

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ ASZPIRIN TROMBOCITA CIKLOOXIGENÁZ-1-RE
KIFEJTETT HATÁSÁNAK KIMUTATÁSA**

Dr. Kovács Emese Gyöngyvér



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2014

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ ASZPIRIN TROMBOCITA CIKLOOXIGENÁZ-1-RE
KIFEJTETT HATÁSÁNAK KIMUTATÁSA**

Dr. Kovács Emese Gyöngyvér

Témavezető:
Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2014

AZ ASZPIRIN TROMBOCITA CIKLOOXIGENÁZ-1-RE KIFEJTETT HATÁSÁNAK KIMUTATÁSA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai
orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kovács Emese Gyöngyvér

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
Dr. Aradi Dániel, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014.05.07. 11:00

DE ÁOK Gyermekgyógyászati Intézet könyvtára

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
bírálók: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
Dr. Bodó Imre, PhD
tagok: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
Dr. Aradi Dániel, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014.05.07. 12:30

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A trombociták a megakariociták főként tromboopoetin által szabályozott proliferációját és differenciációját követően azok citoplazmájából fűződnek le. Nyugalmi állapotban átmérőjük 2-4 μm , granulumokat (α , denz és lizoszómák), mitokondriumot, felülettel közlekedő csatorna rendszert és denz tubuláris rendszert tartalmaznak. A trombocita DNS genommal nem, csak némi megakariocita eredetű mRNS-el és a fehérje szintézishez szükséges translációs apparátussal rendelkezik, ami csak igen limitált mértékű fehérje szintézishez elegendő. A trombociták normál esetben a keringésben $150\text{-}400 \times 10^9/\text{L}$ koncentrációban találhatók meg, életidejük 7-10 nap.

Elsődleges feladatuk a primér hemosztázis biztosítása szöveti traumát vagy érfal sérülést követően. Érfal sérülést megelőzően a trombocitákat a prosztaciklin, az endotél sejtek által termelt nitrogén monoxid és az endotél sejtek felszínén lévő CD39 ADP-áz tartja nyugalmi állapotban. Az érfal sérülés helyszínén a vérzés megállítását célzó trombocita dugó kialakulását a szubendoteliális mátrix hirtelen szabaddá váló kollagénje és a lokális trombin generáció indítja el. A trombociták a kollagénnel és a von Willebrand faktorral kölcsönhatásba lépve aktiválódnak és egy elsődleges fedőréteget képeznek, majd az általuk szekretált TXA_2 , ADP és más vérlemezke agonisták hatására, melyek többsége a trombocita felszínén megtalálható - G proteinhez kapcsolt - receptorok ligandja, a trombociták aktiválódnak. Az aktiváció során a trombociták felszínén a glikoprotein IIb-IIIa komplex konformáció változása révén kialakul a fibrinogén receptor. A fedő trombocita réteghez fibrinogénon keresztül további trombociták kapcsolódnak. Végül a növekedő hemosztatikuss

dugóban a véralvadás során képződött keresztkötött fibrinháló stabilizálja a trombocita aggregátumot.

Patológias körülmények között a trombocita aggregáció/aktiváció szerepet játszik a koszorúér betegség, a stroke, a perifériás artériás érbetegség ischaemiás komplikációinak patomechanizmusában. Bár a vérlemezkék adhéziója az erodált vagy megrepedő ateromás plakkot elfedő válasznak is tekinthető, az ezt követő trombus képződés, átmeneti ischaemiához vagy infarktushoz, s ezen keresztül súlyos szervkárosodáshoz vezethet.

A trombocita funkcióban kiemelt jelentőségű a telítetlen 20 szénatomos zsírsav származék családba tartozó eikozanoidok szintézise. Az eikozanoidok jelentős képviselője a trombociták által a denz vagy az α granulumokban nem tárolt és mindig újonnan képzett tromboxán A_2 (TXA₂), mely kifejezetten erős vazokonstriktor és vérlemezke aktivátor, elősegíti a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációját és atherogén hatással bír. A trombocita TXA₂ receptort aktiválva irreverzibilis trombocita aggregációt indukál és felerősíti a vérlemezkék különböző agonistákra adott válaszreakcióját.

A trombocita TXA₂ képzés első lépésében a trombocitát aktiváló agonisták hatására felszabaduló Ca²⁺ által aktivált foszfolipáz A₂ (PLA₂) a membrán foszfolipidekből arachidonsavat (AA) szabadít fel. Az AA-at a prosztaglandin-H-szintáz-1 alakítja ciklikus endoperoxidokká. A prosztaglandin-H-szintáz-1, a mieloperoxidáz család hemoproteinje, kétféle enzimatis aktivitással is rendelkezik. A ciklooxygenáz (COX) aktivitás az AA-ból prosztaglandin G₂ (PGG₂)-t képez, melyet az enzim peroxidáz aktivitása prosztaglandin H₂ (PGH₂)-vé alakít. Ez az arachidonsav lehasadásától a PGH₂-ig terjedő folyamat számos sejtben végbemegy, majd a különböző szövetekben, sejtekben specifikus izomerázok PGH₂-ből prosztanoidokat: PGD₂-t, PGE₂-t, PGF_{2 α} -t, prosztaciklint (PGI₂), ill. TXA₂-t

képeznek. A trombocitákban ez a specifikus izomeráz, a tromboxán szintetáz felelős a TXA₂ képződésért.

Gerincesekben a prosztaglandin-H-szintáz enzimnek ismert egy második izoformája is, a prosztaglandin-H-szintáz-2 vagy COX-2. A COX izoenzimek aminosav szekvenciája kb. 60%-ban egyezik meg. Mindkettő membránhoz kötött homodimer, alegységeinek tömege kb. 70 kDa. A COX-1 a konstitutív PGH₂ képzésért felelős, míg a COX-2 expressziót elsősorban különféle patológiás folyamatok indukálják, melyek közt jelentős szerepet játszanak a gyulladási folyamatok.

Az aszpirin vagy acetilszalicilsav a gyógyászatban az egyik elsőként használt szintetikus vegyület, 1899 júniusában került a gyógyszerpiacra, hosszú ideig lázcsillapító, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatásai miatt került alkalmazásra. Az aszpirin jótékony hatása ateroszklerotikus betegségek akut komplikációinak megelőzésében a 20. század közepétől ismert. Azóta a kis dózisu, napi 75-100-mg-os aszpirin terápia az akut miokardiális infarktus vagy stroke prevenciójának alapeleme lett.

Különbözö nagy esetszámú tanulmányokat elemzö metaanalízisek alapján a preventív aszpirin terápia fokozott rizikójú betegsoporton a vaszkuláris halál és a nem fatális vaszkuláris események kialakulásának előfordulását 15% ill. 30%-al csökkenti. Ezen belül az aszpirin hatására a nem fatális miokardiális infarktus kialakulásának gyakorisága 34%-kal, a nem fatális stroke 25%-kal és a vaszkuláris vagy ismeretlen eredetü halál gyakorisága egyhatodával csökken. Azon betegek esetében, akiknél a vérzéses rizikó más okok miatt nem fokozott, a vérzéses szövdömények kialakulásának marginális emelkedésének negatív hatását a kedvezö protektív hatás szignifikánsan felülmúlja.

Az akut vaszkuláris események kialakulásának primér prevencióját elemzö metaanalízis szerint a kis dózisu aszpirin alkalmazása manifeszt

vaszkuláris megbetegedés hiányában csökkenti a vaszkuláris események előfordulását, de az abszolút rizikó csökkenés lényegesen kisebb, mint szekunder prevencióban.

