

**TELJES VÉRT ALKALMAZÓ MÓDSZEREK
VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ HAEMOSTASIS
ZAVAROKBAN**

Ph.D. tézis

Szerző: Dr. Tóth Orsolya

Témavezető: Prof. Dr. Losonczy Hajna



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
I. sz. Belgyógyászati Klinika

2009

BEVEZETÉS

A normális 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 hiperkoagulábilis állapotok artériás vagy vénás thrombembóliás betegségekben nyilvánulhatnak meg. A fejlett országokban a halálozás és rokkantság fő oka az artériás érbetegség. Az akut koronária szindróma (ACS) patogenezisében központi szerepet játszik a thrombosis. A különböző vérelemek funkcióit gátló gyógyszerek kardiovaszkuláris és thrombotikus szövődményeket megelőző hatását klinikai vizsgálatok bizonyították. Tekintettel azonban arra, hogy e szerekre adott válaszban jelentős egyéni különbségek figyelhetők meg, melyekről kiderült, hogy a klinikai kimenetelt is befolyásolják, szükség van olyan egyszerű, megbízható módszerre, mellyel a thrombocytagátló kezelés hatékonysága meghatározható. Vizsgálatunk során egy újonnan kifejlesztett, teljes vér aggregometrián alapuló módszert vezetünk be, a többszörös párhuzamos elektródát használó thrombocytá aggregációs módszert, azaz a „multiple electrode aggregometry”-t (MEA).

A mélyvénás thrombosis (MVT) és a tüdőembólia ugyanannak a klinikai entitásnak, a vénás thrombembóliának (VTE) két különböző manifesztációja. Az első vénás thrombosis incidenciája 1-2 esemény/1000 lakos/év, és kb. a betegek 30%-ánál következik be ismételt thrombosis a következő 10 éven belül. A betegség mortalitása magas, és súlyos hosszútávú szövődmények alakulhatnak ki, mint a krónikus pulmonaris hypertenzió és a postthrombotikus szindróma. Néhány esetben mind az artériás, mind a vénás thrombembólia rizikófaktorai jelen lehetnek, mely a klinikai képet még komplexebbé teszi. A vénás thrombembóliát ma multifaktoriális betegségnek tartjuk, melynek kialakulásában genetikai tényezők és környezeti hatások együttesen vesznek részt. A túlélés javítása, a recidívák és a szövődmények megelőzése és az egészségügyi kiadások redukálása érdekében a VTE előfordulását minél nagyobb mértékben meg kell előzni. Ennek érdekében fontos a rizikónak kitett személyek azonosítása. A thrombosisra való fokozott hajlam (azaz a thrombophilia) lehet veleszületett, szerzett, vagy a kettő kombinációja. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan laboratóriumi módszer, mellyel a vér globális hypo- vagy hyperkoagulábilis állapotát diagnosztizálni, vagy az egyes betegségek ill. az orvosi beavatkozások pro- vagy antikoaguláns hatását pontosan követni tudnánk. A thrombelastographia, mely egy globális véralvadási módszer, potenciálisan képes a thrombophiliás állapotok diagnosztizálására a legtermészetesebb környezetben: teljes vérben. Vizsgálatunk során a rotációs thrombelastographia alkalmazhatóságát vizsgáltuk a thrombophilia detektálására VTE betegek esetében.

CÉLKITŰZÉSEK

I. A teljes vérből végzett thrombocyta aggregáció összehasonlító vizsgálata különböző módszerekkel

1. A multiple electrode aggregometria validálása a spontán thrombocyta aggregáció, az ADP-, kollagén- és TRAP-6-indukálta thrombocyta aggregáció mérésével.

2. Két antikoaguláns, a leggyakrabban használt nátrium-citrát, és a direkt thrombin inhibitor hirudin thrombocyta aggregációra kifejtett hatásának összehasonlítása.

3. A MEA összehasonlítása single platelet countinggal (SPC) ugyanazon induktorok használatával.

4. Az aszpirin és az ADP-scavenger enzim apyrase *in vitro* thrombocyta aggregáció gátló hatásának kiértékelése MEA és SPC módszerekkel mérve.

5. A két thrombocyta ADP receptor (P2Y₁ és P2Y₁₂) thrombocyta aggregációban való részvételének vizsgálata a P2Y₁ receptor antagonist MRS2179 és a P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX segítségével.

6. MEA alkalmazásának vizsgálata a clopidogrel kezelés thrombocyta aggregáció gátló hatásának *ex vivo* mérésére.

II. A rotációs thrombelastographia alkalmazása a thrombophilia diagnózisában

1. A rotációs thrombelastographia alkalmazhatóságának vizsgálata hyperkoagulabilis állapot detektálására vénás thrombembólián átesett betegek esetében.

2. A rotációs thrombelastographia szerepének vizsgálata a thrombophilia diagnózisában.

3. A férfiak és nők koagulabilitásának összehasonlítása rotációs thrombelastographia segítségével.

4. Az INTEG és nNATEG tesztek érzékenységének vizsgálata nátrium-heparin és alacsony molekulatömegű heparin jelenlétében.

MULTIPLE ELECTRODE AGGREGOMETRIA

1. Bevezetés

A thrombocyták iszkémiás vaszkuláris betegségekben játszott szerepének vizsgálata, valamint a thrombocyta aggregáció gátló gyógyszerek hatásosságának ellenőrzése kardio- és cerebrovaszkuláris kórképekben megbízható thrombocyta funkciót vizsgáló módszert követel meg. A leggyakrabban a turbidimetriás elven működő optikai aggregometriát (LTA, „Born” aggregometria) használják, amelyhez nátrium-citráttal vagy heparinnal alvadásgátolt thrombocytabő plazma (PRP) szükséges. A módszer fő hátránya, hogy a thrombocytákat centrifugálással el kell különíteni a vér többi alakos elemétől, és ennek során az óriásthrombocyták is elveszhetnek, mely az eredményeket jelentősen befolyásolhatja.

Ezen okok miatt újabb, a thrombocyta funkciót teljes vérben mérő módszerek kerültek bevezetésre. Az egyik ilyen módszer, amely teljes vérben mér thrombocyta aggregációt, a Cardinal és Flower által leírt impedancia aggregometria. A módszer azon alapul, hogy amikor a vérlemezkék a küvetében lévő két platina elektródához kapcsolódnak, megnő az elektromos rezisztencia az elektródák között. Az ellenállás megváltozása arányos az elektródához tapadó thrombocyták mennyiségével. Nemrégiben egy újabb, teljes vér impedancia aggregometriát mérő műszert fejlesztettek ki. Ez az eszköz a korábbiaktól eltérően egyszer használatos, eldobható küvetével működik, és küvetánként 4 elektródát alkalmaz, mely alapján multiple electrode aggregometriának (MEA) nevezték el.

Egy másik módszer, a nem aggregálódott thrombocyták mérése, azaz a „single platelet counting” (SPC), melyben konvencionális haematológiai automaták segítségével mérik az indukció előtt és után az alvadásgátolt vérben a thrombocytaszámot, a különbségből következtetve az aggregálódott thrombocyták arányára.

Tanulmányunkban az újonnan kifejlesztett multiple electrode aggregometriát hasonlítottuk össze a single platelet countinggal, a spontán thrombocyta aggregáció, az ADP-, kollagén- és TRAP-indukálta thrombocyta aggregáció segítségével. Vizsgáltuk a különböző antikoaguláns technikák hatását a thrombocyta aggregációra, valamint a COX gátló aszpirin és az ADP-scavenger apyrase, és az ADP receptor P2Y₁ receptor antagonist MRS2179 és a P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX gátló hatását. Emellett megvizsgáltuk a MEA alkalmasságát a clopidogrel kezelés thrombocyta aggregáció gátló hatásának *ex vivo* mérésére.

