

VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT THROMBOSISKÉSZSÉG LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATÁNAK LEHETŐSÉGEI

Doktori (PhD)-értekezés

Réger Barbara

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Losonczy Hajna

Társ-témavezető: Dr. Tóth Orsolya

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet

I.sz. Belgyógyászati Klinika, Hematológiai Tanszék

Pécs



2018

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
ABSZTRAKT	5
I. BEVEZETÉS	6
I.1. A thrombophilia általános jellemzői	6
I.2. Szerzett thrombophilia kockázati tényezői.....	7
I.3. Veleszületett thrombophilia	10
I.3.1. Antithrombin deficiencia.....	10
I.3.2. Protein C deficiencia	16
I.3.3. Protein S deficiencia.....	18
I.3.4. FV Leiden mutáció	20
I.3.5. Prothrombin gén mutáció	21
II. FOKOZOTT THROMBOSISKÉSZSÉG VIZSGÁLATA KOAGULÁCIÓ INHIBITOR POTENCIÁL (CIP) MÓDSZERREL	22
II.1. Bevezetés	22
II.2. Célkitűzés.....	24
II.3. Anyag és módszer	25
II.3.1. A vizsgálatba bevont személyek	25
II.3.2. Mintagyűjtés és reagensek	25
II.3.3. Koaguláció Inhibitor Potenciál (CIP) mérés metodikája	26
II.3.4. A CIP metodika automatizálása	26
II.3.5. Statisztikai analízis.....	30
II.4. Eredmények	30
II.4.1. A CIP metodika reprodukálhatósági vizsgálata, within-run és day-to-day variabilitás.....	30
II.4.2. A CIP metodika alkalmazása gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon	31
II.4.3. A vizsgálatba bevont személyek jellemzői	32
II.4.4. Kontroll és thrombophiliás minták CIP eredményeinek értékelése	34
II.4.5. A CIP metodika szenzitivitása és specificitása	36
II.5. Megbeszélés	38
III. VÉRALVADÁSI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA NORMÁL VÁRANDÓSSÁG SORÁN	41
III.1. Bevezetés	41

III.2. Célkitűzés	44
III.3. Anyag és módszer.....	44
III.3.1. A vizsgálatba bevont személyek.....	44
III.3.2. Mintagyűjtés és reagensek	44
III.3.3. Statisztikai analízis	45
III.4. Eredmények	45
III.4.1. A vizsgálatba bevont személyek jellemzői.....	45
III.4.2. A vizsgált laboratóriumi paraméterek eloszlása	46
III.4.3. PI, APTI és TI változása terhesség során.....	46
III.4.4. Fibrinogén és CRP változása terhesség során.....	46
III.4.5. D-dimer változása terhesség alatt	47
III.4.6. CIP értékek változása terhesség alatt.....	47
III.5. Megbeszélés.....	52
IV. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA	55
V. IRODALOMJEGYZÉK.....	56
VI. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	66
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	66
IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK	67
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	69

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC	aktivált protein C
APTI	aktivált partialis thromboplastin idő
Asn	aszparagin
AT	antithrombin
AUC	area under the opacity curve, görbe alatti terület
CAT	Calibrated Automated Thrombogram
C4BP	C4 binding protein, C4-kötő fehérje
CI	confidence interval, konfidencia intervallum
CIP	Coagulation Inhibitor Potential, Koaguláció Inhibitor Potenciál
CRP	C-Reactive Protein
CV	coefficient of variation, variációs koefficiens
CV _i	intraindividuális biológiai variabilitás
CV _g	interindividuális biológiai variabilitás
DDU	D-dimer Units
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation, Disszeminált Intravaszkuláris Koaguláció
GAG	glükózaminoglikán
HBS	heparine binding site, heparin kötőhely
HGMD	the Human Gene Mutation Database, human gén mutációs adatbázis
ETP	Endogenous Thrombin Potential, Endogén Thrombin Potenciál
FEU	Fibrinogen Equivalent Units
FII	prothrombin gén G20210A mutáció
FII hom	prothrombin gén G20210A mutáció homozygota
FII het	prothrombin gén G20210A mutáció heterozygota
FVL	factor V Leiden mutáció
FVL hom	factor V Leiden mutáció homozygota
FVL het	factor V Leiden mutáció heterozygota
HUS	Haemolytic Uraemias Syndroma
INR	International Normalised Ratio
LMWH	low molecular weight heparin, alacsony molekulásúlyú heparin
MVT	mélyvénás thrombosis

OCP	Overall Coagulation Potential, teljes alvadási potenciál
OFF	Overall Fibrinolysis Potential, teljes fibrinolysis potenciál
OHP	Overall Haemostasis Potential, teljes haemostasis potenciál
PC	protein C
PE	pulmonális embólia, tüdőembólia
PI	prothrombin idő
PIVKA	protein induced by vitamin K absence, K vitamin függő véralvadási fehérje
PS	protein S
RCL	reactive center loop, reaktív központi hurok
RS	reactive site, reaktív hely
s	secundum, másodperc
SD	standard deviáció
SE	standard error
TI	thrombin idő
TM	thrombomodulin
t-PA	tissue plasminogen activator, szöveti plazminogén aktivátor
TTP	Thromboticus Thrombocytopenias Purpura
U	unit
UFH	unfractionated heparin, nagy molekulásúlyú heparin
VTE	vénás thromboembólia

ABSZTRAKT

A thrombophilia egy olyan hiperkoagulációs állapot, amely vénás thrombosis kialakulásához vezethet. Laboratóriumi vizsgálata idő- és költségigényes, hiszen az egyes defektusok, mint az antithrombin-, protein C-, protein S deficiencia, FV Leiden mutáció, prothrombin gén mutáció csak külön-külön vizsgálhatók. A laboratóriumi diagnosztikában előnyös lehet egy olyan globális teszt bevezetése, amellyel könnyen eldönthető, hogy a beteget szükséges-e tovább vizsgálni az előbb említett defektusokra a thrombophilia pontos típusának meghatározásához vagy sem. Erre a célra ígéretes metodikának tűnik a Koaguláció Inhibitor Potenciál (CIP) teszt.

A dolgozatom alapját képező munka első felében az eddig manuális kivitelezésű CIP metodika optikai véralvadási automatára történő adaptációját végeztük el, majd megvizsgáltuk a teszt megbízhatóságát és alkalmaztuk kontroll és veleszületett thrombophiliás betegek mintáin. Eredményeink alapján a CIP metodika alkalmasnak tűnik az egészséges és a thrombosishajlammal rendelkező betegek elkülönítésére. Ezáltal lehetővé válhat, hogy csak azoknál a betegeknél történjenek meg a további költséges, speciális véralvadási vizsgálatok annak érdekében, hogy kiderüljön a veleszületett thrombophilia hátterében lévő ok, akiknél a CIP metodikával kapott eredmény pozitívnak bizonyult. Az automatizálás által a teszt kivitelezése gyorsabb lett, egyszerre több beteg mintáját is lehet így analizálni, és a manuális tevékenységből adódó esetleges random hibák is kiküszöbölhetőkké váltak.

A munka második felében komplikációmentes várandós nők rutin véralvadási paramétereit vizsgáltuk a 16., 26. és 36. gesztációs hét alkalmával gyűjtött vérmintából. Vizsgálataink során meghatároztuk a prothrombin időt, aktivált partialis thromboplastin időt, thrombin időt, fibrinogént és D-dimert, ezen felül ezeken a mintákon is alkalmaztuk az előbb ismertetett CIP metodikát. Eredményeink alátámasztják, hogy a terhesség előrehaladtával a haemostasis rendszer hiperkoagulációs irányba tolódik el, ami thrombosis kialakulására hajlamosíthat. Méréseink segítségével új, a vizsgált populációra jellemző gesztációs kor szerinti referencia tartományokat illetve cut-off értéket állítottunk fel ezen rutin véralvadási paraméterek esetében, amellyel hozzájárulhatunk a megfelelő klinikai döntéshozatalhoz.

I. BEVEZETÉS

I.1. A thrombophilia általános jellemzői

A normál *haemostasis* a véralvadásért felelős celluláris és molekuláris elemek kiegyensúlyozott interakciójának eredménye, melynek célja az intakt keringés fenntartása. A haemostasisban résztvevő sejtek és fehérjék kóros működése fokozott *thrombosiskészséghez* vagy *vérzékenységhez* vezet.

A cardiovascularis rendszeren belül *in vivo* képződött véralvadékokat *thrombusnak*, a thrombusképződés által létrehozott klinikai kórképet *thrombosisnak* nevezzük. Amikor a thrombus vagy a thrombus egy része leszakad, majd valamely érben elakad, akkor *embolizációról* beszélünk. Kialakulásának helyétől függően artériás vagy vénás thrombosisist különböztetünk meg.

A mélyvénás thrombosis (MVT) és a tüdőembólia (PE) ugyanannak a klinikai entitásnak, a vénás thrombemboliának (VTE) két különböző manifesztációja. A VTE viszonylag nagy számban fordul elő a nyugati populációban. Az első vénás thrombosis incidenciája 1-2 esemény/1000 beteg-év [1–4]. Az akut esemény kapcsán 3-25 %-os a halálozási arány. Gyakori a recidíva, a betegek 30 %-a 10 éven belül újabb thrombotikus eseményen esik át [5].

A vénás thrombembóliát ma multifaktoriális betegségnek tartják, melynek kialakulásában genetikai tényezők és környezeti hatások együtt vesznek részt. A túlélés javítása, a recidívák és a szövődmények megelőzése érdekében a VTE előfordulását minél nagyobb mértékben meg kell előzni. Ezért fontos a rizikónak kitett személyek azonosítása. A thrombosisra való fokozott hajlam (azaz a *thrombophilia*) oka lehet a haemostasis rendszer veleszületett vagy szerzett rendellenesége vagy a kettő kombinációja.

A thromboemboliás megbetegedések kialakulásában patofiziológiai tényezők is szerepet játszanak, amit Virchow már 1856-ban közzé tett. Ezek a következők: 1. az érfal rendellenességei, 2. a vér áramlási tulajdonságainak (stasis), valamint 3. összetevőinek (alakos elemek: vörösvértest, fehérvérsejt, thrombocytá; plazmafaktorok) megváltozása (Virchow 1856) [6]. Az egyes komponensek jelentősége azonban attól függően eltérő, hogy a thrombotikus esemény a vénákban, az artériákban vagy a kiserekben jön létre. Artériás thrombosisnál az érfal elváltozásainak, vénás thrombosisok esetén a stasisnak és a hiperkoagulabilitásnak tulajdonítanak elsősorban jelentőséget. Ezekben a változásokban szerepet játszó kockázati tényezők lehetnek szerzetek, veleszületettek, valamint a kettő

kombinációja. A szerzett thrombophiliák lényegesen gyakoribbak, mint a veleszületett formák.

I.2. A szerzett thrombophilia kockázati tényezői

A VTE legfontosabb szerzett kockázati tényezői a következők lehetnek, ezek közül a malignus betegségek és a várandósság alatt fellépő véralvadási eltéréseket lejjebb részletezem.

- **malignus betegségek:** mechanikai hatás (vénás kompresszió) következtében kialakult stasis; prokoaguláns anyagok: szöveti faktor-, cancer procoagulant A termelés. A thrombosis rizikója jelentős (2-19 x), függ a daganat, kemoterápia típusától ill. egyéb rizikótényezőktől [7–9].
- **szívelégtelenség:** lassult vénás áramlás. A thrombosis előfordulása 10-22%-os. [10,11]
- **nefrózis szindróma:** antithrombin kiürülés a proteinuria részeként. A thrombosis kialakulásának rizikója 2 x-es. [12]
- **paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria (PNH):** a hemolízis során a vörösvérsejtekből felszabaduló thromboplastikus anyagok hozzájárulnak a hiperkoaguláció kialakulásához. A thrombosis előfordulása 10-20%-os. [13]
- **varicositas:** lassult vénás áramlás, érfalgulladás. Enyhe rizikó thrombosis kialakulására.
- **antifoszfolipid szindróma:** lupus antikoaguláns. 9 x-es a rizikó fokozódás. [14]
- **műtét:** nagy hasi műtét esetén 30 % a kockázati tényező VTE előfordulására, elektív ortopédiai műtétnél 50-60%. [15,16]
- **immobilizáció:** gipszrögzítés; agyi esemény következtében; postoperatív állapot; tartós ágynyugalom (72 óránál hosszabb ideig tartó fekvés); 8 óránál hosszabb repülőút, ... stb. [17,18]
- **várandósság, gyermekágyi időszak:** szabad protein S-, AT- és aktivált protein C szint csökkenés, lassult vénás áramlás jellemző. A rizikó fokozódás 4-50 x-es. [19,20]
- **orális antikoncpciens:** ösztrogén ill. ösztrogén/progeszteron kombinációjú készítmény. A rizikó fokozódás 2-8 x-os. [21,22]

- **hormonpótló terápia:** ösztrogénterápia következtében a thrombosis kialakulására 2-4 x-es a rizikó. [23–25]
- **hiperhomociszteinémia:** abban az esetben, amikor vitaminhiányból és/vagy nem genetikai eltéréstől ered. A rizikó 2-3 x-os thrombosis kialakulására. [26–28]
- **hiperviszkozitás szindrómával járó állapotok:** *myeloproliferatív neoplasia* (pl.: polycythaemia vera, essentialis thrombocythaemia); *lymphoproliferatív betegség* (pl.: myeloma multiplex, Waldenström-macroglobulinaemia)
- **traumák:** érfal károsodás, prokoaguláns anyag kiáramlás [29,30]
- **obesitas:** lassult vénás áramlás
- **előrehaladott életkor:** lassult vénás áramlás, véralvadási aktiváció [31,32]
- **korábbi thromboembóliás megbetegedések**
- **VTE elsőfokú rokonnál**

Malignus betegségek

Friss vagy recidiváló thrombosis, recidiváló thrombophlebitis esetén malignus megbetegedés is húzódhat a háttérben, ami az esetek 10-20 %-ban figyelhető meg [33,34]. A daganatos betegség és thrombosis kapcsolatát először Jean-Baptiste Bouillard írta le 1823-ban [35], majd 1865-ben Trousseau, francia orvos számolt be a gyomorrák és a thrombosis kapcsolatáról [36] és csak jóval később, 1935-ben számoltak be az okkult daganatos betegség és a thrombophlebitis kapcsolatáról [37].

A malignus folyamatok részben a mechanikus hatások (vénás kompresszió) következtében kialakuló stasis, részben a humorális hatások (prokoaguláns anyagok termelése pl. szöveti faktor), részben általános hatások (pl. akut fázis fehérje termelés) révén vezethetnek thromboembóliás megbetegedések kialakulásához [38].

Várandósság

A várandósság szintén prothromboticus állapot kialakulásához vezet, melyben a fokozott véralvadás irányába történő fiziológiai változások a méhlepény funkció fenntartásához és a szülés során fellépő jelentős vérvesztés megelőzéséhez járulnak hozzá [39]. A várandósság alatti alvadásaktiváció háttérében a Virchow triászából a vénás keringés lelassulása, az alvadás-készséget fokozó plazmafaktorok beáramlása (pl. a placenta magas szöveti faktor tartalma) és a természetes alvadásinhibitorok (pl. a szabad protein S antigén szintjének)

csökkenése állhat. Ez feltehetően egyfajta adaptív védekező mechanizmus, amely megakadályozza a súlyos vérzéses komplikációt szülésnél [40–42]. Terhesség során 1000 nőből egynél alakul ki thrombosisos állapot [43,44]. A veleszületett thrombophilia még tovább fokozza a thrombosisra való rizikót a várandósság során, különösen az utolsó trimeszterben és a gyermekágyi időszakban [45,46]. A habituális vetélés háttérében is állhat thrombophilia jelenléte [47,48].

A fent felsorolt, szerzett thrombosisra hajlamosító tényezők előfordulhatnak önmagukban, vagy kombinációban a veleszületett defektusok valamelyikével. Ennek függvényében változhat a thrombosis rizikója. Több kockázati tényező együttes előfordulása magasabb rizikójú lesz a vártnál, mivel a hatások potenciálják egymást. Abban az esetben például, amikor a heterozigóta FV Leiden mutációval rendelkező nő kombinált orális kontraceptívumot szed, 30x-ra emelkedik a thrombosisra való rizikó a normál genotípusú orális kontraceptívumot nem szedőkkel szemben [21,22].

I.3. Veleszületett thrombophilia

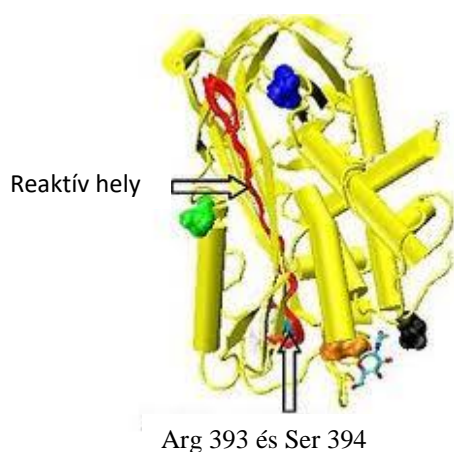
A veleszületett thrombophilia genetikailag meghatározott hajlam, elsősorban vénás thromboemboliás megbetegedések kialakulására. Olyan hiperkoagulabilitás, mely az ismert, szerzett rizikótényezők jelenléte nélkül, önmagában is képes thromboemboliás megbetegedéseket létrehozni, jellemzi az ismétlődések fokozott kockázata is. A homozigóta állapotok önmagukban, illetve több genetikai defektus kombinálódása vezethet klinikailag thromboemboliás megbetegedések kialakulásához, azonban ezekhez a genetikai eltérésekhez gyakran társul valamilyen környezeti rizikótényező is, mely szintén jelentőséggel bír a thromboemboliás kórkép manifesztálódásában. Veleszületett thrombophiliára kell gondolni fiatal korban (~ 45 éves kor alatt) előforduló vénás thromboembolia esetén, ha a thrombosis szokatlan lokalizációjú (nem alsó végtagi), rekurrens thrombosis-, ill. családi halmozódás előfordulásakor.

A legfontosabb veleszületett kockázati tényezők a következők:

- I. antithrombin deficiencia
- II. protein C deficiencia
- III. protein S deficiencia
- IV. FV Leiden mutáció (FV:Q506)
- V. prothrombin gén mutáció (FII G20210A allél jelenléte)
- VI. dysfibrinogenaemiák bizonyos típusai
- VII. emelkedett FVIII szint

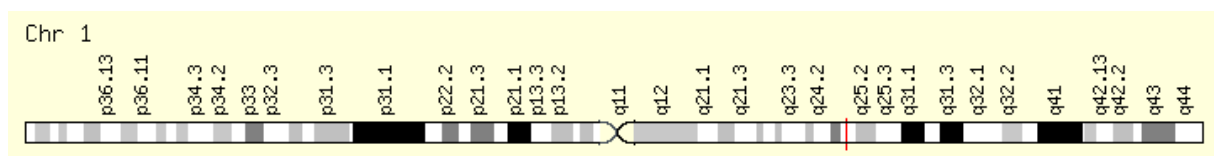
I.3.1. Antithrombin deficiencia

Az antithrombin (AT) 58 kD molekulatömegű 432 aminosavból álló három belső diszulfid híddal rendelkező egyláncú glikoprotein (I.1. ábra), amely a májban termelődik. Félélettideje 2,4 nap. Az AT a szerin proteáz inhibitor családba tartozik (szerpin). Az AT-t kódoló gén (SERPINC1) az 1-es kromoszómán helyezkedik el q25.1 pozícióban, 7 exon és 6 intron alkotja, 13.480 bázispárból áll (I.2. ábra).