A kis dóziszú aspirin terápia fent részletezett kedvező hatásának mechanizmusa intenzív kutatás tárgyát képezte. Ma már egyértelmű, hogy ez a hatás az aspirin trombocita gátló szerepének tulajdonítható, mely a trombocita COX-1 gátlásával, az enzim 529-es szerin (Ser529) reziduumának acetilációja által valósul meg. Emellett az aspirin nagyobb dózisban a gyulladáscsökkentő citokinek és a szabad oxigén gyökök felszabadulásának mértékét is csökkenti.

Az aspirin a sejtmembránon keresztül a trombocitába diffundál, ezt követően a denz tubuláris rendszer membránjában lévő COX-1 szűk, alapvetően hidrofób csatornájába jut, mely az enzim katalitikus üregéhez vezet. Feltehetőleg először az Arg120-hoz kapcsolódik, mely közös dokkoló site a nem-szteroid gyulladáscsökkentő szerek számára, majd a COX-1 aktív site üreg falában elhelyezkedő Ser529-et kovalensen módosítja. Az átészterezési reakció során az *in silico* vizsgálatok szerint a Ser529-H γ - ASA karboxil-csoport oxigénje közötti kötés kialakulása párhuzamosan történik a Ser529-O γ -ASA C (acetilszalicilsav karbonil) kötés kialakulásával. Az acetiláció megakadályozza, hogy az AA elérje az aktív centrumot, azaz meghiúsítja a TXA₂ képzést. A gátlás irreverzibilis és kiterjed a trombocita teljes élettartamára.

Az indukálható ciklooxygenáz-2 enzim (COX-2) Ser516 oldalláncának hasonló mértékű acetilációjához a COX-1 acetilációhoz viszonyítva 10-100x-os acetilszalicilsav koncentráció szükséges. Ennek valószínű oka az, hogy a COX-2 nagyobb katalitikus üregében a Ser516 és az ASA relatív orientációja kevésbé segíti elő az acetilácót.

Az acetilszalicilsav gyorsan szívódik fel a gyomor és a vékonybél felső szakaszának nyálkahártyáján keresztül. A bevonatmentes aspirin a

plazmában 20 perccel a bevételt követően detektálható, csúcskoncentrációját 30-40 perc múlva éri el. Az enteroszolvens bevonatos készítmények esetében ez csak 3-4 órával a bevételt követően várható. A hagyományos aspirin szisztémás biológiai hozzáférhetősége körülbelül 40-50%-os, melytől független a COX-1 gátlás hatásfoka, ugyanis a szalicilsav már a portális keringésben találkozik a vérlemezkékkel ahol a trombociták a szisztémás keringésre jellemző koncentrációnál lényegesen magasabb gyógyszer szintnek vannak kitéve. Az aspirin féléletideje a plazmában 15-20 perc. A trombocita TXA₂ képzés és a trombocita aggregáció gátlás szempontjából, krónikus aspirin terápia esetén, az enteroszolvens bevonatos és a hagyományos készítmények egyformán hatékonyak.

Napi 30 mg aspirin adagolása egy hét után a trombocita TXA₂ képzés sűrűségében mért teljes szuppresszióját okozza, mely kumulatív módon alakul ki. A kis dózisú aspirin kezelés során alkalmazott napi 75-100 mg-os dózis meghaladja a teljes farmakodinámiás hatáshoz szükséges minimálisan hatékony dózist, a gyógyszerre adott válaszreakciót tekintve bizonyos fokú interindividuális variabilitást is engedélyezve. A keringésből való gyors kiválasztódása ellenére, az aspirin gátló hatása a vérlemezke egész élettartamára kiterjed a COX-1 irreverzibilis inaktivációjának következtében. A trombociták nem tudnak COX-1-et szintetizálni, tehát az aspirin hatását csak a vérlemezkék újraképzésével lehet megfordítani.

A megfigyelés, hogy az aspirin csak a betegpopuláció egy részében előzi meg az akut vaszkuláris események kialakulását, a gyógyszerre adott válaszreakciót tekintve jelentős egyéni variációk lehetőségére enged következtetni. Bevezetésre került az "aspirin rezisztencia" fogalma, melyre nem született pontos, egyértelmű definíció, megnehezítve az eredmények értelmezését és a terápiás javaslatok kialakítását. A korábbiakban számos tanulmányban vizsgálták az aspirin

rezisztencia előfordulásának gyakoriságát és a kapott eredmények széles tartományban, 5-66%-ig szórta.

Az „aszpirin rezisztencia” fogalmát elvileg négyféleképpen is meghatározhatjuk:

- 1.) Kémiai (valós) aszpirin rezisztencia: a trombocitákban lévő COX-1 enzim 529-es szerinje nem acetilálható aszpirinnel.
- 2.) Laboratóriumi „aszpirin rezisztencia”: az aszpirinre adott csökkent válasz egy adott laboratóriumi teszttel mérve.
- 3.) Bizonyos esetekben a fokozott trombocita turnover miatt a fiatal és még nem acetilált trombociták képződésének és keringésbe való felszabadulásának folyamata felgyorsul.
- 4.) Klinikai "aszpirin rezisztencia" (klinikai hatástalanság): az aszpirin nem védte meg a beteget egy bekövetkezett akut vaszkuláris eseménytől.

A fokozott trombocita turnover, bár klinikailag lehet jelentős, nem értelmezhető "aszpirin rezisztencia" jelenségként, ugyanis a dozírozás gyakoriságának változtatásával az acetilszalicilsavra adott válasz mértéke megnövelhető. A klinikai hatástalanság egyedileg csak retrospektíve állapítható meg, a hatástalanság populációs szinten történő értékeléséhez pedig statisztikai feldolgozás szükséges. Az akut aterotrombotikus események megelőzésének sikertelensége nem feltétlenül a COX-1 acetiláció hiányának tulajdonítható, ugyanis az aszpirin az AA-nál erősebb trombocita agonisták, mint pl. a nagy dózisu kollagén vagy trombin által kiváltott trombocita aktiváció gátlására nem képes. Természetesen iszkémiás vaszkuláris esemény nem aterotrombotikus mechanizmussal is kialakulhat, pl. embóliás mechanizmus, hialinos vagy mikroaterómás okklúzió, aorta disszekció vagy például vaszkulitis, ahol az aszpirin klinikai hatásossága kevésbé várható.

Az aszpirin hatás mérésére alkalmazott rutin laboratóriumi módszerek magas inter- és intraindividuális variabilitást mutatnak, és a különböző tesztek által kapott eredmények jelentősen eltérnek. Ezen laboratóriumi tesztek értékelésére referencia módszerekkel való összehasonlítás szükséges. A referencia módszerek általában olyan laboratóriumi eljárások, melyek nagy diagnosztikai biztonsággal rendelkeznek, de kivitelezésük időigényes, túl komplikáltak a mindennapi diagnosztikában való elterjedéshez. A referencia módszerek ugyanakkor alkalmasak egy kérdés biztos eldöntésére és a rutin laboratóriumi módszerek evaluálására. Az acetilált trombocita COX-1-et direkt módon kimutató referencia módszerrel eddig nem rendelkezünk, pedig ez feltétlenül szükséges a valódi (kémiai) aszpirin rezisztencia gyakoriságának a megállapításához, ill. a rutin módszerek megbízhatóságának értékeléséhez.

CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt olyan módszerek kifejlesztése, melyek magas biztonsággal mutatják a trombocita COX-1 acetiláltsági státusát és ezeket referencia módszerként felhasználva, a valódi aszpirin rezisztencia gyakoriságának a megállapítása, illetve az aszpirin hatás kimutatására laboratóriumi diagnosztikában használt módszerek megbízhatóságának a tesztelése:

1. Az acetilált COX-1-re (acCOX-1) és nem acetilált COX-1-re (nacCOX-1) specifikus monoklonális antitestek előállítása és felhasználásukkal olyan módszer kifejlesztése, mely közvetlenül detektálja a trombocita COX-1 acetiláltságát vagy annak hiányát.