2. Módszerek

2.1. A vérminták előkészítése

Egészséges önkéntesektől vettünk vért, melyet 1:10 arányú rekombináns hirudin (lepirudin) vagy nátrium citrát segítségével antikoaguláltunk. Az egészséges önkéntesek közül senki sem szedett thrombocyta működést befolyásoló gyógyszert a vérvételt megelőző két hétben. Bizonyos vizsgálatokhoz a vért aszpirint (ASA, 1 mmol/l-es végkoncentráció a vérben) tartalmazó véralvadásgátlóhoz adtuk, hogy az aszpirin teljes oldódását elérjük. Az *ex vivo* kísérletek

esetében, hat egészséges önkéntestől történt vérvétel a clopidogrel adása előtt, illetve 3, 6 és 78 órával az első dózist követően (az első napon 300 mg telítő dózis, majd 75 mg fenntartó dózis a 2., 3., és 4. napokon), és két héttel az utolsó gyógyszerbevétel után. A méréseket a vérvételt követő 0,5-4 órán belül végeztük el.

2.2. A thrombocyta aggregáció mérése multiple electrode aggregometriával

A teljes vér thrombocyta aggregáció mérését egy új generációs impedancia aggregométerrel (Multiplate[®] készülék, Dynabyte Medical, München) végeztük. A műszer 5 párhuzamos mérésre alkalmas csatornával rendelkezik, minden egyes küvettában két pár impedancia szenzor található, minden szenzor 2 egyenes elektródát tartalmaz. Az impedancia változását a szenzorok egymástól függetlenül mérik. A módszer a küvettánként 2 pár elektródának köszönheti a nevét (multiple electrode aggregometria, MEA). A mérés alatt a vérminta keverése egy eldobható mágneses keverő segítségével biztosított. A vizsgálatok egy részében a Multiplate készülék egy speciális, másfajta keverővel rendelkező verzióját használtuk, ezen kísérletek célja a turbulencia thrombocyta aggregációra gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Ebben az eszközben a mágneses keverő felváltva fordul 180°-kal jobbra illetve balra. A megfelelő áramlás elérésére a szokásosnál nagyobb mágneses keverőt (6x3 mm szemben a megszokott 4x2 mm-es keverővel) alkalmaztunk. Egy méréshez 300 µl vér szükséges.

Az 1:1 arányban fiziológiás sóval hígított teljes vért folyamatos keverés közben 37°C-n 3 percreg inkubáltuk, majd a mérést elindítottuk 12 µl megfelelő hígítású agonista, ill. kontroll vizsgálatoknál 12 µl fiziológiás sóoldat hozzáadásával. A hígításhoz használt fiziológiás sóoldathoz adtuk a megfelelő hígítású antagonistákat az inkubáció megkezdése előtt. A thrombocytáknak az elektródákhoz történő adhéziója és aggregációja impedancia változást okoz, melyet folyamatosan detektálunk. A két szenzor küvettánként két aggregációs görbét regisztrál mérésenként. A két mérés átlagát önkényesen megállapított aggregációs egységekben fejeztük ki. A mérési idő általában 5 perc volt. Az időegység alatt regisztrált aggregációs választ az aggregációs görbe alatti terület nagyságában (AUC, mértékegység: AU*min) adtuk meg.

A thrombocyta aggregáció vizsgálatára három agonistát használtunk különböző koncentrációkban: ADP-t, kollagént és TRAP-6-ot. Vizsgáltuk az aggregációs készség változását az idő függvényében. A thrombocyta aggregáció nem változott a vérvételtől számított 30-240 percreg. A módszer reprodukivitása (intra - assay variabilitása) 6±3% (variációs koefficiens átlag [%CV] ± SD, n=8) volt. A maximális aggregáció (AU), és a görbe alatti terület (AUC) tekintetében lineáris korrelációt találtunk az ADP és a TRAP-6, ill. exponenciális korrelációt az ADP és kollagén valamint TRAP-6 és kollagén által indukált thrombocyta aggregáció között.

2.3. A thrombocyta aggregáció mérése single platelet counting módszerrel

A single platelet counting-ot (SPC) Fox és munkatársai, illetve Haseruck és munkatársai által leírt módszert alkalmazva végeztük, azzal a különbséggel, hogy fiziológiás sóoldattal 1:1 arányban hígított vért alkalmaztunk, hogy a MEA-val összehasonlíthatóak legyenek az eredmények. A hígított vért (15 µl) fixációs pufferhez (30 µl) adtuk, majd a fixált mintában lévő nem aggregálódott thrombocyták számát a Sysmex Platelet Counter PL-100 (TOA Medical

Electronics, Kobe, Japán) segítségével határoztuk meg. Az aggregáció mértékét százalékban kaptuk meg azáltal, hogy az indukció előtt és az után mérhető thrombocytaszám különbségét viszonyítottuk az alapértékhez.

2.4. Statisztikai analízis

Az eredményeket 4-8 különböző vérmintán végzett kísérletből átlag \pm SD formájában adtuk meg. Az intra-assay, az intra- és inter-individuális variabilitást variációs koefficiensben fejeztük ki (%CV = SD / átlag \times 100). Az intra-assay variabilitás meghatározására két önkéntes vérért szimultán 4 alkalommal mértük le. Az 50%-os effektív koncentrációt (EC_{50}) manuálisan határoztuk meg minden dózis-válasz görbéből, a következő egyenlet segítségével: $Y_{50} = (y_{max} - y_{min})/2 + y_{min}$, a megfelelő X_{50} értéket a grafikonról olvastuk le (ahol Y_{50} : a maximális aggregáció fele (AUC), y_{max} : maximális aggregáció (AUC), y_{min} : kontroll, thrombocytá stimuláció nélküli aggregáció (AUC)). Ezután az EC_{50} értékeket statisztikailag is kiértékeljük (átlag \pm SD, t-próba). Az 50%-os gátló koncentráció (IC_{50}) hasonlóan került meghatározásra. A minták statisztikai összehasonlítására a Microsoft Excel 2000 páros és független két mintás Student-féle t-próbáját, illetve lineáris regresszióját használtuk.

3. Eredmények

3.1. Spontán thrombocytá aggregáció és az ADP-, kollagén- és TRAP-6-indukálta thrombocytá aggregáció mérése multiple electrode aggregometriával

A módszer validálása céljából a spontán thrombocytá aggregációt, a „gyenge” agonista ADP-vel, és két „erős” agonistával, kollagénnel és a PAR1 receptor agonista TRAP-6-tal indukált thrombocytá aggregációt mértük. A multiple electrode aggregometriával egy kicsi, de nem elhanyagolható mértékű *spontán aggregációt* találtunk, mely 0-123 AU*min között változott a mérések során. Ezzel szemben, amikor turbulens keverést használtunk, a spontán aggregáció sokkal nagyobb volt (280 ± 108 AU*min, átlag \pm SD, n=6 hirudinnal antikoagulált vérben), mint a normál keverés mellett (37 ± 23 AU*min, átlag \pm SD, n=8, $p < 0.05$).

Az ADP idő- és dózisdependens módon egy mérsékelt fokú thrombocytá aggregációt indukált a teljes vérben. Az ADP indukálta maximális thrombocytá aggregáció a különböző donorok között nagy különbségeket mutatott, 27-900 AU*min között változva. Ugyanazon két donor esetében 4 hónapon belül különböző időpontokban meghatározott ADP-indukálta thrombocytá aggregációban jóval kisebb variabilitást találtunk. Az “A” donor esetében 276-435 AU*min (365 ± 68 , átlag \pm SD, n=5, CV: 18%), és a “B” donor esetében 413-483 AU*min (448 ± 49 , mean \pm SD, n=3, CV: 11%) között változott.

A kollagén indukálta thrombocytá aggregáció egy lag fázis után kezdődött, mely dózis- és donor-dependensen változott. A kollagén (2.5 μ g/ml) által indukált maximális aggregáció 225-899 AU*min között változott a különböző donorok között. A kollagén stimulációt követő maximális aggregációnál kisebb mértékű variációt lehetett megfigyelni, mint ADP stimuláció után.

A TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregáció egy gyors kezdeti válasszal volt jellemezhető lag fázis nélkül, és gyorsan elérte a maximális aggregációt. A TRAP-6 (20 $\mu\text{mol/l}$) által kiváltott maximális aggregáció 230-1028 $\text{AU}\cdot\text{min}$ között változott a különböző donorok között. Az interindividuális variáció kisebb volt TRAP-6 esetében, mint az ADP indukálta aggregáció esetében.

A MEA-val végzett mérések során a spontán thrombocytá aggregáció nem korrelált az indukált thrombocytá aggregációval. Az ADP-, kollagén- és TRAP-6 indukálta maximális thrombocytá aggregáció egymással lineáris korrelációt mutatott citráttal és hirudinnal antikoagulált vérben.