I.1. ábra

AT molekula szerkezeti felépítése



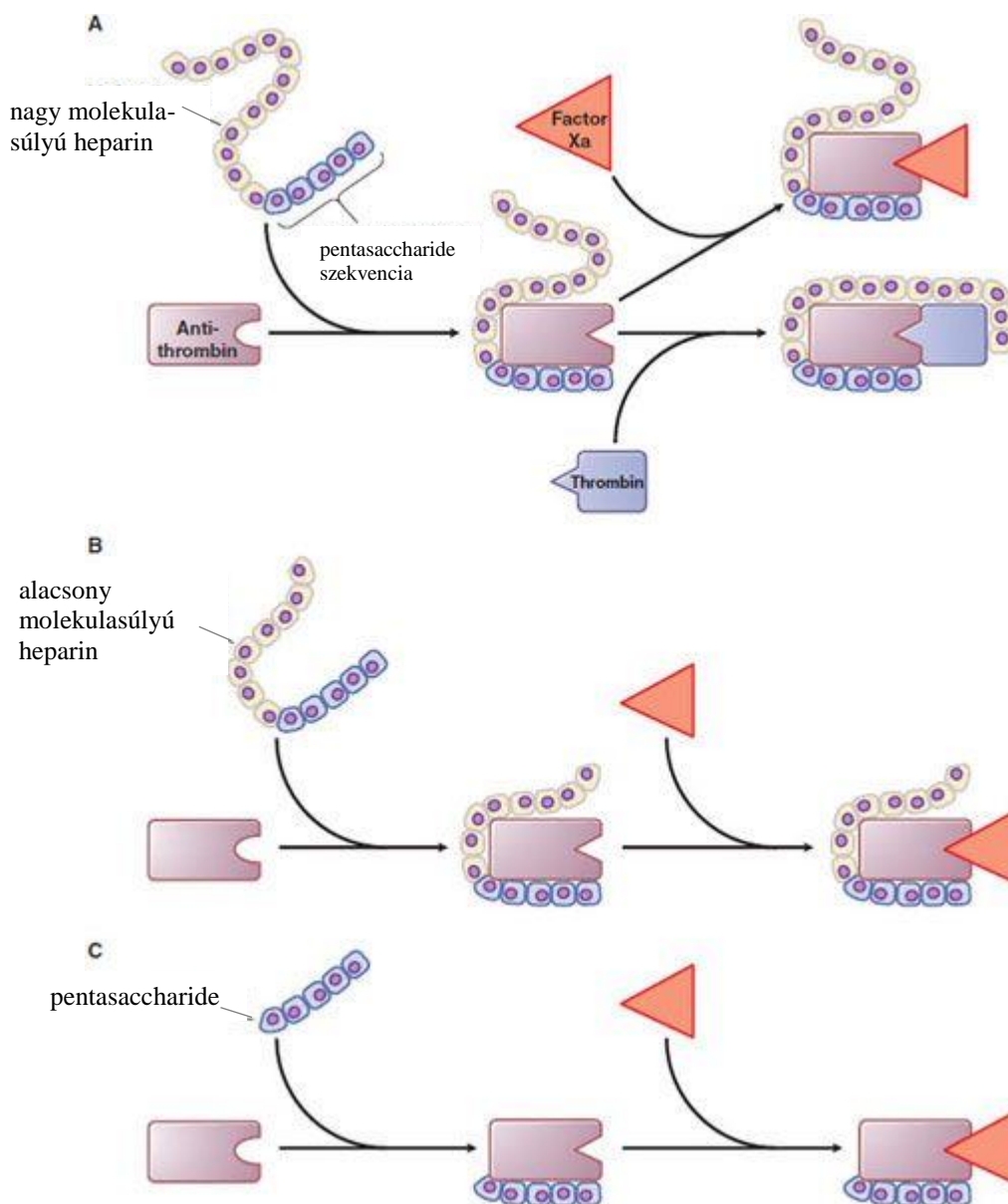
I.2. ábra

A SERPINC1 gén lokalizációja az 1-es kromoszómán a q25.1 helyen található

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINC1>

Az AT molekula kétféle izoformáját (α - és β -izoforma) különböztetjük meg, melyek a glikoziláció fokában térnek el [49]. Az α -izoforma 4 aszparagin (Asn) reziduumon (95, 135, 155, 192) N-glikozilált, míg a β -izoformában az Asn 135 glikoziláció hiányzik. A keringésben 90-95 %-ban α -variáns, 5-10 %-ban pedig β -variáns található. A β -izoforma nagy affinitással kötődik a pentasaccharide-ot tartalmazó negatív töltéssel rendelkező glükózaminoglikánhoz (GAG) (pl. heparin, heparán-szulfát), ezért az endothelium felszínén lévő heparán szulfát proteoglikánok (HSPG) a β -izoforma jelentős részét megkötik az érfalon. Az AT molekula másodlagos és harmadlagos konfigurációval rendelkező SERPIN, 9 α -helix és 3 β -redő alkotja.

Az AT a thrombin (FIIa) inhibitora, ezen kívül a többi szerin-proteáz felépítésű alvadási faktort, a FXa-t és kisebb mértékben a FIXa, FXIa, FXIIa, plazmint és kallikreint is gátolja [49]. Az AT progresszív inhibitor, mivel reakciója az aktivált faktorokkal lassú, viszont heparin jelenlétében akár 500 x-ra is gyorsulhat a gátlás sebessége (I.3. ábra).



I.3. ábra

Nagy molekulasúlyú heparin (unfractionated heparin, UFH) (A), alacsony molekulasúlyú heparin (low molecular weight heparin, LMWH) (B) és pentasaccharide (C) hatásmechanizmusa az AT molekulán.

A pentasaccharide szekvencia kötődik az AT molekulához, ezáltal konformációváltozást idéz elő az AT molekula reactive center loop-ban (RCL), ennek következtében képes a FXa ill. UFH esetén a FIIa megkötésére. Az LMWH-AT- és a pentasaccharide-AT komplex nem képes a FIIa-t kötni, mivel túl rövid a lánc és nem tudja stabilizálni az AT-FIIa komplexet.

<https://basicmedicalkey.com/blood-coagulation-and-anticoagulant-fibrinolytic-and-antiplatelet-drugs/>

Az antithrombinopathiát Egeberg írta le először 1965-ben, ezt az időpontot tekintjük a thrombophilia kutatás kezdetének [50]. Néhány évvel később kiderült, hogy az antithrombin képződési zavarának különböző formái vannak, amik különböző súlyosságú thrombosis hajlammal járnak. 1997-ben már 152 mutációt írtak le, ami azóta 284-re emelkedett a Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SERPINC1>) adatbázisa alapján, viszont ebből csak 7 mutáció felelős MVT kialakulásáért. Az AT deficienciát az International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) ajánlása alapján kvantitatív I. típus és kvalitatív II. típusra osztjuk [51]. A II. típusú képzési zavarok felismerése elsőként hazai szerzők nevéhez fűződik. Két hazai munkacsoport is foglalkozott egyidejűleg ezzel a kutatási területtel, az egyik itt Pécsen, Nagy Ibolya vezetésével [52]; a másik Budapesten, Sas Géza munkacsoportja, ők közölték először az antithrombin Budapest III névre keresztelt defektust, amire az AT molekula heparinkötő helyének működési zavara jellemző [45].

Az AT deficiencia laboratóriumi kimutatása az AT aktivitás- ill. AT antigén szint méréssel történhet, emellett indokolt esetben molekuláris genetikai módszer alkalmazható a deficiencia pontos típusának azonosítására.

I-es típus (kvantitatív): a klasszikus antithrombin deficiencia, csökkent aktivitás és csökkent antigén szint jellemzi (kb. 50%), amely a fehérje szintézisének vagy szekréciójának zavarára utal.

II-es típus (kvalitatív): csökkent aktivitás jellemzi, normál antigén szint mellett. Az AT fehérjét kódoló szakaszban bekövetkezett mutáció miatt variáns fehérje képződik, amely a fehérje funkciójában okoz zavart. Az I.4. ábra szemlélteti a II-es típusú AT deficiencia három altípusát (ld. alább részletesen) és a fehérjét érintő különböző mutációs helyeket.

II.a, PE (pleiotróp) (multiplex) funkcionális defektus jellemzi.

Az AT antigén szint enyhén csökkent (< 70%), vagyis az AT fehérje normál vagy közel normál mennyiségben termelődik, azonban a thrombin inaktiválás (reactive site) és a heparin kötés is zavart szenved működésében.

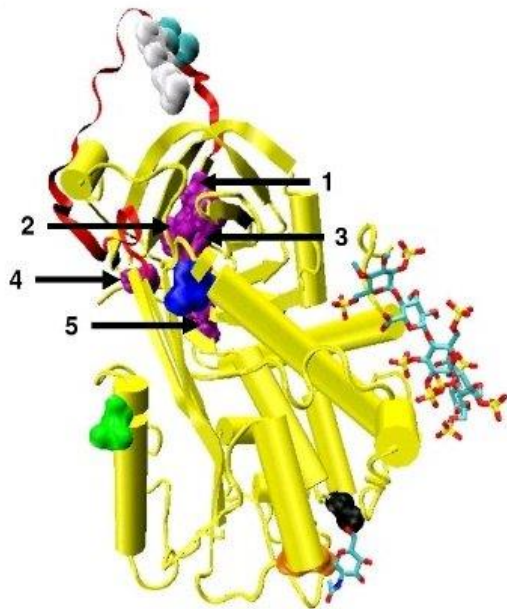
II.b, RS (reactive site, reaktív hely)

A reaktív hely működészavara, az AT molekula reaktív helyére lokalizálódik a mutáció.

II.c, HBS (heparin binding site, heparin kötőhely)

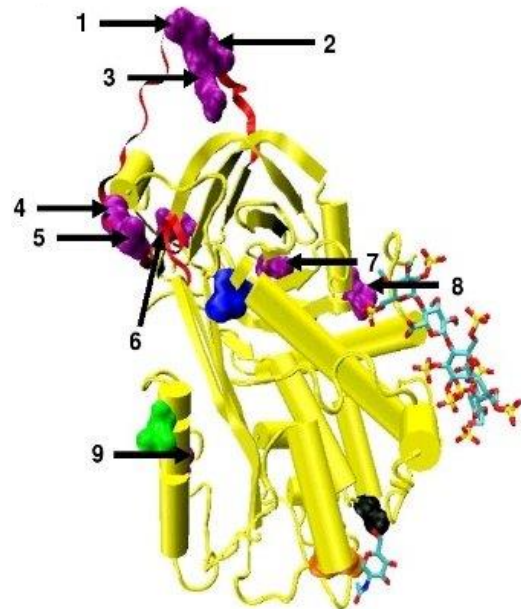
A heparin kötőhely működése szenved zavart. A FIIa és FXa inaktiválása normál módon történik, azonban a heparin nem képes felgyorsítani a folyamatot. Hazánkban az egyik leggyakoribb AT mutáció is ebbe a csoportba tartozik az AT Budapest III, ami a Leu99>Phe aminosavcserét érinti.

II.a típus, pleiotróp mutációk



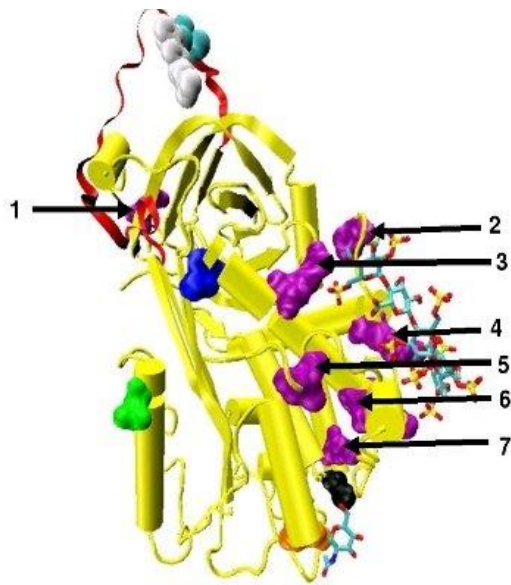
- 1.** Phe 402, **2.** Ala 404 and Asn 405,
- 3.** Arg 406 and Pro 407 **4.** Pro 429
- 5.** Arg 425.

II.b típus, reaktív hely mutációi



- 1.** Gly 392, **2.** Ser 394, **3.** Arg 393,
- 4.** Ala 384, **5.** Ala 382, **6.** Met 251,
- 7.** Ile 284, **8.** Glu 302, **9.** Asn 187.

II.c típus, heparin kötőhely mutációi



1. Glu 237, 2. Pro 41, 3. Arg 129,
4. Arg 47, 5. Ile 7, 6. Arg 24, Ser 116, Gln 118,
7. Leu 99.

I.4. ábra

A II-es típusú AT deficiencia három altípusa.

A II.a típus a pleiotrop (PE), a II.b típus a rektív helyet (RS) és a II.c típus a heparin kötő helyet (HBS) érintő mutációk manifesztálódásainak lokalizációját mutatja.

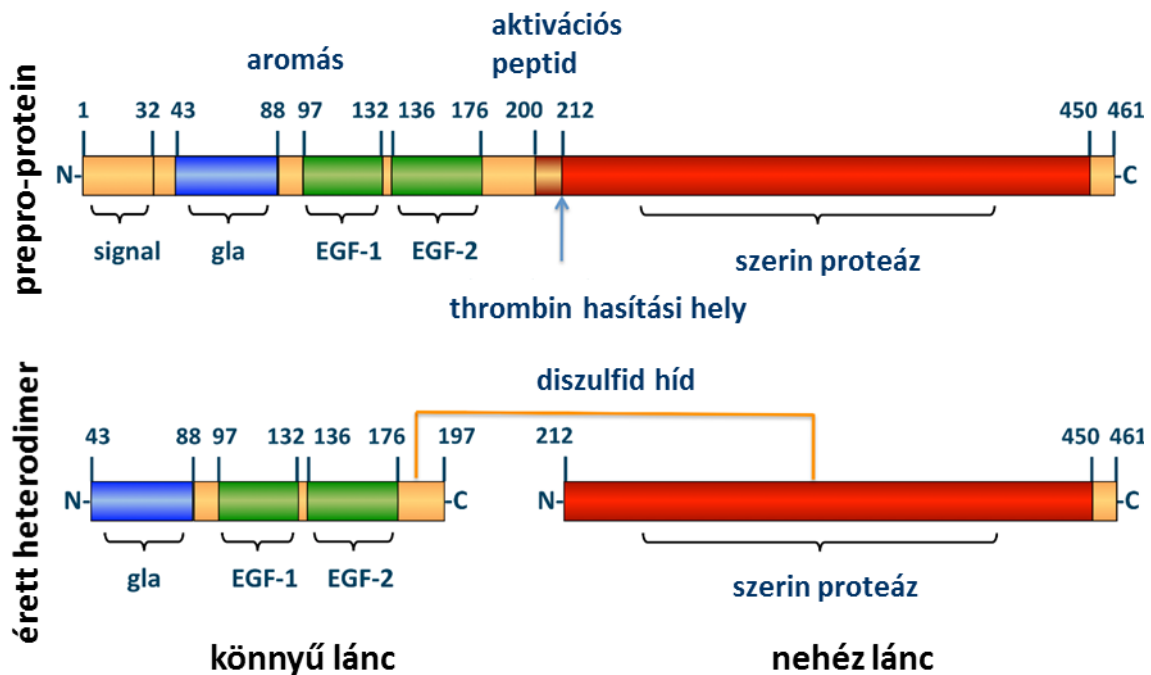
<http://flipper.diff.org/app/items/2873>

A veleszületett AT deficienciára jellemző a fiatal korban történő thromboemboliás megbetegedés, mely gyakran már gyermekkorban jelentkezik. Gyakori a szokatlan thromboemboliás lokalizáció. A veleszületett AT deficiencia autoszomális domináns módon öröklődik, azonban a II HBS altípusban autoszomális recesszív mintázat is előfordulhat. Az I-es típus homozigóta forma az élettel összeegyeztethetetlen. A heterozigóta állapotok között is igen nagy a klinikai variabilitás.

A szerzett antithrombinopathia leggyakoribb okai: akut thrombosis, májcirrhosis, nephrosis syndroma, fehérjevesztő enteropathia, DIC (disseminált intravasculáris coagulatio), sepsis, heparin-, ösztrogén- és L-aszparagináz kezelés.

I.3.2 Protein C deficiencia

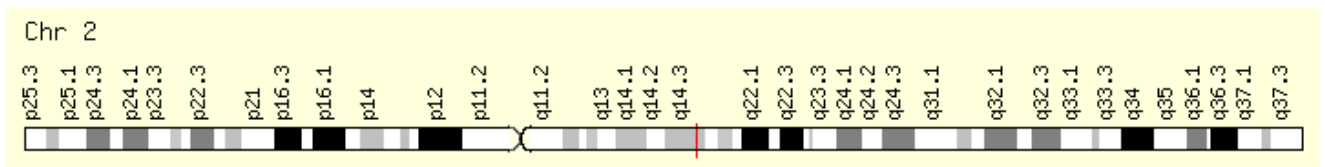
A protein C (PC) 62 kD molekulatömegű 461 aminosavból álló polipeptid [54]. A májban szintetizálódik, inaktív egyláncú prekursor molekula formában. K-vitamin függő véralvadási inhibitor. K-vitamin jelenlétében a hepaticus karboxiláz hatására a glutamát csoportok posztranszlációs módosításon (γ -karboxiláció) esnek át, ennek hiányában inaktív PC molekula jelenik meg a keringésben (PIVKA, protein induced by vitamin K absence). Az N-terminális részen van egy 32 aminosavból álló signal peptid, ami a propeptidet előzi meg. Thrombin hasításának következtében két aminosav leválik, a Lys¹⁹⁸ és Arg¹⁹⁹, ezáltal a PC molekula kétláncú formává alakul át, mely egy könnyű és egy nehéz láncból áll. A könnyű lánc 21 kD, a nehéz lánc 41 kD molekulatömegű. A két láncot diszulfid híd köti össze a Cys¹⁸³ és Cys³¹⁹ helyen (I.5. ábra) [55]. A PC-t kódoló gén a 2-es kromoszómán helyezkedik el q14.3 pozícióban, 9 exon alkotja, megközelítőleg 11.000 bázispárból áll (I.6. ábra).



