

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A heparin-indukálta thrombocytopenia új aspektusai

Dr. Oláh Zsolt

Témavezető: Dr. Boda Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések listája	4
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1 Heparin-indukálta thrombocytopenia	8
2.1.1 A heparin-indukálta thrombocytopenia patomechanizmusa	8
2.1.2 A heparin-indukálta thrombocytopenia klinikuma	10
2.1.3 A heparin-indukálta thrombocytopenia laboratóriumi diagnosztikája	16
2.1.4 A heparin-indukálta thrombocytopenia kezelése	19
2.2 Antifoszfolipid szindróma és antifoszfolipid antitestek	25
2.2.1 Az antifoszfolipid szindróma patomechanizmusa	26
2.2.2 Az antifoszfolipid szindróma klinikuma és kezelése	27
2.2.3 Az antifoszfolipid antitestek	28
2.2.4 A lupus antikoaguláns	30
2.2.5 A hígított protrombin idő mérésén alapuló LA tesztek	35
3. Célkitűzések	37
4. Betegek és módszerek	38
4.1 Betegek és módszerek a HIT/T-ben szenvedő betegek vizsgálata során	38
4.2 Betegek és módszerek a HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin dPT mérésén	

alapuló LA tesztekre kifejtett hatásának vizsgálata során	42
5. Eredmények	45
5.1 A HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin dPT mérésen alapuló LA tesztekre kifejtett hatása	45
5.2 HIT/T-ben szenvedő betegeink retrospektív vizsgálata	53
6. Megbeszélés	60
6.1 A HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a dPT meghatározáson alapuló LA tesztekre	61
6.2 Heparin-indukálta thrombocytopeniában szenvedő betegek retrospektív vizsgálata	64
6.2.1 HIT/T-hez társuló antifoszfolipid antitest pozitivitás	64
6.2.2 A HIT/T ritka formái és klinikai tünetei eseteink kapcsán	67
6.2.3 Rapid HITT előzetes heparinexpozíció nélkül	71
7. Összefoglalás	74
Irodalom	76
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	96
További közlemények	97
Köszönetnyilvánítás	99
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	100

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

APAk	antifoszfolipid antitestek
APS	antifoszfolipid szindróma
APTI	aktivált parciális tromboplastin idő
CL	kardiolipin
DIC	intravascularis disszeminált koaguláció
dPT	hígított protrombin idő (diluted prothrombin time)
dRVVT	hígított Russel vipera mérég idő (diluted Russel viper venom time)
DTI	direkt trombin inhibitor
FXa	faktor Xa
GPL	IgG foszfolipid egység
HIPa	heparin-indukálta thrombocytaaktiváció
HIT	heparin-indukálta thrombocytopenia
HITT	heparin-indukálta thrombocytopenia thrombosissal
HIT/T	HIT és/vagy HITT
HPE	phosphatidil-ethanolamin
HTAG	heparin-indukálta thrombocytaaggregáció
ICAM-1	intracelluláris adhézios molekula-1
ISTH	Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság
iv.	intravénás
LA	lupus antikoaguláns
LMWH	kis molekulatömegű heparin
MPL	IgM foszfolipid egység
MRSE	methicillin rezisztens Staphylococcus epidermidis

MVT	mélyvéna thrombosis
NE	nemzetközi egység
NPP	kevert normál plazma (normal pooled plasma)
OD	optikai denzitás
PaGIA	partikulált gél immunoassay
PE	tüdőembólia
PF4	thrombocyta faktor 4; platelet factor 4
PI	protrombin idő
PL	foszfolipid
PPP	thrombocytaszegény plazma (platelet poor plasma)
PRP	thrombocytadús plazma (platelet rich plasma)
PV	polycythaemia vera
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SRA	szerootonin felszabadulási teszt (serotonin release assay)
SSC	Tudományos és Standardizációs Bizottság
TF	szöveti faktor (tissue factor)
ttkg	testtömegkilogramm
UFH	nem frakcionált vagy konvencionális heparin
VCAM-1	ér eredetű sejt adhéziós molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VKA	K-vitamin antagonistá
VTE	vénás thromboembolia

1. BEVEZETÉS

A heparint közel egy évszázada fedezték fel, majd a múlt század harmincas éveinek végén kezdték alkalmazni vénás thromboemboliák (VTE) kezelésére és megelőzésére. Elsőként 1958-ban Weismann és Tobin számolt be a heparinkezeléshez paradox módon társuló artériás, később vénás thrombosisokról, majd 1973-ban Rhodes és mtsai vélték összefüggést felfedezni az említett klinikai kép és a társuló thrombocytopenia között.^{1,2} A heparin-indukálta thrombocytopenia (HIT, thrombocytopenia – HIT) a heparinkezelés viszonylag ritka, de talán legveszedelmesebb szövődménye. A témában az első magyar nyelvű összefoglaló 1978-ban jelent meg.³ A betegség különleges, egyedülálló természete azóta is kimeríthetetlen témával szolgál a gyakorló orvosok és a kutatók számára egyaránt. A kórkép az alvadásgátló hatású heparin alkalmazása és a társuló thrombocytopenia ellenére nem vérzékenységgel, hanem a thromboticus események fokozott veszélyével társul. A korai diagnózis és a megfelelő kezelés időbeni elkezdése számos további szövődménytől védheti meg a beteget. A HIT/T diagnózisa két pilléren nyugszik: elsősorban a klinikai kép bír döntő jelentőséggel, majd a feltételezett diagnózist laboratóriumi vizsgálattal is meg kell erősíteni. A gyakorlatban azonban a megfelelő diagnózis felállítása komoly kihívást jelent. Míg a HIT/T kezdetben aluldiagnosztizált kórkép volt, az elmúlt egy-két évtizedben – a kereskedelemben széles körben elérhető, HIT antitestek kimutatására alkalmas immunológiai tesztek elterjedésével – inkább túldiagnosztizálttá vált, különösen a fejlett nyugat-európai országokban és Észak-Amerikában. Előbbi a megfelelő kezelés elmaradását vagy késői indítását, utóbbi pedig az antidotummal nem rendelkező és jelentős vérzésveszéllyel járó antikoaguláns készítmények indokolatlan alkalmazását eredményezi. Mindkettő fatális következményekkel járhat. A gyakorlatban komoly differenciáldiagnosztikai problémát jelenthet a HIT és az antifoszfolipid szindróma (APS) elkülönítése. A két kórkép között mind a patomechanizmust,

mind a klinikai képet illetően jelentős hasonlóságok és átfedések észlelhetők. A két entitás elkülönítésében sokszor a laboratóriumi vizsgálatok sem nyújtanak segítséget, APS-ban ugyanis ELISA technikával gyakran mutathatók ki – a klinikai kép alakításában jelentőséggel nem bíró – thrombocyta faktor 4 elleni antitestek. Elméletileg ennek fordítottja is megtörténhet, tehát antifoszfolipid antitestek (APAk) is gyakrabban jelenhetnek meg HIT/T-ben, utóbbit azonban nagy betegcsoporton még senki sem vizsgálta. Ennek egyik oka részben a lupus antikoaguláns (LA) vizsgálatának bonyolultsága, illetve az antikoaguláns terápia mellett végzett LA tesztek bizonytalan értékelhetősége lehet.

Jelen dolgozat célja a Debreceni Egyetem II. számú Belklinikáján az elmúlt években HIT/T diagnózissal kezelt betegek retrospektív vizsgálata volt. Elsősorban az APA-k előfordulását vizsgáltuk beteganyagunkban, és in vitro kísérletek történtek a különböző, HIT/T-ben alkalmazható antikoagulánsok extrinszik alvadási út vizsgálatán alapuló LA tesztekre kifejtett hatását illetően. Az elmúlt egy-két év HIT/T-tel kapcsolatos új kísérletes és klinikai ismeretanyagába ágyazva két kifejezetten ritka, tudományos jelentőséggel is bíró, az APAk átmeneti jelenlétével társuló tanulságos esetet mutatunk be. Az esetek kapcsán felhívjuk a figyelmet a HIT/T diagnózisának új és ritka, kevésbé ismert szempontjaira, melyek ismerete segít elkerülni a kórkép oly gyakori alul- vagy túldiagnosztizálását.

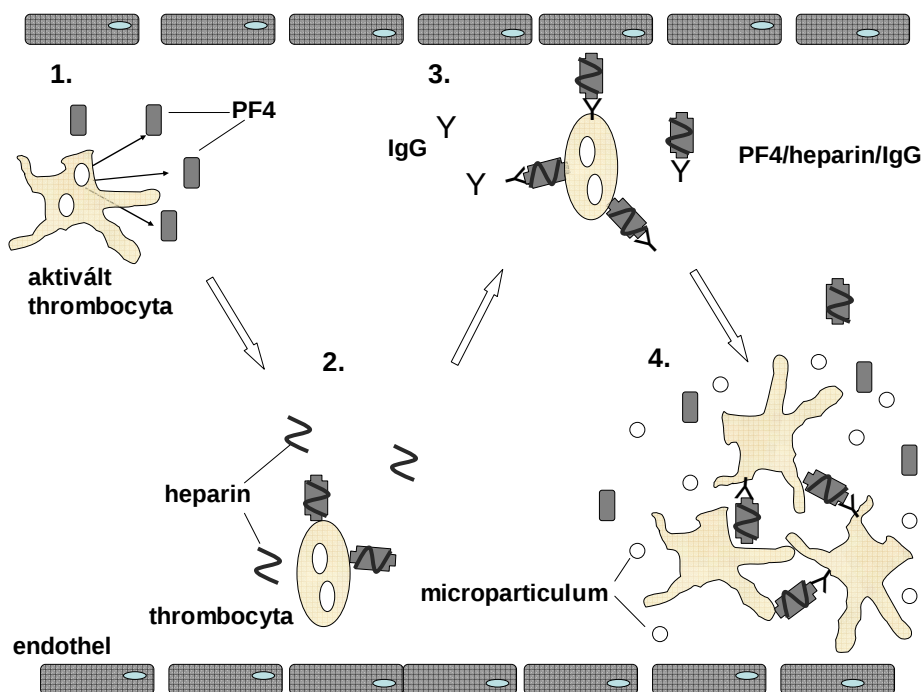
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Heparin-indukálta thrombocytopenia