3.2. A különböző antikoaguláns technikák hatása a thrombocytá aggregációra

Az antikoagulálás hatásának vizsgálatára párhuzamos thrombocytá aggregációs méréseket végeztünk citráttal és hirudinnal antikoagulált vérben. A spontán thrombocytá aggregáció fokozottabb volt citráttal, mint hirudinnal antikoagulált vérben. A hirudinnal antikoagulált vérben az apyrase szignifikánsan csökkentette a spontán aggregációt. Az aszpirinnek nem volt hatása a spontán aggregációra egyik antikoaguláns esetében sem.

Az indukált thrombocytá aggregációnál megfigyeltük, hogy minden agonista magasabb aggregációt indukált hirudinnal antikoagulált vérben, mint citráttal antikoagulált vérben. Az ADP által indukált maximális thrombocytá aggregáció alacsonyabb volt citráttal ($304\pm 136 \text{ AU}\cdot\text{min}$), mint hirudinnal antikoagulált vérben ($483\pm 224 \text{ AU}\cdot\text{min}$, $\text{átlag}\pm\text{SD}$; $n=20$; $p<0,00001$). Ez a különbség valamennyi használt ADP koncentráció esetében megfigyelhető volt, de single platelet counting esetében nem találtunk ilyen különbséget.

A kollagén által indukált maximális aggregáció szintén alacsonyabb volt citráttal ($421\pm 128 \text{ AU}\cdot\text{min}$), mint hirudinnal ($674\pm 110 \text{ AU}\cdot\text{min}$, $p<0,00001$, $n=19$) antikoagulált vérben. A kollagén aggregációt kiváltó küszöb-koncentráció viszont alacsonyabb volt citráttal, mint hirudinnal antikoagulált vérben, amely arra utal, hogy a thrombocyták érzékenyebbek a kollagén stimulációra citrátos vérben, mint hirudinnal antikoagulált vérben. A TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregáció szintén magasabb volt hirudinnal ($691\pm 184 \text{ AU}\cdot\text{min}$), mint citráttal antikoagulált vérben ($531\pm 194 \text{ AU}\cdot\text{min}$, $p<0,0001$, $n=15$) MEA-val mérve.

3.3. A multiple electrode aggregometria és a single platelet counting összehasonlítása

Mindkét módszerrel ki lehetett mutatni spontán thrombocytá aggregációt a kevert hígított teljes vérben. Az ADP indukálta thrombocytá aggregáció vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a maximális aggregációt gyorsabban elértük, ha single platelet countinggal végeztük a mérést, mint amikor MEA-val. Emellett 1 $\mu\text{mol/l}$ ADP-vel indukált thrombocytá aggregáció részben reverzibilisnek bizonyult single platelet countinggal mérve, de ez MEA esetében nem volt megfigyelhető. Az ADP-re adott dózis-válasz görbék hasonlóak voltak a két módszerrel. Mindazonáltal a single platelet countinggal kapott EC_{50} érték kissé alacsonyabb volt, mint MEA esetében, bár ez a különbség nem volt szignifikáns.

A kollagén dózis-válasz görbék különböztek a két módszer esetében. A kollagén effektív koncentrációja (EC_{50}) szignifikánsan alacsonyabb volt single platelet counting esetében, mint

MEA esetében, mind citráttal, mind hirudinnal antikoagulált vérben. A TRAP-6, mint erélyes thrombocytá aggregációt indukáló anyag, irreverzibilis aggregációt váltott ki az összes vizsgált koncentrációnál a MEA mérések során. A TRAP-6 dózis-válasz görbéi és EC_{50} értékei hasonlóak voltak a két módszerrel mérve. Az SPC esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két antikoaguláns között az ADP, kollagén és TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregációban.

3.4. Az aszpirin és az apyrase in vitro thrombocytá aggregáció gátló hatásának vizsgálata

A klinikumban leggyakrabban használt thrombocytá aggregáció gátlók célpontja a cyclooxygenase-1 (COX1) enzim és az ADP receptor $P2Y_{12}$. Vizsgálatainkban a COX gátló aszpirint és az ADP scavenger apyrase-t használtuk annak meghatározására, hogy a MEA képes-e detektálni a hatásukat, és ezt összehasonlítottuk SPC-al. Ahogy már említettük, a spontán thrombocytá aggregáció hirudinnal antikoagulált vérben szignifikánsan gátolható volt apyrase-zal, míg az aszpirinnek nem volt ilyen hatása. Nem volt hatása a spontán aggregációra sem az aszpirinnek, sem az apyrase-nak citráttal antikoagulált vérben MEA-val, ill. SPC-vel mérve egyik antikoaguláns esetében sem.

Másrészt, amikor turbulens keverést alkalmaztunk, magas spontán aggregációt találtunk, mely mind aszpirinnel, mind apyrase-zal gátolható volt, mely az aktivált thrombocytákból felszabaduló TxA_2 és az aktivált thrombocytákból és/vagy sérült vörösvérsejtekből felszabaduló ADP szerepére utal.

A MEA-val és SPC-vel mért kollagén indukálta thrombocytá aggregációt részlegesen gátolta mind az apyrase (10 U/ml) mind az aszpirin (1 mmol/l). Az aszpirin gátló hatása kifejezettebb volt a MEA, mint a SPC esetében. Az apyrase MEA-val mért gátló hatása kifejezettebb volt hirudinnal antikoagulált vérben.

Az aszpirin nem gátolta a TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregációt egyik módszer esetében sem, függetlenül a használt antikoagulánstól. Az apyrase kismértékben gátolta a TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregációt mindkét módszer esetében.

3.5. A két thrombocytá ADP receptor ($P2Y_1$ és $P2Y_{12}$) thrombocytá aggregációban való részvételének vizsgálata

3.5.1. Az ADP receptor antagonistá MRS2179 és AR-C69931MX effektív gátló koncentrációjának meghatározása az ADP indukálta thrombocytá aggregációra

A MEA-val mért ADP indukálta thrombocytá aggregációt koncentráció-dependens módon gátolta az ADP receptor $P2Y_1$ inhibitor MRS2179 és a $P2Y_{12}$ inhibitor AR-C69931MX. Az aggregáció bizonyos antagonistá koncentrációk (>100 $\mu\text{mol/l}$ MRS2179 és >100 nmol/l AR-C69931MX) felett teljesen gátolható volt. Meghatároztuk az 50%-os thrombocytá aggregáció gátló koncentrációt (IC_{50}) 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP-vel indukált aggregáció esetén mindkét antikoaguláns használatával. Az AR-C69931MX IC_{50} értéke 3 nmol/l volt hirudinnal, és 4 nmol/l citráttal antikoagulált vérben, míg az MRS2179 IC_{50} értéke 1.5 $\mu\text{mol/l}$ volt hirudinnal, és 6 $\mu\text{mol/l}$ citráttal antikoagulált vérben. Igen alacsony koncentrációjú MRS2179 (0.1 $\mu\text{mol/l}$) bizonyos mértékig (20%-kal) elősegítette a thrombocytá aggregációt. Ezen eredmények alapján az AR-C69931MX-t

1 $\mu\text{mol/l}$ ill. (az ex vivo vizsgálatoknál) 100 nmol/l végkoncentrációban, az MRS2179-t 100 $\mu\text{mol/l}$ végkoncentrációban használtuk, hogy az ADP receptorok szerepét megvizsgáljuk a spontán ill. a különböző agonisták által indukált thrombocytá aggregációban.