I.5. ábra

A PC fehérje szerkezeti felépítése

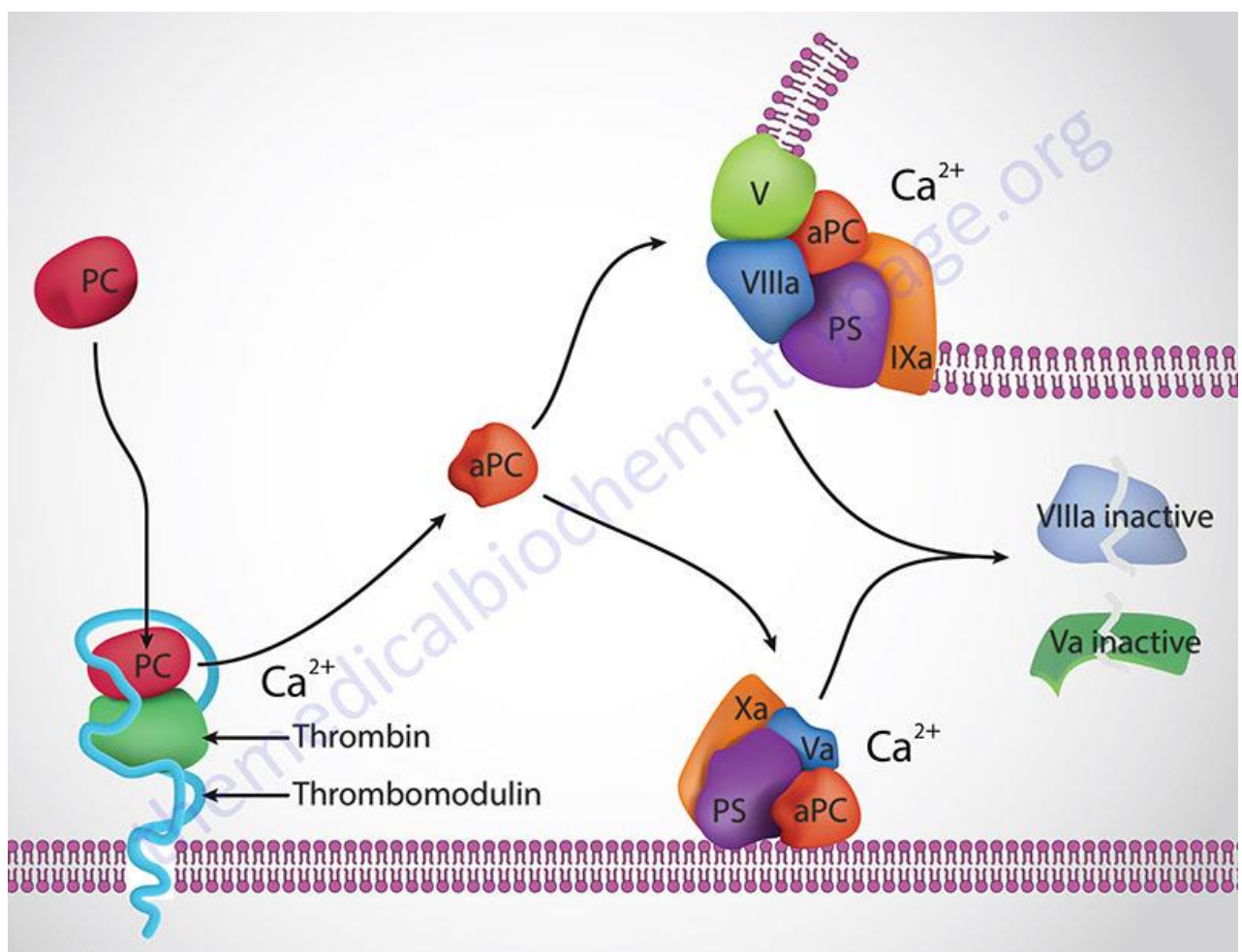
https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_C



I.6. ábra

A PC gén a 2-es kromoszóma q14.3 helyen lokalizálódik

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROC&keywords=protein,c>



I.7. ábra

A PC hatásmechanizmusa

<https://themedicalbiochemistrypage.org/protein-c.php>

A többi véralvadási faktorhoz hasonlóan a PC is proenzim formában van jelen a keringésben. Az aktív enzimé váló átalakuláshoz FIIa, Ca^{2+} -ion, és foszfolipid jelenlétére van szükség. A PC aktivációját két endotheliális faktor, a thrombomodulin (TM) és az endotheliális PC-receptor (EPCR) potenciálja. Az aktivált PC (APC) protein S (PS) jelenlétében neutralizálja a FVa és FVIIIa prokoaguláns aktivitását és gátolja a PAI-1-t (I.7. ábra) [56–58]. A PC deficienciát Griffin 1981-ban közölte [59].

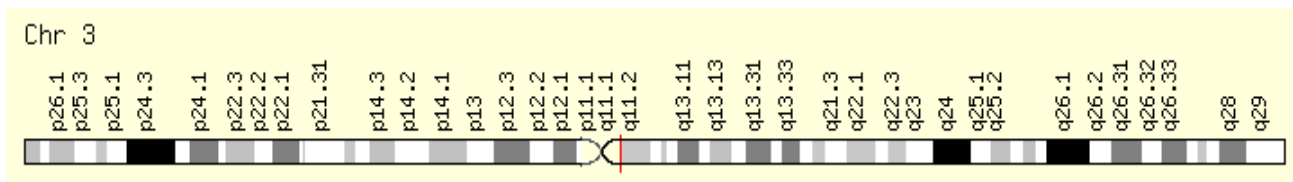
A PC deficiencia laboratóriumi kimutatása a PC aktivitás- ill. PC antigén szint méréssel történhet, emellett indokolt esetben molekuláris genetikai módszer alkalmazható a deficiencia pontos típusának azonosítására.

A PC defektusoknak két fajtáját különböztetjük meg, az I. típus a kvantitatív, ahol az aktivitás és az antigén szint arányosan csökkent, míg a II. kvalitatív típus esetén csökkent aktivitás normál antigénszinttel párosul. A HGMD adatbázis alapján, jelenleg 322 mutációt írtak le, ebből 19 mutáció felelős az I. típus és 4 mutáció a II. típus kialakulásáért (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PROC>).

A PC aktivitás csökkenését okozhatják még a veleszületett defektus mellett: akut thrombosis, májcirrhosis, K-vitamin hiány, nephrosis syndroma, infekció, sepsis, DIC, TTP (thromboticus thrombocytopenias purpura), HUS (haemolyticus uraemias syndroma), PC ellenes antitest, orális antikoaguláns terápia, L-aszparagináz kezelés, posztoperatív állapot, nem megfelelő citrát/vér arány.

I.3.3 Protein S deficiencia

A protein S (PS) 78 kD molekulatömegű, 676 aminosavból álló glikoprotein. Hasonlóan, mint a PC molekula, a PS is a májban szintetizálódik, inaktív prekurzor molekula formában, szintén K-vitamin függő véralvadási inhibitor (PIVKA-faktor) [60,61]. Ez a K-vitamin jelenlétében bekövetkező poszttranszlációs módosítás teszi lehetővé a Ca^{2+} -ionhoz való kötődést. A PS-t kódoló gén a 3-as kromoszómán helyezkedik el q11.1 pozícióban (I.8. ábra).



I.8. ábra

A PS gén lokalizációja a 3-as kromoszómán a q11.1 helyen található

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROS1&keywords=protein,s>

A PS deficienciát egyidejűleg két munkacsoport is leírta 1984-ben [62,63]. Jelenleg a HGMD adatbázis alapján 301 mutáció ismert, amely a PS gént érinti, ebből bizonyítottan 8 mutáció vezet MVT kialakulásához (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PROS1>). A PS potenciálja a PC antikoaguláns aktivitását, feltehetően azzal, hogy növeli a PC affinitását a foszfolipid membránhoz. Hatásmechanizmusát az I.7. ábra szemlélteti.

A keringő PS 60%-a a C4BP fehérjével (C4 binding protein) komplexet képez. Ebben a komplexben a PS nem rendelkezik semmilyen antikoaguláns hatással. A vérben a C4BP 20%-ban kis molekulatömegű formában van jelen, ami nem kötődik a PS-hez, míg 80%-ban nagy molekulatömegű, ez a forma képes a PS-el komplexet képezni. Az össz PS 40%-a szabad PS formában fordul elő a vérkeringésben. Ez a szabad forma képes az APC-hez kötődni, mint kofaktor és potenciálni a hatását [64,65].

A PS deficiencia laboratóriumi kimutatása a PS aktivitás-, PS antigén- és szabad PS antigén szint méréssel történhet, emellett indokolt esetben molekuláris genetikai módszer alkalmazható a deficiencia pontos típusának azonosítására.

A PS defektusoknak három típusát különböztetjük meg, az I. típus a kvantitatív, ahol az aktivitás és az antigén szint arányosan csökkent, míg a II. típus a kvalitatív estén a csökkent aktivitás normál antigénszinttel (az össz és a szabad forma egyaránt) párosul. A III. típusba tartoznak azok a PS defektusok, ahol az össz PS szint normál, viszont a szabad PS csökkent.

A PS aktivitás csökkenését okozhatják a veleszületett defektus mellett még: akut thrombosis, májcirrhosis, K-vitamin hiány, nephrosis syndroma, akut fázis reakció (emelkedett C4BP következtében megnő a C4BP-PS komplex arány), DIC, orális antikoncepció, terhesség, orális antikoaguláns terápia, L-aszparagináz kezelés, posztoperatív állapot, nem megfelelő citrát/vér arány.

I.3.4. FV Leiden mutáció

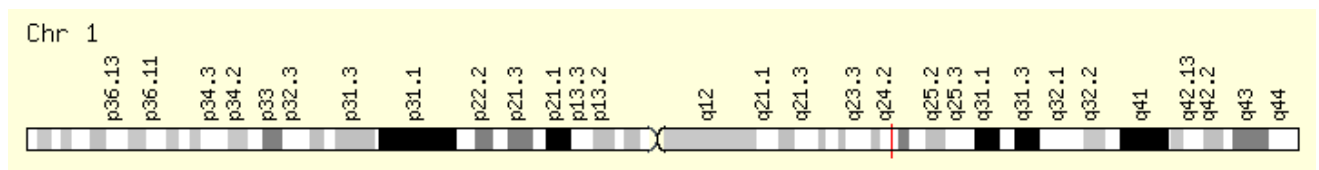
Az aktivált PC hatékony működését lassító folyamatokat Dahlbäck 1993-ban APC-rezisztencia néven közölte [66]. Az APC-rezisztencia hátterében az esetek többségében az 1994-ben közölt genetikai defektus, a Leiden-mutáció áll [67,68]. A Leiden mutációt az FV gén pontmutációja okozza, a gén 1691-es pozíciójában lévő guanin-adeninre cserélődik, aminek következtében a fehérje 506. helyen lévő aminosav arginin helyett glutaminra (Arg⁵⁰⁶ → Glu⁵⁰⁶) cserélődik. Ezáltal az aktivált PC lassabban inaktiválja a FVa-t. A FV gén az 1-es kromoszómán helyezkedik el a q24.2 pozícióban (I.9. ábra).

A FV Leiden mutáció kimutatása molekuláris genetikai módszerekkel történik [69]. Viszont van lehetőség APTI (aktivált parciális thromboplastin idő) alvadási idő alapú teszttel meghatározni az APC-rezisztenciát. Ebben az esetben két alvadási időt kell mérni APC hozzáadásával ill. nélküle. Normál esetben az APC-vel mért APTI több, mint a kétszeresére emelkedik. Az APC-rezisztens betegek esetében a várt APTI megnyúlás elmarad. Az eredmény a két alvadási időből képzett ráta lesz (a vizsgált beteg mintája/normál minta). Az előbb ismertetett metodika az első generációs APC-rezisztencia teszt. A második generációs APC-rezisztencia teszt annyiban különbözik az előzőtől, hogy a mintákat FV hiányplazmával kell hígítani, így az alvadás sebességét a beteg V faktora határozza meg.

Leiden homozygota vad típusnak felel meg, amikor az APC-ráta 2,6 felett van; Leiden heterozygota mutáns, amikor 1,7 – 1,2 között van és Leiden homozygota mutáns, amikor 1,2 alá esik a kapott eredmény.

Az APC-rezisztencia vizsgálat eredményét módosíthatják különböző tényezők: lupus antikoaguláns jelenléte, terhesség, FVIII interferencia (250% feletti érték esetén), heparin interferencia (1 IU/ml felett), továbbá a nem megfelelően kezelt minta, mivel az V faktor labilis szerkezetű, rövid féléletidejű, ezért különösen fontos ezen teszt vizsgálata során a megfelelő preanalitikai előírásokat betartani.

A kapott APC-rezisztencia eredményeket molekuláris genetikai tesztekkel lehet konfirmálni.



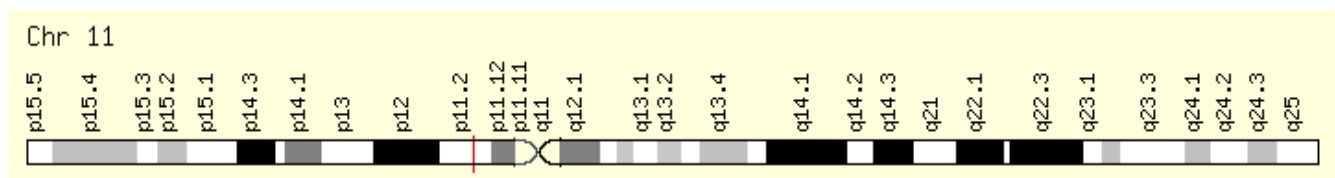
I.9. ábra

A FV gén lokalizációja az 1-es kromoszómán a q24.2 helyen található

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=F5&keywords=factor,V>

I.3.5. Prothrombin gén mutáció

A FII gén mutáció hátterében a 20210-es pozícióban lévő guanin-adeninre cserélődés áll, FII G20210A-nak jelöljük. Poort írta le 1996-ban ezt a gyakori thrombosisra hajlamosító mutációt, ami a 11-es kromoszóma rövid karján p11.2 helyen lokalizálódik (I.10. ábra). A heterozygota forma 2-4 x-es, a homozygota forma pedig 10 x-es kockázatot jelent thrombosis kialakulására [70]. Ezen mutáció esetén a prothrombin molekulát kódoló gén 3' nem transzlálódó régiójában báziscsere történik, aminek következtében a normálisnál nagyobb mennyiségben termelődik prothrombin. A FII G20210A pontmutáció kimutatása molekuláris genetikai módszerekkel történik [71].



I.10. ábra

A FII gén lokalizációja a 11-es kromoszóma p11.2 helyen található

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=F2&keywords=FII>

II. THROMBOPHILIA VIZSGÁLATA KOAGULÁCIÓ INHIBITOR POTENCIÁL (CIP) MÓDSZERREL

II.1. Bevezetés

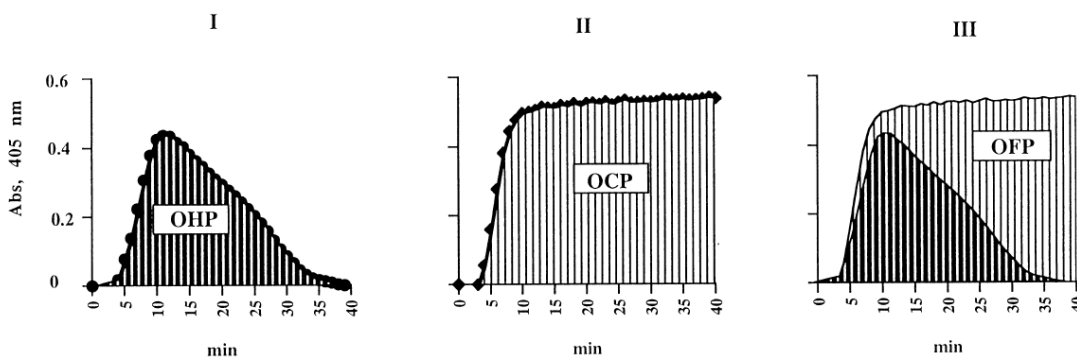
A veleszületett thrombophilia diagnózisa idő és költségigényes folyamat, hiszen az egyes defektusok csak külön-külön vizsgálhatók. Mind a betegek mind az orvosok számára kedvező volna, ha lenne egy megbízható globális véralvadási teszt, amellyel eldönthető, hogy az adott beteget szükséges-e tovább vizsgálni az egyes defektusokra speciális tesztekkel, vagy sem [72–75]. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan rutin laboratóriumi módszer, mellyel a vér globális hipo-, vagy hiperkoagulábilis állapotát diagnosztizálni tudnánk. Egy ígéretesnek tűnő módszer az Abildgaard és mtsai. által kidolgozott metodika, a Koaguláció Inhibitor Potenciál (Coagulation Inhibitor Potential, CIP) elnevezésű módszer, amit manuálisan végeztek ELISA lemezen [76,77]. Ezt a metodikát adaptáltuk laboratóriumunkban az ACL 9000 optikai véralvadási automatára. Az automatizálás által a teszt kivitelezése gyorsabb lett, egyszerre több beteg mintáját is lehet így analizálni, és a manuális tevékenységből adódó esetleges random hibák is kiküszöbölhetőkké váltak ezáltal. A CIP metodika a fibrinképződést monitorizálja Na-citráttal alvadásgátolt thrombocytaszegény plazmában, és a véralvadás gátlását méri Protac és pentasaccharide jelenlétében. A Protac és a pentasaccharide a véralvadás gátlásának fokozására szolgál. A Protac a PC-rendszeren, a pentasaccharide pedig az AT-on keresztül hat. A Protac aktiválja a PC-t, ezáltal inaktiválódik a FVa és FVIIIa, aminek következtében fokozódik a véralvadás gátlása [56]. Viszont, ha FV Leiden mutáció áll fenn - ebben az esetben az aktivált PC hasítási helyénél történik mutáció - aminek következtében az aktivált PC lassabban inaktiválja a FVa-t, ezáltal tovább képződik a thrombin és létrejön a hiperkoaguláció. A pentasaccharide felgyorsítja az AT hatásának a sebességét és ezáltal hamarabb bekövetkezik az általa szabályozott véralvadási faktorok gátlása (FIIa, FXa, FXIa, FXIIa, plazmin, kallikrein) [49].

A CIP módszer az „Overall Haemostasis Potential” (OHP, teljes haemostasis potenciál) módszernek a módosított változata, amit S.He és mtsai. dolgoztak ki [78,79]. Az OHP módszer spektrofotometriásan detektálja a fibrinképződést és a fibrinolízist. Az OHP I. metodikánál CaCl_2 -dal rekalcifikált plazmához thrombint és t-PA-t (szöveti plazminogén aktivátor) adnak, ezáltal lehetséges vizsgálni a fibrinképződést és a fibrinolízist is. A mérés spektrofotometriásan történik 405 nm-en 40 percen át. Az eredményt a mérési pontok által

alkotott görbe alatti területből kapjuk meg AUC-ben kifejezve (area under the opacity curve). Az OHP I metodikának a módosított változata az OHP II. Annyiban különbözik az előzőtől, hogy ugyanazon a mintán két reakciót futtatnak le, a thrombin csökkentett koncentrációban van jelen mindkét reakcióban, viszont a t-PA az egyikben benne van, a másikkól hiányzik. A t-PA nélküli reakció az OCP (Overall Coagulation Potential, teljes alvadási potenciál). A két reakcióból kapott görbék különbségéből kapjuk meg az OFP-t (Overall Fibrinolysis Potential, teljes fibrinolysis potenciál), amit a következő képlet alapján számíthatunk ki: $OFP = ((OCP - OHP)/OHP) \times 100\%$. (II.1. ábra)

Ez a metodika érzékenynek bizonyult a hiperkoaguláció vonatkozásában; a normál terheseknél, preeclampsia-ban és a veleszületett FV Leiden mutációval rendelkező thrombophiliás betegeknél, de a FII mutáció okozta thrombophilia kimutatására nem alkalmazható [79].

S. He et al./Thrombosis Research 103 (2001) 355–361



II.1. ábra

Overall Haemostasis Potential (OHP, teljes haemostasis potenciál), Overall Coagulation Potential (OCP, teljes véralvadási potenciál) és Overall Fibrinolysis Potential (OFP, teljes fibrinolysis potenciál) reakciógörbéi normál mintában.

S. He és mtsai [78]

II.2. Célkitűzés

1. Az eddig manuálisan kivitelezhető CIP metodika elsajátítása, automatizálása, optikai koagulométerre történő adaptálása.
2. Az automatizált CIP teszt teljesítményjellemzőinek a vizsgálata.
3. CIP teszt alkalmazhatósága gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon.
4. Egészséges önkéntesek Na-citráttal alvadásgátolt plazmájának CIP módszerrel történő mérése.
5. A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ (PTE KK) I.sz Belgyógyászati Klinikájának thrombophilia szakrendelésén megjelent VTE-n átesett betegek ill. ismert veleszületett thrombophiliával rendelkező betegek családtagjainak Na-citráttal alvadásgátolt plazmájának vizsgálata thrombophiliaszűrésre alkalmazott rutin laboratóriumi módszerekkel és a CIP metodikával.
6. A thrombophiliás betegeknél kapott rutin laboratóriumi eredmények és a CIP metodikával meghatározott eredmények összevetése.
7. Az új módszer alkalmazhatóságának vizsgálata.

