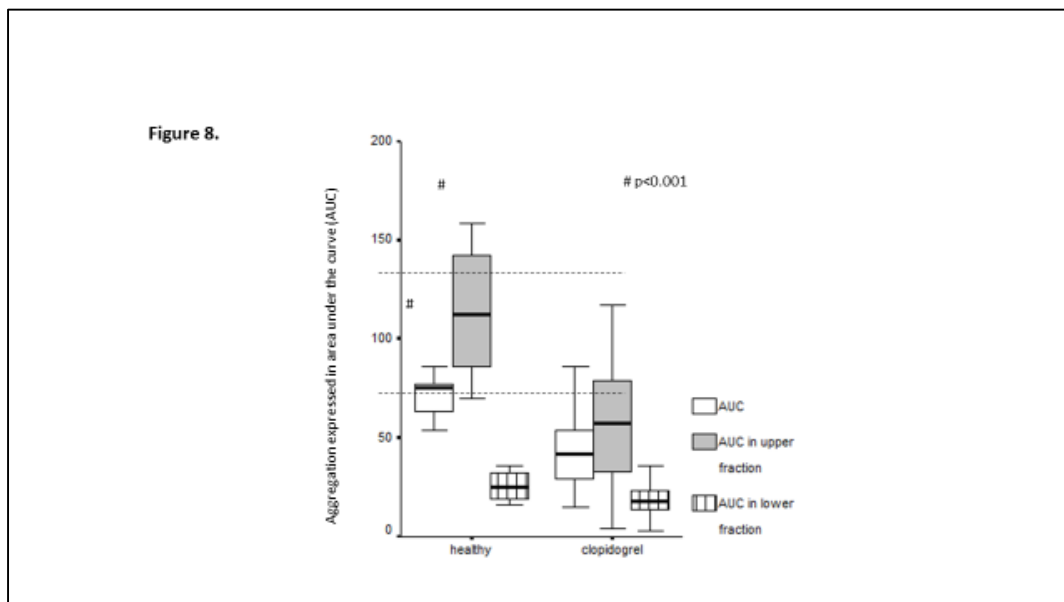
**Table 5. Platelet-derived data of the control group and patients taking clopidogrel**

#### 4.2.3. Impedance aggregometry of the control group and patients taking clopidogrel

In the aggregometric assay (Multiplate® Analyzer), a significant difference was observed between the AUC values of the lower and upper fractions of patients after 1-hour gravity sedimentation (whole blood vs. lower fraction: median 41.5, IQR: 29.0-50 vs 18.0, 14.0-23.0, whole blood vs. upper fraction: 41.5, 29.0-54.0 vs 57.5, 33.0-79.0,  $p < 0.001$ ) (Figure 35). It is striking that measured AUCs in the upper fraction were above the upper limit of the

therapeutic range (AUC: 0-53) in 59% (n = 27) of patients receiving clopidogrel. The question was whether patients not responding to clopidogrel (non-responder on Multiplate whole blood, n = 12) and patients with an AUC above 53 in the upper fraction showed an overlap. Eleven of the 12 non-responder agents also had an AUC above 53 in the upper fraction, so the coincidence between the two groups was significant (P = 0.001). Similarly, whole blood AUC values in the control group were significantly different from those in the upper and lower blood fractions (whole blood: median 73.5, IQR: 59.5-78.5 vs. upper fraction: 112.5, 73.0-137; whole blood: 73.5, 59.5-78.5 vs. lower fraction: 23.0, 16.0-35.0, p = 0.005) (Figure 35) .

Whole blood AUC and upper AUC values were significantly higher in non-drug healthy subjects compared to patients on clopidogrel (p <0.001) (**Table 6**). The AUC values in the upper fraction were higher than the upper limit of normal range (AUC: 53-122) in 40% of the healthy population (n = 6) (**Figure 8**). Meanwhile, the AUC values in the lower fraction showed no significant difference between healthy and patient groups (healthy vs. patient: 23.0, 16.0-35.0 vs. 18.0, 14.0-23.0). These values were in the effective antithrombotic therapeutic range (AUC: 0-53), even in healthy subjects (**Figure 8**). Aggregation (AU) and velocity also showed significant differences (<0.001) between the groups in the whole blood and in the upper fraction. No such correlation could be found between lower part aggregation and velocity (**Table 6**).