3.5.2. Az MRS2179 és az AR-C69931MX gátló hatása a spontán thrombocytá aggregációra

Mindkét ADP receptor antagonistá gátolta a MEA-val mért spontán thrombocytá aggregációt hirudinnal antikoagulált vérben. A két antagonistá között additív hatást nem detektáltunk. A spontán thrombocytá aggregáció átlagosan 44.9 AU*min, 17.0 AU*min, 15.2 AU*min ill. 13.9 AU*min volt a kontroll méréseknél, 1 $\mu\text{mol/l}$ AR-C69931MX, 100 $\mu\text{mol/l}$ MRS2921 ill. mindkét antagonistá hozzáadása után. Az eredmények arra utalnak, hogy a spontán aggregációt a hirudinnal antikoagulált vérben keverés közben felszabaduló nyomnyi mennyiségű ADP mind a P2Y₁, mind a P2Y₁₂ receptoron keresztül mediálja. Citráttal antikoagulált vérben azonban csak a P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179-nek volt statisztikailag szignifikáns gátló hatása (a spontán aggregációt 40%-kal csökkentette). A spontán thrombocytá aggregáció átlagosan 36.2 AU*min, 32.4 AU*min, 21.7 AU*min ill. 18.9 AU*min volt a kontroll méréseknél, 1 $\mu\text{mol/l}$ AR-C69931MX, 100 $\mu\text{mol/l}$ MRS2921 ill. mindkét antagonistá hozzáadása után.

3.5.3. Az MRS2179 és az AR-C69931MX gátló hatása a kollagén indukáltá thrombocytá aggregációra

Hirudinnal antikoagulált vérben mindkét ADP receptor antagonistá közel azonos gátló hatást fejtett ki a kollagén indukáltá aggregációra. A különböző kollagén koncentrációknál (0.5, 1 ill. 2.5 $\mu\text{g/ml}$) az MRS2179 (100 $\mu\text{mol/l}$) a thrombocytá aggregációt 71.6-49.1 ill. 39.8 (8.1-24.9-17.3) %-kal, az AR-C69931MX (1 $\mu\text{mol/l}$) 62.0-55 ill. 30 (20.8-10.7-9.9) %-kal gátolta (átlag (SD)). Az MRS2179 kisebb gátló hatást fejtett ki citráttal antikoagulált vérben, 1 ill. 2.5 $\mu\text{g/ml}$ kollagén által indukált aggregáció esetében ez a különbség szignifikáns szintet ért el. A két antagonistá együttes adásakor szinergizmus volt megfigyelhető a gátló hatásban.

Ha a többi aggregációs eredményt a hirudinnal antikoagulált vérben, antagonistá nélkül mért, kollagén indukáltá aggregációhoz viszonyítottuk (100%), észrevehető volt, hogy a reziduális thrombocytá aggregáció durván azonos volt a citráttal és a hirudinnal antikoagulált vérben bármelyik ADP receptor antagonistá hozzáadása után, és a gátló hatás felerősödött, amikor együtt adtuk az antagonistákat.

3.5.4. Az MRS2179 és az AR-C69931MX gátló hatása a TRAP-6 indukáltá thrombocytá aggregációra

Az AR-C69931MX mindkét antikoaguláns esetén ca. 25-80%-ban gátolta a TRAP-6 indukáltá thrombocytá aggregációt. Minél magasabb volt a TRAP-6 koncentrációja, annál kisebb gátló hatást lehetett elérni AR-C69931MX-szel. Az MRS2179 azonban nem gátolta a TRAP-6 indukáltá thrombocytá aggregációt citráttal antikoagulált vérben, sőt, szignifikánsan fokozta a 10 $\mu\text{mol/l}$ TRAP-6 kiváltotta aggregációt. Másrészt hirudinnal antikoagulált vérben az MRS2179 és

az AR-C69931MX azonos mértékben gátolta a 3.75 $\mu\text{mol/l}$ TRAP-6 által kiváltott thrombocytá aggregációt, de az MRS2179 gátló képessége a TRAP-6 koncentráció növelésével fokozatosan megszűnt. Bár önmagában hiányzott az MRS2179 gátló hatása, a két antagonistá közötti szinergizmust még magasabb TRAP-6 koncentrációk esetén is megfigyelhettük.

3.6. A clopidogrelre adott válasz vizsgálata MEA-val teljes vérben (ex vivo vizsgálatok)

Vizsgálataink során a kontroll ("spontán") thrombocytá aggregációt nem befolyásolta a clopidogrel szedése. A clopidogrel bevétele után 3, 6 és 78 órával az ADP (5 $\mu\text{mol/l}$) indukálta thrombocytá aggregáció gátlását figyeltük meg, melynek mértéke a vizsgált önkéntestől függött. Hirudinnal antikoagulált vérben két személynél (P1 és P2) találtunk több mint 90%-os gátlást, míg két személy (P3 és P5) clopidogrel rezisztensnek bizonyult (<10% gátlás). Két személy (P4 és P6) részlegesen reagáltak clopidogrelre (49 és 57 %-os gátlás). A maximális hatás már 3 órával a telítő clopidogrel dózis (300 mg) bevétele után elérhető volt, és a hatás a vizsgálat során közel állandó maradt. Az in vitro hozzáadott AR-C69931MX (100 nmol/l) maximálisan gátolta az ADP indukálta thrombocytá aggregációt minden önkéntes esetében, ezáltal jelezve a clopidogrel szedés mellett fennmaradó funkcionális P2Y₁₂ receptor rezervet (azaz a clopidogrel nem gátolta teljesen a thrombocytá aggregációt). Citráttal antikoagulált vérben hasonló eredményeket kaptunk. Azonban ebben a kísérletsorozatban is megfigyelhető volt, hogy az ADP indukálta thrombocytá aggregáció alacsonyabb volt citráttal, mint hirudinnal antikoagulált vérben, ezáltal a clopidogrel gátló hatása is kevésbé volt detektálható. PGE₁ (10 nmol/l hirudinnal antikoagulált vérben és 6 nmol/l citráttal antikoagulált vérben) önmagában 30-50%-kal gátolta a thrombocytá aggregációt, és potenciozta a clopidogrel okozta thrombocytá gátlást ca. 40%-ról ca. 60-85%-ra hirudinnal antikoagulált vérben. P1 és P2 személyek kivételével, akiknél az ADP indukálta thrombocytá aggregációt a clopidogrel teljesen gátolta, a PGE₁ hozzáadásával nagyobb relatív gátlást értünk el, mint anélkül. Amint az várható volt az AR-C69931MX részleges gátló hatásából, a TRAP-6 és a kollagén indukálta thrombocytá aggregációt nem befolyásolta jelentősen a clopidogrel. A kollagén indukálta thrombocytá aggregáció gyakorlatilag változatlan volt clopidogrel bevétele után. Két héttel az utolsó clopidogrel adag után az aggregáció visszatért a korábbi értékekre.

4. A thrombocytá aggregációs vizsgálatok összefoglaló értékelése

Munkánk során elsőként mutattunk be egy új, impedancia módszeren alapuló teljes vér aggregometriát. A módszert "multiple electrode aggregometriának" (MEA) nevezték el, mivel egy mérés során összesen 4 elektródát használ. A mérés egy elektromos jel detektálásán alapul, ezért előnye, hogy független a minta optikai tulajdonságaitól (pl. lipémia). Minden analízis egy kinetikus jelet eredményez, mely a görbe alatti területtel jellemezhető. Vizsgálatunk során a készülék könnyen kezelhetőnek bizonyult, az eredmények pedig nagymértékben reprodukálhatóak voltak.

Mind a spontán, mind az indukált thrombocytá aggregációban nagy egyéni variabilitást figyeltünk meg a MEA-val végzett mérések során, és a thrombocytá aggregáció variabilitása az ADP stimulus esetén volt a legnagyobb. A különböző agonisták által kiváltott aggregáció között

szignifikáns korrelációt találtunk, ugyanakkor a spontán és az indukált thrombocytá aggregáció mértéke között nem volt szignifikáns összefüggés.

A MEA-val végzett mérések során minden vizsgált agonista szignifikánsan magasabb thrombocytá aggregációt indukált hirudinnal, mint citráttal antikoagulált vérben, megerősítve Wallén és munkatársai eredményeit. Meglepő módon a MEA-val mért spontán thrombocytá aggregáció alacsonyabb volt a hirudinnal, mint citráttal antikoagulált vérben (a maximális aggregáció 7% ill. 16%-a), mely kizárja a hirudin által okozott műtermék lehetőségét. Mindazonáltal, mivel a citráttal antikoagulált vérben sem az aszpirin, sem az apyrase nem gátolta a spontán aggregációt, következésképpen sem a TXA₂, sem az ADP nem játszhatott szerepet a magasabb spontán aggregáció létrejöttében. A magasabb spontán aggregációt a citráttal antikoagulált vérben jelenlévő nyomnyi mennyiségű aktív thrombin hatásával magyarázhatjuk.