II.3. Anyag és módszer

II.3.1. A vizsgálatba bevont személyek

Vizsgálatainkba 319 személyt vontunk be (126 fő egészséges kontrollt és 193 fő thrombophiliával rendelkező beteget). A helyi etikai bizottság engedélyével végeztük a vizsgálatainkat (engedélyszám: 6544). Minden vizsgálatba bevont személy szóbeli és írásbeli tájékoztatásban részesült, a vizsgálatokhoz írásban adták hozzájárulásukat.

A minták a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ (PTE KK) I. sz Belgyógyászati Klinikájának thrombophilia szakrendelésén megjelent, korábban thrombosison átesett ill. ismert veleszületett thrombophiliával rendelkező betegektől és családtagjaiktól származtak. A mintavétel a thromboembóliás esemény után legalább 3 hónap elteltével történt. Azok a betegek, akik tartós orális antikoaguláns (kumarin, warfarin) terápián voltak, át lettek állítva LMWH-ra a vizsgálat előtt min. 2 héttel. Mintavételkor akut betegsége utaló tünet nem állt fenn. A veleszületett thrombophilia kimutatása standard laboratóriumi módszerekkel történt, mint az AT-, PC-, PS aktivitás és APC rezisztencia meghatározása Instrumentation Laboratory (IL) készülékkel, ACL optikai koagulométeren és IL reagensekkel (Instrumentation Laboratory, Milánó, Olaszország). További vizsgálatokra azokat az AT-, PC- és PS deficiens mintákat válogattuk ki, amelyek esetében ismételten határérték alatt maradt az aktivitás szintje. A FV Leiden mutáció kimutatása Zöller és Dahlbäck, a FII G2021A mutáció Danneberg módszere szerint történt [69,71].

II.3.2. Mintagyűjtés és reagensek

A vérvétel könyökvénából történt Vacutainer csőbe (Becton Dickinson), mely 1/10 részben tartalmazott 0,129 M nátrium citrátot. A nátrium citráttal alvadásgátolt vért 20 °C-on, 2000 g-n, 20 percig centrifugáltuk. Az így nyert thrombocytá szegény plazmát Eppendorf csövekben – 70 °C –on tároltuk feldolgozásig (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) H21-A5 dokumentum alapján).

A CIP méréseket ACL 9000 optikai véralvadási automatán végeztük (Instrumentation Laboratory, Milánó, Olaszország).

Arixtrát (fondaparinux nátrium) használtunk pentasaccharide-ként, amit a GlaxoSmithKline Ltd.-től (Gödöllő, Hungary) szereztünk be. Rekombináns human thromboplastin (rekombináns human szöveti factor és szintetikus foszfolipid) (Dade[®] Innovin[®], Dade Behring) Diagnosticum Zrt.-től (Budapest, Hungary), Protac[®] reagens (Agkistrodon contortrix contortrix nevű kígyó mérgeből vonják ki) Pentapharm cégtől (Basel, Switzerland) és az AT-, PC- és PS deficiens plazma az Affinity Biologicals-tól (Ontario, Canada) származik.

II.3.3. Koaguláció Inhibitor Potenciál (CIP) metodika

A CIP módszer az OHP (Overall Haemostasis Potential) metodikából fejlődött ki, amit S.He és mtsai. dolgoztak ki [78,79]. Az OHP II változatot fejlesztették tovább Abildgaard és mtsai. [78,80]. Úgy módosították a reakciót, hogy elhagyták a t-PA-t, valamint Protac-ot és pentasaccharide-ot adtak a reakcióelegyhez, amivel a protein C és az AT hatását fokozták thrombophiliás betegek citráttal alvadésgátolt plazmáin [80]. Ezt az új metodikát CIP-nek (Coagulation Inhibitor Potential) nevezték el. A CIP metodika elve: két reakcióból áll, amit „A” és „B” reakciónak nevezünk. Na-citráttal alvadésgátolt plazmát szöveti faktor és CaCl₂ oldat hozzáadásával aktiváljuk, majd a képződő fibrinpolymerisatio-t detektáljuk (a plazma opálásodásával egyenesen arányos a képződő fibrin mennyisége) 405 nm-es hullámhosszon 20 percig. Az eredményt AUC-ben (görbe alatti terület) adjuk meg [78,79]. Ez az „A” reakció. A „B” reakció annyiban különbözik az előbb leírtaktól, hogy Protac és pentasaccharide kerül még a reakcióelegybe, melynek segítségével az alvadás gátlása alakul ki az AT- és protein C- rendszer aktiválásán keresztül [81,82]. Ezáltal a „B” reakcióban az alvadás aktivitás csökkent a normál plazmában, míg a thrombophiliás plazmában ez a gátlás kevésbé kifejezett [80]. Az eredményt a két reakció görbe alatti terület különbségéből kapjuk meg és a következő képlet alapján számítjuk: $CIP = ((A-B)/A) \times 100$, amit Unitban (U) fejezünk ki. A teljes gátlás 100 U-nak felel meg, ami egy egészséges egyén eredményének feleltethető meg.

II.3.4. A CIP metodika automatizálása

A CIP tesztet az ACL 9000 optikai véralvadási automatára telepítettük fel (Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) és alkalmaztuk méréseink kivitelezéséhez a korábban Abildgaard

és mtsai. által használt manuális metodika helyett (II.2. ábra). Ez a műszer alkalmasnak bizonyult nem csak a cég által fellepített, gyári tesztek elvégzésére, hanem új tesztek automatára való applikálására, telepítésére, mivel rendelkezik erre a célra alkalmas nyitott csatornával is. A készüléknek két detektálási csatornája van a 405 nm-es hullámhosszú kromogén csatorna és a 660 nm-es hullámhosszú nefelometriás csatorna. A CIP méréshez a 405 nm hullámhosszúságú detektálási csatornát használtuk az irodalmi adatok alapján.

További előnye az automatának, hogy rendelkezik a hűtést igénylő reagensek számára alkalmas térrel, ezáltal biztosítja a hosszan tartó stabilitásukat. Mindazonáltal egyszerre 18 mintát tudunk analizálni, mivel egy rotoron 20 küvetta (mérési hely) található (II.3. ábra). Ebből 2 mérési hely az optikai referensre használdik el, amit a Factor Diluent és a mosófolyadék tesz ki.



II.2. ábra

ACL 9000 optikai véralvadási automata

www.dotmed.com



II.3. ábra

A 20 küvettával rendelkező rotor

http://www.thomasci.com/Laboratory-Supplies/Spectrophotometer-Cells-Cuvettes/_Rotor-Cuvette-for-IL-ACL-Models

A teszt applikálás első lépése az új reagensek definiálása az oldatokhoz, mennyiségük megadása μl -ben, majd a hullámhossz nm -ben és a mérési idő s -ban.

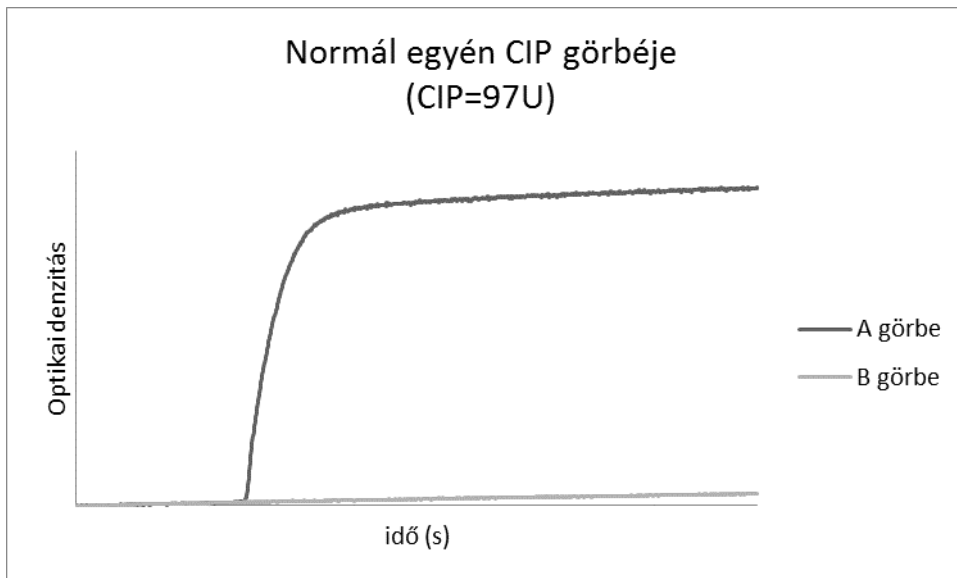
Az „A” reakció $100 \mu\text{l}$ Na-citráttal alvadásgátolt plazma, $85 \mu\text{l}$ Tris puffer (66 mmol/L Trisma base és 130 mmol/L NaCl, $\text{pH}=7,4$), $15 \mu\text{l}$ thromboplastin (Dade Innovin $1/4500$, $1,34 \text{ pmol/L}$) és CaCl_2 (17 mmol/L) 2:1 arányú keveréke. A „B” reakció $100 \mu\text{l}$ Na-citráttal alvadásgátolt plazma, $35 \mu\text{l}$ Tris puffer, $22 \mu\text{l}$ Protac (1U/ml), $28 \mu\text{l}$ Arixtra ($10 \mu\text{g/ml}$) és a $15 \mu\text{l}$ thromboplastin és CaCl_2 2:1 arányú keveréke.

Mindkét reakcióban $200 \mu\text{l}$ a reakcióelegy végtérfogata, az alvadást a thromboplastin és CaCl_2 - oldat keveréke indítja be. A Protac hozzáadása után 5 perc inkubációs idő van. Ez az inkubálás az „A” reakcióban is megvan, de ott Protac helyett puffert adunk a reakcióelegyhez.

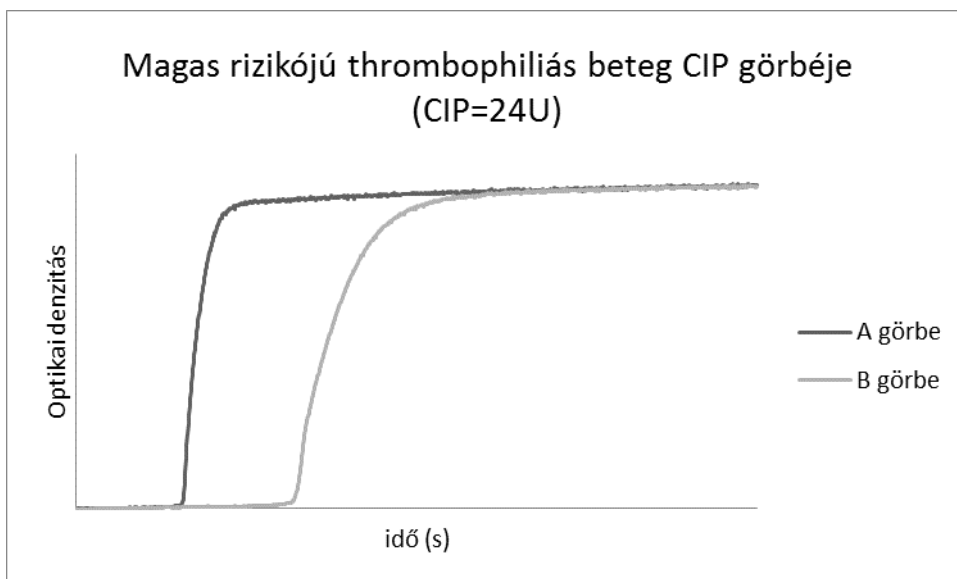
A mérés 405 nm hullámhosszon történik az ACL 9000 optikai véralvadási automatán, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 1000 másodpercig; másodpercenként detektálja a műszer a mérési adatokat, amit abszorbanciában fejez ki. A mérési adatokat görbén lehet ábrázolni az idő függvényében. Az adatok értékelése Microsoft Office Excelben történt, az alábbi képlet alapján: $\text{CIP} = ((A - B)/A) \times 100$, amit Unitban (U) fejezünk ki. A képletben, „A” az „A” reakció során mért reakció görbe alatti területet, a B” a „B” reakcióban mért reakció görbe alatti területet jelenti. A

teljes gátlás 100 U-nak felel meg, ami egy egészséges egyén eredményének feleltethető meg. A II.4. ábrán egy egészséges és egy thrombophiliás beteg CIP görbéi láthatók.

A.



B.



II.4. ábra

Normál és thrombophiliás minta CIP görbéi

A II.4.A. ábrán egy egészséges egyén, a II.5.B. ábrán egy magas rizikójú thrombophiliás beteg CIP görbéi láthatóak. A CIP eredmény a két görbe alatti terület különbségéből adódik az $(A-B)/A \times 100$ képlet alapján, Unitban (U) kifejezve. A teljes gátlás 100 U-nak felel meg, amely egy egészséges egyén eredményének feleltethető meg. Ezt a fenti ábra jól szemlélteti, a

„B” reakcióban nincs alvadékképződés, mivel a Protac és/vagy az Arixtra hat, tehát jól működik a Protein C- és/vagy AT rendszer a vizsgálati egyénben. A CIP eredménye a kontroll személynek 97 U. Ezzel ellentétben a thrombophiliás beteg esetében (lenti ábra), ahol a „B” reakcióban is van alvadékképződés, tehát a Protac és/vagy Arixtra nem hat megfelelően. A két görbe alatti terület különbsége csökkent, jelen esetben a CIP eredmény 24 U.

II.3.5. Statisztikai analízis

Az eredményeket az adatok eloszlásának megfelelően mediánban tüntettük fel és megadtuk az interquartilis tartományt is. A CIP eredmények eloszlásának vizsgálatát **Kolmogorov-Smirnov** teszttel végeztük. A különböző thrombophilia csoportok és az egészséges kontroll csoport közötti statisztikai különbséget **Kruskal-Wallis** teszt **Dunett** féle *post hoc* analízissel végeztük. Az optimális cut-off érték meghatározása a ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist alkalmaztuk. Minden statisztikai elemzésre az SPSS 24.0 (IBM Corporation, New York, USA) statisztikai programot használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak tartottuk az eredményeket a $p < 0,05$ értéknél.

II.4. Eredmények

II.4.1. A CIP metodika reprodukálhatósági vizsgálata, within-run és day-to-day variabilitás

Megvizsgáltuk a CIP metodika reprodukálhatóságát normál és thrombophiliás (FVL hom) minta esetén az ACL 9000 véralvadási automatára való alkalmazása során. Mind a két minta esetén végeztünk within-run (intra-assay variabilitás, egy időben ugyanaz a minta 18-szor lemérve) és day-to-day (inter-assay variabilitás, 18 különböző napon ugyanaz a minta lemérve) reprodukálhatósági vizsgálatot. Azért választottuk a 18 mérési számot, mivel az ACL 9000 optikai véralvadási automata egyszerre 18 minta lemérésére alkalmas. Mind a két mintatípus és mindkét vizsgálati mód esetén a $CV < 10\%$, ezért a CIP metodika reprodukálhatóságát megfelelőnek ill. alkalmasnak tartottuk további mérésekre. (II.1. táblázat)

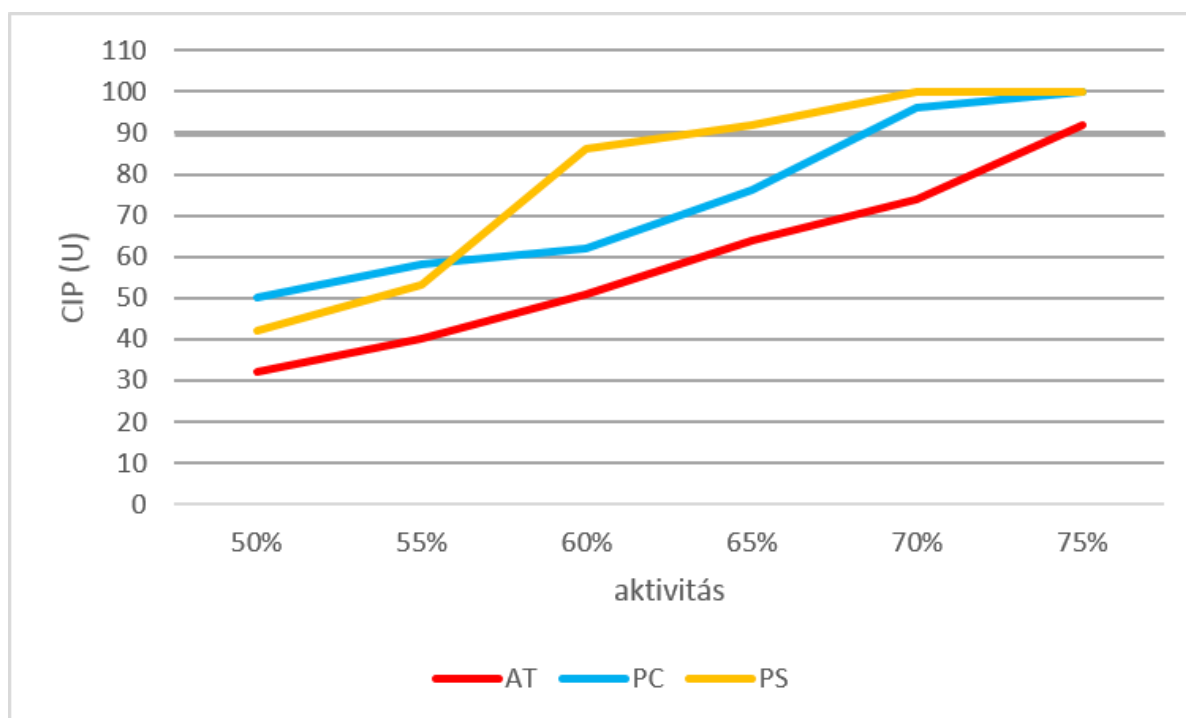
CIP (U)	Within-run precision (n=18)			Day-to-day precision (n=18)		
	átlag	SD	CV%	átlag	SD	CV%
Normál kontroll plazma	96,11	1,03	1,07	95,4	2,24	2,35
Thrombophiliás plazma	35,8	1,50	4,21	35,4	2,76	7,82

II.1. táblázat

CIP metodika reprodukálhatóság vizsgálatának eredménye normál és thrombophiliás (FVL hom) minta esetén

II.4.2. A CIP metodika alkalmazása gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon

A CIP teszt alkalmazhatóságát először kereskedelmi forgalomban elérhető gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon vizsgáltuk. Mind a három deficiens plazmából 50%-, 55%-, 60%-, 65%-, 70%- és 75%-os hígítást készítettünk normál plazma hozzáadásával, majd meghatároztuk a CIP értéket. Az 50%-os hígításnál a CIP érték AT esetében 32 U, PC esetében 50 U és PS esetében 42 U lett. Mind a három deficiens plazmából 90 U feletti CIP értéket mértünk az AT 75%-, PC 70%- és PS 65%-os aktivitásnak megfelelő hígításoknál. (II.5. ábra) Ezek az aktivitási értékek, az egyes paraméterek esetében, megfeleltethetőek a normál referencia tartomány alsó határértékével.