2. Egy módszer kifejlesztése, mely trombocita dús plazmában (platelet rich plasma; PRP) a trombociták által AA hatására képződött

tromboxán B_2 -nek (TXB_2) - a TXA_2 stabil, inaktív végtermékének - a mennyiségét méri. Ez a módszer a trombociták TXB_2 -képző kapacitását határozza meg és közvetetten jelzi az aszpirin által kifejtett COX-1 gátlás jelenlétét vagy annak hiányát.

3. A fenti referencia módszerekkel az "aszpirin rezisztencia" gyakoriságának meghatározása egészséges, kis dózisu aszpirint szedő önkénteseken.

4. A referencia módszerekkel való összehasonlítás alapján annak megállapítása, hogy mely(ek) az(ok) a rutin laboratóriumi módszer(ek) mely(ek) a legbiztonságosabban alkalmazható(ak) az aszpirin hatás ellenőrzésére.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Vizsgált populáció, beválasztási és kizárási kritériumok

A vizsgálatba egészséges, egymással rokon kapcsolatban nem álló, 18 éves életkort betöltött egészséges önkénteseket választottunk be. Egészségi állapotukat fizikális vizsgálattal és kérdőíves felméréssel ellenőriztük.

Az alábbi előzetes (a priori) kizárási kritériumokat alkalmaztuk: az aszpirin kezelés ellenjavallatai (pl. ismert aszpirin intolerancia, fokozott vérzéses rizikó, terhesség, szoptatás), krónikus betegségek, ismert vérlemezke defektusok és a megelőző két hétben bármilyen gyógyszeres terápia alkalmazása (az orális antikoncipiensek kivételével). Kizárást eredményezett továbbá az alkalmazott kis dózisu aszpirin kezelés során az

aszpirin kezelés mellékhatásainak jelentkezése, bármilyen más gyógyszer bevétele vagy a további vérvételi alkalmaktól való elzárkózás.

A 121 toborzott önkéntesből 6 jelentkezőt a tanulmány elkezdését megelőző két hétben ill. annak időtartama alatt történő nem-szteroid gyulladáscsökkentő bevétele miatt kizártunk. Három esetben enyhe vérlemezke funkciós rendellenességet diagnosztizáltunk. További három résztvevő nem jelent meg a második vérvételi időpontban. Egy esetben non-compliance lehetősége merült fel és igazolódott egy második kontrollált gyógyszer adagolási periódus során. A fennmaradó 108 egészséges önkéntesből álló csoporton értékeltük az eredményeket.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinki Deklaráció Etikai elveinek, minden önkéntes résztvevő írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

2. Az aszpirin kezelés és a mintagyűjtés protokollja

A tanulmányban résztvevő egészséges önkéntesek egy hétig napi egy alkalommal 100 mg enteroszolvens bevonatos aszpirint szedtek (Aspirin Protect, Bayer). Az aszpirin tabletták bevétele 8 és 9 óra között történt. A compliance-t tablettá számlálással ellenőriztük. Az egyetlen non-compliance lehetőségét felvető esetben az egy hetes aszpirin terápiát megismételtük és a tabletták ismételt bevitelét közvetlenül ellenőriztük. A vérvétel éhgyomorra történt a könyökhajlati vénából 0.109 M-os trinátrium-citrát tartalmú csöbe (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) az első aszpirin tablettá bevitelét megelőzően, majd azt követően 24 ill. 168 órával (0. napos, 1. napos és 7. napos minták). Trombocita dús plazmát (platelet rich plasma-t;

PRP-t) 120 g-n, 37°C-on, 15 perc centrifugálással nyertünk. Trombocita depletált plazmát (platelet depleted plasma; PDP) két egymást követő centrifugálás segítségével állítottunk elő (1500 g, 25°C, 20 perc). A teljes vér és a PRP trombocita számának meghatározása Sysmex KX-21N (Kobe, Japán) hematológiai automatával történt.

3. Monoklonális antitestek generálása a COX-1 nem acetilált és acetilált formái ellen

A humán COX-1 525-533 reziduumok aminosav szekvenciájának megfelelő nem acetilált (H-Gly-Ala-Pro-Phe-Ser-Leu-Lys-Gly-Leu-OH) és acetilált (H-Gly-Ala-Pro-Phe-Ser(Ac)-Leu-Lys-Gly-Leu-OH) nonapeptideket szintetizáltattunk (Bachem, Bubendorf, Svájc). A peptidek N-terminálisan egy, a konjugációhoz használt, Cys reziduumal is rendelkeztek, melyek felhasználásával 3-maleimido-propionyl csoporton keresztül a peptideket kovalensen óriás lyukas csigából kinyert hemocianinhoz (keyhole limpet hemocyanine; KLH) vagy bovin szérum albuminhoz (BSA) kötöttük. Teljes Freund adjuvánsban emulgeált 50 µg KLH-konjugátumot Balb/c egerekbe injektáltunk szubkután, majd 2 hét múlva 50 µg alumínium hidroxid géltre adszorbeált KLH-konjugátumot adtunk be intraperitoneálisan, amit további két alkalommal két hetes időközönként megismételtünk. Ezt követően alumínium hidroxid géltre adszorbeált BSA-konjugátumot adtunk kéthetes időintervallumokban két alkalommal.

A peptid specifikus válaszok kimutatására indirekt ELISA módszert használtunk, melynek alábbi lépései során a mikrolemez egyes lyukaiba az alábbi oldatokat mértük:

1/ a microplate lemezek felszínének fedése a két nem-konjugált peptid valamelyikével (50 μL 2 $\mu\text{g/ml}$ peptid 0.1 M pH 9.6 -os nátrium karbonát pufferben, inkubálás +4 $^{\circ}\text{C}$ -on 20 órán át).

2/ a szabad felszín blokkolása 100 μL hígító pufferrel (0.5 % humán szérum albumint, 0.5 M NaCl-t és 0.05% Tween 20-at tartalmazó 0.01 M pH 7.2-es foszfát puffer, phosphate-buffered saline: PBS) történő 1 órás inkubálással.

3/ 50 μL antitest tartalmú minta (hígított egér szérum vagy hígítatlan hibridóma felülúszó) bemérése, majd inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten.

4/ 50 μL HRPO-jelzett kecske anti-egér IgG antitest (Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, USA) bemérése és inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten.

5/ 50 μL 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrát (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) bemérése és inkubálás 0,5 órán át szobahőmérsékleten.

6/ 50 μL 2 M H_2SO_4 .

7/ spektrofotometriás mérés 450 nm-en.

Az immunizált egerekből eltávolított lépsejteket Sp-2/o myeloma sejtekkel fuzionáltattuk. Először azokat az antitesteket termelő hibridómákat szelektáltuk, melyek a nem acetilált peptiddel adtak reakciót, az acetilált peptiddel pedig nem reagáltak. Ezek az antitestek az aszpirinnel nem kezelt egyénektől nyert trombocita lizátumban található COX-1-el reagáltak. A másik szelekciós eljárás során ezzel szemben csak az acetilált peptiddel reagáló antitesteket termelő hibridómákat szelektáltuk; ezek az antitestek csak az aszpirinnel kezelt egyének trombocita lizátumában lévő COX-1-el reagáltak. A szelektált hibridómákat határhígítási módszerrel klónoztuk. Az antitesteket ascites folyadéktól Protein G affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. Így két típusú antitestet állítottunk elő; egyik a nem acetilált

COX-1-re specifikus (anti-nacCOX-1), a másik pedig csak az acetilált COX-1-el ad reakciót (anti-acCOX-1).