A MEA-t a single platelet counting (SPC) módszerrel hasonlítottuk össze, mely egyike a teljes vér aggregometria standard módszereinek. Azt találtuk, hogy a MEA-val kapott eredmények jól összeegyeztethetőek voltak a SPC eredményeivel. Hirudinnal antikoagulált vérben az apyrase szignifikánsan gátolta a spontán thrombocytá aggregációt MEA esetében, mely a vörösvérsejtekből vagy thrombocytákból felszabaduló ADP szerepére utal. Egy turbulensebb keverést alkalmazó MEA készülék esetében szignifikánsan magasabb spontán aggregációt találtunk. Mivel ekkor mind az aszpirin, mind az apyrase gátolta a spontán aggregációt, ez mind ADP felszabadulással, mind az aktivált thrombocytá által termelt TxA₂ hatásával magyarázható.

A jó egyezés mellett különbségeket is találtunk a két módszerrel meghatározott thrombocytá aggregáció között. A single platelet counting érzékenyebb volt az alacsony koncentrációjú ADP (nem szignifikáns) és kollagén (szignifikáns) indukálta thrombocytá aggregációra, míg nem volt különbség a TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregációban. Ezek a különbségek feltehetően annak köszönhetőek, hogy a SPC már akár a két thrombocytából álló aggregátumok létrejöttét is detektálja, míg az impedancia aggregometria a fémszenzorokon erősen rögzülő thrombocytá által létrehozott elektromos jelváltozáson alapul. Ennek megfelelően a single platelet counting esetében gyorsabban elértük a maximális thrombocytá aggregációt mint a MEA esetében. Ugyanakkor, a MEA mérések során azt tapasztaltuk, hogy a vér normál kation koncentrációja is fontos a thrombocytá aktivációban és aggregációban, mivel az ADP, kollagén és TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregáció alacsonyabb volt citráttal antikoagulált vérben, ez a különbség azonban hiányzott a SPC-al végzett mérések esetén.

Az impedancia aggregometria érzékenységét alacsony dózisú aszpirin irányában korábban Sathiropas és munkatársai ex vivo vizsgálatban bizonyították. Riess és munkatársai megmutatták, hogy egy egyszeri dózisú aszpirin kollagén indukálta thrombocytá aggregációra kifejtett gátló hatása hosszabb ideig kimutatható impedancia aggregometriával, mint turbidimetriás módszerrel. A MEA mérések során az aszpirin még a legmagasabb koncentrációban (2.5 µg/ml) használt kollagén esetén is szignifikáns gátló hatással bírt, szemben a SPC-gal végzett mérésekkel.

Összehasonlítva az ADP scavenger apyrase gátló hatását citráttal és hirudinnal antikoagulált vérben mindkét módszerrel azt találtuk, hogy a gátló hatás kifejezettebb volt hirudinnal antikoagulált vérben. Megvizsgáltuk a két thrombocytá ADP receptor szerepét is a felszabaduló ADP hatásának közvetítésében. Az ADP receptor antagonisták effektív gátló koncentrációjának meghatározása során azt találtuk, hogy függetlenül a használt antikoagulánstól, egy bizonyos antagonistá koncentráció felett az ADP indukálta thrombocytá aggregáció teljesen

gátolható volt. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy mindkét receptor aktivációja szükséges ahhoz, hogy a thrombocyták erőteljesen rögzüljenek a MEA elektródáihoz, illetve feltehetően egyéb nem fiziológiás felületekhez, mint például az atherosclerotikus plakkok felszíne.

Az antagonisták gátló hatása koncentrációfüggő módon változott, hasonlóképpen, mint ahogy azt korábban turbidimetriával, VASP foszforilációval, single platelet countinggal vagy áramlási cytometriával detektált PAC-1 expressziós vizsgálattal megfigyelték. Az AR-C69931MX IC₅₀ értékei közel azonosak voltak a hirudinnal és citráttal antikoagulált vérben, míg az MRS2179 hatékonyabbnak bizonyult hirudinnal antikoagulált vérben. Ez az eredmény arra utal, hogy a citráttal antikoagulált vérben, feltehetően az alacsony kation koncentrációnak köszönhetően a P2Y₁ receptor vagy a receptorhoz tartozó szignál transzdukciós rendszer nem működik megfelelően.

Mindkét ADP receptor antagonista gátolta a kollagén indukálta thrombocytá aggregációt, mely arra utal, hogy a thrombocytákból másodlagosan felszabaduló ADP fontos szerepet játszik a kollagén indukálta thrombocytá aggregáció létrejöttében. Azt találtuk, hogy az MRS2179 jelentősen kisebb gátló hatással bírt a citráttal, mint a hirudinnal antikoagulált vérben, de összességében a reziduális thrombocytá aggregáció csaknem azonos volt a két antikoaguláns között. Másrészt, a citráttal antikoagulált vérben mért thrombocytá aggregáció alacsonyabb volt a hirudinnal antikoagulált vérben mért aggregációnál. Ezek az eredmények is azt sugallják, hogy a citrátos vérben mérhető csökkent aggregáció egy P2Y₁ dependens jelátviteli út defektusával kapcsolatos, mely az afiziológiás divalens kation koncentráció miatt jön létre. Mivel ez a hatás nem volt kimutatható a microaggregációt mérő single platelet countinggal, feltételezzük, hogy a P2Y₁ receptor dependens jelátviteli út felelős a macroaggregátum képződésért.

A TRAP-6 a G-protein-kapcsolt PAR-1 thrombin receptor szintetikus peptid ligandja. Vizsgálataink szerint a TRAP-6 indukálta thrombocytá aggregáció részlegesen gátolható P2Y₁₂ receptor blokáddal, ugyanakkor a P2Y₁ inhibitor MRS2179 csak kismértékben hatott a thrombocytá aggregációra. Ez megfelel annak, hogy az aktivált PAR-1 közvetlenül aktiválja a G α_q proteint, és másodlagosan fokozza a release reakciót. A felszabadult ADP elsősorban a P2Y₁₂ receptoron keresztül stimulálja a thrombocytá aggregációt, mivel a P2Y₁ receptor-kapcsolt G α_q már eleve aktív.

Miután demonstráltuk, hogy a MEA képes az ADP receptor gátlás detektálására, elkezdtük a clopidogrel gátló hatásának ex vivo vizsgálatát, mely az aszpirin mellett a leggyakrabban használt thrombocytá aggregáció gátló gyógyszer az akut koronária szindróma (ACS) szekunder profilaxisában. A májban képződő aktív metabolitjain keresztül a clopidogrel irreverzibilisen gátolja a thrombocyták P2Y₁₂ receptorát, ezáltal csökkenti a thrombocytá aggregációt. Egy kis egészséges populáción vizsgálva demonstráltuk, hogy a MEA-val végzett mérések során a jelenleg javasolt clopidogrel adag (egy telítő majd fenntartó dózis) szignifikánsan csökkentette az ADP indukálta thrombocytá aggregációt már három órával a gyógyszer bevétele után. A gátlás mértékében azonban jelentős különbségeket találtunk az önkéntesek között. A vizsgált csoportban 2/6 személy clopidogrel rezisztensnek, 4/6 személy clopidogrel reszpondernek bizonyult, ha összehasonlítottuk a gyógyszer bevétele előtti és utáni értékeket. Tapasztalataink szerint a clopidogrel nem gátolja teljes mértékben a P2Y₁₂ ADP receptort, mivel az in vitro hozzáadott AR-C69931MX megnövelte a gátló hatást. Korábban leírták, hogy a P2Y₁₂ antagonisták hatását fokozni lehet természetes prosztaglandinokkal, mint pl. a PGE₁, mivel a

prostaglandinok növelik az intracelluláris cAMP koncentrációt és a PKA aktivációt, és ezáltal megakadályozzák az aktivált thrombocytaiban a cAMP koncentráció P2Y₁₂ receptor aktiváció hatására bekövetkező csökkenését. Azt is leírták korábban, hogy a VASP foszforiláció hatásosabban detektálta a clopidogrel hatását, ha az ADP-t PGE₁-gyel vagy iloprosttal kombinálták. Tanulmányunkban a PGE₁ potenciózta a clopidogrel gátló hatását. Tömören, egészséges önkéntesekben a clopidogrel hatás detektálására MEA módszerrel mérve az ADP indukálta thrombocytá aggregáció vizsgálata volt a legmegfelelőbb, hirudinnal antikoagulált vérben PGE₁-gyel kombinálva. Vizsgálatunk során a clopidogrel maximális gátló hatása már 3 órával a gyógyszer bevétele után észlelhető volt, mely egyetértésben van korábbi tanulmányok eredményével. A reszponderek és non-reszponderek közötti határ meghatározásához nagy esetszámú tanulmányokra van szükség mind egészséges populációban, mind ACS betegek körében.