II.5. ábra

Különböző aktivitású gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon mért CIP értékek

II.4.3. A vizsgálatba bevont személyek jellemzői

Vizsgálatainkba 319 személyt vontunk be. 126 fő egészséges kontrollt és 193 fő thrombophiliával rendelkező beteget vizsgáltunk, ebből AT deficiens (n=12), PC deficiens (n=14), PS deficiens (n=4), FVL homozygota mutációval (n=9), FVL heterozygota mutációval (n=115), FII heterozygota mutációval rendelkező (n=8) és kombinált thrombophiliával rendelkező (n=29) csoportokat képeztünk. A kombinált thrombophiliás betegek esetében kettő vagy több veleszületett deficiencia áll fenn egyidőben a fent felsoroltak közül. A vizsgálatba bevont személyek jellemzőit a II.2. táblázat szemlélteti.

	n	%	életkor	nem	
			($\text{átlag} \pm \text{SD}$)	nő	ff
I. kontroll	126		34 \pm 13	73	53
II. thrombophilia	193		40 \pm 16	132	63
II/1. magas rizikójú thrombophilia	70	36	39 \pm 15	47	23
AT deficiens	12	6	45 \pm 15	6	6
PC deficiens	14	7	34 \pm 21	9	4
PS deficiens	6	3	31 \pm 9	5	1
FVL homozygota	9	5	38 \pm 15	5	4
kombinált thrombophilia*	22	11	38 \pm 15	16	6
FVL het + FII het**	7	4	49 \pm 15	6	1
II/2. alacsony rizikójú thrombophilia	123	64	41 \pm 17	85	38
FVL het	115	60	41 \pm 15	81	34
FII het	8	4	42 \pm 19	4	4

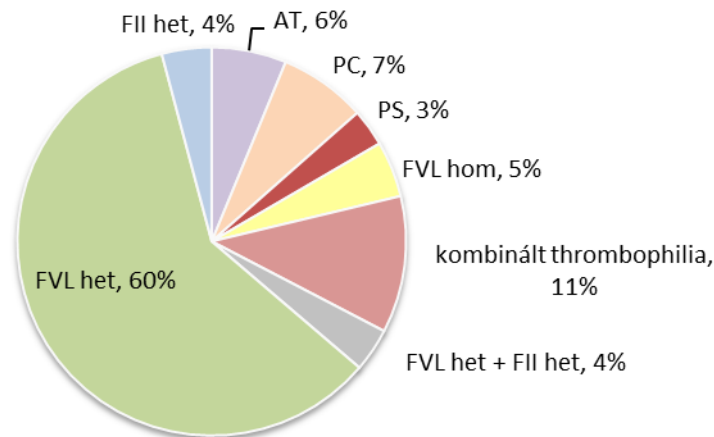
II.2. táblázat

A vizsgálatba bevont személyek jellemzői

* kivéve a FVL het + FII het kombinált thrombophilia alcsoportot

**kombinált thrombophilia alcsoport

A thrombophiliásokat két csoportba soroltuk klinikai súlyosság szerint. A betegek 36%-a került a *magas rizikójú thrombophiliás* csoportba, ezek közül AT 6%, PC 7%, PS 3%, FVL hom 5%, kombinált thrombophilia 15%; a kombinált csoporton belül a FVL het + FII het alcsoport 4%-ot foglal magába. A betegek túlnyomó többsége, 64%-a *alacsony rizikójú thrombophiliás* csoportba; ezen belül FVL het 60%, FII het 4%. II.6. ábra



II.6. ábra

A különböző thrombophilia típusok megoszlása a vizsgált populációban

II.4.4. Kontroll és thrombophiliás minták CIP eredményeinek értékelése

Normál kontroll egyének és thrombophiliás betegek plazmáit analizáltuk a CIP teszttel. A mért eredmények eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Az adatok eloszlása szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) mutatott a normál eloszláshoz képest, ezért Kruskal-Wallis teszt Dunnett post hoc analízist alkalmaztunk a kontroll és a thrombophiliás csoportok összehasonlítására. Szignifikánsnak ($p < 0,01$) találtuk a különbséget az AT-, PC-, PS-deficiens, FVL hom, FVL het, és kombinált thrombophilia (kivéve FVL het + FII het alcsoportot) csoportok esetében, összehasonlítva a normál kontrollal. Ezen thrombophiliás csoportok esetében a CIP medián értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a normál csoportéhoz képest. A magas rizikójú thrombophiliába tartozó kombinált csoportból a FVL het + FII het kombinációjú alcsoportot külön értékeltük, mivel ennek a csoportnak a szignifikanciája nem bizonyult olyan erősnek az előzőekben tárgyalt csoportokhoz képest a kontroll csoporttal összehasonlítva ($p = 0,01$). Az alacsony rizikójú thrombophiliás csoportba tartozó FII het csoport és a kontroll csoport között nincs szignifikáns különbség ($p = 0,669$). II.3. táblázat szemlélteti a kontroll és thrombophiliás csoportok CIP eredményeinek jellemzőit.

Összességében elmondhatjuk, hogy mindegyik magas kockázatú thrombophiliás csoport CIP értékeinek mediánja alacsonyabb a kontroll csoportéhoz képest.

	n	CIP (U)	CIP (U)
		medián (min.-max.)	25 th ; 75 th percentilis
<i>Kontroll</i>	126	96,7 (74,9 – 99,1)	94,9; 97,6
<i>Magas rizikójú thrombophilia</i>	70	25,0* (-12,0 – 97,0)	14,8; 51,8
AT deficiencia	12	38,5* (15,0 – 80,0)	24,3; 56,8
PC deficiencia	14	34,0* (7,0 – 86,0)	14,8; 57,3
PS deficiencia	6	13,5* (-7,0 – 85,0)	2,7; 54,3
FVL hom	9	16,0* (-12,0 – 66,0)	-8,0; 48,6
Kombinált thrombophilia ¹	22	20,5* (-2,0 – 75,0)	10,6; 30,0
FVL het + FII het ²	7	80,0** (19,0 – 97,0)	47,9; 96,0
<i>Alacsony rizikójú thrombophilia</i>	123	74,0* (-10,0 – 107,8)	35,0; 96,0
FVL het	115	72,0* (-10,0 – 108,0)	32,0; 96,0
FII het	8	95,0*** (68,0 – 97,0)	92,5; 96,6

II.3. táblázat

A kontroll és thrombophiliás csoportok CIP eredményeinek jellemzői.

A CIP értékek a median (tartomány; min.-max. érték) és interquartilis tartomány (25th és 75th percentilis) megadásával.

¹ kombinált thrombophilia kivéve a FVL het + FII het alcsoportot

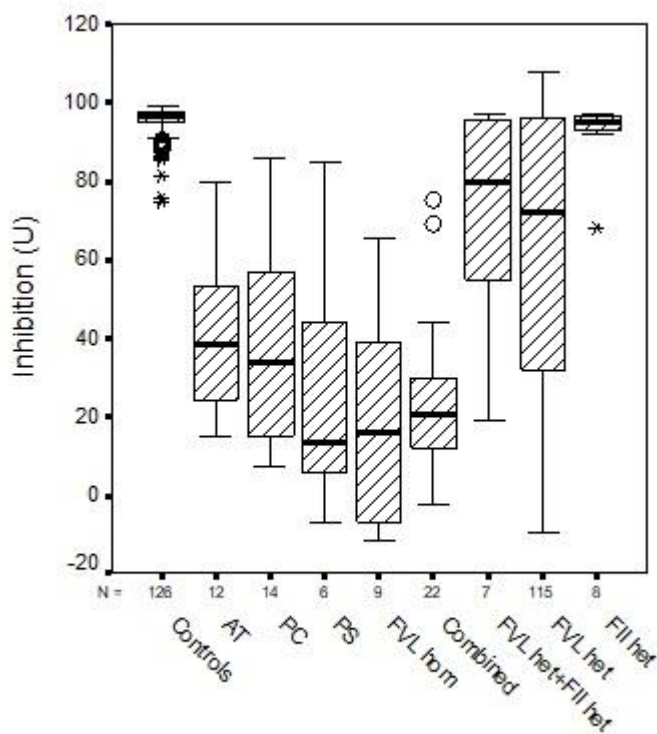
² kombinált thrombophilia alcsoportja

* $p < 0,01$ kontroll csoporthoz képest

** $p = 0,01$ kontroll csoporthoz képest

*** $p = 0,669$ kontroll csoporthoz képest

A kontroll mediánja 96,7 U, a magas kockázatú thrombophilásoké 25,0 U; ezen belül az AT deficiencia 38,5 U, PC deficiencia 34,0 U, PS deficiencia 13,5 U, FVL hom 16,0 U, kombinált thrombophilia 20,5 U (kivéve a FVL het + FII het) és a FVL het + FII het 80,0 U. A kombinált thrombophilia FVL het + FII het alcsoportjának medián értéke (80,0 U) viszonylag emelkedett a többi magas kockázatú thrombophiliás csoport medián értékéhez képest, de még így is a kontroll csoport medián értéke (96,7 U) alatt van. Az alacsony kockázatú thrombophiliás csoport medián értéke 74,0 U, ezen belül a FVL het 72,0 U és a FII het 95,0 U. A kontroll és a különböző thrombophiliás csoportok CIP eredményeinek jellemzőit jól szemlélteti a box-plot diagram (II.6. ábra).



II.6. ábra

A kontroll és thrombophiliás csoport CIP értékeinek ábrázolása box-plot diagramon.

A box-plot diagram szemlélteti a 25th-75th interquartilis tartományt a mediánnal. A kiugró értékeket (1,5 x interquartilis tartomány) kör, az extrém értékeket (3,0 x interquartilis tartomány) csillag jelzi.

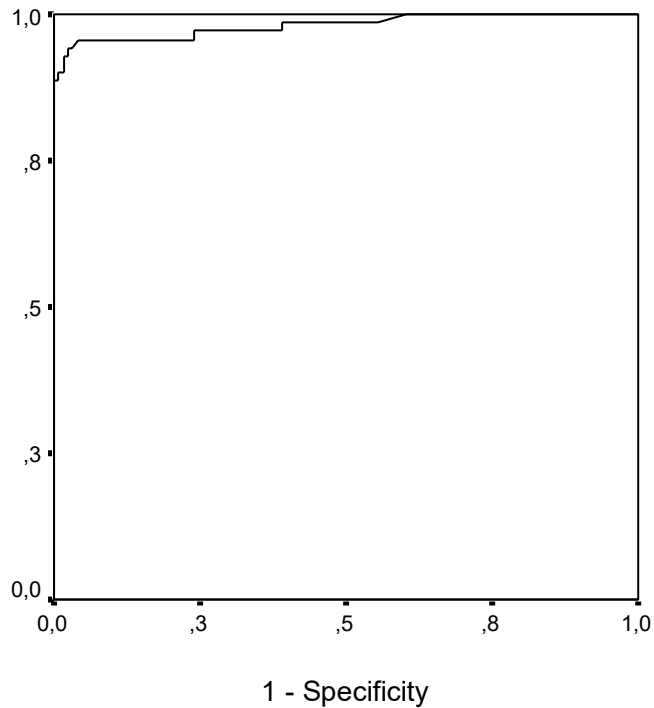
Combined: kombinált thrombophilia csoport, kivéve a FVL het + FII het alcsoportot

FVL het + FII het: a kombinált thrombophilia csoport alcsoportja

II.4.5. A CIP metodika szenzitivitása és specificitása

Az automatizált CIP teszt szenzitivitását és specificitását a ROC görbe (Receiver Operating Characteristic) alkalmazásával demonstráltuk, valamennyi thrombophiliás csoport esetén, különböző határértékek megadása mellett. A magas kockázatú thrombophiliás csoportnál a CIP teszt legjobb alkalmazhatósága 90,0 U határértéknél bizonyult megfelelőnek (area: 0,981), ahol a szenzitivitás 96% és a specificitás 92% (SE=0,011; CI:0,961-1,000), (II.7. ábra). Amikor a szenzitivitást és specificitást nem csak a magas rizikójú thrombophiliás

csoportban, hanem az összes thrombophiliás beteget együtt vizsgáltuk meg, akkor a 90,0 U határértéknél a szenzitivitás alacsonyabb lett (72%; 75%).



II.7. ábra

Magas kockázatú thrombophiliás betegek CIP értékeinek ROC analízise.

90,0 U határértéknél (area: 0,981) a szenzitivitás 96% és a specificitás 92% (SE=0,011; CI:0,961-1,000).

II.5. Megbeszélés

A CIP módszer ígéretes, globális véralvadási teszt a thrombophilia laboratóriumi kimutatására. Eredetileg manuális kivitelezésű metodika volt, amely érzékeny a magas kockázatú thrombophilia kimutatására [77]. Munkánk során a CIP metodikát az ACL 9000 optikai véralvadási automatára adaptáltuk és ismert thrombophiliás betegek ill. egészséges kontrollok plazmáit mértük vele. Vizsgáltuk még a teszt analitikai megbízhatóságát, cut-off értéket és hasznosságát a veleszületett thrombophilia kimutatásában.

Eredményeink alapján a CIP metodikát alkalmasnak és megbízhatónak találtuk a magas kockázatú thrombophiliák, mint az AT-, PC-, PS deficiencia, homozigóta FV Leiden mutáció és a kombinált deficienciák kimutatására, kivételt képez ez alól a kombinált deficienciák csoportból a FVL het + FII het alcsoport, ami viszont külön-külön, egyenként alacsony rizikónak számít. Előbbiekkel ellentétben a FII G20210A mutációra nem érzékeny a CIP teszt és nagy heterogenitást mutat a FV Leiden heterozigóta mutáció esetén is.

Mivel a CIP metodika alkalmasnak tűnik thrombophilia szűrőtesztként való felhasználásra, ezért a magas szenzitivitás az elvárt kívánalom a teszttel szemben. Erre a magas rizikójú thrombophilia esetén a 90 U-nál lévő cut-off érték alkalmazható, ahol a szenzitivitás 96%.

Eredményeink alapján 90 U feletti CIP érték tekinthető normálnak, ez alól kivételt képez az alacsony rizikójú heterozigóta FV Leiden és heterozigóta FII G20210A mutáció külön-külön ill. kombinációban is, mivel átfedést mutatnak ezen csoportok a kontroll csoporttal. Ezért abban az esetben, amikor a CIP eredmény normál tartományba esik, nagy biztonsággal kizárható a magas kockázatú thrombophilia jelenléte, viszont a FV Leiden és a FII G20210A mutáció jelenléte nem. Ezért normál CIP eredménynél célszerű elvégezni ezen két genetikai vizsgálatot is ezen mutációk kizárására, habár az alacsony rizikójú FV Leiden és FII G20210A mutáció nem növeli a rekurrens VTE előfordulását és nem befolyásolja a kezelést, ha önmagában és nem más defektusokkal együtt, kombinációban van jelen [83]. Ha a mérések során 90 U alatti a CIP eredmény, akkor ajánlott a részletes thrombophilia kivizsgálás. A korábbi, Andresen és mtsai. által leírt manuális kivitelezésű metodikával a cut-off érték 32,9 U volt [77]. Az automatizált módszer esetében kisebb az átfedés a kontroll és a magas rizikójú thrombophiliás csoportok között a manuális módszerhez képest. A különbség a különböző mérési módszerek, - reagensek, - készülékek használatával magyarázható továbbá a vizsgált esetek számának eltéréséből adódhat.

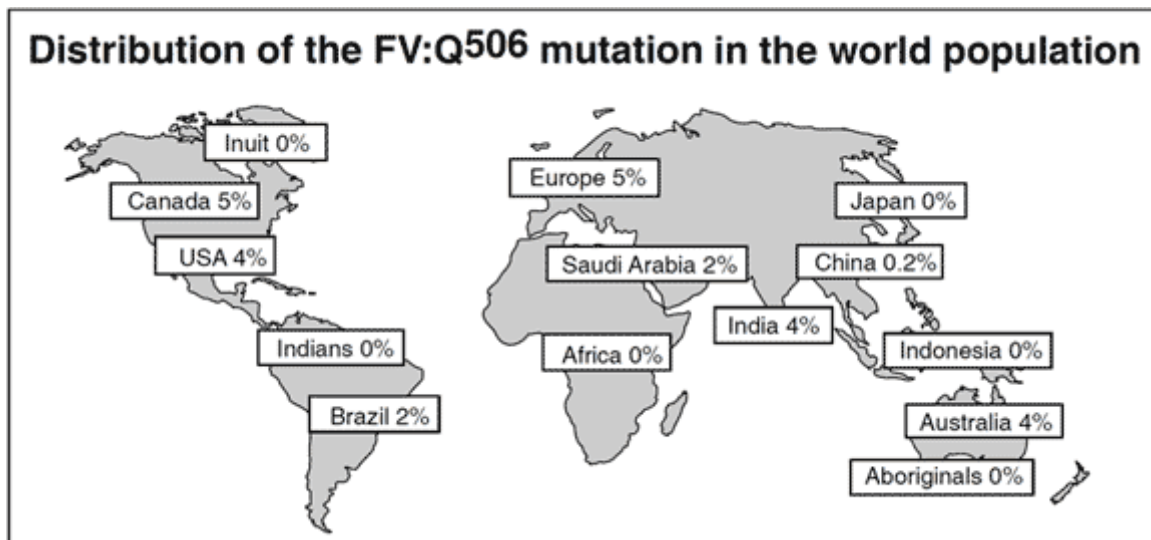
Az automatizált metodika a magas rizikójú thrombophilia esetén megbízhatóbbnak bizonyult a manuális metodikával szemben.

A CIP metodika magas szenzitivitásúnak bizonyult a veleszületett magas kockázatú thrombophilia esetében más globális véralvadási módszerekhez képest [77]. Ilyen globális véralvadási teszt a Calibrated Automated Thrombogram (CAT) metodika, ami Endogén Thrombin Potenciál néven (ETP) is ismert, és a veleszületett AT deficiencia [84] és homozigóta FII G20210A mutáció kimutatására alkalmazható [85]. A CAT módszernek több változata ismert, ahol eltérő minőségű és koncentrációjú reagenseket alkalmaznak a vizsgálni kívánt különböző szenzitivitású koagulopathiák kimutatására. Ez tovább nehezíti a módszer standardizációját, mivel a különböző laborokban, különböző mérőrendszerekkel ill. eltérő specificitású és/vagy különböző tulajdonságú reagensekkel a meghatározott eredmények nagy eltérést mutatnak. Azonban az egy helyen, állandó feltételek mellett végzett vizsgálatok reprodukálhatóak és alkalmasnak bizonyulhatnak thrombosiskészség ill. vérzés kockázatának a becslésére. A CAT metodikát viszont a standardizáció hiánya miatt jelenleg még nem ajánlják rutinszerűen alkalmazni a klinikai gyakorlatban [74,75,86,87]. Másik globális módszer a ProC Global (PCG), ami a PC-deficiencia kimutatására érzékeny [72,77].

Vizsgálatunkban a veleszületett thrombophilia különböző típusainak (entitásai) előfordulása az irodalmi adatok alapján megegyezik más nyugat-európai országokban talált prevalencia adatokkal [88–91], kivéve a heterozigóta FV Leiden mutáció, aminek az előfordulási gyakorisága az általunk vizsgált populációban 60% volt. Ez a mutáció hazánkban sokkal gyakrabban fordul elő, mint a körülöttünk lévő országokban, Közép-Európában az egyik legmagasabb prevalenciát mutatva ezzel [92–94]. Ezek az eredmények szemben állnak a heterozigóta FV Leiden mutáció területi megoszlásával, amely délről észak felé növekszik (a Skandináv területen a leggyakoribb az előfordulás) [92]. Ez a felülreprezentáltság egyes szerzők szerint alátámaszthatja a magyarok északi, finnugor eredetét [94–97]. A magas rizikójú thrombophilia prevalenciájában viszont nincs különbség hazánkat és a környező országokat tekintve.