Minden minta reakciót adott a nyúl anti-COX-1 poliklonális antitesttel (Rb pAb ACOX-1, Abcam, Cambridge, UK) kecske anti-nyúl IgG-HRPO (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Baltimore Pike, USA) rendszerben. A poliklonális anti-COX-1 antitest nem tett különbséget az acetilált- és a nem acetilált formák között.

4. Az acetilált és nem acetilált COX-1 kimutatása trombocita lizátumban Western blottinggal

PRP-ből készített mosott trombocita szuszpenziót ($1000 \times 10^9/L$) nem redukáló nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) minta pufferben szonikálással ($4^\circ C$, 3×10 másodperc) lizáltuk. A sejttörmelék eltávolítása céljából 5 perc centrifugálást (14000 g, Eppendorf 5415R centrifuga) követően a felülúszó trombocita lizátum proteín tartalmát BCA proteín assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg. A következő lépésben a mintákat redukáltuk 5% merkaptotanol hozzáadásával, majd 5 percig forrásban lévő vízben inkubáltuk. A továbbiakban SDS-PAGE-t követően az analízis Western blotting technikával történt. A blottokat az anti-nacCOX-1 és az anti-acCOX-1 monoklonális antitestekkel inkubáltuk. Az immunreakciót biotinált anti-egér IgG-vel majd avidin-biotinált peroxidáz komplexszel hívtuk elő (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA, USA) és az immunreakciót felerősített kemilumineszcens detektálással tettük láthatóvá (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK). A Western blottokat GS800 kvantitatív denzitóméterrel (Bio-Rad, Hercules CA) szkenneltük be.

5. Módosított TXB₂ assay a trombociták AA-indukálta TXB₂-képzésének mérésére

A PRP minták trombocita számát PDP-vel való hígítással 30 x 10⁹/L-re állítottuk be. A trombocita TXB₂ képződést 12.5 µL 5 mg/mL-es AA (Helena, Gateshead, UK) 237.5 µL hígított PRP-hez történő hozzáadásával indukáltuk. 37°C-on történő 5 perces inkubációt követően a reakciót 12.5 µL 2 M HCl hozzáadásával állítottuk le. A mintát 15 percig 4°C-on hűtöttük, majd 12000 g-n centrifugáltuk (4°C, 10 perc).

A módszer beállítása során annak ellenére, hogy az AA az alkalmazott TXB₂ assay antitestével csak kis mértékben adott keresztreakciót (0.1 %), a képződött TXB₂ -höz viszonyítva az AA 10000x-es moláris túlsúlya miatt interferenciát tapasztaltunk. A felülúszóban található TXB₂-t az interferáló anyagoktól, mindenekelőtt az AA-tól, Discovery C18 oszlopon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) szekvenciális szilárd fázisú extrakciós módszerrel választottuk el.

125 µL TXB₂ tartalmú felülúszót C18 oszlopra vittünk, majd szekvenciálisan 2 x 1 mL HPLC-tisztaságú vízzel, 15%-os etanollal, aceton:hexán 1.5:8.5 arányú elegyével és hexánnal mostuk. A TXB₂-t 2 mL etil-acetátban eluáltuk. Az eluátumot 200 µL-enként nitrogén alatt szárítottuk majd 500 µL, a reagens kithoz biztosított assay pufferben oldottuk. Amennyiben a minták TXB₂ koncentrációját egy későbbi időpontban határoztuk meg, az eluátumokat -70°C-on tároltuk.

A TXB₂ koncentrációt kompetitív immunoassay-vel (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) határoztuk meg 96 lyukú kecskében termelt anti-nyúl IgG-vel fedett mikrotiter lemezben. A mintákban található TXB₂-koncentrációk meghatározására a mért optikai denzitást használtuk. A kötődést jelző sárga szín intenzitása fordítottan arányos a mintákban ill. standardokban található TXB₂-koncentrációkkal. A trombociták által képzett

TXB₂-t pg TXB₂/10⁶ trombocita egységben fejeztük ki. Az aszpirinnel nem kezelt egyénektől nyert trombociták AA-indukálta TXB₂ képzési tartományában, 13363 pg/mL-es TXB₂ koncentrációnál, a módszer variációs koefficiense (CV) 6.9%-nak adódott. Az aszpirinnel egy hétig kezelt egyénektől nyert trombociták AA-indukálta TXB₂ képzési tartományában, nagyon alacsony, 888 pg/mL-es TXB₂ koncentrációnál, a CV 11.7% volt. A mintákhoz hozzáadott és a teljes procedúrán végig vitt TXB₂ visszanyerése jól reprodukálhatóan 75% körül volt, magas endogén TXB₂ koncentrációjú minták esetén a hozzáadott TXB₂ visszanyerése 74.1%, alacsony endogén TXB₂ koncentrációjú minták esetén 78.2% volt.

6. A trombocita funkció vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel

A PFA-100 záródási időt kollagén/epinefrines (CEPI) patronnal mértük. A módszer olyan egyszer használatos patront használ, melynek nyílásába mért citráttal alvadásgátolt vérminta vákuum segítségével egyenletesen áramlik egy kapillárison és rezervoáron át trombocita agonistákkal (kollagén és epinefrin vagy kollagén és ADP) átítatott szűk nyílással (aperturával) rendelkező membránon lévő aperturán keresztül. Az áramló aktivált trombociták kitapadnak a membránon található apertura falához majd aggregálódva eltömítik a nyílást. A nyílás eltömődését egy vákuum szenzor érzékeli és ezt az ún. záródási időt méri másodpercben.

A VerifyNow (VN) Aspirin Assay elvégzése a gyártó előírása szerint történt. Ez a betegágy mellett is használható (point of care) trombocita funkciós teszt is citráttal alvadásgátolt vérmintát használ.

A teszt alkalmazása során a vérben lévő trombociták AA agonista hatására aktiválódnak. A képződött TXA₂ biokémiai jelátvivő útvonalat indít el mely végső soron a trombocita membránban lévő GPIIb/IIIa komplexszet

fibrinogén kötő receptorra alakítja. Az aktivált trombociták az egyszer használatos patronok keverőkamrájában található fibrinogénnel fedett gyöngyökhöz kötődnek és agglutinálják azokat. Az agglutináció fokozott fény áteresztést (transzmissziót) eredményez. Amennyiben az aspirin gátolja a TXA₂ képződést nem alakul ki trombocita aktiváció és a fény transzmisszió sem növekszik. Az eredményeket Aspirin Reaction Unit-ban (ARU) fejezzük ki. A gyártói előírás szerint az 550 ARU cut-off érték alatti eredmények megfelelő aspirin hatást mutatnak.

A trombocita aggregációt és szekréciónálást Chrono-log 700 lumiaggregométeren (Chrono-Log, Havertown, PA, USA) vizsgáltuk PDP-vel $260 \times 10^9/L$ trombocita számra beállított PRP-ben. A meghatározáshoz esetenként 450 μL PRP-t, trombocita mentes referencia mintaként 450 μL PDP-t, 50 μL luciferin-luciferáz (LL) reagenst (Biothema AB, Handen, Svédország) ill. 50 μL agonista oldatot használtunk. Utóbbi esetben kivételt jelentett a kollagén, amit 5 μL -ben adtunk a rendszerhez. Az agonisták végkoncentrációja a következő volt: 500 $\mu g/mL$ (1.53 mmol/L) AA (Helena, Gateshead, UK), 10 $\mu mol/L$ ADP, (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 10 $\mu g/mL$ (54.6 $\mu mol/L$) adrenalin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország), 1 $\mu g/mL$ fibrilláris Horm kollagén (Nycomed, Zurich, Svájc). Az aggregációs és szekréciónálási görbéket ADP agonistával végzett aktiváció során 6 percig, AA jelenlétében 8 percig, adrenalin és kollagén jelenlétében 10 percig rögzítettük. Az eredményeket a maximális transzmisszió változás százalékában fejeztük ki. Az aktivált trombociták ATP szekréciónálását - az aggregációval párhuzamosan - biolumineszcens módszerrel, luciferin-luciferáz reagens (Biothema AB, Handen, Svédország) segítségével detektáltuk. A maximális ATP szekréciónálást μmol ATP/ 10^{11} trombocita egységben fejeztük ki.

7. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat SPSS (v.16) szoftver (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) segítségével végeztük. A változókat Kolmogorov-Smirnov teszttel megvizsgált eloszlásuknak megfelelően átlag és standard deviáció (SD) vagy medián, interkvartilis tartomány (IQR) és teljes tartomány értékekkel fejeztük ki. A 0., 1. és 7. mintavételi napokon kapott eredmények közti különbségek elemzésére Wilcoxon-féle előjeles rangszámösszeg próbát (Wilcoxon signed rank test) alkalmaztunk. A korrelációelemzést Spearman teszttel (Spearman's rank correlation test) végeztük. Az egyének alcsoportjai közti különbségek elemzése Student féle t-próbával történt.

EREDMÉNYEK

1. A vizsgált populáció jellemzői

A kizárási kritériumok alkalmazását követően 108 egészséges önkéntes (60 nő és 48 férfi) felelt meg a követelményeknek. Átlagéletkoruk 33.5 év (SD 9.3, tartomány: 19-59) volt. 69.4%-uk soha nem dohányzott, 9.3%-uk korábban dohányzott és 21.3%-uk aktív dohányos volt. A kiindulási átlagos trombocita szám $271.3 \times 10^9/L$ (SD 62.5, tartomány: 138-429) volt, az egyes egyéneknél a különböző mintavételi időpontokban a trombocita számban csak lényegtelen eltérések voltak.

2. Az aszpirin terápia hatása az AA-indukált trombocita TXB₂-képzésre

Az első aszpirin tableta bevitelét megelőzően (0. nap) AA hatására a trombociták jelentős mennyiségű TXB₂-öt szintetizáltak, jöllehet, a TXB₂ képző kapacitás széles tartományban szórt. Annak ellenére, hogy a 0. és az 1. mintavételi napokon mért TXB₂ értékek között az eltérés statisztikailag magasan szignifikáns volt ($p < 0.0001$), a jelentkezők 10%-ánál egyetlen enteroszolvens bevonatos aszpirin tableta bevétele után 24 órával a TXB₂ képzés nem csökkent a 0. napon mért tartomány alsó határa alá. Továbbá, az 1. napon mért TXB₂ értékek 65%-a a 7. napon kapott értékek maximuma felett helyezkedett el, tehát ezekben az esetekben egyetlen aszpirin tableta bevétele nem volt elegendő a maximális trombocita gátló hatás eléréséhez. Az egy hetes aszpirin kezelés kivétel nélkül hatékonyan lecsökkentette a TXB₂ képzést egy szűk tartományba, tehát elmondhatjuk, hogy a hét napos aszpirin terápia minden résztvevő esetében hatékony volt és részleges "aszpirin rezisztenciát" sem lehetett detektálni. A 7. napon kapott TXB₂ értékek mediánja a 0. napos értékek mediánjának csak 1.4%-a volt. A 7. napon kapott értékek nem mutattak korrelációt a 0. napon mért TXB₂ képzés mértékével ($r = -0.061$, $p = 0.528$), tehát a kezelést megelőző trombocita reaktivitás mértékétől függetlenül az aszpirin egyöntetűen egy nagyon alacsony szintre csökkentette a trombociták TXB₂ képző kapacitását.

3. A trombocita COX-1 acetiláció egy hetes aszpirin terápia során

Az aszpirin hatását a COX-1 acetilációs státus direkt kimutatásával is igazoltuk. A COX-1 acetiláció mértékének meghatározása az acCOX-1 vagy nacCOX-1-re specifikus monoklonális antitestekkel történt. A 0. mintavételi napon az acCOX-1 ellenes antitesttel nem volt kimutatható reakció, ezzel ellentétben nagyon intenzív reakciót kaptunk a nacCOX-1 ellenes antitesttel.

Az 1. mintavételi napon a COX-1 sávval mindkét antitest adott reakciót, utalva a COX-1 acetiláció részlegességére. A 0. napos eredményekkel szöges ellentétben, a 7. napon az acCOX-1 ellenes antitest nagyon intenzív reakciót adott, míg a nacCOX-1 ellenes antitesttel nem volt kimutatható reakció. Egyetlen „non-compliance” eset kivételével (lásd később), az összes résztvevő esetében megegyező eredményeket kaptunk.

Az általunk használt Western blot technika érzékenységét aszpirinnel nem kezelt egészséges önkéntesektől nyert trombocita lizátum hígítási sorával ellenőriztük. A nacCOX-1 fehérje 40x-es hígítás esetén is kimutatható volt, tehát az assay alkalmas a nacCOX-1 mennyiség 2.5%-ának a detektálására. Tekintettel arra, hogy a 7. mintavételi napon a nacCOX-1 ellenes antitestekkel nem volt reakció, ennek az alkalmazására nem volt szükség.

Következésképpen, az AA-indukálta TXB₂-képző kapacitást elemző eredményeinkkel összhangban, ezzel a módszerrel sem tudtunk kimutatni egyetlen esetben sem valódi aszpirin rezisztenciát. Az 1. mintavételi napon az anti-nacCOX-1 és anti-acCOX-1-el adott reakciók mértéke mintánként változott, az aszpirin hatása azonban minden mintában kimutatható volt.

A 108 önkéntessel ellentétben egyetlen önkéntesnél a 7. mintavételi napon az anti-nacCOX-1-gyel intenzív reakciót kaptunk, és nem kaptunk reakciót anti-acCOX-1-gyel. Ennek megfelelően a 7. napon mért AA indukálta TXB₂-képződés a kiindulási (0. napos) tartományban maradt. Felmerült a non-compliance lehetősége, ezért az önkéntes egy második gyógyszer adagolási periódusban is részt vett, mely időszakban a tableta bevitelét ellenőriztük. Az ismételt eredmények a 7. napon teljes COX-1 acetilációt mutattak és a vérelemek TXB₂-képző kapacitása a többi önkéntes eredményének megfelelő tartományba csökkent.

4. Az aszpirin hatás vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel

A referencia módszerek kiválóan elkülönítették a kiindulási és a hét napos aszpirin szedést követően kapott eredményeket, részleges "aszpirin rezisztencia" sem volt kimutatható, ezért a 0. és 7. mintavételi napokon kapott eredmények alkalmasak voltak a párhuzamosan elvégzett rutin laboratóriumi tesztekkel kapott értékekkel való összehasonlításra. Ha a 7. napos értékek nem tértek el a 0. napos értékek tartományától az az adott módszer által mért fals pozitív aszpirin rezisztenciát jelent.

4.1. A PFA-100 CEPI záródási idő- és a VN Aspirin Assay eredményeinek értékelése

Bár a 0. és 7. napon mért PFA-100 CEPI záródási idők közt statisztikailag szignifikáns eltérés volt ($p < 0.0001$), a két tartomány jelentős átfedést mutatott és a záródási idők 38.9%-a az egy hetes aszpirin szedést követően is a 0. napnak megfelelő kiindulási tartományban maradt. Amennyiben a végső értéket nem a kezelést megelőző saját egyéni értékekhez hasonlítjuk, hanem az aszpirinnel nem kezelt populáció számára megállapított referencia intervallumhoz, az esetek jelentős részében, tévesen, aszpirin rezisztenciát diagnosztizálunk.