**Figure 8. Multiplate-measured aggregation (AUC) in whole blood and upper and lower fractions in healthy and clopidogrel-treated groups**



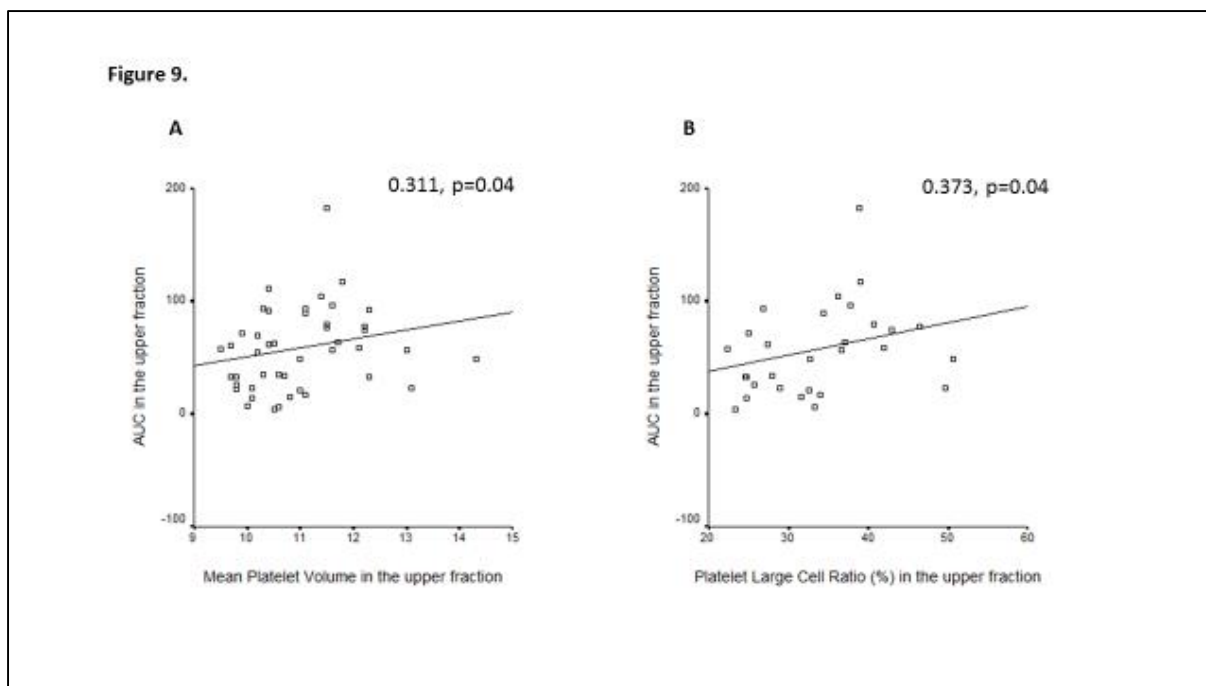
	<b>Healthy controls (n=15)</b>	<b>Patients on clopidogrel (n=46)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>AUC</b>	73,5 (59,5-78,5)	41,5 (29,0-54,0)	<0,001
<b>AUC upper</b>	112,5 (73,0-137)	57,5 (33,0-79,0)	0,003
<b>AUC lower</b>	23,0 (16,0-35,0)	18,0 (14,0-23,0)	0,26
<b>Aggregation, AU</b>	135 (105-146)	76,3 (59,3-107,3)	<0,001
<b>Aggregation upperAU</b>	164 (131-203)	100,1 (48,8-138)	<0,001
<b>Aggregation lowerAU</b>	39,8 (34,1-60,4)	37,4 (30,8-45,8)	0,200
<b>velocity</b>	15,1 (12,2-16,6)	9,4 (7,4-11,4)	<0,001
<b>velocity upper</b>	27,5 (17,5-33,6)	12,3 (6,5-21,1)	<0,001
<b>velocity lower</b>	5,3 (5,0-7,0)	5,1 (4,3-6,5)	0,254

Data are shown as medians and 25-75 percentiles.