Összefoglalva, különböző thrombocytá agonistákat használva demonstráltuk, hogy a MEA egy gyors, megfelelő teljes vér thrombocytá funkciót mérő módszer, mely point-of-care formában is lehetővé teszi a thrombocytá aggregáció mérését. A hirudin alkalmazása antikoagulánsként kedvezőbbnek bizonyult a citrátnál. Az aggregációs mérések eredményei jól összevethetőek voltak a single platelet counting-gal kapott eredményekkel. A MEA képesnek bizonyult különböző agonista koncentrációk használata mellett az aszpirin, apyrase és az ADP receptor antagonisták aggregációgátló hatásának kimutatására in vitro és ex vivo körülmények között is, ezáltal alkalmasnak látszik a különböző klinikai esetekben alkalmazott thrombocytá aggregáció gátló gyógyszerek akár korai hatásának a vizsgálatára is.

A ROTÁCIÓS THROMBELASTOGRAPHIA ALKALMAZÁSA A THROMBOPHILIA DIAGNÓZISÁBAN

1. Bevezetés

A véralvadási zavarokkal rendelkező betegek rutin véralvadási vizsgálatához a nátrium-citráttal antikoagulált plazma használata terjedt el. Míg a plazma a véralvadási folyamatban résztvevő véralvadási faktorok többségét tartalmazza, a teljes vérben megtalálhatóak a phospholipid felszín szolgáltató fehérvérsejtek és vérlemezkék is, melyeknek a véralvadás és fibrinolízis folyamatában játszott fontos szerepét a közelmúltban megjelenő tanulmányok bizonyították. Ezek alapján a véralvadás vizsgálatához a teljes vér használata kedvezőbb, mint a plazmával végzett, prothrombin idő és aktivált parciális thromboplastin idő alapú módszerek alkalmazása. Emellett a koagulációs profil folyamatos regisztrálása további információkat szolgáltat a teljes haemostasisról.

1948-ban Hartert írta le először a thrombelastographiát (TEG), mely a véralvadás során fellépő viszko-elasztikus változásokat detektálja folyamatosan az egész koagulációs folyamat alatt. Kezdetben a TEG technikai nehézségek miatt nem terjedt el a rutin laboratóriumokban. Manapság a TEG-et számos klinikai helyzetben alkalmazzák, így májtranszplantációk és szívsebészeti műtétek monitorizálásánál, hypokoagulábilis állapotok vizsgálatában, hyperkoagulációval járó állapotok kimutatásában, és a haemostaticus beavatkozások ex vivo monitorizálásában. Bár a TEG teljes vér hyperkoagulabilitást detektáló képességét számos vizsgálatban bizonyították, a módszer hasznosságáról a thrombophilia diagnózisában csak néhány beszámoló született. Nemrégiben egy új, hordozható, a korábbi technikai problémákat nélkülöző TEG készüléket (ROTEG[®] Coagulation Analyzer, Pentapharm, München, Németország) fejlesztettek ki. Ebben a TEG-ben a folyamatos mérések során nyert adatokat digitális formában kapjuk meg, melyek kinyerhetők további számítások céljából. A módszer alkalmasnak bizonyult a hemosztázis átfogó, betegágy melletti analizisére. Jelen vizsgálatunkban 55 klinikailag thrombophiliás beteget analizáltunk rotációs thrombelastográfiával és eredményeiket egészséges önkéntesek paramétereivel vetettük össze. Vizsgálatuk a nemek szerinti globalis alvadékkésztséget a thrombosis után 3 hónap elteltével, és a különböző tesztek érzékenységét heparinra.

2. Módszerek

2.1. Vér- és plazmaminták előkészítése

Vizsgálatunkban 66 egészséges önkéntes (kor: 34.9±10.7 év; férfi:nő=32:34), valamint a klinikánk hemosztázis szakrendelésén megjelenő 55 vénás trombembóliában szenvedő beteg (kor: 37.6±12.6 év; férfi:nő=12:43) vett részt. Felvilágosított beleegyezésük elnyerése után natív ill. trinátrium-citráttal (végkoncentráció: 12.9 mmol/l) alvadásgátolt vért vettünk kubitális vénából. Az orális antikoaguláns kezelésben részesülő betegeket a vérvétel előtt két héttel alacsony molekulatömegű heparin (LMWH) profilaxisra (általában 0.01 ml nadroparine/kg vagy 1 mg enoxaparine/kg naponta egyszer) állítottuk át. A vérvételre legkorábban a TE esemény után 3 hónappal, 24 órával az utolsó LMWH dózis beadása után, reggel, éhgyomorra került sor. A ROTEG méréseket és a rutin véralvadási teszteket a vérvétel

után 4 órán belül végeztük el. A speciális véralvadási vizsgálatokhoz az alvadásgátolt vért 20 percen át 2000 G-n centrifugáltuk, majd az aliquotokat -70°C –on tároltuk a vizsgálatok elvégzéséig.

2.2. Véralvadási- és thrombophilia vizsgálatok

Vizsgálatunk során a prothrombin idő, fibrinogén, aktivált parciális thromboplastin idő, thrombin idő, antithrombin aktivitás és antigén, protein C aktivitás és antigén, protein S aktivitás és szabad antigén, aktivált protein C rezisztencia, lupusz antikoaguláns, plazma homocisztein szint meghatározás, valamint a FV:Q506 Leiden-mutáció és a FII 20210A allél vizsgálata történt meg.

2.3. Rotációs thrombelastographia

A natív és alvadásgátolt vérminták thrombelastographiás analízise módosított thrombelastograph segítségével történt (ROTEG[®]; Pentapharm Co., München, Németország), mely a Hartert által kifejlesztett rendszeren (TEG[®]) alapul. A TEG a véralvadási folyamat során kialakult elaszticitás változást regisztrálja az alvadékképződés és az azt követő fibrinolízis során. A ROTEG és a hagyományos TEG[®] meghatározások eredményei között jó korrelációt találtak. A ROTEG[®] mérések eredményei pontosak és reprodukálhatóak voltak a vérvétel után számított 30 perctől 4 óráig. A rotációs thrombelastographia (ROTEG[®]) egy csapágyas rendszert használ az erőátvitelhez, mely a hagyományos TEG-hez képest ellenállóbbá teszi a mechanikai behatásokkal, vibrációval, mozgatással szemben. A ROTEG[®] analízis során használt paraméterek az alvadási idő (CT), az alvadékképződési idő (CFT), a maximális alvadékszilárdság (MCF), az alfa-szög és a maximális lízis (ML). A mérések során négyféle tesztet alkalmaztunk:

1. Az nNATEG teszt során 360 µL natív teljes vért helyeztünk a küvettába közvetlenül a vérvétel után, és a mérést azonnal elindítottuk.
2. A NATEG teszt során 300 µL citráttal alvadásgátolt teljes vért 20 µL kalcium-kloriddal (0.2 M, Start-TEG; Pentapharm Co., München, Németország) rekalifikáltuk közvetlenül a mérés indítása előtt.
3. Az INTEG teszt során 300 µL alvadásgátolt vérhez 20 µL kalcium-kloridot és 20 µL kontakt aktivátort (nyúlágyból előállított parciális thromboplastin, In-TEG reagens, Pentapharm Co., München, Németország) adtunk.
4. Az EXTEG teszt során 300 µL alvadásgátolt vérhez 20 µL kalcium-kloridot és 20 µL szöveti thromboplastint (Ex-TEG reagens, Pentapharm Co., München, Németország) adtunk.

A heparin in vitro hatását vizsgáló mérésekben 16 µL megfelelő hígítású natrium-heparint vagy nadroparint (Fraxiparine, GlaxoSmithKline) vagy ugyanannyi fiziológiás sóoldatot adtunk a küvettába a mérés indítása előtt.