Az alacsony rizikójú mutációk gyakoriak a nyugati populációban [88–90], viszont az ázsiai és az afrikai populációból hiányzik [90,98,99]. Ezzel ellentétben a magas rizikójú mutációk gyakorisága a nyugati populációban kevésbé fordul elő [88,91], míg az ázsiai populációban gyakoribb [99–102]. Ez alapján úgy tűnik, hogy a CIP metodika az ázsiai országokban thrombophilia vizsgálatok előszűrésére még inkább alkalmasabb lehet, mivel a két genetikai teszt (FV Leiden és a FII G20210A) elvégzése ezen régiókban nem szükséges,

mivel itt nem fordulnak elő ezen mutációk [103]. A II.8. ábra a FV Leiden mutáció előfordulási gyakoriságát mutatja be világszerte.



II.8. ábra

A FV Leiden mutáció eloszlása világszerte

<https://diapharma.com/activated-protein-c-apc-factor-v-leiden/>

Eredményeink azt mutatják, hogy a CIP metodikával végzett thrombophilia vizsgálat kiterjeszhető olyan populációkra, ahol a vizsgálat nehézkes, időigényes illetve drága. Jelen tanulmányunkban a veleszületett thrombophiliával rendelkező betegeket vizsgáltuk. Érdeemes lenne megvizsgálni olyan koagulációs állapotokat is, amikben fokozott a thrombosiskészség, mint pl.: várandósság, gyermekágyi időszak, orális kontraceptívumot szedő nők, daganatos betegek, K vitamin antagonistá- vagy direkt orális antagonistát szedők. A vizsgálatunkba bevont, különböző alcsoportokban lévő betegek számát is célszerű lenne kiterjeszteni annak érdekében, hogy megfelelően értékeljük és összehasonlítsuk a CIP metodika hasznosságát a hagyományos thrombophilia tesztekkel szemben.

III. VÉRALVADÁSI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA NORMÁL VÁRANDÓSSÁG SORÁN

III.1. Bevezetés

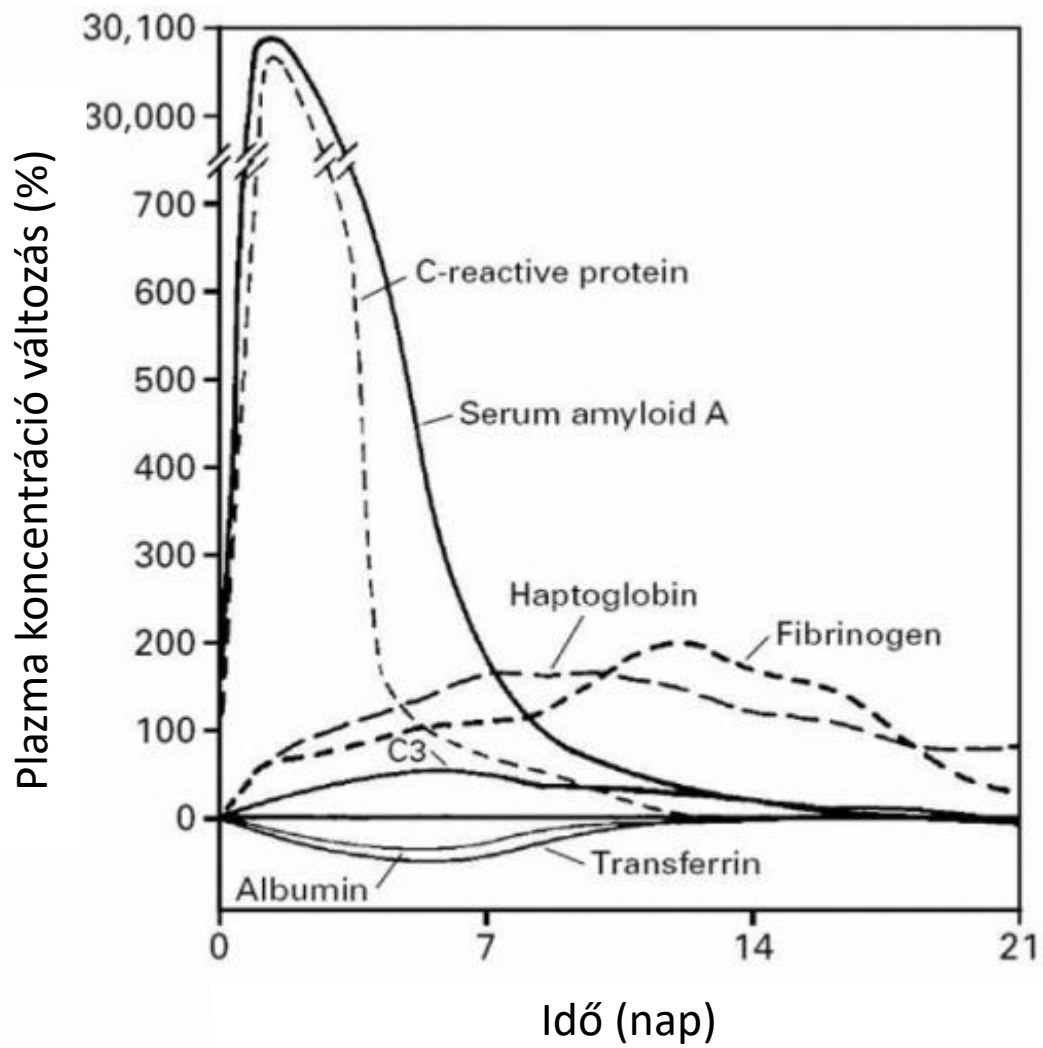
A terhesség, szülés és gyermekágy során gyakran előfordul véralvadási rendellenesség, amely az anya és a magzat életét veszélyeztetheti [39,40,104]. A terhességi és gyermekágyi állapotnak jól ismert kockázati tényezője a vénás thromboembólia (VTE), amely 4-50-szer gyakrabban fordul elő, mint a nem terhes nők esetében. Különösen nagy a kockázat a terhesség harmadik trimeszterében és még ennél is nagyobb a gyermekágy időszakában [20,39–41,104,105]. A terhesség alatti alvadásaktiváció hátterében a Virchow triászból a vénás keringés lelassulása és az alvadás-készséget fokozó plazma faktorok beáramlása, mint pl. a placenta magas szöveti faktor tartalma és a természetes alvadásinhibitorok, mint pl. a szabad protein S antigén szintjének csökkenése állhat. Ez feltehetően egyfajta védekező mechanizmus, amely megakadályozza a súlyos vérzéses komplikációt szülésnél [40–42]. A terhességi kor előrehaladtával az aktiválódott véralvadási és fibrinolitikus rendszer faktorai egyre inkább emelkednek, ezáltal fokozódik a thrombin generáció, a fibrinogén-fibrin átalakulás és a reaktív fibrinolízis. Szecsi és mtsai. [20] azt találták, hogy a véralvadási II-es, V-ös, X-es, XI-es, XII-es faktor, az antithrombin, a protein C, az aktivált partialis thromboplastin idő (APTI) és a prothrombin idő (PI) nem változik lényegesen terhesség alatt, szülésnél és szülés után a nem terhes nők referencia tartományához képest. Azonban a véralvadási VII-es, VIII-as, IX-es faktor, a fibrinogén és a D-dimer jelentősen emelkedik a terhesség előrehaladtával. Azonban J. Liu és mtsai. szerint a PI, APTI és thrombin idő (TI) rövidül, a fibrinogén emelkedik, amely a hiperkoagulációs állapot jelenlétére utal [106]. A protein S aktivitása jelentősen csökken, miközben a szabad protein S csak mérsékelt csökkenést mutat és a totál protein S nem változik [20].

A terhesség tehát egy szerzett prothromboticus állapot, amelyben a fokozott véralvadás irányába történő változások a méhlepény funkció fenntartásához és a szülés során fellépő jelentős vérvesztés megelőzéséhez járulnak hozzá [39]. Ezek a változások legtöbbször meghaladják a biológiai variabilitást. A biológiai variabilitásra vonatkozó laboratóriumi adatokat Westgard foglalta össze a nem terhes egészséges populáció esetében (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm/>). A PI intraindividuális biológiai variabilitása

(CV_I) 4,0% és az interindividuális biológiai variabilitása (CV_g) 6,8%, az APTI esetében a CV_I 2,7% és a CV_g 8,6%. A fibrinogén a szervezet bizonyos kóros állapotai esetén (pl. gyulladás) pozitív akut fázis fehérjeként viselkedik, így a variabilitása is magasabb: CV_I 10,7% és CV_g 15,8%. Az, hogy a terhesség előrehaladtával emelkedő fibrinogén annak a következménye-e, hogy akut fázis fehérjeként viselkedik vagy a terhességgel összefüggő változások következtében emelkedik, egy másik pozitív akut fázis fehérje (pl. C-Reactive Protein (CRP)) vizsgálatával dönthető el (III.1. ábra). A CRP biológiai variabilitása nagyon magas (CV_I 42,2% és a CV_g 76,3%), a D-dimernél is jelentős (CV_I 23,3% és a CV_g 26,5%). A TI-re vonatkozólag nem szerepel adat. Terhesség alatt a normálisan fellépő fiziológiai változások hatással lehetnek a mért biológiai paraméterekre. Általában a laboratóriumok a referencia intervallumok meghatározásánál nem állapítanak meg külön terhes nőkre vonatkozó referencia intervallumot, pedig az fontos lehet a klinikai döntéshozatalban. A terhes nőknél fellépő VTE tünetek félrevezetőek lehetnek. A D-dimer és fibrinogén trimeszter specifikus referenciaintervallumainak meghatározása segíthet a VTE differenciáldiagnózisában. Ezen intervallumok ismerete nélkül a megemelkedett D-dimer és fibrinogén eredmények tévesen erősíthetik a VTE valamint a PE gyanúját az alacsony preteszt valószínűségű Wells score mellett [107].

Néhány tanulmány beszámol terhességi kor szerinti referencia intervallum meghatározásról, melyekben tanulmánytól függően különböző analitikai módszert alkalmaztak és a referencia intervallumok is vonatkozhattak komplikált, komplikációmentes terhességre, illetve mindkettőre egyidejűleg [20,108–113].

Tanulmányunkban terhességi kor szerinti referencia intervallumokat határoztunk meg 83 terhes nő bevonásával a következő véralvadási paraméterekre: PI, APTI, TI, fibrinogén, D-dimer. Ezen felül az előző fejezetben tárgyalt CIP metodikát is alkalmaztuk ezen mintákon.



III.1. ábra

A pozitív és negatív akut fázis fehérjék időbeli változása

https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3226076_ar1917-1&req=4

III.2. Célkitűzés

1. Várandós nőktől a terhesgondozás során előírt vérvételek alkalmával, a gesztáció 16., 26. és 36. hetében gyűjtött vérminta vizsgálata véralvadási módszerekkel.
2. Gesztációs kor szerinti referenciatartomány ill. cut-off érték megállapítása a PI, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer esetében a vizsgált populációban.
3. Gesztációs kor szerinti referencia intervallumok összehasonlítása a nem terhesekre vonatkozó normál tartományokkal a PI, APTI, fibrinogén és D-dimer esetében.
4. A CIP metodika alkalmazása a 16., 26. és 36. terhességi héten levett plazmamintákon.

III.3. Anyag és módszer

III.3.1. A vizsgálatba bevont személyek

Vizsgálatainkba 128 terhes nőt vontunk be, akik a terhesség 16. hetében jártak. Közülük 40 személy vagy a 26. és/vagy 36. terhességi héten nem jelent meg vérvételen. Az ikerterheseket (n=3) és a veleszületett thrombophiliásokat (n=2) kizártuk a további vizsgálatokból. Összességében 83 terhes nő vérmintáját vizsgáltuk a 16., 26. és 36. terhességi héten, ami megegyezik a terhesség során a kötelező laboratóriumi vizsgálatok idejével. A helyi etikai bizottság engedélyével végeztük a vizsgálatainkat (engedélyszám: 3192/2008). Minden vizsgálatba bevont személy szóbeli és írásbeli tájékoztatásban részesült, a vizsgálatokhoz írásban adták hozzájárulásukat.

III.3.2. Mintagyűjtés és reagensek

A vérvétel könyökvénából történt Vacutainer csőbe (Becton Dickinson), mely 1/10 részben tartalmazott 0,129 M nátrium citrátot. A nátrium citráttal alvadásgátolt vért 20 °C-on, 2000 g-n, 20 percig centrifugáltuk. Az így nyert thrombocyta szegény plazmát Eppendorf csövekben – 70 °C –on tároltuk feldolgozásig (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) H21-A5 dokumentum alapján).

PI, APTI, TI, Clauss fibrinogén és D-dimer méréseinket IL (Instrumentation Laboratory, Milánó, Olaszország) reagensekkel végeztük ACL 9000 optikai véralvadási

automatán (IL), a CRP méréseket pedig Integra 400 klinikai kémiai automatán Roche (Roche, Basel, Svájc) reagenssel.

III.3.3. Statisztikai analízis

Az eredményeket az adatok eloszlásának függvénye szerint, átlagban ill. mediánban tüntettük fel. Az adatokat páros t próba, Kolmogorov-Smirnov, Mann-Whitney és Wilcoxon Signed-Rank teszt segítségével elemeztük az SPSS 15.0-ös (IBM Corporation NY, USA) statisztikai programmal. Statisztikailag szignifikánsnak tartottuk az eredményeket a $p < 0,05$ értéknél. A terhességi kor szerinti referencia intervallumokat (2,5th és 97,5th percentilis megadásával) nem-paraméteres bootstrap ReFVal software 4.11 program segítségével határoztuk meg az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) ajánlásának megfelelően [114]. Az adatok normál eloszlása esetében a konvencionális 95%-os referencia intervallumok számítására az átlag ± 2 SD-t is alkalmaztuk az előbb említett módszer mellett.

III.4. Eredmények

III.4.1. A vizsgálatba bevont személyek jellemzői

A 83 gravida átlag életkora $28,9 \pm 4,3$ év (átlag \pm SD) volt. Közülük 55 személynél nem lépett fel patológiás jel vagy tünet a terhesség során („normál terhesek”), 28-an legalább egy, a következő kóros állapot, szövödmény vagy anamnesztikus abnormalitás egyikét mutatta („nem normál terhesség”): 1. proteinuria (n=1) (preeclampsia nélkül), 2. lábdagadás (n=7), 3. magas vérnyomás (n=2) (preeclampsia nélkül), 4. visszér (n=2), 5. thrombophlebitis (n=1), 6. gestatio diabetes mellitus (n=13) (diétával egyensúlyban lehetett tartani), 7. autoimmun betegség (n=1; Raynaud's szindróma), 8. in vitro fertilisatio (IVF) (n=3), 9. habituális vetélés előző terhességek során (n=2). Mann-Whitney teszttel megvizsgáltuk a „normál” és „nem normál” terhességi csoportok között lévő összefüggést külön a PI, APTI, TI, fibrinogén, D-dimer és CRP értékekre a 16., 26. és 36. terhességi hétre vonatkozólag, és egyik paraméter és időpont esetében sem találtunk szignifikáns különbséget ($p > 0,05$) a két csoport között. Ennek megfelelően a továbbiakban a 83 terhes nő adatait együtt elemeztük.

III.4.2. A vizsgált laboratóriumi paraméterek eloszlása

A PI, APTI, TI, fibrinogén, D-dimer, CIP és CRP adatok eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk mind a három terhességi hétnél. Az APTI, TI és fibrinogén adatok eloszlása nem tért el szignifikánsan a normál eloszláshoz képest a három vizsgált terhességi hét esetében ($p > 0,05$). Ennek megfelelően a gesztációs hetek összehasonlítására a páros t próbát alkalmaztuk. A PI, D-dimer, CIP és CRP adatok eloszlása jobbra ferde ($p < 0,05$) mind a három vizsgált hét esetében, ezért Wilcoxon Signed-Rank tesztet alkalmaztunk a terhességi hetek összehasonlítására.

III.4.3. PI, APTI és TI változása terhesség során

Eredményeink alapján a PI (INR, International Normalised Ratio) a terhesség során fokozatosan rövidül. A vizsgált gesztációs heteket összehasonlítva a 16. és a 26. ($p = 0,043$), a 26. és a 36. valamint a 16. és a 36. ($p < 0,001$) hetek között szignifikáns a különbség. A PI-t INR-ben tüntettük fel, mivel a PI standardizált, származtatott formája és számos laboratórium is ebben a formában tünteti fel a leleten. Az INR adatokra elvégeztük a statisztikai analízist. (III.2.A ábra). Az eloszlás jobbra ferde, ezért a nem paraméteres bootstrap módszert alkalmaztuk a gesztációs kor szerinti referencia intervallum meghatározására a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával (III.1 táblázat) [114].

Hasonlóan a PI-hoz, az APTI és TI is rövidülést mutatott a terhesség előrehaladtával. A vizsgált gesztációs heteket összevetve szignifikáns csökkenést tapasztalunk, az APTI esetében a 16. és a 26., a 26. és a 36. valamint a 16. és a 36. hetek között ($p < 0,001$) (III.2.B ábra), és a TI esetében a 16. és a 26. ($p < 0,001$), a 26. és a 36. ($p = 0,008$) valamint a 16. és a 36. ($p < 0,001$) terhességi hetek értékelésénél is (III.2.C ábra). Mivel az APTI és TI adatok eloszlása normál, ezért a referenciatartomány meghatározására lehet az átlag ± 2 SD formát is alkalmazni a nem paraméteres bootstrap módszer mellett (III.1 táblázat) [114].

III.4.4. Fibrinogén és CRP változása terhesség során

A fibrinogén szint a terhesség előrehaladtával fokozatosan emelkedik. A 16. és a 26., a 26. és a 36. valamint a 16. és a 36. terhességi hetek között szignifikáns a különbség ($p < 0,001$) (III.2.D ábra). A fibrinogén szint átlaga már a 16. terhességi héten magasabb volt, mint a

konvencionális referencia intervallum felső határértéke. Mivel a fibrinogén adatok eloszlása mind a három vizsgált terhességi héten normál volt, ezért a gesztációs kor specifikus referencia intervallum meghatározásához az $\bar{x} \pm 2 \text{ SD}$ formát alkalmaztuk. A fibrinogén referencia intervallumának meghatározására is a nem paraméteres bootstrap módszert használtuk a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával (III.1 táblázat) [114].

A CRP esetében statisztikailag szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a 16. és a 26. hét ($p=0,003$) és a 16. és a 36. hét között ($p=0,001$). A 26. és 36. terhességi hét között nem volt szignifikáns a változás ($p=0,1$). Mind a három terhességi héten mért CRP értékek mediánja alatta maradt a normál nem terhes konvencionális határértéknek (III.2.F ábra). Ennek megfelelően, nincs szignifikáns különbség az egészséges és a terhesség alatt mért CRP értékek között.

Mivel mindkét fehérje, a CRP és a fibrinogén pozitív akut fázis protein, ezért megvizsgáltuk a kapcsolatukat. Regresszió analízissel az adataink alapján gyenge pozitív kapcsolat volt megfigyelhető ($p<0,001$, $r=0,265$).

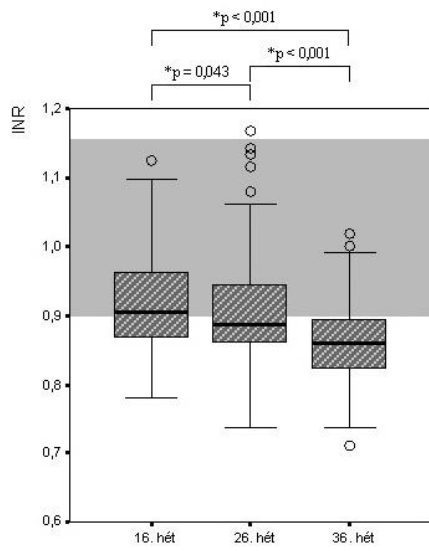
III.4.5. D-dimer változása terhesség alatt

A D-dimer koncentráció fokozatosan emelkedik a terhesség során. A három vizsgált terhességi hetet összehasonlítva statisztikailag szignifikáns a különbség minden csoport között ($p<0,001$) (III.2.E ábra). Amíg a 16. terhességi héten mért D-dimer értékek mediánja a normál nem terhesekre vonatkozó konvencionális cut-off érték (250 ng/mL; D-dimer Units-ban (DDU) kifejezve) alatt volt, a 26. és 36. terhességi héten mért medián értékek ezt már meghaladták. A várandós nők 42%-nak volt magasabb a D-dimer értéke a konvencionális cut-off értéknél a 16. terhességi héten, miközben a 36. terhességi héten már az esetek 98%-ban volt a határérték felett a D-dimer. Az adatok eloszlása jobbra ferde, ezért a gesztációs kor szerinti cut-off értéket a medián segítségével határoztuk meg ill. itt is alkalmaztuk a nem paraméteres bootstrap módszert a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával (III.1 táblázat) [114].