**Table 6. Impedance aggregometry data in healthy subjects and those taking clopidogrel**

#### **4.2.4. Platelet parameters and impedance aggregometry of patients**

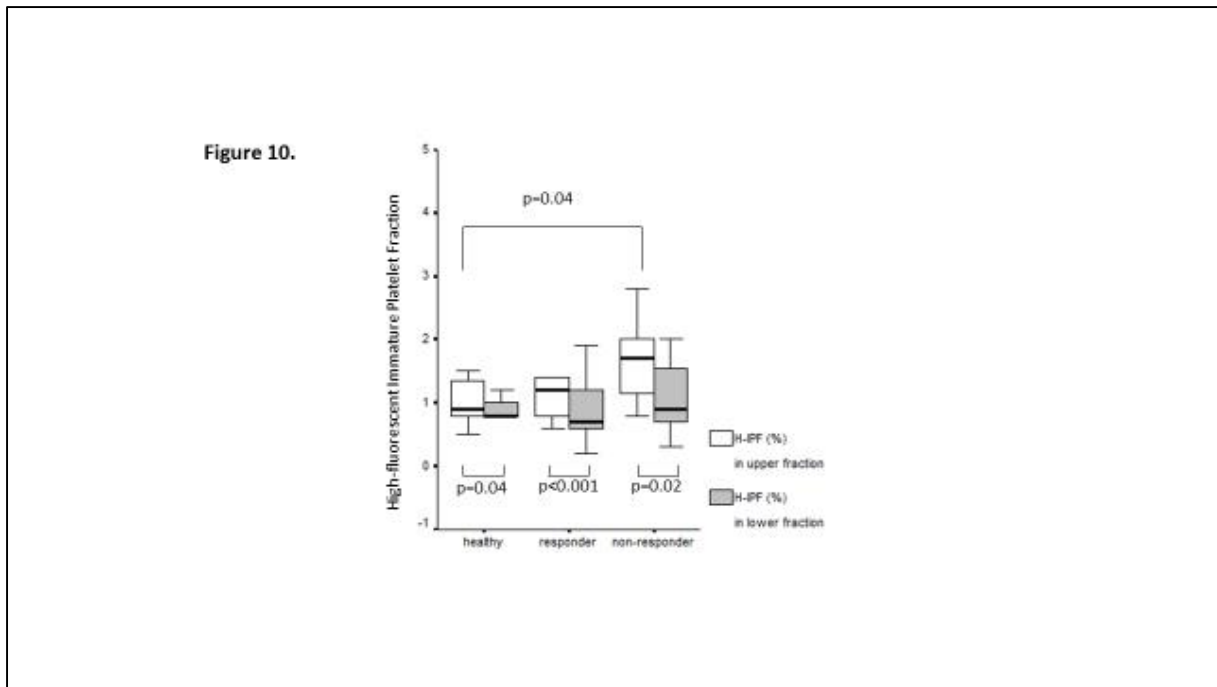
In patients receiving platelet aggregation inhibitors (75 mg clopidogrel), both MPV ( $r = 0.311$ ,  $p = 0.04$ ) in the upper fraction (**Figure 9A**) and PLCR (%) in the upper fraction ( $r = 0.373$ ),  $p = 0.04$ ) was positively correlated with AUC values in the upper fraction (**Figure 9B**).



**Figure 9. Relationship of upper fraction AUC with upper MPV (A) and PLCR% (B)**

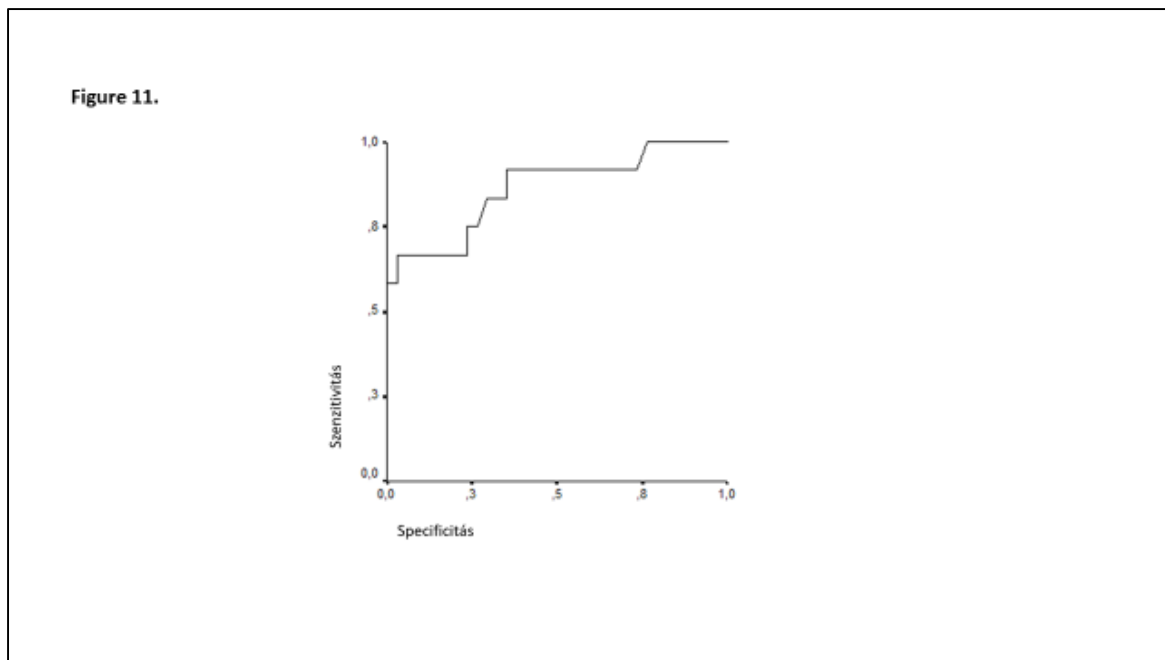
#### **4.2.5 Responder vs nonresponder patients**

Patients receiving 75 mg of clopidogrel were divided into responders ( $AUC < 53$ ,  $n = 34$ ) and non-responders ( $53 \leq AUC$ ,  $n = 12$ ) using the Multiplate® analyzer. Subsequently, H-IPF (%) measured in the upper and lower fraction was compared among the healthy group and the clopidogrel-responsive and non-responding subgroups. The proportion of H-IPF in the upper fraction was significantly higher in the non-responder subgroup compared to the control group (median: 1.7, 25-75 percentile: 1.15-2.0 vs. 0.9, 0.8-1.35,  $p = 0.04$ ). The difference between the values of the non-responder and the responder subgroup is not significant, but the trend is similar as above. When comparing the upper and lower fractions, H-IPF (%) was higher in the upper fraction in each subgroup (Healthy group: 0.9, 0.8-1.35 vs 0.8, 0.8-1.0,  $p=0.04$ ; Responder: 1.2, 0.8-1.4 vs 0.7, 0.6-1.2,  $p < 0.001$ ; Non-Responder: 1.7, 1.15-2, 0-0.9, 0.7-1.55,  $p = 0.02$ ) (**Figure 10**).



**Figure 10. H-IPF (%) in the lower and upper fractions of the healthy control group and the clopidogrel responder and non-responder subgroups.**

Similarly, the PAR values were higher in the non-responder group compared to the responder (median: 71.9, 25th-75th percentiles: 63.6-74.3 vs. 67.2, 60.3-71.0,  $p = 0.20$ ). PAR showed a positive correlation with MPV values from the whole fraction in the whole patient group (Spearman correlation:  $r=0.300$ ,  $p=0.04$ ) and in the responder subgroup ( $0.364$ ,  $p=0.04$ ), but this correlation could not be detected in the non-responder group members. Age, PAR, ESR and CRP, as well as H-IPF, LCR, MPV, AUC measured in the upper fraction were subjected to binary logistic regression to find independent predictors for residual platelet aggregation (HRPR, non-responder status) despite treatment with clopidogrel. Based on this, only upper AUC is considered to be an independent risk factor for residual high platelet reactivity (OR: 1.06, 95% CI: 1.007-1.120,  $p = 0.027$ ). Using a ROC analysis, it was determined that  $AUC > 62$  in the upper fraction predicted non-responder status with 84% sensitivity and 71% specificity (Area: 0.863, 95% CI: 0.728-0.998,  $p < 0.001$ ) (**Figure 11**).



**Figure 11. ROC plot of AUC in upper fraction for prediction of non-responder status**

## **5. NOVEL RESULTS, SUMMARY**

### **5.1. Novel results**

#### **Flotation of platelets during gravity sedimentation**

1. Platelet antisedimentation rate (PAR) as a novel approach was introduced to explore specific characteristics of platelets. Based on 1-hour gravity sedimentation, different platelet subpopulations were determined from the separated upper and lower blood fractions.
2. In both healthy control groups, PAR showed minor difference (58.5% vs 50.8%), presumably due to difference between the mean age of the two cohorts. Importantly, creation of normal reference range for different ages should be addressed in the future.
3. As a tendency, PAR was higher in patients on clopidogrel treatment compared to healthy controls (median: 67.7 vs 58.5%). However, patients were significantly older than healthy controls (mean age: 66 vs 40,  $p < 0.001$ ). To decide whether normal aging or other factors (e.g. aging of platelets *per se* or systemic inflammation or vascular diseases) are responsible for this phenomenon requires further studies.