2.4. Statisztikai analízis

A különböző betegcsoportok és egészséges önkéntesek eredményeit átlag \pm SD formában adtuk meg. A csoportok közötti különbségeket Microsoft Excel 2000 egymintás és kétmintás t-próbával vizsgáltuk.

3. Eredmények

3.1. Vénás thrombembólián átesett betegek és egészséges önkéntesek összehasonlítása

Vizsgálatunk során 55, klinikánk haemostasis szakrendelésére irányított, vénás trombembólián átesett beteg eredményeit hasonlítottuk össze 66 egészséges önkéntes eredményével. A vénás trombembólián átesett betegek csoportjában az alvadási idő (CT) az INTEG tesztben, az alvadékképződési idő (CFT) az INTEG és EXTEG tesztekben szignifikánsabban rövidebb, a maximális alvadékszilárdság (MCF) szignifikánsan magasabb és az alfa szög szignifikánsan nagyobb volt az INTEG és EXTEG tesztekben, mint a kontroll csoportban. Nem észleltünk szignifikáns különbséget a két csoport paraméterei között a NATEG teszt során. Meglepő módon az nNATEG teszt során az CFT szignifikánsan hosszabbnak, az MCF szignifikánsan alacsonyabbnak és az alfa szög szignifikánsan kisebbnek bizonyult a kontroll csoporthoz képest.

3.2. Thrombophilia pozitív és negatív VTE betegek összehasonlítása

A vizsgált 55 VTE beteg közül 21 (39%) bizonyult az elvégzett speciális tesztekkel thrombophiliásnak (13 FV Leiden heterozigóta, 2 FV Leiden homozigóta, 2 FII20210 heterozigóta, 1 lupusz antikoaguláns pozitív, 1 I-es típusú protein C hiányos, 2 hyperhomocysteinaemia), 34 (61%) betegnél nem igazolódott thrombophilia. A thrombophilia pozitív és negatív betegek összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbségeket, bár a CT és CFT értékek továbbra is szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontroll csoporthoz képest az INTEG teszt esetében.

3.3. Az LMWH hatása a véralvadásra a ROTEG[®] vizsgálat során

Az nNATEG teszt során észlelt diszkrepanciára magyarázatot keresve kiegészítő vizsgálatokat végeztünk. Mivel a VTE betegek nagy többsége LMWH profilaxisban részesült a mérés idején, feltételeztük az LMWH zavaró hatását az nNATEG teszt során mért eredményekre. Megvizsgáltuk az INTEG és nNATEG tesztek in vitro érzékenységét nadroparinra. Azt találtuk, hogy a nadroparin dózisdependens módon gátolja a teljes vér koagulációját. Az nNATEG teszt jelentősen érzékenyebb volt kis mennyiségű nadroparinra, mint az INTEG teszt (a CT-re vonatkozó IC₅₀ 0.65 ill. 15 U/ml volt a nNATEG ill. INTEG teszt esetében).

3.4. A női nem hatása a véralvadásra a ROTEG[®] vizsgálat során

Tekintettel arra, hogy a férfi-nő arány szignifikánsan különbözött a TE betegek és kontrollok csoportja között, megvizsgáltuk, hogy észlelhető-e különbség a férfi és nő egészséges önkéntesek thrombelastographiával mért eredményei között. Vizsgálatunk szerint nem volt szignifikáns különbség a nNATEG, NATEG és INTEG tesztekben mért paraméterekben, azonban az EXTEG teszt során a CT és a CFT szignifikánsan rövidebb, az MCF szignifikánsabban magasabb és az alfa szög szignifikánsabban nagyobb volt nőkben, mint férfiakban.

4. A rotációs thrombelastographiával végzett vizsgálatok összefoglaló értékelése

Vizsgálatunkban 66 egészséges önkéntes és 55, klinikánk hemosztázis szakrendelésére utalt, trombembólián átesett beteg thrombelastographiás paramétereit hasonlítottuk össze a nemrégiben kifejlesztett rotációs thrombelastographia segítségével. Kimutattuk, hogy a trombembólián átesett betegek hyperkoagulábilisabbak a kontroll csoporthoz képest, akár a szöveti faktorról, akár a kontakt aktivátorral aktivált tesztet használtuk. Az irodalomból ismert, hogy a TEG® képes detektálni a hyperkoagulábilis állapotot terhesség és gyermekágy alatt, malignus daganatos betegek esetén, ill. sebészi beavatkozásokkal kapcsolatban, azonban a TEG paraméterek és a thrombophilia között világos összefüggést nem sikerült bizonyítani. O'Donnell és mtsai thrombophiliás betegeket vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a TEG nem használható egyedüli szűrőtesztként a thrombophilia vizsgálatokra utalt betegeknél, mivel az a thrombophiliás defektusok 43%-át nem mutatta ki.

Mivel vizsgálatunkban a betegek és a kontroll csoport klinikai paramétereiben jelentős különbség mutatkozott a nembeli megoszlás tekintetében, és korábbi, módosított ROTEG tesztek során szignifikáns különbséget figyeltek meg a két nem ROTEG paraméterei között, a kontroll csoporton belül összehasonlítottuk a férfiak és nők eredményeit. Az EXTEG teszt során a női kontrolloknál az összes paraméter szignifikánsan a fokozott véralvadás irányába mutatott a férfiakéhoz képest. Sorensen és munkatársai leírták, hogy kis mennyiségű szöveti faktorról aktivált TEG-ekben a nőknél nagyobb alvadékképződési sebességet találtak a férfiakhoz képest, mely egyetértésben áll a mi eredményeinkkel. Ezzel szemben a többi teszt (azaz NATEG, INTEG, nNATEG) paramétereit nem befolyásolták nemek közötti különbségek. Így a vizsgálatunkban kialakult nembeli eltolódás ellenére megállapíthatjuk, hogy a kontakt aktivátorral végzett INTEG teszt eredményei elfogadhatóak.

Az nNATEG teszt esetén meglepő módon a TE betegcsoport "vérzékenyebbnek" bizonyult a kontrollcsoportnál, melynek hátterében elsősorban a TE profilaxisként alkalmazott LMWH szerepe merült fel. Bár nem volt lehetőségünk a mintákban anti-Xa aktivitás mérésére, az nNATEG teszt kifejezetten magas heparin érzékenysége megmagyarázhatja a különböző tesztek eredményei között észlelhető diszkrepanciát. Ugyanakkor az aktivált tesztek használatával a mintákban nyomokban meglévő heparin zavaró hatása eliminálható.

Meglepő módon nem találtunk szignifikáns különbséget a laboratóriumiilag igazolt thrombophiliával rendelkező betegek és a thrombophilia negatív TE betegek thrombelastographiás paraméterei között. Ezt magyarázhatja az, hogy a kimutatott defektusok többsége nem tartozik a súlyos thrombophiliák közé. Ez, valamint az alacsony esetszám elfedheti a TEG által is kimutatható különbségeket. Tekintettel azonban arra, hogy a vizsgált betegek klinikailag thrombophiliásnak tarthatók, a két csoport közötti különbség hiánya felveti a szerepét mindezidáig nem azonosított eltéréseknek is, melyek a napjainkban ismert abnormalitásokhoz hasonló prothrombotikus potenciállal bírnak. Bár a kontroll csoport és a VTE csoport közötti különbségek kicsik, és így a módszer ebben a formájában nem alkalmazható önmagában a trombólízisra hajlamos betegek azonosítására, a tesztek módosításával lehetővé válhat érzékenyebb, rotációs thrombelastographián alapuló tesztek kifejlesztésére.

Összefoglalva vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy a rotációs thrombelastographia, és ezen belül is elsősorban az INTEG teszt képes a hiperkoagulabilitás igazolására a VTE betegek körében, mely független a speciális laboratóriumi tesztekkel igazolt thrombophilia jelenlététől.

ÖSSZEFOGLALÁS

A multiple electrode aggregometriával nyert új eredményeink:

1. Elsőként vizsgáltuk a multiple electrode aggregometriát, mely vizsgálataink alapján megbízható, reprodukálható thrombocytá aggregációs módszernek bizonyult. Különböző thrombocytá agonisták donor-, idő-, és dózisdependens módon indukáltak thrombocytá aggregációt, melyet nem befolyásolt a thrombocytaszám a normál tartományon belül.