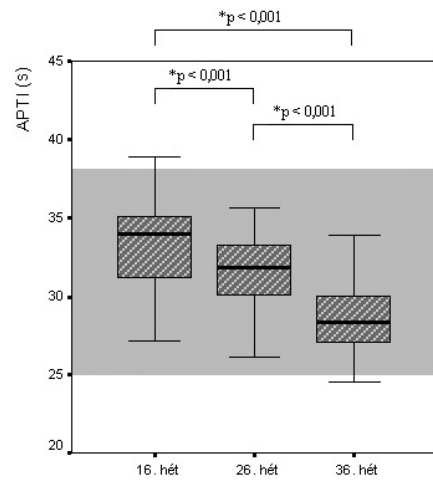
III.4.6. CIP változása terhesség alatt

A CIP érték a gesztációs kor előrehaladtával fokozatosan csökken. A 16. és a 26., ($p=0,016$) a 26. és a 36. ($p=0,005$) valamint a 16. és a 36. terhességi hetek között szignifikáns a különbség ($p<0,001$) (III.2.G. ábra). Mivel az adatok eloszlása jobbra ferde, ezért a gesztációs kor

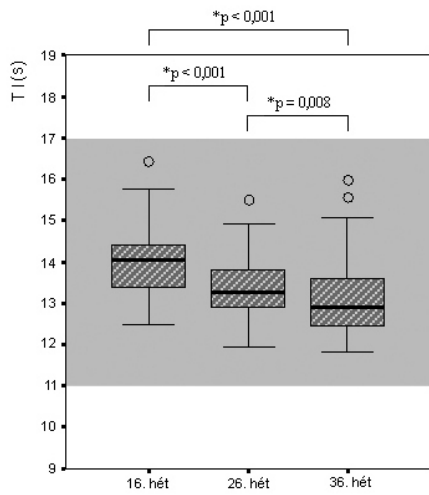
szerinti cut-off értéket jelen esetben is a medián segítségével határoztuk meg ill. itt is alkalmaztuk a nem paraméteres bootstrap módszert a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával (III.1 táblázat) [114]. A normál nem terhesekre vonatkozó CIP határérték 90 U felett van. A gesztációs kor szerint a 16. héten 42 U, 26. héten 36 U és a 36. héten 32 U-nak megfelelő CIP értéket kaptunk mediánnak.



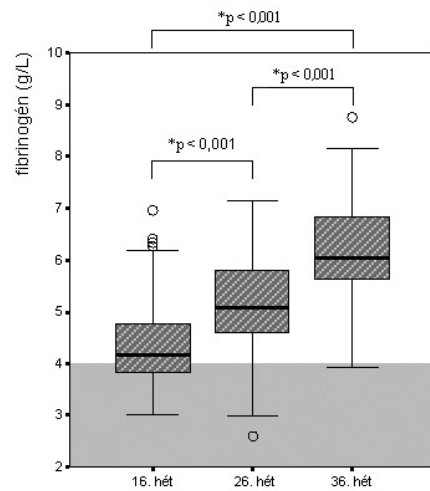
III.2.A. ábra



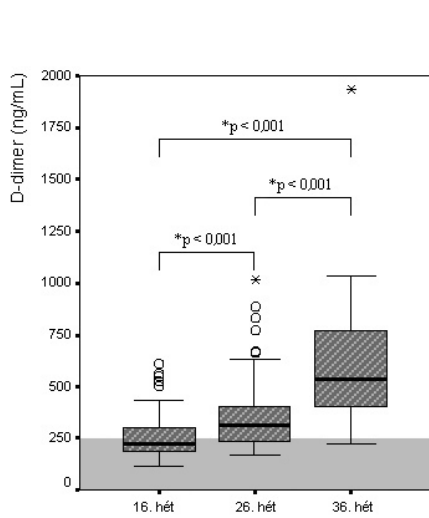
III.2.B. ábra



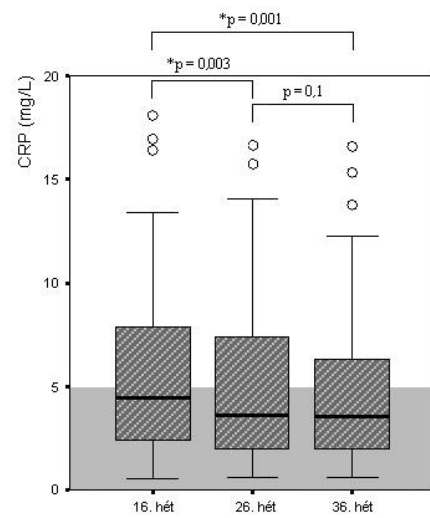
III.2.C. ábra



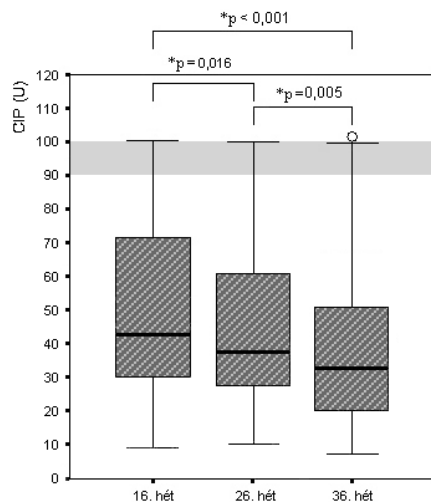
III.2.D. ábra



III.2.E. ábra



III.2.F. ábra



III.2.G. ábra

III.2. ábra

INR (III.2.A. ábra), APTI (I.B ábra), TI (III.2.C. ábra), fibrinogén (III.2.D. ábra), D-dimer (III.2.E. ábra), CRP (III.2.F. ábra) és CIP (III.2.G) értékek box-plot ábrája a 16., 26. és 36. terhességi hét feltüntetésével.

A box-plot diagram szemlélteti a 25th-75th interquartilis tartományt a mediánnal, amely vízszintes vonalként látható a box-plotokban. A kiugró értékeket (1,5 x interquartilis tartomány) kör, az extrém értékeket (3,0 x interquartilis tartomány) csillag jelzi. A szürkével jelölt rész mutatja a nem terhes nőkre vonatkozó referencia tartományt ill. cut-off értéket.

gesztációs hét/vizsgált paraméter		INR	APTI	TI	fibrinogén	D-dimer	CIP
	mértékegység		s	s	g/L	ng/mL	U
	normál referencia intervallum (nem terhesekre vonatkozó)	0,90-1,15	25,0-37,0	11,0-17,0	2,00-4,00	<250	>90
16. hét	átlag	0,93	33,3	14,0	4,43	268	50
	medián	0,91	34,0	14,0	4,18	224	42
	SD	n.a.	2,7	0,7	0,83	n.a.	26
	átlag±2SD	n.a.	27,8-38,8	12,5-15,5	2,77-6,09	n.a.	n.a.
	2,5th-97,5th	0,80-1,12	27,5-38,8	12,5-15,6	3,28-6,59	152-607	8-98
26. hét	átlag	0,91	31,7	13,4	5,14	355	43
	medián	0,89	31,9	13,4	5,10	309	36
	SD	n.a.	2,2	0,7	0,90	n.a.	25
	átlag±2SD	n.a.	27,2-36,2	12,0-14,8	3,35-6,93	n.a.	n.a.
	2,5th-97,5th	0,77-1,18	26,3-35,7	12,1-14,9	3,34-6,80	191-874	10-98
36. hét	átlag	0,87	28,6	13,1	6,15	596	38
	medián	0,85	28,4	12,9	6,04	541	32
	SD	n.a.	2,1	0,8	0,99	n.a.	24
	átlag±2SD	n.a.	24,3-32,9	11,4-14,8	4,18-8,13	n.a.	n.a.
	2,5th-97,5th	0,74-1,02	24,7-32,7	11,8-15,5	4,30-8,11	260-1036	8-98

III.1. táblázat

Gesztációs kor szerinti referencia intervallum ill. cut-off érték az INR, APTI, TI, fibrinogén D-dimer és CIP véralvadási paraméterekre

Az INR, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer referencia intervalluma a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával, emellett az APTI, TI és fibrinogén referencia intervalluma az átlag ± 2 SD képlettel, a D-dimer és CIP cut-off értéke pedig a mediánnal feltüntetve.

A D-dimer érték D-dimer Units-ban (DDU) van kifejezve. A DDU-ban megadott mért értéket kettővel megszorozva kapjuk meg Fibrinogen Equivalent Units-ban (FEU).

n.a. = nem alkalmazható

III.5. Megbeszélés

Tanulmányunkban terhes nők véralvadási paramétereinek változását (PI, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer) és a CRP-t, mint pozitív akut fázis fehérjét vizsgáltuk a terhesség során a 16., 26. és a 36. gesztációs héten. Emellett az előző fejezetben részletesen tárgyalt CIP metodikát is alkalmaztuk ezeken a mintákon.

A PI, APTI és TI meghatározása elsősorban plazmatikus véralvadási zavarok ill. faktorhiány esetén nyújt segítséget. A megrövidült alvadási idők fokozott alvadékkésztséget jelentenek, mind az extrinsic-, mind az intrinsic alvadási úton. A D-dimer, mint véralvadási és fibrinolitikus paraméter fontos szerepet játszik a klinikai döntéshozatalban a VTE kizárásához, mivel nagy a negatív prediktív értéke és segíti a klinikust az alacsony pre-teszt valószínűségű Wells score esetén. A fibrinogén, mint véralvadási paraméter és akut fázis fehérje a DIC és hiperfibrinolízis diagnosztikájában is segítséget nyújthat. A CIP teszttel kapott eredményeink a terhesség során kialakuló hiperkoagulációs állapot kialakulását támasztják alá.

A laboratóriumok a normál nem terhes populációra vonatkoztatva adják meg a konvencionális referencia tartományt ill. cut-off értéket, amely az általunk vizsgált laboratóriumi paraméterek esetében a terhes nőknél félrevezető lehet.

A véralvadás aktivációja fokozódik a terhesség során [20,39–41,104,105,108–113], amit az eredményeink is alátámasztanak: a PI, az APTI a TI és a CIP érték rövidül, a fibrinogén és a D-dimer a terhességi kor előrehaladtával egyre emelkedik, míg a CRP lényegesen nem változik.

Összehasonlítva a normál nem terhesekre vonatkozó referencia intervallumokat ill. cut-off értékeket a gravidák eredményével, megállapítottuk, hogy az PI medián értéke a 16. héten még benne volt a referencia intervallumban, de a 26. hétre már alatta volt és egyre csökkent a 36. hétre, amely az alvadékkésztség fokozódását jelzi. Az APTI és TI átlaga mind a három vizsgált terhességi héten benne maradt a konvencionális referencia intervallumban és csökkenő tendenciát mutatott. A fibrinogén szintek átlaga már a 16. terhességi héten meghaladta a felső határértéket és egyre emelkedett a 26. és 36. hét során. A D-dimer medián értéke a 16. terhességi héten még a konvencionális cut-off érték alatt volt, de a 26. héten már fölé emelkedett, amely tovább nőtt a 36. hétre. A D-dimer érték a 16. gesztációs héten a terhes nők 42%-ának a 26. héten 66%-ának és a 36. héten már a 98%-ának volt a normál, nem terhes

cut-off érték felett. A D-dimer meredekebben emelkedik, mint a fibrinogén. A CIP eredmény mind a 3 vizsgált gesztációs héten alatta maradt az általunk mért normál határértéknek a 90 U-nak.

A fokozott thrombin generáció és a nagymértékű fibrinogén termelés intenzívebb fibrinogén-fibrin átalakuláshoz vezethet, és ezáltal megnövekedhet a fibrinolysis és a fibrin degradációs termékek (FDP) szintje. Ennek a két tényezőnek – az intenzív termelésnek és átalakulásnak – az előfordulása fokozott véralvadáshoz vezethet, legtöbbször klinikai tünet nélkül.

A CRP medián értéke végig alatta maradt a határértéknek. Habár mindkét paraméter, a fibrinogén és a CRP is pozitív akut fázis fehérje, csak a fibrinogén emelkedik a gesztációs kor előrehaladtával. Vagyis a fibrinogén szint emelkedése nem akut fázis reakció eredménye. Ezt az elgondolást támasztja alá a kettő közötti kapcsolatot vizsgáló regresszió analízis eredménye is. Ezzel ellentétben, kóros állapotban, különösen preeclampsziában jelentős CRP növekedés figyelhető meg [115]. A CRP szint medián értéke nem haladta meg a nem terhesekre jellemző határértéket egyik vizsgált gesztációs hétnél sem, bár a 16. terhességi hétnél az eredmény szignifikánsan magasabb volt a 26. ill. a 36. héthez képest. További vizsgálat szükséges annak felderítésére, hogy milyen kapcsolat áll fenn a normál terhesség és ezen CRP változás között. Hasonlóak az eredményeink más szerzőkével [20,108–113], akik szintén fokozott véralvadási készséget tapasztaltak terhesség alatt. Egyes tanulmányok között azonban eltérőek lehetnek a számított referencia tartományok a vizsgált populáció változatossága és a használt metodika illetve a reagensek különbözősége miatt. Szecsi és mtsai. hasonló PI és APTI rövidülést, magasabb D-dimer és az általunk meghatározott fibrinogénnél valamivel alacsonyabb értéket írtak le minden vizsgált terhességi hétnél [20]. Ez a különbség származhat abból, hogy más metodikát és reagenseket használtak. Kovac és mtsai. ugyanazt a metodikát és reagenst használták a D-dimer meghatározásnál, mint mi, és eredményeik is hasonlóak voltak [113]. J. Liu és mtsai. a PI, APTI, TI és fibrinogén véralvadási paramétereiket vizsgálták. Ugyanattól a gyártótól származó mérőműszerrel és reagensekkel dolgoztak, mint amit mi is használtunk [106]. Tanulmányukban a PI, APTI, TI rövidül, a fibrinogén emelkedik a gesztációs kor előrehaladtával. Hasonló eredményeket kaptunk mi is, még ha számszerűen nem is ugyanazokat a referencia értékeket. A különbség oka talán a populáció változatosságában keresendő.

Az egyes tanulmányok közötti eltérések arra hívják fel a figyelmet, hogy a laboratóriumoknak létre kellene hozni saját referencia intervallumot illetve cut-off értéket

terhes nőkre vonatkozóan, ami segítségére lehet a klinikusnak. A tanulmányokban szereplő adatok viszont addig is irányt mutathatnak bizonyos helyzetekben. Abbassi-Ghanavati és mtsai. pl. az irodalomban fellelhető adatok alapján létrehoztak egy referencia értékeket tartalmazó táblázatot normál egészséges terhes nőkre vonatkozóan, mind a három trimeszterre [108]. Ez a táblázat az interneten is hozzáférhető és a véralvadási paraméterek mellett magába foglalja a hematológiai, klinikai kémiai és egyéb laboratóriumi paramétereket is (<http://www.perinatology.com>).

IV. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

Kutatómunkám során a veleszületett és szerzett hiperkoagulációs állapotokat vizsgáltam rutin és speciális véralvadási módszerek segítségével.

Koaguláció Inhibitor Potenciál módszerrel nyert új eredmények:

1. Elsőként adaptáltuk az eddig manuális kivitelezésű CIP metodikát optikai véralvadási automatára, mely vizsgálataink alapján megbízható és reprodukálható módszernek bizonyult.
2. Kereskedelmi forgalomban elérhető gyári AT-, PC- és PS deficiens plazmákon a CIP metodika alkalmasnak bizonyult ezen defektusok jelenlétének a kimutatására.
3. A kontroll és a thrombophiliás minták összehasonlítása során azt találtuk, hogy a CIP metodika alkalmasnak bizonyult a magas thrombophilia rizikóval rendelkező betegek elkülönítésére a veleszületett thrombosis hajlammal nem rendelkező kontroll csoporttól.
4. Meghatároztuk az automatizált CIP metodika optimális határértéket az AT-, PC-, PS deficiencia és az APC rezisztencia valamint a kombinált defektusok kimutatására.

Várandósság során vizsgált véralvadási paraméterekkel kapcsolatos új eredményeink:

1. Gesztációs kor szerinti referencia tartományt ill. határértéket állítottunk fel rutin véralvadási paraméterekre, mint a PI, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer, komplikációmentes várandós nők esetében.
2. A PI, APTI és TI szignifikánsan rövidül, a fibrinogén és D-dimer pedig szignifikánsan emelkedik normál terhesség során a gesztációs kor előrehaladtával.
3. Eredményeink a PI, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer esetében alátámasztják a véralvadás hiperkoaguláció irányába történő változását a terhességi kor előrehaladtával.
4. A várandós nőknél kapott gesztációs kor szerinti CIP eredmények határértéke jóval alatta marad a normál nem terhesekre vonatkozó határértéknek.
5. A CIP metodika alkalmasnak bizonyult a terhesség alatt létrejött hiperkoagulációs állapot kimutatására thrombosis kialakulása nélkül.

V. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med* 1991; **151**: 933–8.
- 2 Naess I a, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 692–9.
- 3 Shen MC, Lin JS, Tsay W. High prevalence of antithrombin III, protein C and protein S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic Chinese patients in Taiwan. *Thromb Res* 1997; **87**: 377–85.
- 4 Spek CA, Reitsma PH. Genetic risk factors for venous thrombosis. *Mol Genet Metab* 2000; **71**: 51–61.
- 5 Heit JA, Lahr BD, Petterson TM, Bailey KR, Ashrani AA, Melton LJ. Heparin and warfarin anticoagulation intensity as predictors of recurrence after deep vein thrombosis or pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Blood* 2011; **118**: 4992–9.
- 6 Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Meditin*. 1856.
- 7 Nordström M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellström T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992; **232**: 155–60.
- 8 Gadó K, Domján G. [Thromboembolic events in malignant diseases]. *Orv Hetil* 2012; **153**: 934–47.
- 9 Losonczy H, Nagy Á, Tar A. [Actual questions about the prevention of venous thromboembolism in cancer patients receiving chemotherapy]. *Orv Hetil* 2016; **157**: 203–11.
- 10 Dean SM, Abraham W. Venous thromboembolic disease in congestive heart failure. *Congest Heart Fail* **16**: 164–9.
- 11 Tang L, Wu Y-Y, Lip GYH, Yin P, Hu Y. Heart failure and risk of venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol* 2016; **3**: e30-44.