4. As a tendency, PAR was also higher in non-responder patients on clopidogrel treatment compared to responders (median: 71.9 vs. 67.2%,  $p=0.20$ ), nevertheless the mean age of the two groups was similar.

### **Morphological analysis of platelets by TEM and AFM**

1. Electron microscopy was performed for the first time on platelets separated by the antisedimentation technique. Flotating platelets contain significantly more alpha-granules and their area and perimeter were also significantly larger compared to sedimentating platelets.

2. There is no published literature on AFM testing of separated platelets. We found that the volume of flotating platelets is significantly higher in the upper blood fraction.

### **Immature platelet fraction, platelet large cell ratio and mean platelet volume**

1. High-fluorescent IPF (%) was the highest in non-responder patients and it was significantly higher compared to healthy controls (median: 1.7 vs 0.9%,  $p=0.04$ ).

2. Comparing the upper and lower blood fractions, the high-fluorescent IPF (%) measured in the upper sample was higher in each groups, indicating that the very immature platelets are flotating.

3. MPV showed significant differences neither in patients vs healthy intergroup comparison nor in intragroup comparisons (whole blood vs upper, whole blood vs lower, upper vs lower samples).

3. PAR showed a positive correlation with MPV in the total patient population ( $r=0.300$ ,  $p=0.04$ ) and in responders ( $0.364$ ,  $p=0.04$ ), but this correlation disappeared in non-responders.

4. In the second recruitment of healthy subjects, mean platelet volume (MPV), absolute immature platelet fraction (IPF), and percentage H-IPF were significantly higher in the upper fraction compared to the lower fraction.

### **Platelet aggregation measurement**

I. Novel results concluded from healthy cohort

1. The whole blood aggregation expressed in AUC (aggregation unit x time) showed significant differences compared either to the upper or lower samples separated after 1-hour gravity sedimentation. In addition, the AUC of the upper sample was also significantly higher compared to the lower one.
2. Velocity values indicating the slope of the curve also showed a significant difference in the comparison of whole blood versus upper and lower, and upper versus lower blood fractions respectively.
3. It should be noted that AUC values in the upper fraction exceeded the upper limit of normal aggregation range (53-122) in 38% of healthy controls, suggesting that floating platelets exhibit *ex vivo* hyperaggregability in the presence of ADP.
4. The AUC values in the lower fraction were in the range "as if there was an effective inhibition of aggregation". This leads us to conclude that sedimented platelets cannot be activated *ex vivo* by the addition of ADP.
5. In the lower fraction, PAR showed a significant negative correlation with AUC, aggregation size (AU), and "velocity" indicating the slope of the curve.

## II. Novel results concluded from patients on clopidogrel treatment and healthy cohort

1. The whole blood aggregation expressed in AUC (aggregation unit x time) showed significant differences compared either to the upper or lower samples separated after 1-hour gravity sedimentation.
2. It is important to note that AUC values in the upper fraction was higher than the upper limit of the therapeutic range in 59% of patients taking clopidogrel. Coincidence between cases with an AUC above 53 in the upper fraction and non-responders to clopidogrel was significant.
3. It should be noted that in 40% of the healthy population the AUC measured in the upper fraction was higher than the upper limit of the normal aggregation range (AUC: 53-122), suggesting that up-migrating platelets exhibit *ex vivo* hyperaggregability in the presence of ADP. However, the AUC values in the lower fraction showed no significant difference between the healthy and the patient groups.
4. Both in whole blood and in the upper fraction, the aggregation unit (AU) on the vertical axis and the velocity indicating the slope of the curve were significantly lower in clopidogrel-

treated subjects than in the healthy control. In contrast, neither AU nor velocity values in the lower fraction showed significant difference between clopidogrel-treated subjects and healthy controls. These findings suggest that sedimented (or non-floating) platelets do not participate in aggregation.

5. In patients taking clopidogrel, MPV and PLCR (%) in the upper fraction correlated positively with AUC in the upper fraction.

6. Upper AUC is considered to be an independent risk factor for residual high platelet reactivity (HRPR). AUC above 62 in the upper fraction, with a sensitivity of 84% and a specificity of 71%, is predictive of non-responder status.

## **5.2. Summary**

1. It can be stated that the platelets of blood fractions separated by 1-hour gravity sedimentation of whole blood differ in a number of properties (see results section).

2. The new method we first described, PAR, may be related to age and certain pathological changes.

3. The AUC of the upper fraction separated by one-hour sedimentation of whole blood, as measured by Multiplate aggregometry, is an independent predictor of HRPR status.

4. The H-IPF (%) value of the upper fraction separated by 1-hour gravity sedimentation of whole blood may also be useful in identifying patients with HRPR.

5. HRPR may be related to the number, flotation, and enhanced aggregation properties of the most immature platelet forms, and this appears to be supported by morphological (EM and AFM) results.

6. Transmission electron microscopy images showed that platelets in the upper fraction had a larger area and periphery than platelets in the lower fraction, and more alpha granules were detected.

7. AFM may further refine the morphological analysis of sedimented platelets.

## 6. LIST OF PUBLICATIONS

### Publications the Thesis is based on

**Ezer E**, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. Clin Hemorheol Microcirc. 2019 May 28. doi: 10.3233/CH-190580

**IF: 1,642**

**Cit: 1**

Csecsei P, Pusch G, **Ezer E**, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T.: Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 27(4):951-956. (2018)

**IF: 2,881**

**Cit: 3**

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M<sup>2</sup>, Ábrahám Á, Koller Á, Kellermayer M, Hársfalvi J, Bogár L, Molnár T. Gravity sedimentation reveals functionally and morphologically different platelets in healthy subjects (under review)

### Publications on other topics

Büki A, Barzó P, Demeter B, Kanizsai P, **Ezer E**, Tóth P, Horváth P, Varga C. : [Guidelines for the treatment of traumatic brain injury - 2017]. Ideggyógy Sz.;70(7-8):223-245. (2017)

**IF: 0,252**

**Cit: 3**

Toth P, Szarka N, Farkas E, **Ezer E**, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A. Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 311(5):H1118-H1131 (2016)

**IF: 3,351**

**Cit: 24**

Toth A, Kovacs N, Perlaki G, Orsi G, Aradi M, Komaromy H, **Ezer E**, Bukovics P, Farkas O, Janszky J, Doczi T, Buki A, Schwarcz A. Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? J Neurotrauma. 1;30(1):2-10 (2013)

**IF: 3,968**

**Cit: 67**

Czeiter E, Mondello S, Kovacs N, Sandor J, Gabrielli A, Schmid K, Tortella F, Wang KK, Hayes RL, Barzo P, **Ezer E**, Doczi T, Buki A. Brain injury biomarkers may improve the predictive power of the IMPACT outcome calculator. J Neurotrauma. 10;29(9):1770-8 (2012).

**IF: 4,295**

**Cit: 87**

Auer T, Schwarcz A, **Ezer E**, Czeiter E, Aradi M, Hudvágner S, Janszky J, Büki A, Dóczi T.: [Diffusion tensor and functional MR imaging of severe traumatic craniocerebral injury at low magnetic field]. Ideggyogy Sz. 30;60(11-12):480-8 (2007).

Kasó G, Horváth Z, Kövér F, **Ezer E**, Dóczi T. Application of vertebroplasty, neuronavigation and kyphoplasty in the treatment of multiplex osteoporotic vertebral fractures--case report]. Ideggyogy Sz. 20;59(7-8):282-7 (2006).

**Cit: 1**

Ertl T, Sulyok E, **Ezer E**, Sárkány I, Thurzó V, Csaba IF.: The influence of metoclopramide on the composition of human breast milk. Acta Paediatr Hung. 31(4):415-22 (1991).



**Cit: 24**

Hanley DF, et al. MISTIE III Investigators. Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial. *Lancet.*; 393(10175):1021-1032 (2019).

**Cit: 35**

van Essen TA, den Boogert HF, Cnossen MC, de Ruyter GCW, Haitsma I, Polinder S, Steyerberg EW, Menon D, Maas AIR, Lingsma HF, Peul WC; CENTER-TBI Investigators and Participants.: Correction to: Variation in neurosurgical management of traumatic brain injury: a survey in 68 centers participating in the CENTER-TBI study. *Acta Neurochir (Wien)*. 161(3):451-455 (2019).

**Cit: 2**

Vande Vyvere T, Wilms G, Claes L, Martin Leon F, Nieboer D, Verheyden J, van den Hauwe L, Pullens P, Maas AIR, Parizel PM; Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI) Investigators and Participants : Central versus Local Radiological Reading of Acute Computed Tomography Characteristics in Multi-Center Traumatic Brain Injury Research. *J Neurotrauma*. 1;36(7):1080-1092 (2019).

**Cit: 0**

van Veen E, van der Jagt M, Cnossen MC, Maas AIR, de Beaufort ID, Menon DK, Citerio G, Stocchetti N, Rietdijk WJR, van Dijk JTJM, Kompanje EJO; CENTER-TBI investigators and participants. Brain death and postmortem organ donation: report of a questionnaire from the CENTER-TBI study. *Crit Care*. 16;22(1):306 (2018) (cit:1).

**Cit: 1**

.....  
**cumulative IF: 16,389**

**cumulative Cit: 248**

### **Book Chapters (Hungarian)**

**Ezer Erzsébet**: Intracranialis nyomásmérés, liquordrenázs. In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. *Medicina*, Budapest(2013), 175-179.

**Ezer Erzsébet**: Intracranialis katasztrófák intenzív terápiaja In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. *Medicina*, Budapest(2013), 317-332.

**Ezer Erzsébet**: Nyaki gerincsérültek intenzív terápiaja In.:Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. *Medicina*, Budapest (2013), 326-331.

**Ezer Erzsébet**: Az intracranialis nyomás (ICP) mérése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. *Medicina*, Budapest (2014), 51-54.

**Ezer Erzsébet**: Sztereotaktikus beavatkozások érzéstelenítése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. *Medicina*, Budapest (2014), 157-165.

**Ezer Erzsébet**: Craniocerebrális sérülést szenvedett betegek anesztéziája In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanestézia és neurointenzív ellátás. *Medicina*, Budapest (2014), 51-54

**Ezer Erzsébet**, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Súlyos koponyasérültek primer ellátása In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) *Emberi életfolyamatok idegi szabályozása – a neurontól a viselkedésig*.

Interdiszciplináris tananyag az idegrendszer felépítése, működése és klinikuma témáiban orvostanhallgatók, egészség- és élettudományi képzésben résztvevők számára Magyarországon. 2299 p Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1900-1919.

### **Book Chapters (English)**

Endre Czeiter, Zsuzsanna Ursprung, Noemi Kovacs, **Erzsebet. Ezer**, Ferenc Kover, Janos Sandor, Tamas Doczi and Andras Buki: Outcome Prediction with Marshall CT-classification and Rotterdam Score in Severe Traumatic Brain Injury. **Proceedings of EANS, ISBN 978-88-7587-385-1 2007; 353-356.**

Büki András, Czeiter Endre, Dán Livia, **Ezer Erzsébet** Haematomas in anticoagulated patients. In: **EANS Training Course Book: Second EANS Course In Spinal Surgery, Opatija, Croatia, November 6 - 8,2008. pp. 178-182.**Opatija:2009.

**Ezer Erzsébet**, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primary treatment of severe neurotrauma In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.)

Neural regulation of human life processes – from the neuron to the behaviour. Interdisciplinary teaching material concerning the structure, function and clinical aspects of the nervous system for students of medicine, health and life sciences in Hungary. 2266 p.

Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1876-1895.

### **Book Chapters (German)**

**Ezer Erzsébet**, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primäre Versorgung nach schweren Schädeltraumata In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.)

Neurologische Regulierung humaner Lebensprozesse – vom Neuron zum Verhalten. Interdisziplinärer Lernstoff zum Thema Aufbau, Funktion und Klinik des Nervensystems für Studierende der Medizin, Gesundheits- und Biowissenschaften in Ungarn. 2453 p.

Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 2032-2053.

### **Abstracts**

Szellár Dóra, Czeiter Endre, Péterfalvi Ágnes, Sándor János, Mezősi Emese, Kövér Ferenc, Kosztolányi Péter, Angyal Miklós, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Dóczi Tamás, Büki András The Pécs Traumatic Brain Injury Databank Clin **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience** 2005;58(5-6):212.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Büki András, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. Clin Neurosci/Ideggy Szle 2005;58(5-6):210-1.

Czeiter Endre,Szellár Dóra, **Ezer Erzsébet**, Meszaros István, Kövér Ferenc, Auer Tibor, Schwarcz Attila, Dóczi, Tamás, Büki, András; Analysis of the Pecs severe traumatic brain injury database: the effect of guideline implementation on outcome **Journal of Neurotrauma**. 2006 May;23(5):758.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, **Büki András**, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. **Journal of Neurotrauma**. 2006 May;23(5):752

Czeiter Endre; Kovács Noémi; Ursprung Zsuzsanna; **Ezer Erzsébet**; Kövér Ferenc; Sándor János; Dóczi Tamás; Büki András : Prediction of outcome in severe traumatic brain injury based on computed tomographic examinations **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience** 2007;60(S1):14.

Hudak Istvan, Botz Lajos, **Ezer Erzsébet**, Doczi Tamas.:A novel strategyin the treatment of high grain brain AVMS: combinedtransarterial and transvenous embolisation by means of a polyurethane based new embolizing agent.**WFITN Congress** , Beijing, 2007 szept.

Zsuzsanna Ursprung, Endre Czeiter, Janos Sandor, Noemi Kovacs, **Erzsebet Ezer**, Tamas Doczi, Andras Buki :Outcome Prediction in Severe Traumatic Brain Injury: Does Conventional CT Matter? **Journal of Neurotrauma**. 2008 Jul;25(7):913.

Czeiter Endre, Sándor János, Kovács Noémi, **Ezer Erzsebet**, Dóczi Tamás, Büki András. : The „Pécs severe traumatic brain injury database”: treatment and outcome estimation in case of severe head injury in Hungary **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience**2008;61(9-10):330.

Kovács Noémi, Ursprung Zsuzsanna, Czeiter Endre, **Ezer Erzsebet**, Demeter Béla, Szabó József, Sándor János, Dóczi Tamás, Büki András. :Outcome prediction in severe traumatic brain injury: does conventional CT matter? **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience** 2008;61(9-10):334.

Molnár Tihamér, Pálinkás Dániel, Pisztrai Levente, Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Büki András. Effect of different fluid resuscitation on brain tissue oxygen depth in patients with severe traumatic brain injury **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience** 2008;61(9-10):337.

**Erzsebet Ezer**, Csaba Loibl, Katalin. Szenohradszki, István Hudák, Tamas Dóczi: Hemodynamic aspects of the endovascular treatment of cerebral arterio-venous malformations and their perioperative care (preliminary study) **European Journal of Anaesthesiology**, Volume 25, Supplement 44, 2008

Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Sándor János, Kovács Noémi, Geider Attila, Szabó József, Demeter Béla, Dóczi Tamás, Büki András Coagulopathy in severe head injury: a deadly combination? **Journal of Neurotrauma**26:(8) p. A99. (2009)

**E. Ezer**, S. Mondello, S. Robicsek, A. Gabrielli, G. Brophy, Linda Papa, J. Tapas, C. Robertson, E.Czeiter, A.Buki, R.L.Hayes, K.K.W.Wang: Brain Tissue oxygenation and putative biomarkers in severe traumatic brain injury **Intensive Care Medicine**, Volume 36, Supplement 2, September 2010

S.Mondelo, A.Buki, R.Bullock, C.Robertson, P.Barzo, E.Czeiter, **E.Ezer**, J.Streeters, K.Schmidt, F.Tortella, K.Wang, R.Hayes: Elevated Serum Biomarkers Associated with Increased Intracranial Pressure after Severe Traumatic Brain Injury **International Conferenc on Intracranial Pressure and Brain Monitoring**, September 12-16, 2010, Tübingen/Germany

András Büki, Endre Czeiter, Noémi Kovács, Krisztina Amrein, **Erzsébet Ezer**, János Sándor, Tamás Dóczi: Geriatric Traumatic Brain Injury with special focus on Eastern Europe **Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience** 2013;66(3-4):130

**Ezer E.**, Csabai L., Cseplo P., Kanizsai P., Szenohradszki K., **Vamos Z.**: Effect of Intravenous administration of NSAIDs on platelet aggregation after herniated disc surgery International Neurotrauma Society (INTS 2014), **Budapest, március 19-23., 2014.Journal of Neurotrauma, in press**

**Erzsebet Ezer**, Noémi Kovács, Endre Czeiter, Krisztina Amrein, Andras Büki: A fallen elderly patient with coagulopathy – a new dominant type of severe traumatic brain injury? (Analysis of the „Pécs severe head injury database”.) International Neurotrauma Society (INTS 2016), **Cape Town, 1-4 February 2016. Journal of Neurotrauma, in press**