A PFA-100 CEPI záródási idő meghatározással ellentétben, egyetlen kieső érték „outlier” kivételével (590 ARU), nem volt átfedés a VN Aspirin Assay-vel a 0. és 7. napon mért értékek között. A kieső értéket is figyelembe véve az átfedés százalékos aránya mindössze 0.9% volt.

A PFA-100 záródási idő meghatározása esetében a kiindulási értékek szignifikánsan korreláltak a 7. napos értékekkel, tehát az aszpirin kezelés előtt is fokozott reaktivitású trombocitákkal rendelkező egyének aszpirin kezelést követően is relatíve magas trombocita reaktivitást mutattak.

A VN Aspirin Assay esetében hasonló összefüggés nem volt, azaz az aszpirin kezelés előtt mért trombocita reaktivitás, az AA indukálta TXB₂ képződéshez hasonlóan, nem befolyásolta az aszpirin hatékonyságát.

4.2. A trombocita aggregációs- és szekréción vizsgálatok eredményeinek értékelése

A 0. mintavételi napon adrenalin agonista hatására bekövetkezett trombocita aggregáció mértéke, az esetek 30%-ában igen alacsony volt, és a 7. mintavételi napon mért értéktartományba esett. Hasonlóképpen, a vizsgált populáció 26%-ánál a 0. napon mért adrenalin-indukált ATP szekréción mértéke mérési határ alatt volt. Az adrenalinra gyenge választ adók jelentős száma miatt ez az agonista nem alkalmas az aszpirin hatás megítélésére.

Az ADP jelenlétében végzett trombocita aggregációs vizsgálatok esetében, a statisztikailag szignifikáns változás ellenére, a 0. és 7. napos eredmények között jelentős volt az átfedés. Az egyetlen, ADP agonistára gyengébb választ adó, 39%-os transzmisszió növekedést mutató, outlier érték kizárása után is, a 7. napon kapott eredmények 94.4%-a átfedést mutatott a kiindulási értéktartománnyal. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az ugyanannál az egyénnél meghatározott kiindulási (kezelést megelőző) érték hiányában, az ADP aggregáció sok esetben álpozitív "aszpirin rezisztenciát" mutat. A 0. napos ADP indukálta ATP szekréción értékek széles tartományban szórtak, ez a paraméter sem használható az aszpirin hatás ellenőrzésére.

A kollagén indukálta trombocita aggregáció és ATP szekréción esetében, a 7. napon kapott eredmények 5% ill. 25%-a esett a 0. napos tartomány minimum értéke felé.

Az AA-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréción esetében a 0. és 7. napos értéktartományok közt nem volt átfedés, azaz ez a teszt kiválóan alkalmas az aszpirin hatás detektálására.

Az egy hetes aszpirin kezelést követően mért adrenalin-, ADP- és kollagén-indukált trombocita aggregációs válasz mértéke szignifikánsan korrelált a kiindulási értékekkel. AA agonista esetében ilyen összefüggés nem volt, hasonlóan az AA-indukált TXB₂-képző kapacitás meghatározása során kapott eredményeinkhez.

MEGBESZÉLÉS

A trombocita COX-1 aszpirin által történő acetilációját nagy biztonsággal kimutató két referencia módszert fejlesztettünk ki. A COX-1 acetilációjának mérésére egy indirekt módszert már korábban leírtak. Ez esetben a trombocita lizátum 180.000 g felülúszójában a COX-1 aszpirin hatására bekövetkezett inaktivációjának mértékét a [³H-acetil]-aszpirin, egy 85 kDa-os fehérjéhez (feltehetően COX-1-hez) való kötődésének csökkenésével mérték. A módszer amellet hogy meglehetősen nehézkes, nem lett validálva és nem is terjedt el a laboratóriumi gyakorlatban. Az általunk kifejlesztett acCOX-1-re illetve nacCOX-1-re specifikus monoklonális antitesteket alkalmazó módszerek a COX-1 acetiláltsági státusát mutatják ki trombocita lizátumban. Az aszpirin által acetilált Ser529 reziduum a COX-1 belsejében fedett állapotban van, így az antitestek szekvenciális epitópjukkal csak a molekula szekundér és terciér struktúráját denaturáló anionos detergens kezelés (SDS) alkalmazását követően reagáltak. Ezért az antitestek és a COX-1 Ser529-et magában foglaló epitópok interakciójának kimutatására Western blottingot (SDS-PAGE és immunoblot) alkalmaztunk. Az antitestek specificitását a megfelelő acetilált, illetve nem acetilált peptidekkel való reagálás mellett az aszpirinnel nem kezelt önkéntesektől nyert trombocitákban az anti-acCOX-1-el adott reakció hiánya és az aszpirinnel egy hétig kezelt önkéntesektől nyert trombocitákban

az anti-nacCOX-1-el adott reakció hiánya is igazolta. Tudomásunk szerint ez az első COX-1 Ser529 acetilációt közvetlenül kimutató módszer, mely alkalmas a kémiai (valódi) aszpirin rezisztencia vagy annak a hiányának a megállapítására.

A TXB₂-képzés jellemzésére kifejlesztett módosított TXB₂ assay megtervezésénél célunk volt a trombociták által képzett TXA₂ mennyiségének meghatározása függetlenül a más sejtek által in-vivo vagy in-vitro körülmények között képzett TXA₂-tól, kikerülve a receptor-mediált trombocita aktivációt, melyet az AA-TXA₂ átalakulástól eltérő tényezők befolyásolnak. Módszerünk egy meghatározott trombocita számra beállított hígított PRP-ben vizsgálja a TXB₂ képződést, ami lehetővé teszi az egy trombocita által képzett TXB₂ meghatározását, azaz függetleníti a TXB₂ képződést, ill. annak gátlását az egyénileg eltérő trombocita számtól is. A TXB₂ képződés jellemzésére, ill. az aszpirin hatás detektálására korábban leírták a véralvadás során képződött TXB₂ mérését szérumban, és a 11-dehidro-TXB₂ meghatározást vizeletben. Bár mindkét említett módszer értékes információval szolgál az aszpirin hatásával kapcsolatban, az előbbi a véralvadási folyamat alatt történő trombin generációtól függ, az utóbbit pedig a trombocitáktól független forrásból képződő TXA₂ és a vesefunkció is befolyásolhatja. Emellett a vérben lévő egyéb esetleg COX-2-öt tartalmazó sejtek (fehérvérsejtek) által képzett TXB₂ is befolyásolhatja az eredményeket. Az általunk kifejlesztett módszer a trombociták TXA₂-képző kapacitását határozza meg, az aszpirin hatására kapott eredmények indirekt módon mérik a COX-1 acetilációját.

Újjonnan kifejlesztett módszereink alkalmazása bonyolult és időigényes, jelenlegi formájukban nem az aszpirin hatás rutin ellenőrzését célozzák. Az aszpirin által előidézett COX-1 acetiláció mértékének és a kémiai ("valós") "aszpirin rezisztencia" gyakoriságának meghatározására egészséges vagy beteg populációban azonban jól alkalmazhatók.

Felhasználhatók továbbá az "aszpirin rezisztencia" kimutatására használatos rutin módszerek értékelésére.

Az általunk kifejlesztett referencia módszerekkel egybehangzóan igazoltuk, hogy 108 önkéntes által alkotott egészséges populációban nem volt "aszpirin rezisztens" egyén. Megállapításunk ellentmond számos korábbi, inadekvát laboratóriumi módszerek alkalmazásával elvégzett tanulmány eredményeinek, melyek alapján az aszpirin rezisztencia gyakorisága 5-66%-ig terjed. Az általunk vizsgált egészséges önkéntesek esetében az AA-indukálta trombocita TXB₂-képzés mértéke egységesen egy nagyon alacsony értéktartományba csökkent. Ennek megfelelően minden egyénnél egy hetes kis-dózisú aszpirin kezelést követően a trombocita COX-1 teljes acetilációját észleltük. Ez azt is jelenti, hogy a COX-1-et kódoló gén gyakori genetikai polimorfizmusai nem játszanak szerepet az aszpirinre adott válasz kialakulásában. Hasonlóképpen a kezelést megelőző, kiindulási TXB₂-képzési kapacitás („platelet reactivity”) sem befolyásolja a COX-1 aszpirin hatására bekövetkező acetilációjának és a TXA₂-generációjának gátlását. A tanulmányt más gyógyszer hatásától mentes egészséges önkéntes csoporton végeztük és az eredmények arra engednek következtetni, hogy egészségesek esetében az aszpirin általi COX-1 acetiláció hiányával jellemzett "aszpirin rezisztencia" nem létezik, vagy ha igen, az ritkaságnak számít. Eredményeinkkel megegyezően, egy, az irodalomban közölt adat szerint az aszpirin hatására 47 egészséges önkéntesnél a szérumban mért TXB₂-szint is egységesen lecsökkent.

Egyetlen enteroszolvens bevonatos aszpirin tablettá hatásának kialakulása időben egyénenként igen változó, melyet valószínűleg az egyéni felszívódási- és metabolikus jellemzők közti különbségek magyaráznak. Az aszpirin kezelés elkezdésekor érdemes figyelembe venni ezt az egyéni variabilitást.

Az aspirin trombocita funkcióra kifejett hatásának detektálására a klinikai gyakorlatban számos laboratóriumi módszert alkalmaznak. Tanulmányunkban a trombocita COX-1 acetilációt (inaktivációt) megbízhatóan kimutató tesztek azonosítása céljából összehasonlítottuk az e célra leggyakrabban alkalmazott rutin laboratóriumi módszerekkel és a két referencia módszerrel kapott eredményeket.

Aszpirinnel kezelt és nem kezelt betegcsoportban a PFA-100 CEPI záródási idők közti jelentős átfedést már korábban is megfigyelték. Tanulmányunkban a PFA-100 záródási időt kollagén/ADP patronnal is meghatároztuk, a kapott kiindulási és az egy hetes aszpirin kezelést követő értékek azonban teljes mértékben átfedtek, s így ezeket az eredményeket nem vettük be a tanulmányunkba. A COX-1-től független útvonalak, melyeket az aszpirin hatás nem befolyásol, fontos szerepet töltenek be a trombocita dugó képződésében a patron membránjának aperturáján, ezért a záródási idő csak az esetek egy részében tükrözi az aszpirin hatását. Érdekes módon az aszpirin kezelést követően mért záródási idők magas szignifikanciával korreláltak a kiindulási záródási időkkel. Ez arra enged következtetni, hogy a fokozott kiindulási trombocita reaktivitás jelentősen befolyásolja az eredményeket, ami elfedheti az aszpirin hatást. A PFA-100 záródási időt a von Willebrand faktor koncentrációja, a hematokrit érték és a trombocita szám is befolyásolja. Az alkalmazott egy hetes aszpirin kezelés nem változtatta meg a trombocita számot és feltételezzük, hogy a másik két változó sem változott jelentősen.

A VN Aspirin Assay sokkal pontosabban jelezte az aszpirin hatás kialakulását, mint a PFA-100 záródási idő. A kiindulási értékek a gyártó által meghatározott 550 ARU határérték felett, továbbá egyetlen kivétellel (586 ARU), 600 ARU felett helyezkedtek el. Az egy hetes aszpirin kezelést követően az AA-ra adott válasz egyetlen kivétellel (590 ARU) 550 ARU alá csökkent. Tehát, az egészséges önkéntesek 99%-ában a VN Aspirin Assay

megbízhatóan mutatta a COX-1 acetiláció státusát. Nem volt összefüggés a kiindulási (0. napos) és 7. napos értékek közt, tehát a kezelést megelőző trombocita reaktivitás mértéke nem befolyásolta a VN Aspirin Assay-vel mért aszpirin hatást.

Amint azt feltételeztük, a hatását COX-1 függő útvonalon keresztül kifejtő AA agonista indukálta trombocita aggregáció és szekréció nagy biztonsággal különítette el a kizárólag acCOX-1- et, ill. nacCOX-1-et tartalmazó mintákat. A 0. és 7. napos AA-indukált trombocita aggregációs és szekréciós eredmények közt nem volt átfedés. A VN Aspirin Assay-hez hasonlóan, a kiindulási trombocita aggregabilitás nem befolyásolta az aszpirin hatás kialakulását.

A résztvevők kb. negyedénél az adrenalinra adott kiindulási trombocita aggregációs és szekréciós válasz alacsony volt, így ez az agonista aligha alkalmazható az aszpirin hatás kimutatására. ADP aggregáció esetében a 7. napos mediánérték kisebb volt a 0. naposnál, az eredmények jelentős átfedése miatt azonban, individuális kezelés előtti saját értékek hiányában, ez az agonista nem alkalmas az aszpirin hatás megbízható detektálása. Még akkor is, ha ismernénk a kezelés előtti értéket az aszpirin hatására bekövetkezett, kisértékű transzmisszió csökkenés bizonytalanná teszi annak megítélését, hogy a COX-1 aktivitás teljes mértékben gátolt-e. Az eredmények között nem szerepel ugyan, de végeztünk kísérleteket különböző ADP koncentráció mellett is. Az ADP koncentráció változtatása 2.5-20 μM közötti tartományban nem javította az aszpirin hatás kimutatásának a hatékonyságát. Kis dózísú kollagén agonista (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alkalmazása az ADP-hez képest jobb elkülönítő erővel bírt. A kiindulási- és 7. napos értéktartományok átfedése azonban, kisebb mértékben mint ADP vagy adrenalin esetében, ez esetben is észlelhető volt.

Az ADP- és kollagén-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció COX-1 független mechanizmusokat is involvál, melyeket nem

befolyásol az aszpirin. Ezekben az esetekben, hasonlóan a PFA-100 CEPI záródási idő meghatározáshoz, a kiindulási értékek szignifikánsan befolyásolták a 7. napos eredményeket, az agonistákra magas reaktivitást mutató nem acetilált trombociták a COX-1 acetilációja után is magas reaktivitást mutattak.

Tekintettel arra, hogy a szérumban TXB₂ meghatározás és a vizeletben 11-dehidro-TXB₂ mennyiségének a mérése nem tekinthető a rutin laboratóriumi diagnosztikában általánosan használt eljárásnak, ezeket a módszereket nem vettük be az összehasonlító vizsgálatokba. Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy a véralvadás során képződött trombin által aktiválódott trombocitákban a TXA₂ generáció, melyet a szérumban megjelenő TXB₂ tükröz, jól jelzi az aszpirin hatását. Ugyanakkor az aszpirinnel nem kezelt egyének esetében a módszerrel kapott eredmények függenek a trombin generáció mértékétől, ami egyénenként változik, s amit pl. az antikoaguláns terápia befolyásolhat. A szérumban lévő TXB₂-höz a vér egyéb alakos elemei is hozzájárulhatnak, pl. a COX-2-öt tartalmazó leukociták, melyek TXB₂ generációját a preventív dózisban alkalmazott aszpirin nem gátolja. A leukociták hozzájárulását a szérumban TXB₂ szintjéhez jelenleg vizsgálják intézetünkben.

Az értekezésben részletezett vizsgálatok egészséges önkénteseken bizonyították az aszpirin rezisztencia hiányát. A preventív aszpirin terápiában részesülő betegeknél elvileg más szempontok is felmerülhetnek. Az aszpirin gyengébb gátló hatása a trombocita TXA₂ képzésre bizonyos patológiás állapotokban, mint a gyulladási betegségek, összefügghet a kis dózisú acetilsalicilsav által nem gátolt COX-2 expresszióval bár ennek a mechanizmusnak a jelentősége vitatott. Előzetes kardiovaszkuláris betegeken végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy e betegcsoporton az eredmények hasonlóak az egészséges önkéntesek esetében leírt eredményekhez. Véleményünk szerint, a COX-1 acetilációra kifejtett

aszpirin hatás hiányának az elsődleges oka a non-compliance, így az aszpirin hatás ellenőrzésének fő indikációja valószínűleg a non-compliance laboratóriumi detektálása. Tanulmányunkban igazoltuk, hogy az új referencia módszerek és az ezeknek megfelelő specifikus módszerek alkalmasak a non-compliance detektálására is. További indikációs terület az aszpirinnel esetleg párhuzamosan szedett nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek interferáló hatásának a kiszűrése. Utóbbiak megakadályozzák az aszpirin hozzáférését a COX-1 aktív site üregben elhelyezkedő Ser529-hez.

Összefoglalva, a valódi aszpirin rezisztencia, ha létezik extrémén ritka a populációban. Az aszpirin hatás detektálásának fő indikációja a non-compliance és az interferáló gyógyszerek hatásának a kizárása. Az aszpirin hatás megbízható detektálására a kifejlesztett referencia módszerek mellett az AA-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció mértékének meghatározása, a VN Aspirin Assay és nagy valószínűséggel a szérum TXB₂ meghatározás is alkalmasak. A PFA-100 CEPI záródási idő mérése és az AA-tól eltérő agonisták által indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció meghatározása nem megbízhatóak erre a célra. Ezeket a tesztek a COX-1-től független aktivációs mechanizmusok jelentősen befolyásolják, így nem javasolhatók az aszpirin hatás kimutatására. Ugyanakkor hasznosak lehetnek az acetilált COX-1 mellett (vagy attól függetlenül) is magas reaktivitású trombociták kimutatására, ennek bizonyítására azonban további széleskörű klinikai vizsgálatok szükségesek.

A közölt eredményeket a Thrombosis Research nemzetközi szakfolyóirat külön szerkesztőségi közleményben méltatta.

ÖSSZEFOGLALÁS

A kis dózisú aspirin terápia napjainkban is széles körben alkalmazott az akut artériás aterotrombotikus események megelőzésében. Az aspirin a ciklooxygenáz-1 enzim 529-es szerin reziduumát irreverzibilisen acetilálja, ezáltal gátolt a trombocita tromboxán A_2 képzés arachidonsavból.

Az aspirin hatás követésére jelenleg alkalmazott rutin laboratóriumi tesztek változó eredményeket adnak, melyek pontos értékelésére referencia módszerrel való összehasonlítás vált szükségessé. Bizonyos esetekben az aspirin nem előzi meg az akut vaszkuláris eseményeket, ill. egyes laboratóriumi módszerek inkonzekvensen mutatták ki az aspirin hatását, ezért bevezetésre került az "aspirin rezisztencia" fogalma, melyre nem született pontos, általánosan elfogadott definíció, megnehezítve az eredmények értelmezését és a terápiás javaslatok kialakítását.

Két új referencia módszert fejlesztettünk ki az aspirin által előidézett ciklooxygenáz-1 acetiláció közvetlen és közvetett kimutatására. Az első közvetlen módszer működési elve monoklonális anti-humán ciklooxygenáz-1 ellenes antitestek alkalmazása, melyek csak az acetilált (inaktivált) ciklooxygenáz-1-el vagy csak az aktív (nem acetilált) ciklooxygenáz-1-el adnak reakciót. Az antitesteket a humán ciklooxygenáz-1 525-533 reziduumok aminosav szekvenciájának megfelelő acetilált és nem acetilált nonapeptidek ellen termeltettük. Western blotting technikával az antitestek egyértelműen különítették el az acetilált- és nem acetilált enzimet trombocita lizátumban.

A második módszer arachidonsav indukciót követően trombociták által képzett tromboxán A_2 inaktív, stabil metabolitjának, a tromboxán B_2 -nek a mennyiségét méri trombocita dús plazmában. Ez a módszer a

trombociták tromboxán B₂ képző kapacitását határozza meg és közvetetten jelzi az aszpirin által előidézett ciklooxygenáz-1 gátlást.

A két referencia módszerrel 108 kis dózisu aszpirint szedő egészséges önkéntesen vizsgáltuk az aszpirin hatást. Az önkénteseket egy hétig napi egy alkalommal 100 mg enteroszolvens bevonatos aszpirinnel kezeltük. A vérmintákat az első aszpirin bevétel előtt, azt követően 24 órával ill. 168 órával nyertük (0. napos, 1. napos és 7. napos minták). Az aszpirin kezelés elkezdését követő 7. napon nyert valamennyi mintában a trombocita ciklooxygenáz-1 teljes acetilációját figyeltük meg, míg a kiindulási (0. napos) mintákban csak nem acetilált ciklooxygenáz-1 volt jelen. Ennek megfelelően a 7. napon a trombociták tromboxán B₂ képző kapacitásának teljes gátlását tapasztaltuk, azaz a 108 önkéntes közül egy sem volt rezisztens az aszpirin hatására.

A referencia módszerekkel az önkéntes csoporton kapott eredményeket párhuzamosan elvégzett, az aszpirin hatásának detektálására a klinikai gyakorlatban általánosan használt alábbi rutin módszerek eredményeivel hasonlítottuk össze: PFA-100 záródási idő meghatározása kollagén/epinefrines patronnal, VerifyNow Aspirin Assay, arachidonsav, ADP, adrenalin és kollagén agonisták által indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció mérése lumiaggregométeren. A kezelést megelőző (kiindulási) és 7. napos eredményeket a referencia módszerekkel összehasonlítva, az arachidonsav agonistát alkalmazó tesztek (arachidonsav-indukálta trombocita aggregáció és szekréció, VerifyNow Aspirin Assay) detektálták megbízhatóan az aszpirin hatását. A további módszerek esetében jelentős átfedéseket tapasztaltunk a 0. és 7. napos értékek közt, azaz az esetek egy részében fals pozitív aszpirin rezisztenciát mutattak.

Az új, általunk kidolgozott referencia módszerekkel kapott eredmények azt bizonyítják, hogy egészséges populációban a kémiai ("valós") aszpirin rezisztencia, ha egyáltalán létezik, ritkaságnak számít.

Véleményünk szerint, csak az acetilált- és nem acetilált ciklooxygenáz-1-et egyértelműen elkülönítő referencia módszerek által validált arachidonsav agonistát használó módszerek alkalmasak az aszpirin trombocita gátló hatásának megítélésére.

Iktatószám: DEENKÉTK/392/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kovács Emese Gyöngyvér
Neptun kód: BMUED0
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
Mintazonosító: 10037210

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, E.G.**, Katona, É., Bereczky, Z., Homoródi, N., Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R.G., Édes, I., Muszbek, L.: Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods.
Thromb. Res. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.008>
IF:3.133 (2012)
2. **Kovács, E.G.**, Katona, É., Bereczky, Z., Homoródi, N., Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R.G., Édes, I., Muszbek, L.: New direct and indirect methods for the detection of cyclooxygenase 1 acetylation by aspirin; the lack of aspirin resistance among healthy individuals.
Thromb. Res. 131 (4), 320-324, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.01.033>
IF:3.133 (2012)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6.266

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6.266

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013. 12. 03