- 12 Al-Azzawi HF, Obi OC, Safi J, Song M. Nephrotic syndrome-induced thromboembolism in adults. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2016; **6**: 85–8.
- 13 Griffin M, Munir T. Management of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a clinician’s guide. *Ther Adv Hematol* 2017; **8**: 119–26.
- 14 Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; **86**: 3685–91.
- 15 Wallmark E, Lindblad B, Bergqvist D, Cronberg S. Frequency of thromboembolic complications in patients with acute pneumonia and pyelonephritis. *Scand J Infect Dis* 1988; **20**: 453–4.
- 16 Mayo ME, Halil T, Browse NL. The incidence of deep vein thrombosis after prostatectomy. *Br J Urol* 1971; **43**: 738–42.
- 17 Chee Y-L, Watson HG. Air travel and thrombosis. *Br J Haematol* 2005; **130**: 671–80.
- 18 GIBBS NM. Venous thrombosis of the lower limbs with particular reference to bed-rest. *Br J Surg* 1957; **45**: 209–36.
- 19 Réger B, Péterfalvi Á, Litter I, Pótó L, Mózes R, Tóth O, Kovács GL, Losonczy H. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thromb Res Elsevier Ltd*; 2013; **131**.
- 20 Szecsi PB, Jørgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost* 2010; **103**: 718–27.
- 21 Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet (London, England)* 1994; **344**: 1453–7.
- 22 Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 700–3.
- 23 Høibraaten E, Abdelnoor M, Sandset PM. Hormone replacement therapy with estradiol and risk of venous thromboembolism--a population-based case-control study. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1218–21.
- 24 Gomes MP V, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004; **164**: 1965–76.
- 25 Grady D, Wenger NK, Herrington D, Khan S, Furberg C, Hunninghake D, Vittinghoff

- E, Hulley S. Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med* 2000; **132**: 689–96.
- 26 den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; **334**: 759–62.
- 27 den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 874–7.
- 28 Oliveira LR de, Fonseca JR. Simultaneous pulmonary thromboembolism and superior mesenteric venous thrombosis associated with hyperhomocysteinemia secondary to pernicious anemia-induced vitamin B12 deficiency. *Hematol Transfus cell Ther* 2018; **40**: 79–81.
- 29 Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. *N Engl J Med* 1994; **331**: 1601–6.
- 30 Gutiérrez Guisado J, Trujillo-Santos J, Arcelus JI, Bertoletti L, Fernandez-Capitán C, Valle R, Hernandez-Hermoso JA, Erice Calvo-Sotelo A, Nieto JA, Monreal M, en nombre de los investigadores del estudio RIETE. Prognosis of venous thromboembolism in orthopaedic surgery or trauma patients and use of thromboprophylaxis. *Rev Clin Esp* 2018; .
- 31 Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1–6.
- 32 Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d’Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 657–60.
- 33 Heit JA, O’Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, Melton LJ. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002; **162**: 1245–8.
- 34 Blom JW, Doggen CJM, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; **293**: 715–22.
- 35 Bouillard, J. B.; Bouillaud S. De l’Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. *Arch Gen Med* 1823; : 188–204.
- 36 Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Clinique médicale de l’Hôtel-Dieu de Paris*.

- 1865.
- 37 T.G. Illtyd JNMM. Thrombophlebitis in cancer. *Practitioner* 1935; : 683–4.
- 38 Adess M, Eisner R, Nand S, Godwin J, Messmore HL, Wehrmacher WH. Thromboembolism in cancer patients: pathogenesis and treatment. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; **12**: 254–66.
- 39 Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 2004; **114**: 409–14.
- 40 O’Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; **17**: 385–96.
- 41 Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost* 2003; **29**: 125–30.
- 42 James AH, Brancazio LR, Ortel TL. Thrombosis, thrombophilia, and thromboprophylaxis in pregnancy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; **3**: 187–97.
- 43 McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, Carty MJ, Greer IA. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1183–8.
- 44 Lindqvist P, Dahlbäck B, Maršál K. Thrombotic risk during pregnancy: a population study. *Obstet Gynecol* 1999; **94**: 595–9.
- 45 Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D’Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, Di Minno G. Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; **179**: 1324–8.
- 46 Girling J, de Swiet M. Inherited thrombophilia and pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; **10**: 135–44.
- 47 Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briët E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, Schulman S, van der Meer FJ. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet (London, England)* 1996; **348**: 913–6.
- 48 Vossen CY, Preston FE, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, van der Meer FJM, Pabinger I, Palareti G, Scharrer I, Souto JC, Svensson P, Walker ID, Rosendaal FR. Hereditary thrombophilia and fetal loss: a prospective follow-up study. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 592–6.
- 49 Hernández-Espinosa D, Ordóñez A, Vicente V, Corral J. Factors with conformational effects on haemostatic serpins: implications in thrombosis. *Thromb Haemost* 2007; **98**:

- 557–63.
- 50 EGEBERG O. INHERITED ANTITHROMBIN DEFICIENCY CAUSING THROMBOPHILIA. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; **13**: 516–30.
- 51 Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Thein SL, Emmerich J. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 197–211.
- 52 Nagy I, Losonczy H, Szaksz I, Temesi C, Hergert K. An analysis of clinical and laboratory data in patients with congenital antithrombin III (AT III) deficiency. *Acta Med Acad Sci Hung* 1979; **36**: 53–60.
- 53 Sas G, Blaskó G, Bánhegyi D, Jákó J, Pálos LA. Abnormal antithrombin III (antithrombin III “Budapest”) as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1974; **32**: 105–15.
- 54 Esmon CT. Protein-C: biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood* 1983; **62**: 1155–8.
- 55 Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976; **251**: 355–63.
- 56 Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004; **79**: 109–16.
- 57 Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 639–43.
- 58 Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4743–6.
- 59 Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; **68**: 1370–3.
- 60 Fair DS, Marlar RA. Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the Protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood* 1986; **67**: 64–70.
- 61 Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P. Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1971–8.
- 62 Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; **64**: 1297–300.

- 63 Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984; **311**: 1525–8.
- 64 Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991; **66**: 49–61.
- 65 Dahlbäck B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**: 2512–6.
- 66 Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 1004–8.
- 67 Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; **369**: 64–7.
- 68 Dahlbäck B, Hillarp A, Rosen S, Zöller B. Resistance to activated protein C, the FV:Q506 allele, and venous thrombosis. *Ann Hematol* 1996; **72**: 166–76.
- 69 Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet (London, England)* 1994; **343**: 1536–8.
- 70 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; **88**: 3698–703.
- 71 Danneberg J, Abbes AP, Bruggeman BJ, Engel H, Gerrits J, Martens A. Reliable genotyping of the G-20210-A mutation of coagulation factor II (prothrombin). *Clin Chem* 1998; **44**: 349–51.
- 72 Toulon P, Adda R, Perez P. Sensitivity of the ProC global assay for protein C pathway abnormalities. clinical experience in 899 unselected patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2001; **104**: 93–103.
- 73 Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004; **114**: 539–45.
- 74 Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res* Elsevier Ltd; 2011; **127 Suppl**: S21-5.

- 75 van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol* 2008; **142**: 889–903.
- 76 Andresen MS, Abildgaard U. Coagulation Inhibitor Potential: a study of assay variables. *Thromb Res* 2005; **115**: 519–26.
- 77 Andresen MS, Abildgaard U, Liestøl S, Sandset PM, Mowinckel M-C, Ødegaard OR, Larsen ML, Diep LM. The ability of three global plasma assays to recognize thrombophilia. *Thromb Res* 2004; **113**: 411–7.
- 78 He S, Antovic A, Blombäck M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res* 2001; **103**: 355–61.
- 79 He S, Bremme K, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* 1999; **96**: 145–56.
- 80 Andresen MS, Iversen N, Abildgaard U. Overall haemostasis potential assays performed in thrombophilic plasma: the effect of preactivating protein C and antithrombin. *Thromb Res* 2002; **108**: 323–8.
- 81 Béguin S, Choay J, Hemker HC. The action of a synthetic pentasaccharide on thrombin generation in whole plasma. *Thromb Haemost* 1989; **61**: 397–401.
- 82 Exner T, Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the protein C activator from Agkistrodon Contortrix Contortrix venom. *Thromb Haemost* 1988; **59**: 40–4.
- 83 Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. *J Thromb Thrombolysis* 2011; **31**: 275–81.
- 84 Wielders S, Mukherjee M, Michiels J, Rijkers DT, Cambus JP, Knebel RW, Kakkar V, Hemker HC, Béguin S. The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 629–36.
- 85 Kyrle P a, Mannhalter C, Béguin S, Stümpflen A, Hirschl M, Weltermann A, Stain M, Brenner B, Speiser W, Pabinger I, Lechner K, Eichinger S. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1287–91.
- 86 Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kiszalák M, Vásárhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis* 2016; **41**: 359–64.

- 87 Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; : 42–8.
- 88 Dalen JE. Should patients with venous thromboembolism be screened for thrombophilia? *Am J Med* 2008; **121**: 458–63.
- 89 Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003; **138**: 128–34.
- 90 Jadaon MM. Epidemiology of Prothrombin G20210A Mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; **3**: e2011054.
- 91 Lippi G, Franchini M. Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over. *Semin Thromb Hemost* 2008; **34**: 747–61.
- 92 Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet (London, England)* 2000; **355**: 1627–32.
- 93 Herrmann FH, Koesling M, Schröder W, Altman R, Jiménez Bonilla R, Lopaciuk S, Perez-Requejo JL, Singh JR. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997; **14**: 403–11.
- 94 Balogh I, Póka R, Pfliegler G, Dékány M, Boda Z, Muszbek L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 660–1.
- 95 Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet (London, England)* 1995; **346**: 1133–4.
- 96 Akar N, Akar E, Dalgin G, Sözüöz A, Omürlü K, Cin S. Frequency of Factor V (1691 G --> A) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1527–8.
- 97 Zöller B, Norlund L, Leksell H, Nilsson JE, von Schenck H, Rosén U, Jepsson JO, Dahlbäck B. High prevalence of the FVR506Q mutation causing APC resistance in a region of southern Sweden with a high incidence of venous thrombosis. *Thromb Res* 1996; **83**: 475–7.
- 98 Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol* 1999; **105**: 564–6.
- 99 Angchaisuksiri P. Venous thromboembolism in Asia--an unrecognised and under-treated problem? *Thromb Haemost* 2011; **106**: 585–90.
- 100 Kim S, Song I, Kim H-K, Huh S. Thrombophilia in Korean patients with arterial or venous thromboembolisms. *Ann Surg Treat Res* 2016; **90**: 340–5.
- 101 Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T. Genetic risk factors for deep vein

- thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006; **83**: 217–23.
- 102 Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R. Thrombophilia in East Asian countries: are there any genetic differences in these countries? *Thromb J Thrombosis Journal*; 2016; **14**: 25.
- 103 Angchaisuksiri P. Venous thromboembolism in Asia--an unrecognised and under-treated problem? *Thromb Haemost* 2011; **106**: 585–90.
- 104 Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost* 2006; **95**: 401–13.
- 105 Uchikova EH, Ledjev II. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; **119**: 185–8.
- 106 Liu J, Yuan E, Lee L. Gestational age-specific reference intervals for routine haemostatic assays during normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 2012; **413**: 258–61.
- 107 Ljungqvist M, Söderberg M, Moritz P, Ahlgren A, Lärfars G. Evaluation of Wells score and repeated D-dimer in diagnosing venous thromboembolism. *Eur J Intern Med* 2008; **19**: 285–8.
- 108 Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol* 2009; **114**: 1326–31.
- 109 Kline JA, Williams GW, Hernandez-Nino J. D-dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. *Clin Chem* 2005; **51**: 825–9.
- 110 Chabloz P, Reber G, Boehlen F, Hohlfeld P, de Moerloose P. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. *Br J Haematol* 2001; **115**: 150–2.
- 111 Nolan TE, Smith RP, Devoe LD. Maternal plasma D-dimer levels in normal and complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 1993; **81**: 235–8.
- 112 Morse M. Establishing a normal range for D-dimer levels through pregnancy to aid in the diagnosis of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 1202–4.
- 113 Kovac M, Mikovic Z, Rakicevic L, Srzentic S, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Elezovic I. The use of D-dimer with new cutoff can be useful in diagnosis of venous thromboembolism in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; **148**: 27–30.
- 114 Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med* 2004; **42**: 710–4.
- 115 Ustün Y, Engin-Ustün Y, Kamaci M. Association of fibrinogen and C-reactive protein

with severity of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; **121**: 154–8.

VI. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Folyóiratcikkek:

Réger B, Losonczy H, Nagy A, Péterfalvi A, Mózes R, Pótó L, Farkas N, Kovács GL, Miseta A, Hussain A, Tóth O. *Detection of high-risk thrombophilia with an automated, global test: the Coagulation Inhibitor Potential assay*. Blood Coagulation & Fibrinolysis 2018; 29: (5):435-441 IF:1,119 (2017-es IF)

Réger Barbara, Tóth Orsolya, Litter Ilona, Pótó László, Nagy Ágnes, Mózes Réka, Miseta Attila, Kovács L. Gábor, Losonczy Hajna. *Véralvadási paraméterek változása normál várandósság során*. Magyar Nőorvosok Lapja 2014. március 77. évfolyam 2. szám

Réger B, Péterfalvi A, Litter I, Pótó L, Mózes R, Tóth O, Kovács GL, Losonczy H. *Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women*. Thrombosis Research 2013; 131: (4) pp. e183-e187. IF:2,427

Összesített impakt faktor: 3,546

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

Barbara Réger, Hajna Losonczy, Ágnes Nagy, Emese Kátai, Ágnes Péterfalvi, Nelli Farkas, Attila Miseta, Tóth Orsolya. *Introduction of an automated global coagulation assay, the coagulation inhibitor potential method (CIP)*. CCLM 2018; Volume 56, (Issue 9) eA128

Réger Barbara, Losonczy Hajna, Nagy Ágnes, Kátai Emese, Péterfalvi Ágnes, Farkas Nelli, Alizadeh Hussain, Miseta Attila, Faust Zsuzsanna, Tóth Orsolya. *Koaguláció Inhibitor Potenciál metodika alkalmazása thrombophiliás betegmintákon*. Metabolizmus 2018; 16(Suppl. 1):121.

Réger Barbara, Tóth Orsolya, Litter Ilona, Losonczy Hajna. *Véralvadási paraméterek változása normál várandósság során*. Metabolizmus 2014; 12(4):254.

Losonczy H, Tóth O, Réger B, Szomor Á. *Trombózis profilaxis és kezelés hematológiai malignomákban*. Metabolizmus 2014; 12(4)

Ágnes Nagy, **Barbara Réger**, Orsolya Tóth, Hajna Losonczy. *Comparative pharmacokinetic analysis of 1200/500 IU vWF/FVIII and 900/800 IU vWF/FVIII concentrate in patient with type 3 von Willebrand disease*. International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013; 11(Suppl.2) 85-289

Réka Mózés, Orsolya Tóth, Hajna Losonczy, Marianna Dávid, **Barbara Réger**, Béla Meleg, Ágnes Nagy. *Dose modifying effect of VKORC1 9041G > A and 6009C > T gene-polymorphisms in acenocoumarol anticoagulated Hungarian outpatients*. Thrombosis Research 2012; 130: (Suppl. 1) pp. S119-S120

Orsolya Tóth, Jacqueline Conard, Hajna Losonczy, **Barbara Réger**, Marianne S. Andresen, Marie-Hélène Horellou, Réka Mózés, Ulrich Abildgaard. *High sensitivity of the global CIP assay for hereditary thrombophilia*. Thrombosis Research 2012; 130: (Suppl. 1) pp. S133

Tóth Orsolya, **Réger Barbara**, Andresen Marianne, Conard Jacqueline, Mózés Réka, Abildgaard Ulrich, Losonczy Hajna. *A „koaguláció inhibitor potenciál” (CIP) esszé alkalmazása hereditaer thrombophilia kimutatására*. Haematológia-Transzfuziológia 45. évfolyam 1/2012. október, p. 72.

Réger Barbara, Mózés Réka, Tóth Orsolya, Andresen Marianne, Abildgaard Ulrich, Losonczy Hajna. *Optikai véralvadási automatára applikált „koaguláció inhibitor potenciál” teszt használata thrombophilia kimutatására*. Haematológia-Transzfuziológia 45. évfolyam 1/2012. október, p. 66.

Mózés Réka, **Réger Barbara**, Tóth Orsolya, Rideg Orsolya, Abildgaard Ulrich, Losonczy Hajna. *Kombinált orális antikonceptív hatása a „koaguláció inhibitor potenciál”-ra*. Haematológia-Transzfuziológia 45. évfolyam 1/2012. október, p. 60.

Mózés Réka, **Réger Barbara**, Tóth Orsolya, Nagy Ágnes, Dávid Marianna Losonczy Hajna. *Kontrollált LMWH profilaxis jelentősége Habitualis abortusz diagnózisban*. Haematológia-Transzfuziológia 2011; 44: (Suppl. 1) p. 102. különszám

Réka Mózes, Hajna Losonczy, Orsolya Tóth, **Barbara Réger**, Béla Melegh, Ágnes Nagy. The dose modifying effect of VKORC 9041G>A and 6009C>T gene polymorphisms in acenocumarine anticoagulated hungarian outpatients Thrombosis: a multidisciplinary approach. XI ETRO Advanced Teaching Course, Campobasso, Olaszország, 2011; Paper15.

Réger Barbara, Pótó László, Tóth Orsolya, Mózes Réka, Seierstad Marianne Andresen, Abildgaard Ulrich, Losonczy Hajna. *Thrombophilia kimutatása egy új globális módszerrel*. Magyar Belorvosi Archívum 2010; 63:(5) p. 380.

Mózes Réka, Nagy Ágnes, Tóth Orsolya, Dávid Marianna, **Réger Barbara**, Sipeky Csilla, Melegh Béla, Losonczy Hajna. *Tartósan antikoagulált betegek vérzéses szövődeményeinek elemzése VKORC és CYP2C9 polimorfizmusok ismeretében*. Magyar Belorvosi Archívum 2010; 63:(5) p. 374.

Tóth Orsolya, Nagy Ágnes, Mózes Réka, **Réger Barbara**, Losonczy Hajna, Dávid Marianna. *Rotációs thrombelastographia használata familiaris thrombophilia diagnózisában*. Magyar Belorvosi Archívum 2010; 63:(5) p. 383.

Barbara Réger, László Pótó, Réka Mózes, Orsolya Tóth, Ilona Litter, Hajna Losonczy. *Qualitative challenges of haemostatic changes during pregnancy*. Lab Med 2010; 35. évf. 3. szám

Réger Barbara, Füziné Budos Julianna, Litter Ilona. *Terhes nők véralvadási paramétereinek monitorozása fibrinogén eredmények statisztikai elemzése*. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 2009; 34. évf. Supplementum

Tóth Orsolya, Dávid Marianna, Nagy Ágnes, Szomor Árpád, Lima Nikoletta, Kosztolányi Szabolcs, Kovács Gábor, Csalódi Renáta, Szendrei Tamás, **Réger Barbara**, Losonczy Hajna. *Rotációs thrombelastographia alkalmazása a familiáris thrombophilia diagnózisában*. Hematológia Transzfuziológia 2008; 41: (3-4) pp. 155-163.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak ahhoz, hogy ez az értekezés elkészülhessen.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Losoncy Hajnának és társ-témavezetőmnek Dr. Tóth Orsolyának, hogy befogadtak munkacsoportjukba, vezettek, szakmailag és emberileg támogattak, bíztattak munkám során.

Hálás vagyok, hogy megismerhettem Ulrich Abildgaard Professzort, aki értékes tanácsokkal látott el a tudományos kutatás során.

Köszönettel tartozom Dr. Litter Ilona főorvosnőnek, hogy biztatott és értékes tanácsokkal segítette a munkámat.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Kovács L. Gábornak és Prof. Dr. Miseta Attilának, hogy hozzájárultak ahhoz, hogy a PhD értekezésül szolgáló munkát az I. sz. Belgyógyászati Klinika, Hematológia Munkacsoportjában végezhessem.

Köszönöm Dr. Péterfalvi Ágnesnek a támogatását, biztatását és a publikációk elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm családomnak a támogatást, a sok türelmet és ösztönzést. Az Ő bátorításuk nagyban hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészüljön.