

VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT THROMBOSISKÉSZSÉG LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATÁNAK LEHETŐSÉGEI

Ph.D. tézis

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

ABSZTRAKT

A thrombophilia egy olyan hiperkoagulációs állapot, amely vénás thrombosis kialakulásához vezethet. Laboratóriumi vizsgálata idő- és költségigényes, hiszen az egyes defektusok, mint az antithrombin (AT)-, protein C (PC)-, protein S (PS) 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 háttérében 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 (PI), aktivált partialis thromboplastin időt (APTI), thrombin időt (TI), 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.

BEVEZETÉS

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 *thrombosis*készséghez vagy *vérzékenység*hez vezet.

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

A mélyvénás thrombosis (MVT) és a tüdőembólia (PE) ugyanannak a klinikai entitásnak, a vénás thromboembóliának (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. 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.

A vénás thromboembóliát 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 veleszületett thrombophilia genetikailag meghatározott hajlam, elsősorban vénás thromboembóliás megbetegedések kialakulására. Olyan hiperkoagulabilitás, mely az ismert, szerzett rizikótényezők jelenléte nélkül, önmagában is képes thromboembóliás megbetegedéseket létrehozni, jellemzi az ismétlődések fokozott kockázata is. A homozigóta állapotok önmagukban, illetve több genetikai defektus kombinálódása vezethetnek klinikailag thromboembóliás megbetegedések kialakulásához, azonban ezekhez a genetikai eltérésekhez gyakran társul valamilyen környezeti rizikótényező is, mely szintén jelentőséggel bír a thromboembóliás kórkép manifesztálásában. Veleszületett thrombophiliára kell gondolni fiatal korban (~ 45 éves kor alatt) előforduló vénás thromboembolia esetén, ha a thrombosis

szokatlan lokalizációjú (nem alsó végtagú), recurrens thrombosis-, ill. családi halmozódás előfordulásakor.

A veleszületett thrombophilia kockázati tényezők az AT-, PC-, PS deficiencia, FV Leiden mutáció (FV:Q506), prothrombin gén mutáció (FII G20210A allél jelenléte), dysfibrinogenaemiák bizonyos típusai és az emelkedett FVIII szint jelenléte.

A legfontosabb szerzett kockázati tényezők a VTE-ás megbetegedések kialakulásában a malignus betegségek, szívelégtelenség, nephrosis syndroma, paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria, varicositas, antiphospholipid syndroma, műtét, immobilizáció, várandósság, gyermekágyi időszak, orális antikoncipiens, vitaminhiányból eredő hiperhomociszteinémia, hiperviskozitás syndromával járó állapotok, mint myeloproliferatív neoplasia (pl.: polycythaemia vera, essentialis thrombocythaemia) és lymphoproliferatív betegség (pl.: myeloma multiplex, Waldenström-macroglobulinaemia), trauma, obesitas, előrehaladott életkor, korábbi thromboemboliás megbetegedés jelenléte.

CÉLKITŰZÉS

I. Thrombophilia vizsgálata Koaguláció Inhibitor Potenciál (CIP) módszerrel

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. Véralvadási paraméterek változásának vizsgálata normál várandósság során

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 az PI, APTI, TI, fibrinogén és D-dimer esetében a vizsgált populációban.
3. Gesztációs kor szerinti referencia intervallumok összehasonlítása a nem terhesekre vonatkozó normál tartományokkal az PI, APTI, fibrinogén és D-dimer esetében.
4. A CIP metodika alkalmazása a 16., 26. és 36. terhességi héten levett plazmamintákon.

THROMBOPHILIA VIZSGÁLATA KOAGULÁCIÓ INHIBITOR POTENCIÁL (CIP) MÓDSZERREL

I. 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. 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. 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. 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).

II. Anyag és módszer

II.1. A vizsgálatba bevont személyek

Vizsgálatainkba 319 személyt vontunk be, 126 fő egészséges kontrollt és 193 fő thrombophiliával rendelkező beteget (helyi etikai engedély száma: 6544).

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 betegségre utaló tünet nem állt fenn. A veleszületett thrombophilia kimutatása standard laboratóriumi módszerekkel történt, mint az AT-, PC-, PS aktivitás és APC rezisztencia meghatározása ACL optikai koagulométeren és a készülék saját reagenseivel. További vizsgálatokra azokat az AT-, PC- és PS deficiens mintákat válogattuk ki, amelyek esetében ismételen határérték alatt maradt az aktivitás szintje. A FV Leiden mutáció kimutatása Zöller és Dahlbäck, a FII G2021A mutáció Danneberg módszere szerint történt.

II.2. A vérminták előkészítése

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).

II.3. Koaguláció Inhibitor Potenciál (CIP) metodika elve

A CIP metodika két reakcióból áll, amit „A” és „B” reakciónak nevezünk. Na-citráttal alvadásgátolt plazmát szöveti faktor és CaCl₂ oldat hozzáadásával aktiváljuk, majd a képződő fibrinpolymerisatiót 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. 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. Ezáltal a „B” reakcióban az alvadás aktivitása csökkent a normál plazmában, míg a thrombophiliás plazmában ez a gátlás kevésbé kifejezett. Az eredményt a két reakció görbe alatti terület különbségéből kapjuk meg és a következő képlet alapján számítjuk: $CIP = ((A-B)/A) \times 100$. Az eredményt Unitban (U) fejezünk ki. A teljes gátlás 100 U-nak felel meg, ami egy egészséges egyén eredményének feleltethető meg.

II.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.

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

Az „A” reakció 100 μ l Na-citráttal alvadásgátolt plazma, 85 μ l Tris puffer (66 mmol/l Trisma base és 130 mmol/l NaCl, pH=7,4), 15 μ l thromboplastin (Dade Innovin 1/4500, 1,34 pmol/l) és CaCl₂ (17 mmol/l) 2:1 arányú keveréke. A „B” reakció 100 μ l Na-citráttal alvadásgátolt plazma, 35 μ l Tris puffer, 22 μ l Protac (1U/ml), 28 μ l Arixtra (10 μ g/ml) és a 15 μ l thromboplastin és CaCl₂ 2:1 arányú keveréke.

Mindkét reakcióban 200 μ l a reakcióelegy végtérfogata, az alvadást a thromboplastin és CaCl₂ - 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 °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: $CIP = ((A-B)/A) \times 100$, amit Unitban (U) fejezünk ki. A képletben, „A” az „A” reakció során mért reakció görbe alatti terület, a B” a „B” reakcióban mért reakció görbe alatti területet jelenti.

II.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.

III. Eredmények

III.1. A CIP metodika reprodukálhatósági vizsgálata, within-run és day-to-day variabilitás

Megvizsgáltuk a CIP metodika reprodukálhatóságát normál és thrombophiliás (FVL homozygota (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.

III.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.

Ezek az aktivitási értékek, az egyes paraméterek esetében, megfeleltethetők a normál referencia tartomány alsó határértékével.

III.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 (het) 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 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%.

III.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 csoporthoz 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 ($p = 0,669$). Összességében

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

A kontrollok 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.

III.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). 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%).

IV. Megbeszélés

A CIP módszer ígéretes, globális véralvadási teszt a thrombophilia laboratóriumi kimutatására. Eredetileg manuális kivitelezésű metodika volt, amely érzékeny a magas kockázatú thrombophilia kimutatására. 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 tesztel 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. 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. 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 szenzitivitásának bizonyult a veleszületett magas kockázatú thrombophilia esetében más globális véralvadási módszerekhez képest. Ilyen globális véralvadási teszt a Calibrated Automated Thrombogram (CAT) metodika, ami Endogén Thrombin Potenciál néven (ETP) is ismert, és a veleszületett AT deficiencia és homozigóta FII G20210A mutáció kimutatására alkalmazható. 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 thrombosis-készség ill. vérzés kockázatának a becslésére. A CAT metodikát viszont a standardizáció hiánya miatt jelenleg még nem ajánlják rutinszerűen alkalmazni a klinikai gyakorlatban. Másik globális módszer a ProC Global (PCG), ami a PC-deficiencia kimutatására érzékeny.

Vizsgálatunkban a veleszületett thrombophilia különböző típusainak (entitásai) előfordulása az irodalmi adatok alapján megegyezik más nyugat-európai országokban talált prevalencia adatokkal, 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. Ezek az eredmények szemben állnak a heterozigóta FV Leiden mutáció területi megoszlásával, amely délről észak felé növekszik (a Skandináv területen a leggyakoribb az előfordulás). Ez a felülreprezentáltság egyes szerzők szerint alátámaszthatja a magyarok északi, finnugor eredetét. A magas rizikójú thrombophilia prevalenciájában viszont nincs különbség hazánkat és a környező országokat tekintve.

Az alacsony rizikójú mutációk gyakoriak a nyugati populációban, viszont az ázsiai és az afrikai populációból hiányzik. Ezzel ellentétben a magas rizikójú mutációk gyakorisága a nyugati populációban kevésbé fordul elő, míg az ázsiai populációban gyakoribb. 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.

Eredményeink azt mutatják, hogy a CIP metodikával végzett thrombophilia vizsgálat kiterjeszhető olyan populációkra, ahol a vizsgálat nehézkes, időigényes illetve drága.

VÉRALVADÁSI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA NORMÁL VÁRANDÓSSÁG SORÁN

I. Bevezetés

A terhesség, szülés és gyermekágy során gyakran előfordul véralvadási rendellenesség, amely az anya és a magzat életét veszélyeztetheti. A terhességi és gyermekágyi állapotnak jól ismert kockázati tényezője a vénás thromboembólia, 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. 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 PS antigén szintjének csökkenése állhat. Ez feltehetően egyfajta védekező mechanizmus, amely megakadályozza a súlyos vérzéses komplikációt szülésnél. 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. azt találták, hogy a véralvadási II-es, V-ös, X-es, XI-es, XII-es faktor, az AT, a PC, az APTI és a 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 TI csökken, a fibrinogén emelkedik, amely a hiperkoagulációs állapot jelenlétére utal. A PS aktivitása jelentősen csökken, miközben a szabad PS csak mérsékelt csökkenést mutat és a totál PS nem változik.

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. 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. 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 pre-teszt valószínűségű Wells score mellett. 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.

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.

II. Anyag és módszer

II.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).

II.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).

II.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. Az adatok normál eloszlása esetében a konvencionális 95%-os referencia intervallumok számítására az $\text{átlag} \pm 2 \text{ SD}$ -t is alkalmaztuk az előbb említett módszer mellett.

III. Eredmények

III.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 jelenlétét a terhesség során („normál terhesek”), 28-an legalább egy, a következő kóros állapot, szövődmény 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. gestációs 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.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.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. 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.

*Az **INR** gesztációs kor szerinti referencia intervalluma: 16. hét **0,80-1,12**; 26. hét **0,77-1,18** és 36. hét **0,74-1,02**.*

*Az **INR** normál, nem terhesekre vonatkozó referencia intervalluma: **0,90-1,15**.*

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 ($p < 0,001$), 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. Mivel az APTI és TI adatok eloszlása normál, ezért a

referenciatartomány meghatározására lehet az átlag \pm 2 SD formát is alkalmazni a nem paraméteres bootstrap módszer mellett.

Az APTI gesztációs kor szerinti referencia intervalluma: 16. hét **27,5-38,8 s**; 26. hét **26,3-35,7 s** és 36. hét **24,7-32,7 s**.

Az APTI normál, nem terhesekre vonatkozó referencia intervalluma: **25,0-37,0 s**.

A TI gesztációs kor szerinti referencia intervallum: 16. hét **12,5-15,6 s**; 26. hét **12,1-14,9 s** és 36. hét **11,8-15,5 s**.

A TI normál, nem terhesekre vonatkozó referencia intervalluma: **11,0-17,0 s**.

III.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 ($p < 0,001$). 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 átlag \pm 2 SD formát alkalmaztuk. A fibrinogén referencia intervallumának meghatározására is a nem paraméteres bootstrap módszert használtuk a 2,5th és 97,5th percentilis megadásával.

A fibrinogén gesztációs kor szerinti referencia intervalluma: 16. hét **3,28-6,59 g/L**; 26. hét **3,34-6,80 g/L** és 36. hét **4,30-8,11 g/L**.

A fibrinogén normál, nem terhesekre vonatkozó referencia intervalluma: **2,00-4,00 g/L**.

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. 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.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 ($p < 0,001$). 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.

A D-dimer gesztációs kor szerinti referencia intervalluma: 16. hét < **224 ng/ mL**; 26. hét < **309 ng/mL** és 36. hét < **541 ng/mL**.

Az D-dimer normál, nem terhesekre vonatkozó referencia intervalluma: < **250 ng/mL**.

III.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 ($p < 0,001$). Mivel az adatok eloszlása jobbra ferde, ezért a gesztációs kor szerinti cut-off értéket a medián segítségével határoztuk meg.

A CIP gesztációs kor szerint a 16. héten **42 U**, 26. héten **36 U** és a 36. héten **32 U**-nak megfelelő CIP értéket kaptunk mediánnak.

A normál nem terhesekre vonatkozó CIP határérték **90 U felett** van.

IV. 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, 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 termelődés intenzívebb fibrinogén-fibrin átalakuláshoz vezethet, és ezáltal megnövekedhet a fibrinolysis és a fibrin degradációs termékek (FDP) szintje. Ennek a két tényezőnek – az intenzív termelődésnek 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 preeclampszában jelentős CRP növekedés figyelhető meg. 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, 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. 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. J. Liu és mtsai. a PI, APTI, TI és fibrinogén véralvadási paramétereket vizsgálták. Ugyanattól a gyártótól származó mérőműszerrel és reagensekkel dolgoztak, mint amit mi is használtunk. Tanulmányukban a PI, APTI, TI rövidül, a fibrinogén emelkedik a gesztációs kor előrehaladtával. Hasonló eredményeket kaptunk mi is, mégha 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. 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>).

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 csökken, 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.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Folyóiratcikkek:

Réger B, Losonczy H, Nagy A, Péterfalvi A, Mózes R, Póto 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, Póto 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, Póto 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 Melegh, Ágnes Nagy. *Dose modifying effect of VKORC1 9041G > A and 6009C > T gene-polimorphisms 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 antikoncipiens 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 Mózés, Hajna Losonczy, Orsolya Tóth, **Barbara Réger**, Béla Melegh, Ágnes Nagy. *The dose modifying effect of VKORC 9041G>A and 6009C>T gene polymorphisms in acenocoumarin anticoagulated hungarian outpatients* Thrombosis: a multidisciplinary approach. XI ETRO Advanced Teaching Course, Campobasso, Olaszország, 2011; Paper15.

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

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

Tóth Orsolya, Nagy Ágnes, Mózés 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 Mózés, 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.

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.