2. Bebizonyítottuk, hogy a direkt thrombin inhibitor hirudin a MEA mérések során kedvezőbb véralvadásgátlóként, mint a nátrium-citrát, mivel úgy tűnik, hogy a citrát gátolja a thrombocytá aggregációt.

3. A MEA és SPC összehasonlítása során azt találtuk, hogy a mérési eredmények jól korrelálnak, bár az SPC jóval időigényesebb, mint a MEA.

4. Megállapítottuk, hogy a MEA érzékenyebben detektálja az aszpirin és az apyrase gátló hatását, mint a SPC.

5. A MEA alkalmas volt a szelektív ADP receptor antagonisták gátló hatásának vizsgálatára *in vitro* körülmények között is.

6. A MEA alkalmasnak bizonyult a clopidogrel hatásosságának *ex vivo* vizsgálatára. A MEA így alkalmas jelölt a thrombocytá aggregáció további vizsgálatára kardiovaszkuláris betegekkel végzett nagy esetszámú tanulmányokban.

A rotációs thrombelastographia vizsgálatával nyert új eredményeink:

1. A rotációs thrombelastographiáról bebizonyítottuk, hogy kimutatja a korábban vénás thrombembólián átesett betegeknél a thrombotikus tendenciát.

2. Elsőként vizsgáltuk a leggyakrabban használt ROTEG[®] tesztek (nNATEG, NATEG, INTEG, EXTEG) alkalmazhatóságát thrombophiliás betegeken, és azt találtuk, hogy különösen az INTEG teszt alkalmas a hyperkoagulábilis állapotok kimutatására.

3. Nem volt különbség a laboratóriumiilag thrombophilia pozitív és negatív VTE-n átesett betegek ROTEG[®] paraméterei között. Ez arra utal, hogy klinikailag mindkét csoport hasonló thrombosis hajlammal rendelkezik, melynek oka a hypercoagulábilítást mutató esetekben még felderítésre vár.

4. Az egészséges önkénteseken belül a nők esetében nagyobb thrombosis hajlamot találtunk az azonos életkorú férfiakhoz viszonyítva a szöveti faktorról aktivált tesztben.

5. Mind a nátrium-heparin, mind az LMWH gátolta a véralvadást a natív és a kontakt aktivátorral végzett tesztben, mindazonáltal a natív teszt kb. 20x érzékenyebbnek bizonyult heparinnal szemben.

Vizsgálataikkal tehát két új teljes vérből elvégezhető gyors módszert állítottunk be ill. alkalmaztunk a haemostasis két területének, a thrombocytá aggregációs készség és a fokozott globális alvadékkészség kimutatására. A kutatás során nyert eredmények alapján mindkét módszer, az elméleti haemostasis mechanizmusaiba való részletesebb betekintést nyújt, ezen kívül alkalmazható a közvetlen betegágy melletti diagnosztikában is.

A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

Könyvfejezet:

Dávid M, **Tóth O**, Nagy Á, Meng B, Tábori J, Losonczy H: Pathogenesis of Hepatic Veno Occlusive Disease in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Scharrer I/Schramm W: 35th Hemophilia Symposium, Hamburg, 2004. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2006, 247-258.

Folyóiratcikkek:

Toth O, David M, Habon T, Nagy A, Keszthelyi Z, Kovacs N, Losonczy H. [Type I antithrombin deficiency as a cause of arterial and venous thrombosis in a family with severe thrombophilia] Orv Hetil. 2005; 146:2121-5.

Toth O, Szabo C, Kecskes M, Poto L, Nagy A, Losonczy H. In vitro effect of the potent poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor INO-1001 alone and in combination with aspirin, eptifibatide, tirofiban, enoxaparin or alteplase on haemostatic parameters. Life Sci. 2006; 79:317-23. (IF: 2.512)

Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. Thromb Haemost. 2006; 96:781-8 (IF: 2.803)

Penz SM, Reininger AJ, **Toth O**, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. Thromb Haemost. 2007; 97:435-43. (IF: 3.501)

Tóth O, Dávid M, Nagy Á, Szomor Á, Lima N, Kosztolányi Sz, Kovács G, Csalódi R, Szendrei T, Réger B, Losonczy H: Rotációs thrombelastographia alkalmazása a familiáris thrombophilia diagnózisában. Hematológia Transzfuziológia. 2008; 41: 1155-163.

Összesített impact factor: 8.816

Idézhető absztraktok:

Losonczy H, Nagy Á, Dávid M, Vidra T, **Tóth O**, Kecskés M, Szomor Á: Prevalence and clinical significance of single and combined abnormalities predisposing to venous thromboembolism in familiar thrombophilias. The Hematology Journal 2006; 3(Suppl. 1):351.

Tóth O, Dávid M, Habon T, Nagy Á, Vidra T, Meng B, Keszthelyi Zs, Kovács N, Losonczy H: Vizsgálati stratégia artériás és vénás thromboemboliás események társulásánál. Magyar Belorvosi Archivum 2003; 56(Suppl. 1):68.

Dávid M, **Tóth O**, Nagy Á, Szomor Á, Vida L, Losonczy H: Az őssejt-transzplantációkat kísérő máj VOD etiológiájának vizsgálata. 2003; 56(Suppl. 3):47.

David M, **Toth O**, Szomor A, et al.: Analysis of thrombotic tendency and endothelial dysfunction of the peri-transplant period in patients undergoing autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation 2004; 33(Suppl. 1):S119-S120.

David M, **Toth O**, Nagy A, et al.: Pathogenesis of hepatic veno-occlusive disease in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. 35th Hemophilia Symposium 2006; 247-258.

Dávid M, **Tóth O**, Szomor Á, Nagy Á, Losonczy H: Pathogenetic factors in the development of hepatic veno-occlusive disease in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation 2006; 37(Suppl. 1):S253.

Losonczy H, Nagy A, **Toth O**, et al.: Prevalence and clinical significance of single and combined inherited thrombophilias. Blood 2005; 106(11):467A.

David M, **Toth O**, Szomor A, et al.: Pathogenetic factors in the development of hepatic veno-occlusive disease in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation 2006; 37(Suppl. 1):S253.

Penz S, Reiningger AJ, Brandl R, **Toth O**, et al.: Glycoprotein VI blockade, ADP receptor antagonists and aspirin inhibit thrombus formation induced by human atheromatous plaque. Journal of Vascular Research 2006; 43:55.

Tóth O, Lima N, Dávid M, Nagy Á, Losonczy H: The use of rotation thrombelastography in familial thrombophilia. Blood Reviews 2007; 21(Suppl. 1): S101.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő munkákat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar I. számú Belgyógyászati Klinikán ill. a Münchener Egyetem Kardiovaszkuláris Betegségek Prevenciója Intézetében végeztem 2001 és 2005 között.

Mindenekelőtt tanáromnak és témavezetőmnek, Dr. Losonczy Hajna Professzorasszonynak szeretném hálás köszönetemet kifejezni, aki vezette tanulmányaimat, és tanácsaival segítette a munkámat.

Köszönöm Dr. Wolfgang Siess Professor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy csatlakozzak a munkacsoportjához, és irányította a munkámat a thrombocytá aggregációs vizsgálatok területén. Hálás vagyok a munkacsoport tagjainak, akik elfogadtak és segítségemre voltak mind a munkában, mind a mindennapi életben. Külön köszönöm Sandra Penznek a hasznos és építő eszmecseréket.

Hálával tartozok Dr. Dávid Mariannak, Dr. Nagy Ágnesnek és a Haematológiai Munkacsoport összes dolgozójának, akik érdeklődésemet a haematológia felé fordították és fáradhatatlanul tanítottak haematológiára és haemostasisra, az orvos-beteg kapcsolat fontosságára és a laboratóriumi munkára.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kecskés Mariannak, Vető Ádámnénak, Temesi Lászlónénak, Somos Évának és Meng Beátának, akik kiváló segítséget nyújtottak a haemostasis laboratóriumi módszereinek elsajátításában és elvégzésében.

Végül, de nem utolsósorban, hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy tanulmányaim és munkám során ösztönöztek és támogattak.