2.1.1 A heparin-indukálta thrombocytopenia patomechanizmusa

A heparin-indukálta thrombocytopenia immunmechanizmus révén, IgG izotípusú autoantitestek közvetítésével alakul ki (1. ábra).⁴⁻⁸ A thrombocyta faktor 4 (platelet factor 4 vagy PF4) – egy pozitív töltéssel bíró kemokin - a vérlemezkék alfa-granulumaiból thrombocytaaktiváció során kerül nagy mennyiségben a keringésbe (1. ábra/1).⁹ Az aktivált thrombocyták környezetében tetramer szerkezetben fordulnak elő és nagy affinitással kötődnek különböző polianionokhoz, szulfatált poliszacharidokhoz, többek között a heparin készítményekhez is (1. ábra/2), lineáris szerkezetű, multimolekularis komplexeket képezve azokkal a thrombocyták felszínén. Mindez a PF4-ben konformációváltozást idéz elő, melynek hatására addig rejtett epitopok válnak szabaddá. Ezen epitopok ellen – bizonyos feltételek teljesülése esetén - autoantitestek termelődhetnek (1. ábra/3).^{10,11} HIT/T kialakulása során a heparin/PF4/IgG immunkomplexek az FcγIIa receptorokon keresztül a thrombocyták aktivációját váltják ki, mely során újabb, nagy mennyiségű PF4 kerül a keringésbe, illetve thrombocytaaggregátumok képződnek (1. ábra/4).¹²⁻¹⁵ A thrombocytaaktiváció során a vérlemezkékből mikropartikulumok is felszabadulnak, melyek foszfolipidekkel telített felszíne ideális hely - többek között - az aktivált X faktor által katalizált protrombin-trombin átalakuláshoz is.¹⁴⁻¹⁶ Az immunkompleksszel fedett vérlemezkéket a reticuloendothelialis rendszer sejtjei kivonják a keringésből, melynek a consumptioval együtt thrombocytopenia lesz a következménye.¹⁷ A HIT antitestek ugyanakkor képesek az endothel sejtekhez is kötődni és prokoaguláns irányú változásokat létrehozni az endothel felszínén, illetve aktiválják a monocytákat is, fokozva a szöveti faktor szintézisét és expresszióját.^{18,19} A fenti

folyamatok eredményeként a HIT - a thrombocytopenia és a heparin alkalmazása ellenére – artériás és vénás thrombosisok fokozott veszélyével társul.



1. ábra: A HIT/T patomechanizmusa⁸

A PF4/heparin elleni antitestek jelenléte csak az esetek kis hányadában okoz valódi, klinikailag is nyilvánvaló betegséget.²⁰⁻²² Az antitest kimutatása általában tehát szükséges a HIT/T diagnózisához, de önmagában – a megfelelő klinikum hiányában - nem bizonyítja azt.

A patomechanizmus egyik kulcskérdése, hogy egyesekben miért termelődik és miért okoz betegséget a PF4/heparin komplex elleni autoantitest, míg másokban ez miért hiányzik.

Ebből a szempontból fontos a heparin molekula mérete.^{20,23-26} Minél nagyobb ugyanis a PF4-hez kötődő heparinlánc hossza, annál több PF4 tetramert tud áthidalni és ezáltal komplexben tartani, létrehozva a kellően stabil és immunogén ultranagy komplexeket (>670 kDa).²⁷ Ezért észlelik konvencionális heparin (UFH) esetében a legnagyobb (1-5%), míg kis molekulatömegű heparin (LMWH) alkalmazásánál lényegesen kisebb arányban (0.2-0.8%)

HIT/T megjelenését.^{20,23-26} Pentaszacharid (fondaparinux) esetében úgy tűnik, HIT/T kialakulásával a gyakorlatban csak rendkívül ritkán kell számolnunk.^{22,28}

A patomechanizmusban elsődleges szereppel bíró ultranagy PF4/heparin komplexek csak az alkotók megfelelő arányú – 1-2 mol tetramer szerkezetű PF4:1 mol heparin - jelenlétében alakulnak ki. Ennél kisebb vagy nagyobb arányú heparin az ultranagy komplexek szétesésével és az immunogenitás csökkenésével jár együtt.²⁷

Sebészeti betegcsoportban (elsősorban szívsebészet és ortopédia) szintén nagyobb arányban termelődnek az említett autoantitestek, illetve a gyulladásos alapbetegség is kedvez a HIT/T létrejöttének.^{21,26,29,30} Magyarázatként a thrombocytaikat aktiváló hatások túlsúlyba kerülése említhető műtétek, gyulladások kapcsán. Ezzel szemben terhesség során csak nagyon ritkán észlelik HIT/T kialakulását, valószínűleg a társuló immunmoduláció miatt.³¹⁻³³

A női nem szintén fokozott kockázatot jelent HIT/T tekintetében, különösen sebészeti betegekben és UFH alkalmazása mellett.³⁴

2.1.2 A heparin-indukálta thrombocytopenia klinikuma

A heparin-indukálta thrombocytopenia definíciója a nemzetközi irodalomban általában a következő: heparinkészítmény alkalmazása mellett kialakuló valódi vagy relatív thrombocytopenia és laboratóriumi teszttel kimutatható IgG típusú autoantitest a PF4/heparin komplex ellen. Thrombocytopenia alatt a thrombocytaszám 100 G/l alá történő, de legalább 30 %-os esését, vagy - az aktuális thrombocytaszámtól függetlenül – a kiindulási értékhez képest legalább 50 %-os csökkenését értjük. Nem feltétlenül abszolút thrombocytopeniáról van tehát szó, normális vérlemezkeszám esetén is fennállhat HIT/T.

Típusos esetben a thrombocytopenia nem súlyos (50-80 G/l), de – amennyiben a heparinkezelést ekkor nem függesztik fel – 50 G/l alatti értékek is előfordulhatnak.³⁵ A HIT - a patomechanizmus ismeretében érthető módon - kifejezett thrombosisra való hajlammal jár

együtt. Az összes HIT eset közel 50%-ában észlelnek dominálónan vénás, ritkábban artériás thromboemboliát (HIT thrombosis - HITT), melyek elsődlegesen felelősek a HITT-ben észlelt jelentős, 8-20%-os halálozási arányért.³⁶⁻³⁸ A relatív thrombocytopenia kialakulása általában megelőzi a thromboticus eseményt, de az esetek harmadában csak a thrombosis kialakulása után, vagy azzal egyidőben válik nyilvánvalóvá.³⁹ Ezekben az esetekben gyakran késik a HIT/T felismerése vagy téves diagnózis születhet, ha elmarad a vérlemezkeszám kontroll vizsgálata.⁴⁰ A HIT/T ritkán előforduló megnyilvánulási formája lehet még - thrombocytopeniával vagy nélküle - a heparin-indukálta bőrnekrózis, az intravénásan adagolt heparinra adott szisztémás válaszreakció (láz, hidegrázás, hypotensio, dyspnoe, asystolia), illetve mellékvesevéna thrombosis esetén a mellékvese vérzéses nekrózisa.⁴¹⁻⁴⁴ A HIT/T-hez ritkán disszeminált intravascularis koaguláció (DIC) is társulhat.^{45,46}

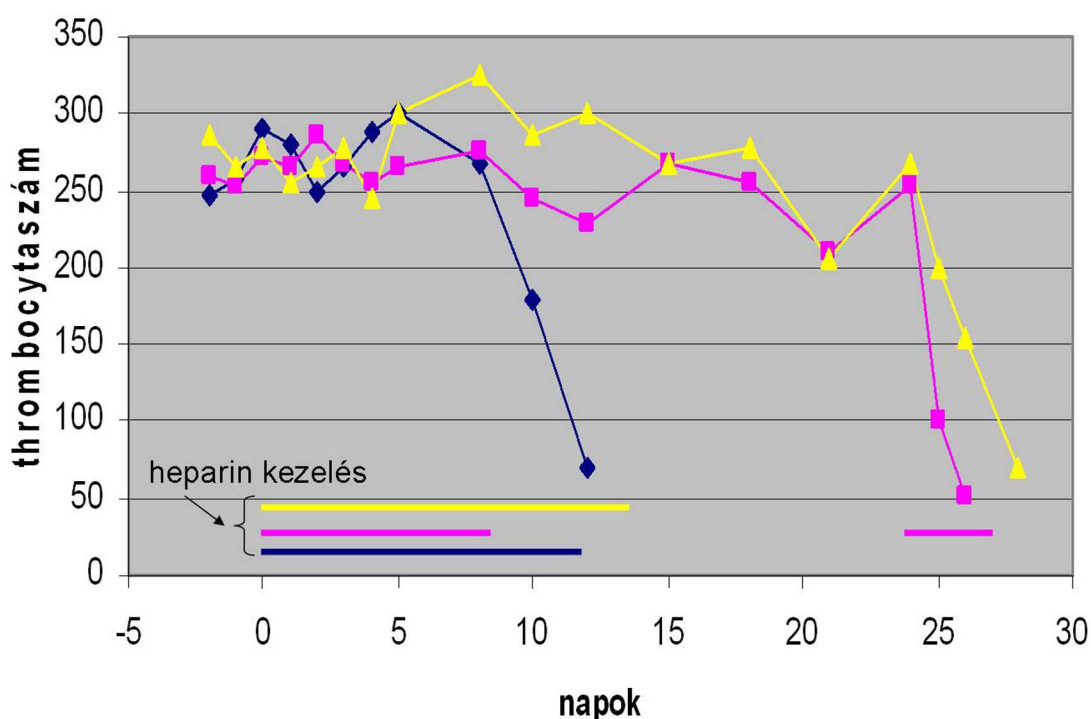
A thrombocytopenia időbeli kialakulása alapján a HIT/T-nek különböző típusait különíthetjük el, melyeket az alábbiakban részletezek (2. ábra).^{8,46-48}

Típusos HIT/T: A thrombocytopenia jellemzően a heparinkezelés 5-10., gyakran 5-15. napja között alakul ki, legalább ennyi idő kell ugyanis az autoantitestek termeléséhez, megjelenéséhez és a következményes, klinikai jelentőséggel bíró thrombocytaaktiváció létrejöttéhez.

Rapid HIT/T: A thrombocytopenia a heparin bevezetését követően gyorsan, általában 24 órán belül kialakul. A jelenség klasszikus magyarázata, hogy a beteg az elmúlt 3-4 hónapban már kapott heparinkészítményt, és az ekkor termelődött, de betegséget nem okozó IgG típusú HIT antitestek még jelen vannak a keringésben. Az ismételten adott heparin mintegy triggerként szerepel a folyamatban. Greinacher munkacsoportja egy új, alternatív elmélettel is előállt, melyet később, a megbeszélés fejezetben részletezek.

Késői („delayed”) HIT/T: A beteg általában profilaktikus céllal, viszonylag rövid ideig (napoktól-hetekig) tartó heparinkezelésben részesül, és közben PF4/heparin ellenes

autoantitestek képződnek. A heparin elhagyását követően a keringésben az autoantitest és az immunkomplex titere még napokig-hetekig olyan magas lehet, hogy - valószínűleg egyéb trigger hatására - heparin hiányában is képes a thrombocyták aktivációját kiváltani. Az anamnézis tehát ilyenkor típusosan a következő: a beteg napokkal, hetekkel korábban valamilyen heparinkészítményt kapott, jelenleg pedig vénás vagy artériás thromboembolia diagnosztizálható thrombocytopenia kíséretében. Ez esetben a heparin ismételt alkalmazása során a thrombosis és a thrombocytopenia progresszióját észlelhetjük.



2. ábra: A heparin-indukálta thrombocytopenia típusai (lila – típusos HIT; rózsaszín: rapid HIT; sárga: késői típusú, „delayed” HIT^{8,48})

Meg kell említeni a kórkép egy igen ritka, negyedik formáját is: a spontán HIT/T heparin alkalmazása nélkül alakul ki és mindössze néhány esetet írtak eddig le.⁴⁹⁻⁵¹ Ezek az esetek általában ortopédiai műtétet és/vagy heveny gyulladásos folyamatot követően alakultak ki. Kialakulásával kapcsolatban azt feltételezik, hogy ilyenkor a PF4 egyéb – a heparinhoz

hasznló szerkezetű - endogén polianionokhoz, például a vérlemezkék felszínén megtalálható chondroitin-szulfáthoz kötődve válik antigénné.⁴⁹⁻⁵²

A diagnózis felállításánál mindig meg kell fontolni a csökkent vérlemezkeszám egyéb lehetséges okait is (pseudothrombocytopenia, antifoszfolipid szindróma, thromboticus thrombocytopeniás purpura, DIC, szepszis, transzfúziók, stb.).

A diagnosztikus nehézségek miatt erőfeszítések történtek a klinikai képen alapuló, a HIT/T fennálltának valószínűségére utaló pontrendszerek kidolgozására. Az 1. táblázatban a Warkentin munkacsoportja által kidolgozott, a klinikumban is jól használható pontrendszert ismertetem.^{20,53,54} A 6-8 közötti összesített pontérték nagyban valószínűsíti a HIT/T jelenlétét, 3 alatti pontszám pedig valószínűtlenné teszi azt, míg 3--6 közötti pontérték esetén a HIT/T diagnózisa nem vethető el, és a laboratóriumi tesztek ezekben az esetekben segíthetnek a leginkább.

	2 pont	1 pont	0 pont
Thrombocytopenia mértéke	50 %-os csökkenés és >20 G/l abszolút thrombocytaszám	30-50 %-os csökkenés és/vagy 10-20 G/l abszolút thrombocytaszám	30 %-nál kisebb csökkenés és/vagy <10 G/l abszolút thrombocytaszám
Thrombocytopenia időbeni megjelenése	5-10 nap között, vagy 24 órán belül (ha a beteg 30 napon belül heparint kapott)	10 napon túl, vagy ismeretlen ideje, vagy 24 órán belül (ha a beteg 30-100 napja heparint kapott)	4 napon belül (előzőleg a beteg heparint nem kapott)
Thrombosis	Igazolt új thrombosis; bőrnekrozis; szisztémás reakció iv. heparin adása után	Progreáló, vagy visszatérő thrombosis; erythematosus bőrlaesus; valószínűsített, de nem alátámasztott thrombosis	Nincs
Thrombocytopenia egyéb oka	Nem igazolható	Lehetséges	Igazolható

1. táblázat: 4T pontrendszer a HIT/T diagnózisához (magyarázat a szövegben)^{20,53,54}

Az elmúlt évben került kidolgozásra egy részletesebb, az előzőnél ugyan bonyolultabb, de a laboratóriumi vizsgálatokkal és a klinikummal úgy tűnik még jobban korreláló, szintén a

klinikai kép értékelésén alapuló pontrendszer (HEP score), melynek klinikai alkalmazhatósága még további megerősítést igényel (2. táblázat).⁵⁵ A két modellt összehasonlító klinikai vizsgálat alapján szűrés céljára a 4T esetén 4 pontban, a HEP rendszer alkalmazása esetén 2 pontban szabták meg az alsó határértéket. Az adott pontszámok alatt mindkét teszt 100%-os negatív prediktív értékkel rendelkezett, míg ROC görbe analízis alapján a legjobb szenzitivitási és specificitási arányokat akkor kapták, ha 5 pontnál húzták meg a határt.

Klinikai jellemző	Pont
1. A thrombocytaszám-csökkenés mértéke (a heparinkezelés alatt mért legnagyobb és legalacsonyabb vérlemezkeszám különbsége) a) < 30% b) 30-50% c) > 50%	-1 1 3
2. A thrombocytaszám-csökkenés kezdetének ideje Típusos HIT gyanúja esetén a) A heparinkezelés első három napján b) A heparinkezelés 4. napján c) A heparinkezelés 5-10 napja között d) A heparinkezelés 11-14 napja között e) A heparinkezelés 14. napja után Rapid-HIT gyanúja esetén (a beteg a megelőző 100 napban kapott heparinkészítményt) f) A heparinkezelés kezdete után < 48 órával g) A heparinkezelés kezdete után > 48 órával	-2 2 3 2 -1 2 -1
3. Legalacsonyabb thrombocytaszám a) ≤ 20 G/l b) > 20 G/l	-2 2

4. Thrombosis (egy választható) Típusos HIT gyanúja esetén	
a) Új vénás vagy artériás thrombosis ≥ 4 nappal a heparinkezelés kezdete után	3
b) Már fennálló vénás vagy artériás thrombosis progressziója a heparinkezelés mellett	2
Rapid HIT gyanúja esetén	
c) Új vénás vagy artériás thrombosis a heparinkezelés kezdete után	3
d) Már fennálló vénás vagy artériás thrombosis progressziója a heparinkezelés mellett	2
5. Bőrnektrózis Bőrnektrózis a heparin beadási helyén	3
6. Akut szisztémás reakció Akut szisztémás reakció intravénás heparin bolus után	2
7. Vérzés Petechia, vérzés jelenléte	-1
8. A thrombocytopenia egyéb lehetséges okai	
a) Idült thrombocytopeniával járó betegség	-1
b) Újonnan indított, thrombocytopeniát okozó, nem heparin típusú készítmény alkalmazása	-2
c) Súlyos fertőzés	-2
d) Súlyos DIC (fibrinogén $< 1\text{g/l}$ és D-dimer $> 5\text{ }\mu\text{g/ml}$)	-2
e) Az artériás rendszerbe beültetett eszköz (pl. intraaortikus ballon pumpa)	-2
f) Cardiopulmonalis bypass 96 órán belül	-1
g) Nincs egyéb oka a thrombocytopeniának	3

2. táblázat: HIT Expert Probability (HEP) pontrendszer⁵⁵

HIT/T klinikai gyanúja esetén minden esetben szükséges elvégezni az alább részletezett laboratóriumi tesztek egyikét.

2.1.3 A heparin-indukálta thrombocytopenia laboratóriumi diagnosztikája

Amennyiben heparin alkalmazása mellett relatív vagy abszolút thrombocytopenia kialakulását észleljük, a patomechanizmusban kulcsszerepet játszó PF4/heparin komplex ellen termelődött antitestek kimutatására kétféle laboratóriumi teszt áll rendelkezésünkre.^{20,56}

A funkcionális tesztek a thrombocyták heparin jelenlétében bekövetkező aktivációját mutatják ki, és ezáltal - közvetve - az említett antitestek jelenlétét bizonyítják. Ezzel szemben az immunológiai tesztek közvetlenül és specifikusan a PF4/heparin(polianion) komplex ellen termelődött IgG típusú antitestek minőségi vagy mennyiségi mérésére szolgálnak.

A funkcionális tesztek közül egyszerűsége, gyors kivitelezhetősége, olcsósága és magas specificitása miatt kezdetben a hagyományos in vitro heparin-indukálta thrombocytaaggregáció vizsgálata terjedt el (HTAG), melynek hátránya azonban az alacsony szenzitivitás volt.^{4,57-59} A vizsgálatot a későbbiekben módosították, és mosott thrombocytákat kezdtek el használni, mely jelentősen javította a módszer szenzitivitását is (heparin-indukálta thrombocytaaktiváció - HIPA).^{58,60} A teszt során egészséges donorok mosott thrombocytáihoz adják a beteg plazmáját, majd kis koncentrációban (0.1-0.5 NE/ml) a kezelésnél alkalmazott heparinkészítményt. Pozitív esetben a beteg plazmájában található HIT antitestek thrombocytaaktivációt és -aggregációt idéznek elő. Hasonló elven alapul és szintén funkcionális teszt a thrombocytaaktiváció során felszabaduló szerotonin mennyiségét mérő, úgynevezett serotonin release assay (SRA), melyhez C-14 izotóppal jelzett szerotoninnal telített vérlemezkéket használnak.⁶¹ A thrombocytaaktivációt a folyamat során nagy mennyiségben felszabaduló mikropartikulumok kimutatásával, áramlási citometria alkalmazásával is bizonyíthatjuk.⁶² Áramlási citometriával egyéb, a thrombocyták aktivációját bizonyító felszíni markerek (P-selectin, annexin V kötő képesség) megjelenését, mennyiségi változását is mérni tudjuk.⁶³ A funkcionális vizsgálatok nagy előnye, hogy csak a betegséget

okozó, thrombocytaktivációt kiváltó valódi HIT antitesteket mutatják ki.²¹ A fentebb említett, mosott thrombocytákat alkalmazó funkcionális tesztek diagnosztikus specificitása 95-99%-nak felel meg, és a legjobb szenzitivitás/specificitás aránnyal társulnak.^{4,21} Hátrányuk azonban, hogy általában csak a nagyobb, HIT/T betegekkel rendszeresen foglalkozó centrumokban érhetőek el, idő- és technikaigényesek, illetve az SRA esetében izotóp használata is szükséges. Magyarországon napjainkban a hagyományos HTAG és az áramlási citometrián alapuló tesztek érhetőek el, csekély számú laboratóriumban.

Meg kell említeni egy új fejlesztésű, jelenleg validálás alatt álló funkcionális tesztet, mely teljes vért vizsgál impedancia aggregométer segítségével (whole blood impedance aggregometry – WBIA).⁶⁴ A teszt kivitelezése – szemben az eddig alkalmazott funkcionális módszerekkel – egyszerű és gyors, mely kitűnő szenzitivitással társul. A közelmúltban végzett vizsgálat szerint specificitása szintén összevethető az SRA-éval, így a módszer elterjedése várható a továbbiakban.⁶⁵

Az immunológiai tesztek során a PF4/heparin komplex ellen termelődött antitestek jelenlétét általában ELISA technikával igazoljuk.^{4,20} A módszer nagyon szenzitív, specificitása azonban alacsony, melyet elsősorban a következő okokra vezethetünk vissza: 1. már az antitestek olyan kis mennyiségét is képes kimutatni, mely egyébként nem jár klinikai következménnyel; 2. a funkcionális tesztekkel szemben nem tud különbséget tenni a thrombocytákat aktiváló és nem aktiváló antitestek között; 3. egyes ELISA tesztek a klinikai jelentőséggel nem bíró IgA és IgM típusú antitesteket is kimutatják; 4. a csak PF4 (nem pedig a PF4/heparin komplex) ellen termelődött antitesteket is képes detektálni.^{4,22,66,67} Mindezek alapján a specificitás növelhető, ha csak az IgG típusú HIT antitesteket kimutató ELISA teszteket alkalmazzuk.⁶⁸ Vizsgálatok bizonyították továbbá, hogy minél magasabb a vizsgálat során mért optikai denzitás (OD) értéke, annál valószínűbb a valódi, thrombocytaktivációt is kiváltani képes antitestek jelenléte és a klinikailag nyilvánvaló HIT/T megjelenése.^{69,70} Érdekes tehát az

ELISA vizsgálat eredményét számszerűen megadni a gyárilag meghatározott OD határérték kíséretében, mely utóbbi általában 0.4-0.5 körül van. A HIT/T diagnózist elsősorban az erősen pozitív eredmény ($OD > 1.0$) támogatja, míg <1.0 alatti OD érték esetén a HIT/T nem zárható ugyan ki, de valószínűsége csekély, 5% alatt marad.^{20,69}

Az immunológiai tesztek között meg kell említeni egy elsősorban gyorsesztként használható, a gélcentrifugálás módszerét alkalmazó vizsgálatot, melyben a HIT antitestek – amennyiben jelen vannak - PF4/heparinnal bevont polystyrene gyöngyöket agglutinálnak.⁷¹ A módszer mindhárom isotípusba tartozó HIT antitesteket kimutatja, szenzitivitása 94-95%-nak, specificitása pedig 88-92%-nak bizonyult.²⁰

Mind az ELISA, mind a funkcionális laboratóriumi tesztek esetében hasznos, a HIT/T diagnózist megerősítő lépésnek számít a nagy koncentrációban (10-100 NE/ml) alkalmazott heparin gátló hatásának bizonyítása.^{4,22,30,72} A HIT/T patomechanizmusának részletezésénél kitértünk a heparin:PF4 arányának döntő fontosságára.²⁷ Nagy mennyiségben jelenlevő heparin az ultranagy komplexek széteséséhez vezet és így a funkcionális tesztek során thrombocytaktiváció nem következik be. HIT/T-ben tehát a kis koncentrációban jelenlevő heparin mellett pozitív eredményt adó funkcionális tesztek negatívvá válnak, ha nagy mennyiségű heparint alkalmazunk a teszt során. ELISA teszt esetében az OD értéke legalább 50%-kal mérséklődik nagy koncentrációjú heparin mellett.⁷²

Az antitestek a HIT/T gyógyulását követően még hónapokig – ELISA technikával vizsgálva hozzávetőleg 3-4 hónapig – jelen lehetnek a keringésben.

A HIT/T gyanúja tehát elsősorban a klinikai kép alapján merül fel. A HIT/T diagnózisának valószínűségét a rendelkezésre álló 4T és HEP pontrendszerek segítségével pontosíthatjuk. Amennyiben a HIT/T gyanúja megalapozott, vagy a kórkép biztonsággal nem zárható ki, a feltételezett diagnózist laboratóriumi vizsgálattal kell megerősíteni. A funkcionális tesztek - kiváló specificitásuk és szenzitivitásuk miatt – előnyben részesítendőek, azonban csak kevés

helyen állnak rendelkezésre. Így napjainkban leginkább a viszonylag könnyen elérhető, bár alacsony specificitással rendelkező ELISA technikát alkalmazzák elsőként, majd – különösen gyengén pozitív ELISA eredmény esetén (OD: 0.4-1.0) - megerősítés céljából valamely funkcionális teszt elvégzése is szükséges lehet. Negatív ELISA eredmény a diagnózist valószínűtlenné teszi, és az esetek nagyon nagy többségében további vizsgálatokat nem indokol HIT/T irányában.^{4,22}

2.1.4 A heparin-indukálta thrombocytopenia kezelése

A HIT/T kezelése során a kórkép korai stádiumban való felismerése és a szövődmények megelőzése az elsődleges cél. Ennek érdekében korábban felmerült a heparinkezelésben vagy profilaxisban részesülő egyéneknél a rendszeres, az első két hétben 2-3 naponként végzett thrombocytaszám-ellenőrzés szükségessége. Ez azonban komoly terhet jelent mind a betegek, mind az orvosok számára, mely általában nem is társul megfelelő együttműködési hajlandósággal a páciensek részéről.⁷³ Az összes, heparint kapó betegre kiterjedő thrombocytaszám-ellenőrzés további hátrányos következményekkel is együttjárhat: jelentősen megnő a HIT/T túldiagnosztizálásának aránya, mely maga után vonja a heparin indokolatlan elhagyását és az alternatív antikoaguláns készítmények használatával társuló fokozott vérzés kockázatát, különösen azokban a centrumokban, ahol csak a túl érzékeny ELISA teszt elérhető a HIT/T laboratóriumi diagnosztikájában.²⁰ A fentiekén túl komoly anyagi terhet is jelent az egészségügyi kassza számára a mindenre kiterjedő szűrés. A ma érvényes ajánlások szerint ezért csak azoknál a betegcsoportoknál javasolt a thrombocytaszám rendszeres, 2-3 naponkénti ellenőrzését elvégezni a 4-14. nap között, akiknél a HIT/T kialakulásának gyakorisága meghaladja az 1%-ot (3. táblázat).²⁰ Ettől függetlenül minden heparinkezelés vagy -profilaxis előtt elengedhetetlen a kiinduló thrombocytaszám rögzítése, mely a későbbiekben a viszonyítás alapja lehet az esetleges vérlemezkeszám csökkenés

mértékének megállapításánál. Amennyiben a beteg az elmúlt 100 napban heparinkészítményt kapott, a heparin indítása után 24 órával is javasolt – amennyiben ez lehetséges – thrombocytaszám-ellenőrzést végezni rapid HIT/T kizárása céljából. Ezt követően ebben a betegcsoportban is a fent leírt ajánlás az irányadó. Intravénás heparin alkalmazása mellett jelentkező szisztémás reakció esetén azonnali vérképvizsgálat szükséges.

Betegek csoportja	A HIT/T incidenciája
Műtéten átesett betegek ➤ UFH, profilaktikus dózisban ➤ UFH terápiás dózisban ➤ UFH használata branül, kanül lezárásához ➤ LMWH alkalmazása ➤ Szívsebészeti műtéten átesett betegek	1-5% 1-5% 0.1-1% 0.1-1% 1-3%
Egyéb, nem sebészeti betegek ➤ Malignus betegség ➤ UFH alkalmazása ➤ LMWH alkalmazása ➤ Intenzív osztály betegek ➤ UFH használata branül, kanül lezárásához ➤ terhesek	1% 0.1-1% 0.6% 0.4% <0.1% 0.1%

3. táblázat: A HIT/T incidenciája a betegcsoporttól és az alkalmazott heparin típusától függően²⁰

Fontos továbbá minden beteg megfelelő tájékoztatása és felvilágosítása, mely szerint thrombosisra utaló jelek, vagy a heparin beadásának helyén észlelt helyi reakciók esetén azonnal forduljanak orvoshoz.

HIT gyanúja esetén a heparinkezelés minden formáját azonnal fel kell függeszteni, így a thrombocytaszám általában napokon - ritkán csak heteken - belül normalizálódik. A HIT azonban a thrombocytopenia megszűnését követően még hetekig a thrombosis kifejezett veszélyével jár, ezért a heparin típusú készítmények helyett alternatív antikoaguláns alkalmazása ilyen esetekben is ajánlott.^{5,6,20,36,74}

Az alvadásgátló kezelés folytatására - profilaktikus vagy terápiás céllal - direkt trombin inhibitorokat (DTI) (rekombinált hirudin, bivalirudin, argatroban) vagy indirekt faktor Xa (FXa) gátlókat (danaparoid, fondaparinux) alkalmazhatunk.²⁰

Hazánkban az elsőként választandó szer a rekombinált hirudin (lepirudin, Refludan®). Féléletideje intravénás alkalmazás esetén 60, bőr alá adva 120 perc, mely veseelégtelenségben többszörösére emelkedik, ezért ilyenkor a dózis csökkentése szükséges.^{20,75} Terápiás céllal történő alkalmazásakor előnyben részesítjük az intravénás bevitelt: az ajánlás szerint kezdetben 0,15 mg/ttkg-ot kap a beteg óránként folyamatos infúzió formájában, melyet súlyos esetekben 0,4 mg/ttkg bolus injekcióval vezetünk be. A továbbiakban a kezelés laboratóriumi kontrollja az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI), melynek a kontrollhoz képest 1.5-2.0-szeres megnyúlását kell ideális esetben elérnünk az adagolás szükség szerinti módosításával.²⁰ Saját beteganyagunkban egyébként a 0,03-0,07 mg/ttkg/óra dózisban alkalmazott lepirudin is elegendő volt a terápiás APTI tartomány eléréséhez.⁴⁸ Profilaxis céljára 1-2x25 mg Refludan injekció (2x1/2 amp.) szubkután formában történő alkalmazása javasolható átlagos testsúlyú felnőtt esetében, mely mellett az APTI követése szintén szükséges.^{76,77} A kezelés hatodik napja után 44-74 %-ban számolni kell antihirudin antitestek megjelenésével, mely az esetek kis százalékában megnyújthatja a hirudin féléletidejét és így az APTI értékét, így ilyenkor a dózis csökkentése válhat szükségessé.⁷⁸

A danaparoid (Orgaran®) a heparinoidok csoportjába tartozik, heparán-, dermatán- és chondroitin-szulfát elegye.⁷⁵ Antitrombin aktivitása mellett dominálónan anti-FXa hatással rendelkezik, ennek megfelelően laboratóriumi kontrollra is az anti-FXa aktivitás mérése szolgál. Veseelégtelenség esetén szintén dóziscsökkentés szükséges. Az Orgaran® injekció egy ampullája 0,6 ml-ben 750 anti-FXa NE aktivitással rendelkező hatóanyagot tartalmaz. Profilaxis céljára általában 2x750 NE-t (<2250 NE naponta 2-3 részletben) alkalmazunk szubkután, míg vénás thromboembolia és HITT esetén testsúlytól függően 1500-3750 NE

(<60 kg esetén 1500 NE; 60-75 kg esetén 2250 NE; 75-90 kg között 3000 NE; >90 kg 3750 NE) intravénás bolus injekció után 4 órán keresztül 400 NE/óra, további 4 órán át 300 NE/óra adaggal folytatjuk a kezelést, majd óránként 200 NE danaparoid iv. adását javasolják.^{20,36,79} Megnyugtató és javuló klinikai kép mellett áttérhetünk a 2x2500 NE danaparoid szubkután alkalmazására.³⁶ A laboratóriumi kontrollra szolgáló anti-FXa szintje terápiás adagolásnál 0,5-0,8 NE/ml legyen, profilaxis céljára a 0,2-0,6 NE/ml-es érték a megfelelő.^{20,75} A danaparoid előnyös tulajdonsága, hogy nem jut át a placentán, így terhességben HIT/T vagy heparinallergia gyanúja esetén az elsőként választandó készítménynek számít.²⁰ Hátránya azonban a hosszú, 25 órás féléletidő.

Az Észak-Amerikában elérhető argatroban injekció - a fenti szerekkel szemben - a májban metabolizálódik, így veseelégtelenségben nem szükséges az adag módosítása. Kezdő adagja 1-2 µg/kg/óra folyamatos infúzióban adva. Laboratóriumi kontrollra – a hirudinhoz hasonlóan - az APTI szolgál, melynek a kontrollhoz képest 1,5-3-szoros megnyúlását kell elérjünk a terápiás hatás kifejtéséhez. Károsodott májfunkció esetén dóziscsökkentés javasolt.^{20,75} A bivalirudin hazánkban szintén nem elérhető, HIT/T-ben perkután coronaria intervenció során engedélyezett a használata.^{20,75}

Kevés tapasztalattal rendelkezünk a szintetikus, szelektív, indirekt FXa gátló hatással bíró fondaparinux (Arixtra®) HIT-ben történő alkalmazásával kapcsolatban. HIT antitestek megjelenését fondaparinux adása esetén is észlelték ugyan, klinikailag megnyilvánuló betegség kialakulása azonban rendkívül ritka.^{20,22,28,80,81} Több, egyelőre még csak kis betegszámú tanulmányban sikeresen alkalmazták a fondaparinuxot HIT/T-ben szenvedő betegek kezelésére, miközben a társuló vérzés veszélyét alacsonynak találták.⁸²⁻⁸⁵ Habár a rendelkezésre álló vizsgálatokat összesítve úgy tűnik, hogy a fondaparinux legalább olyan hatékony készítmény HIT/T-ben, mint a direkt trombin inhibitorok, meggyőző, nagy

betegszámú vizsgálat hiányában egyelőre nem tartozik a kórkép kezelésére törzskönyvezett készítmények közé.^{20,22}

Az új, szájon át adagolható direkt trombin (dabigatran) és FXa inhibitorok (rivaroxaban) in vitro nem kötődnek a PF4-hez, mely alapján feltehetően HIT/T-ben is alkalmazható készítmények lehetnek a későbbiekben, amennyiben ezt további klinikai vizsgálatok is megerősítik.^{20,86}

Thrombocyta-koncentrátum HIT/T-ben való alkalmazásával kapcsolatban nagyon kevés tapasztalattal rendelkezünk. Ezek nem támogatják azt a korábbi feltételezést, hogy thrombocyta alkalmazása HIT/T-ben tovább növelné a thromboticus események bekövetkeztének valószínűségét és súlyosságát, azonban a biztonságos alkalmazhatóságról sincsenek bizonyító erejű adatok. A jelenleg érvényes ajánlás szerint kizárólag – a kórképben egyébként ritkán előforduló – vérzés vagy az alacsony thrombocytaszám ellenére szükségessé váló invazív beavatkozás esetén lehet létjogosultsága.²⁰

HIT/T-ben fokozott elővigyázatosságot igényel a kumarinszármazékok beállítása. A HIT/T-tel együttjáró fokozott prokoaguláns aktivitás és a kumarinkezelés kezdetén jelenlevő szerzett protein C hiány által halmozódó trombogén hatások következményeként ugyanis kumarin-indukálta bőrnekrózis és vénás végtagi gangréna alakulhat ki, mely gyakran végtagamputációt tesz szükségessé.⁸⁷ Ezért HIT/T-ben szenvedő betegnél K-vitamin antagonistá (VKA) csak a fent részletezett alternatív antikoaguláns készítmények egyikének védelmében, azzal legalább ötnapos átfedésben, fokozatosan, kis kezdő dózissal indítva és normális (>150 G/l) thrombocytaszám mellett állítható be.^{20,88} A parenterális, alternatív alvadásgátló készítmény csak akkor hagyható el, ha az INR érték két egymást követő napon a terápiás tartományban mérhető. Amennyiben a HIT/T diagnózisakor a beteg már kumarinkezelésben részesül, hatását K-vitamin per os vagy intravénás adásával (5-10 mg) érdemes felfüggeszteni, és a kezelést a fent leírtak szerint folytatni.^{20,87}

Fontos kérdés, hogy a HIT/T gyógyulását követően, a későbbiekben alkalmazható-e ismételten heparinkészítmény. Ahogyan azt már fentebb részleteztük, a HIT antitestek általában legkésőbb 3-4 hónappal a heparin adását követően eltűnnek a keringésből. Ezen időszakon belül azonban - mindaddig amíg az antitestek kimutathatóak a keringésben - fokozottnak tekinthető a rapid HIT/T kialakulásának esélye, és heparinkészítmény nem alkalmazható. Ezután elméletileg lehetőség van heparin ismételt adására, de megbízható adatok hiányában csak rövid ideig, maximum 4 napon át adhatóak. A HIT antitestek kialakulásának nagy kockázatával járó szívsebészeti műtétek esetében pedig ez az időszak lehetőleg csak a beavatkozás idejére korlátozódjon. Hosszabb időtartamú alvadásgátló kezelés szükségessége esetén a már ismertetett alternatív antikoaguláns készítmények közül kell választani. Vénás thromboembolia megelőzésére vagy kezelésére az adott indikációban bizonyítottan hatékony fondaparinux az elsőként választandó szer, mellyel átfedésben a kumarinkezelés is beállítható.²⁰

2.2 Antifoszfolid szindróma és antifoszfolid antitestek

Az antifoszfolid szindróma a szerzett thrombophiliák családjába tartozik. Klinikailag thromboticus események és/vagy szülészeti komplikációk jellemzik, melyhez antifoszfolid antitestek jelenléte társul.^{89,90} Az APS kritériumrendszere a 4. táblázatban látható.⁸⁹

Klinikai kritériumok (legalább egy jelenléte)
1. Artériás, vénás vagy kis erek thrombosisa bármely szövetben vagy szervben objektív vizsgálati módszerrel igazolva (képalkotó vagy szövettani vizsgálat), az érfal gyulladására utaló jelek nélkül.
2. Terhességi szövődmények a.) ≥ 1 egyéb okkal nem magyarázható, morfológiailag egészséges magzat halála a 10. terhességi héten vagy ezt követően; vagy b.) ≥ 1 koraszülés a 34. terhességi hét előtt eclampsia, súlyos preeclampsia vagy a méhlepény elégtelensége miatt (az újszülött morfológiailag egészséges); vagy c.) ≥ 3 egymást követő megmagyarázatlan spontán vetélés a 10. terhességi hét előtt (anyai anatómiai vagy hormonális okok valamint anyai és apai kromoszóma eltérések kizárhatóak)
Laboratóriumi kritériumok (egy vagy több feltétel teljesülése ismételten, minimum 12 hét elteltével)
1. Lupus antikoagulans jelenlétének igazolása a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság érvényes ajánlása alapján ^{91,92}
2. IgG és/vagy IgM típusú anticardiolipin antitestek jelenléte közepes vagy magas titerben (>40 GPL vagy MPL, vagy >99 percentilis), standardizált ELISA módszerrel igazolva
3. $\beta 2$ -glycoprotein-1 elleni IgG és/vagy IgM típusú antitest jelenléte (>99 percentilis titerben) standardizált ELISA módszerrel igazolva

4. táblázat: Az antifoszfolid szindróma elfogadott kritériumrendszere⁸⁹

A diagnózis felállításához legalább egy klinikai és egy laboratóriumi kritériumnak kell teljesülnie.

2.2.1 Az antifosfolipid szindróma patomechanizmusa

Az APS kialakulásában elsősorban az endothel sejtek, a monocyták, a thrombocyták és a komplement rendszer bírnak nagy jelentőséggel.⁹³ Az antifosfolipid antitestek - diagnosztikus jelentőségük mellett - az APS patomechanizmusában, az egyes tünetek kifejlődésében szintén központi szerepet játszanak. Az APAk kötődnek a sejtek felszínén expresszálandó foszfolipidkötő fehérjékhez vagy foszfolipidekhez (PL), és különböző szignalizációs útvonalakon keresztül befolyásolják a sejtek funkcióját: 1. az endothel sejtek fokozzák az adhézións molekulák (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) és a szöveti faktor (TF) expresszióját, mely prokoaguláns és proinflammatorikus fenotípus kialakulását eredményezi; 2. a thrombocytákban megnő a glikoprotein IIb/IIIa expresszió és a tromboxán A₂ termelés, illetve fokozódik a thrombocytáaggregációt kiváltó egyéb ágensek hatása; 3. a monocyták felszínén szintén megemelkedik a TF mennyisége és felgyorsul bizonyos cytokinek termelődése.

A fenti folyamatokban a sejtek szintjén a nukleáris faktor κ B (NF κ B) és a p38 mitogén-aktiválta protein-kináz (p38 MAPK) tölt be fontos mediátor szerepet.^{93,94}

Az APAk továbbá az alvadási kaszkád szabályozásában résztvevő fehérjékkel (pl. protrombin, faktor X, protein C és plazmin) való interakciójuk során gátolják a prokoaguláns faktorok inaktivációját valamint a fibrinolízist. Mindezen folyamatok eredményeként a haemostasis rendszerében a prokoaguláns hatások kerülnek túlsúlyba.

A terhességi komplikációk kialakulásában a fent részletezetteken túl lokális tényezők is kiemelkedő szerepet kapnak: az APAk az endothel és a trophoblast felszínéről leszorítják a természetes antikoaguláns hatású annexin A5-t, mely a placentában helyileg még tovább

fokozza a prokoaguláns aktivitást; a β 2GPI kötődik a trophoblast sejtekhez, majd az ellene termelődött anti- β 2GPI jelenlétében gyulladásos folyamatok indulnak be, apoptosis indukció következik be, a trophoblast proliferáció és differenciáció zavart szenved, összességében gátolva a placentáció folyamatát, illetve a human chorion gonadotropin termelését.⁹³⁻⁹⁵

Úgy tűnik, hogy mind a thrombosis, mind a terhességi szövődmények kialakulásában fontos szerepet játszik és szükséges a komplement rendszer aktivációja is.⁹³

Jól ismert, hogy ugyanazon APA egyesekben nem okoz klinikailag megnyilvánuló betegséget, míg másokban thrombosist képes kiváltani, és vannak olyanok, ahol a szülészeti komplikációk kerülnek előtérbe. Az adott APA által kiváltott eltérő klinikai következmények magyarázataként az antigén felszínén megtalálható eltérő epitopok jelenlétét felételezik. Az ugyanazon molekula különböző epitopjai ellen termelődött – egyes forgalomban levő laboratóriumi tesztekkel látszólag azonos - antitestek azután eltérő szignál útvonalakat aktiválva eltérő válaszreakciót és klinikai képet idéznek elő.⁹³ Pár éve került a figyelem középpontjába a β 2GPI domén I-ben található Gly40-Arg43 aminosavak által határolt szekvencia, mely epitop ellen termelődő IgG antitestek általában LA aktivitással is bírnak és kifejezett kockázatot jelentenek mind a szülészeti, mind a thromboticus szövődmények tekintetében.⁹³ A közeljövőben várható a pontosan meghatározott epitopok ellen termelődött, fokozott gyakorlati jelentőséggel bíró specifikus antitestek kimutatására alkalmas laboratóriumi tesztek elterjedése.

2.2.2 Az antifosfolipid szindróma klinikuma és kezelése

Az APS klinikailag leggyakrabban vénás thromboembolia formájában nyilvánul meg, mely a betegek 30-70%-ában van jelen.⁹⁶⁻⁹⁸ Leginkább az alsó végtag mély és felületes vénái érintettek, de a vena axillaris, vena centralis retinae, a máj vénás rendszere és az agyi sinusok thrombosisai is előfordulnak. A leggyakoribb artériás események az ischaemiás stroke

(19.8%), az átmeneti agyi keringészavar (11.1%) és a myocardialis infarctus (5.5%).⁹⁶ A kórkép másik fő megnyilvánulási formája a kritériumok között is megtalálható terhességi komplikációk (elsősorban habituális vetélés, eclampsia, preeclampsia, koraszülés, abruptio placentae).⁹⁶ Az APS-hoz egyéb, a kritériumrendszerben nem szereplő klinikai tünetek is társulhatnak. Az esetek 20-40%-ában fennálló thrombocytopeniát részben a vérlemezkék felszíni glikoproteinjei ellen termelődött antitestek, részben az APAk thrombocyták aktiváló hatása és a következményes consumptio okozza.^{94,99} Gyakori tünetek a livedo reticularis és a migrén, de – a teljesség igénye nélkül – társulhatnak még a szívbillentyűk betegségei, hemolitikus anémia, nephropathia, epilepszia és végtagi fekélyek is.^{96,100} Secunder APS-ről akkor beszélünk, ha az APAk egyéb autoimmun alapbetegséghez társulva okozzák a kritériumrendszerben meghatározott tüneteket, vagy felmerül esetleges gyógyszer kóroki szerepe; ismert kiváltó ok nélkül primer APS-ről van szó. Elkülönítjük még a magas halálozási aránnyal bíró katasztrofális APS-t, amikor a kórkép gyorsan progrediál és rövid idő alatt (egy héten belül) legalább három különböző szervben, szervrendszerben fejlődik ki thrombosis, rendszerint többszervi elégtelenséget okozva.^{100,101}

Az APS részét képező artériás és/vagy vénás thromboemboliák antithromboticus kezelése nem különbözik lényegesen ezen kórképek ismert általános terápiás elveitől, azonban hangsúlyozni kell a thromboemboliához vezető alapbetegség kezelésének fontosságát is, melyben már jelentős eltérések mutatkozhatnak.^{102,103} Amennyiben az APS terhességi szövődeményekkel társul, a terhesség alatt kis dózisban aspirin és legalább profilaktikus - a magunk részéről inkább terápiás - dózisban LMWH együttes alkalmazása ajánlott.¹⁰⁴

2.2.3 Az antifoszfolipid antitestek

Az antifoszfolipid antitest elnevezés megtévesztő, hiszen az ellenanyagok APS-ban elsősorban foszfolipid-kötő képességgel rendelkező fehérjék (β 2GPI, protrombin, annexin

A5, protein S) vagy ritkábban ezen fehérjék és foszfolipidek (kardiolipin, phosphatidyl-serin, stb.) komplexei ellen termelődnek. A továbbiakban az APS-ban legfontosabb szerepet játszó antigének és az ellenük termelődött antitestek szerepét foglalom össze.

A kardiolipin (CL) egy difoszfátidil-glicerol szerkezettel bíró foszfolipid, mely a mitokondrium belső membránjának egyik fontos alkotóeleme, de sok baktérium membránjában is jelen van.¹⁰⁵ Először állatok szívéből izolálták, a neve is innen származik.¹⁰⁶

A kardiolipin a belső mitokondriális membránban megtalálható számos enzim optimális működéséhez szükséges, így alapvetően fontos szerepet tölt be a mitokondrium energia metabolismusában.

A β 2GPI egy antikoaguláns hatással bíró, foszfolipid-kötő képességgel is rendelkező többfunkciós apolipoprotein. Gátolja a trombocytákból származó szerotonin felszabadulást, a trombocytáaggregációt,¹⁰⁷ csökkenti a trombocyták felszínén a protrombináz számára hozzáférhető kötőhelyek számát,¹⁰⁸ gátolja a FXII aktivációját és a FXa termelődését.^{109,110} A jelenlevő foszfolipid mennyiségétől függően befolyásolja továbbá a protein C működését is, szabályozó szerepet betöltve az alvadási rendszerben.¹¹¹

A fent említett fehérjék, mint antigének ellen termelődött antitestek elsősorban autoimmun kórképekben mutathatóak ki, de kóroki szerepük bizonyítottan APS-ban van, ha IgG vagy IgM izotípusba tartoznak és tartósan, közepes vagy magas titerben vannak jelen.^{89,100,112-114}

APS-ban a CL β 2GPI-hez kötődve vált ki az utóbbival szemben kialakuló immunválaszt, szemben a fertőző betegségekhez társuló, csak átmenetileg kimutatható és általában kis titerben jelen levő IgM típusú anti-CL (aCL) antitestekkel, melyek nem β 2GPI-dependensek.¹¹⁵⁻¹¹⁸ A LA az APAk heterogén csoportját alkotja, mely főként két foszfolipidet kötő fehérje, a β 2GPI és/vagy a protrombin ellen irányuló IgG és/vagy IgM izotípusú antitesteket foglalja magában.¹¹² A LA bizonyult a legerősebb rizikófaktornak az APAk közül, de az aCL és anti- β 2GPI antitestek is egyértelműen elősegítik az artériás és/vagy a

vénás thrombosisok valamint a szülészeti komplikációk kialakulását.¹¹²⁻¹¹⁴ A legnagyobb veszéllyel akkor kell számolnunk, ha mindhárom antitest – LA, anti- β 2GPI, aCL - kimutatható.^{112,119} Az APS kritériumrendszere – nagy betegszámú, egyértelműen bizonyító erejű vizsgálatok hiányában - nem tartalmazza ugyan a protrombin és az annexin A5 ellen termelődött antitestek detektálását, úgy tűnik azonban, hogy bizonyos esetekben mégis indokolt lehet ezek vizsgálata. Az anti-annexin A5 antitestek hozzájárulhatnak a vetélések kialakulásához APS-ban, az anti-protrombin antitestek pedig szintén az artériás és vénás thrombosisokhoz társulhatnak nagyobb arányban.¹¹² A LA kivételével az APAk kimutatása ma már szinte kizárólag ELISA technikával történik, melyhez a különböző diagnosztikai eszközöket gyártó cégek számos tesztje elérhető.¹²⁰

Lényegesen bonyolultabb a LA kimutatása, ezért – figyelembe véve a dolgozat 3-as számú célkitűzését is – külön fejezetben foglalom össze a LA irányú laboratóriumi vizsgálatokat és diagnosztikát.

2.2.4 A lupus antikoaguláns

A LA az APAk heterogén csoportját alkotja, mely in vitro képes gátolni az alvadás folyamatát, in vivo azonban prothromboticus hatással bír. Már közel 60 évvel ezelőtt észlelték egyes SLE-ben szenvedő betegek megnyúlt alvadási idő értékeit, melyek néhány esetben vérzékenységgel társultak.¹²¹ A jelenségért felelős anyagot ezért „circulating anticoagulant”-nak – „keringő antikoaguláns”-nak nevezték el. 1963-ban írták le először, hogy ezen „keringő antikoaguláns” megjelenése még gyakrabban társul thrombosis kialakulásával.¹²² A lupus antikoaguláns elnevezést azután 1972-ben használták, elsőként Feinstein és Rapaport, mivel a fenti eltéréseket SLE-ben szenvedő betegek vizsgálata során észlelték.¹²³ A későbbiekben kiderült, hogy az elnevezés nem szerencsés, hiszen LA nem csak lupusos betegekben jelenhet meg és – ahogyan az már akkor ismert volt - elsősorban nem vérzékenységgel társul.¹²⁴ Ma

már azt is tudjuk, hogy a legerősebb rizikófaktor mind a thrombosis mind a szülészeti szövődmények tekintetében a LA jelenléte.^{112,113} Főként két foszfolipidet kötő fehérje, a β 2GPI és/vagy a protrombin ellen irányuló IgG és/vagy IgM izotípusú antitesteket foglalja magában. Ezen fehérjéken azonban az antitest megkötésében résztvevő epitopok csak akkor kerülnek a felszínre, ha azok negatív töltésű felszínhez, leginkább foszfolipidekhez kötődnek.¹²⁵ A LA ezáltal a foszfolipidfüggő alvadási folyamatokat, elsősorban a protrombin-aktivátor komplex-protrombin interakciót és a protrombin-trombin átalakulást gátolja in vitro, előidézve az alvadási tesztek – elsősorban az APTI, egyes esetekben a protrombin idő (PI) - megnyúlását.¹²⁶ A LA laboratóriumi diagnózisa során is elsősorban ezen tulajdonságát használjuk ki. Megfigyelték továbbá, hogy a foszfolipid mennyiségének csökkentésével a LA foszfolipidfüggő alvadási tesztekre kifejtett in vitro hatása fokozódik, így a vizsgált alvadási idő megnyúlik, míg a foszfolipid mennyiség emelésével az alvadási idők értéke rövidül.^{123,126} Elvileg tehát valamennyi foszfolipidfüggő alvadási teszt használható a LA diagnosztikájában. Az intrinszik alvadási utat vizsgáló LA tesztek az APTI és a kaolin alvadási idő, míg az extrinszik utat a hígított protrombin idő (dPT), a közös utat pedig a hígított Russell vipera méreg idő (dRVVT) vizsgálja.

A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) APAk-kel foglalkozó Tudományos és Standardizációs Bizottsága (SSC) 1991-ben összefoglalta a LA diagnosztika aktuális helyzetét és ajánlásokat fogalmazott meg azzal kapcsolatban.¹²⁷ Az SSC a következő négy kritériumot javasolta a LA laboratóriumi azonosításához: 1. PL-függő alvadási teszt megnyúlása - szűrőtesztek; 2. a gátlótest jelenlétének keveréses vizsgálattal történő bizonyítása kevert normál plazma (NPP) alkalmazásával – keveréses vizsgálatok; 3. annak igazolása, hogy a gátlótest aktivitása foszfolipid-függő – megerősítő tesztek; 4. a PL-függő alvadási teszt megnyúlásáért felelőssé tehető egyéb coagulopathiák kizárása (pl. valamely alvadási faktor elleni gátlótest jelenléte, faktorhiány, stb.). 1991 óta két alkalommal, 1995-ben

és 2009-ben módosították és frissítették az ajánlást.^{91,92} A ma érvényes 2009-es ajánlás főbb elemei az alábbiakban kerülnek összefoglalásra.⁹²

A vizsgálathoz szükséges vérminta levétele az alvadásgátló kezelés indítása előtt, vagy annak megszakítása után, a hatás megszűnéséhez szükséges elegendő idő elteltével történjen 0.109 M nátrium-citrátot tartalmazó vérvételi cső használatával. Thrombocytaszegény plazma (PPP) biztosítása szükséges, ezért a minta kétszeri centrifugálása javasolt (2000 g 15 percig, majd a plazmát ismételtén >2500 g-vel, további 10 percig centrifugáljuk). Amennyiben a LA vizsgálatát a későbbiekben tervezik elvégezni, az így nyert PPP gyors lefagyasztása szükséges legalább -70 °C-ra, hogy megelőzzük az alvadási faktorok szintjének csökkenését. A fagyasztott mintát felhasználásakor 37 °C-os vízfürdőben, 5 perc alatt kell kiolvasztani.

A szűrőteszt során két, egymástól eltérő alvadási utat vizsgáló, PL-függő alvadási tesztet kell elvégezni. Kettőnél több szűrővizsgálat kivitelezése szükségtelen, jelentősen megnöveli ugyanis az álpozitív eredmények arányát, míg egy vizsgálat önmagában nem elég érzékeny a LA kimutatására. A szűrőtesztek egyikeként a közös alvadási utat vizsgáló hígított Russell vipera méreg időt (dRVVT), második szűrőtesztként pedig APTI alapú módszert (aktivátor: szilika) javasolnak alacsony foszfolipid tartalom mellett. A kaolin alvadási időt az alacsony reprodukálhatósági ráta, az egyéb aktivátorokat (Ecarin és Textarin) a megfelelően standardizált reagensek hiánya miatt nem ajánlják. A hígított protrombin időn alapuló teszteket szintén a nem javasolt csoportba sorolták a forgalomban előforduló és sokszor házilag gyártott, eltérő összetételű tromboplasztin reagensek miatt. A Siemens által előállított Innovin[®] rekombinált tromboplasztin alkalmazásával azonban ez a teszt széles körben használt, megbízható és szenzitív módszer a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján.¹²⁸⁻¹³¹

A keverékes tesztek során a vizsgálandó plazmát egészséges egyénekből származó NPP 1:1 térfogatarányú hozzáadásával vizsgálják, melynek célja a gátlótest jelenlétének kimutatása. Gátlótest jelenlétében a megnyúlt alvadási idő nem normalizálódik, míg faktorhiány esetében

igen, mivel a NPP-vel pótoljuk a hiányzó faktort. A teszt során alkalmazott NPP-t helyileg állítják elő egészséges egyénekből származó PPP-k 1:1 arányban történő összekeverésével. A NPP készítése esetében is fontos a kétszeri centrifugálás és - a későbbi felhasználhatóság érdekében - a gyors, kis térfogategységekben történő lefagyasztás és tárolás legalább -70 °C-on. Keveréssel teszt során az alvadási idő nem korrigálható megnyúlását nem frakcionált heparin vagy valamely alvadási faktor elleni gátlótest jelenléte is okozhatja. A trombin idő mérése és a klinikai kép – thrombosis vagy vérzékenység fennállta - segíthet a fentiek elkülönítésében.

A megerősítő tesztek során a korábban már kimutatott gátlótest hatásának PL-függését bizonyítjuk a foszfolipid mennyiségének növelésével, mely az elvégzett szűrőteszt megnyúlt alvadási idejét LA jelenlétében csökkenteni képes. Ehhez úgynevezett bilayer vagy hexagonális fázisú PL-ek alkalmazása javasolt.

Minden egyes fent részletezett lépés esetén a vizsgálandó mintát NPP-val párhuzamosan, megegyező körülmények között kell vizsgálni. Az eredményt mindig a NPP-val kapott eredményhez kell viszonyítani és vagy az alvadási idő változásával, vagy egy arányszámmal, rátával kell megadni, mely a tesztelt minta és a NPP vizsgálata során mért értékek hányadosával fejezhető ki. Keveréssel teszteknél az úgynevezett Rosner index is számítható, melyet a következőképpen kapunk meg: $[(b-c)/a] \times 100$, ahol 'a' a beteg plazmával, 'b' a beteg plazma és NPP 1:1 arányú keverékével és 'c' a NPP–vel kivitelezett alvadási időt jelenti. Amennyiben a Rosner-index értéke 15 felett van, az megerősíti a gátlótest, azaz jelen esetben a LA jelenlétét.

A vizsgálatot végző laboratórium összegző véleménye szintén szükséges, tekintettel az elvégezhető tesztek sokaságára, különbözőségére és a LA kimutatásának bonyolult, összetett folyamatára.

A szűrő, keveréses és megerősítő teszteknel minden esetben javasolt a helyi (vizsgálóhely specifikus) felső határértékek megállapítása, melyet legalább 40 darab, 50 évesnél fiatalabb, egészséges egyén mintáinak vizsgálatával, az eredmények 99. percentilisénél kell meghúznunk.

Megerősítő tesztek esetében a határértéket az egészséges donorok vizsgálata során kapott százalékos korrekció átlagával is kifejezhetjük. A százalékos korrekció minden egyes minta esetében a következő egyenlettel számítható: $[(a-b)/a] \times 100$, ahol 'a' a PL szegény környezetben, 'b' a PL hozzáadásával, ugyanazon teszt alkalmazásával mért alvadási időt jelenti. Az 'a' és 'b' értékek hányadosával a LA ráta is megadható, melyet szintén viszonyíthatunk a NPP LA rátájához.

A LA vizsgálatát számos külső tényező befolyásolhatja, melyeket a fenti lépések kivitelezésénél figyelembe kell venni.

A napjainkban leggyakrabban alkalmazott orális antikoaguláns készítmények, a K-vitamin antagonisták alkalmazása mellett az alvadási idők megnyúlnak, így a LA irányú laboratóriumi vizsgálatok értékelése igen nehezzé és megbízhatatlanná válik. A tévedések elkerülése érdekében a jelenleg érvényes ajánlás a vizsgálatot az alvadásgátló kezelés megszakítása után 1-2 héttel javasolja időzíteni, egyéb esetben az INR értékét kell legalább 1.5 alá csökkenteni. Habár az ajánlás szerint is csak korlátozott tapasztalattal rendelkezünk az LMWH-val kezelt betegek LA szűrésével kapcsolatban, alternatív lehetőségként áthidaló heparinkezelést javasolnak. A vizsgálat elvégzése ilyenkor lehetőség szerint az utolsó LMWH adag után több mint 12 óra elteltével, vagy antiheparin hatású anyag jelenlétében történjen. A szűrő és keveréses vizsgálatok nem végezhetők el, ha a vizsgálandó minta heparin tartalma meghaladja a reagens heparint semlegesítő kapacitását. Az elérhető dRVVT és APTI alapú LA tesztekben alkalmazott heparin neutralizátorok általában 0.8 NE/ml heparin mennyiséget tudnak semlegesíteni. Az ajánlás hangsúlyozza ugyanakkor azt is, hogy az egyes LMWH

készítmények eltérő arányban gátolják a FXa-t és a FIIa-t, ennek következtében eltérő lehet a hatásuk a LA szűrőtesztekre is.

A lupus antikoaguláns vizsgálatát lehetőség szerint nem a thromboemboliás esemény akut szakában kell elvégezni, mert ilyenkor a beteg általában már alvadásgátló kezelésben részesül, illetve az akut fázis fehérjék – közöttük a FVIII – szintje megemelkedik és ezek zavarhatják a LA tesztek elvégzését, megfelelő értékelését.

A gyakorlatban fontos a teljes APA profil vizsgálata. Közepes vagy magas titerben kimutatható IgG vagy IgM típusú aCL és/vagy β 2GPI elleni antitestek egyidejű jelenléte tovább növeli a LA kóroki szerepét és magas VTE rizikót valószínűsít.

2.2.5 A hígított protrombin idő mérésén alapuló LA tesztek

LA jelenlétében PI megnyúlást rendszerint nem észlelünk, mert a PI meghatározásnál alkalmazott tromboplasztin reagens jelentős mennyiségű foszfolipidet tartalmaz. A hagyományos PI mérése ezért nem alkalmas LA kimutatására. Ha azonban a mérést erősen hígított tromboplasztin reagenssel végezzük el, egy LA-ra érzékeny szűrőtesztet kapunk.¹²⁸⁻¹³¹

A hígított protrombin idő (dPT) méréséhez kezdetben állati agyszövetből származó tromboplasztin reagenst használtak 1:500-as hígításban, melynek összetétele nem volt standardizálva, lényegében szöveti faktor és foszfolipid változó arányú keveréke volt, sőt változó koncentrációban egyéb alvadási faktorokat is tartalmazott. Ennek megfelelően – bár LA-ra kellően szenzitív volt - komoly problémát jelentett a mérések nem megfelelő reprodukálhatósága és gyenge specificitása.^{132,133} Az 1990-es évek elején vált aztán elérhetővé a fenti problémák jelentős részét kiküszöbölő rekombinánt, humán szöveti faktort tartalmazó reagensek új nemzedéke, melynek egyik leggyakrabban használt képviselőjévé a Siemens által gyártott Innovin vált.¹²⁹ Ez már jól meghatározott foszfolipid és szöveti faktor összetétellel rendelkezik, egyéb alvadási faktoroktól pedig teljesen mentes, ezáltal a reagens

minősége a gyártás során nem változik. 1994-ben Arnout és munkatársai bizonyították, hogy az Innovin 1:200 használatával egy 100%-os szenzitivitású és 96%-os specificitású, jól reprodukálható tesztet kapunk kiváló negatív prediktív értékkel, mely a vizsgálatot alkalmassá teszi szűrővizsgálatok végzésére LA irányában.¹²⁹ Azt is kimutatták, hogy a dPT megnyúlik az alvadási faktorok aktivitásának csökkenésével járó állapotokban, különösen ha az az extrinszik alvadási utat érinti. A dPT szűrőtesztként való alkalmazásakor a dPT rátát határozzuk meg a következőképpen: hígított tromboplasztin reagens jelenlétében mérjük a beteg és a kevert kontroll plazma dPT értékét, majd ezek hányadosa szolgáltatja a dPT rátát. A dPT ráta felső határértékét mindig helyileg kell meghatározni megfelelő számú (>40) egészséges egyén mintáinak vizsgálatával; a határértéket 99 percentilisnél határozzuk meg. A gyakorlatban a tromboplasztin többféle hígítását is alkalmazzák, 1:50-től egészen az 1:500-as hígításig.¹²⁸⁻¹³¹

Létrehoztak már integrált dPT tesztet is, mely során a szűrő (kis PL tartalom mellett végzett dPT meghatározás), a megerősítő (nagy PL koncentráció mellett végzett dPT meghatározás) és a keverékes tesztek (a fenti vizsgálatokat a tesztminta és a NPP 1:1 arányával végzik el) egy vizsgálatban megtörténnek.¹³⁴ Egy 2009-ben megjelent tanulmány szerint a dPT mérésén alapuló LA teszt eredménye pontosabb összefüggést mutat egy későbbi thrombosis kialakulásával vagy annak hiányával, mint a dRVVT-n alapuló vizsgálatoké.¹³¹

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) II. számú Belklinikáján, a Thrombosis és Haemostasis Tanszéken 2004-2011 között HIT/T miatt kezelt betegek adatait retrospektív módon értékelve vizsgálni kívántuk az antifoszfolipid antitestek HIT/T-ben való előfordulását és kimutathatóságát.
2. Célunk volt a ritka, egyedi sajátosságokat vagy azok eddig le nem írt társulását mutató és tudományos szempontból is jelentőséggel bíró HIT/T esetek kiemelése és részletes bemutatása, elemzése.
3. In vitro körülmények között vizsgálni kívántuk a HIT/T-ben alkalmazható parenterális antikoaguláns készítmények (lepirudin, danaparoid, argatroban és fondaparinux) valamint az enoxaparin dPT rátára és ezen keresztül a dPT ráta meghatározásán alapuló LA tesztek értékelhetőségére kifejtett hatását.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Betegek és módszerek a HIT/T-ben szenvedő betegek vizsgálata során

Betegek: 2004 és 2011 között a Debreceni Egyetem II. számú Belklinikáján 12 beteget kezeltünk HIT/T miatt. A HIT/T diagnózisát akkor állítottuk fel, ha

1. a thrombocytaszám csökkenés mértéke valamely heparinkészítmény alkalmazása mellett meghaladta a kiindulási érték 50%-át, és
2. a 4T és/vagy HEP érték alapján a klinikai kép elsősorban HIT/T fennálltát valószínűsítette (4T és/vagy HEP érték legalább 5 pont), és
3. az aktuálisan elérhető HIT irányú laboratóriumi tesztek pozitív eredményt adtak.

A 12 beteg közül retrospektív vizsgálat során választottuk ki további analízisre azt a hét beteget, akiknél valamely APA vizsgálata a HIT/T akut szakában, a diagnózis felállítása utáni 10 napon belül, értékelhető módon megtörtént. A hét beteg közül kettő esetében olyan – általunk tudományos szempontból is jelentősnek tartott - adatokat tártunk fel, melyeket további részletes feldolgozásra és ismertetésre is érdemesnek találtunk.

Módszerek:

A retrospektív vizsgálat során tanulmányozott betegek esetében a következő releváns laboratóriumi tesztek kerültek alkalmazásra:

A kvantitatív vérkép vizsgálata Sysmex XE-2100 automatával történt (Sysmex, Kobe, Japán).

A HIT antitesteket kimutató laboratóriumi vizsgálatok nem voltak egységesek, az elérhető módszerek idővel változtak, fejlődtek. Az alábbi módszerek valamelyikét biztosan elvégeztük minden beteg esetében:

HIT irányú immunológiai tesztek:

Partikulált gél immunoassay (PaGIA): a partikulált gél immunoassayt (PaGIA) (DiaMed AG, Cressiers/Morat, Svájc) szűrőtesztként alkalmaztuk minden HIT/T-re gyanús beteg esetében. A vizsgálat során a beteg szérumát (10 µl) egy műanyag cső felső részén elhelyezkedő sephacryl gél felszínére mérik, majd ehhez adják hozzá a piros színű, PF4/heparin komplexszel bevont polystyrene partikulákat (20 µl), a gyártó utasításának megfelelően.⁷¹ Amennyiben HIT antitestek jelen vannak a beteg szérumában, azok hozzákötődnek a partikulák felszínén található PF4/heparin komplexhez és a gyöngyök agglutinációját váltják ki. Az ötperces szobahőn történő inkubálási időt követően centrifugálással különítik el egymástól a pozitív eredményt jelentő agglutinált és a negatív eredményt jelző nem agglutinált partikulákat. Pozitív esetben az agglutinált gyöngyök a gél felszínén vagy a gél belsejében csapdába esnek, így a piros színt a gél felszínén vagy magában a gélben láthatjuk. Negatív eredmény esetén a nem agglutinált partikulák a centrifugálás során a gélen átjutva a cső alján képeznek piros sávot. A teszt tehát pozitív vagy negatív eredménnyel szolgál, és nem ad információt a jelenlevő antitest mennyiségét illetően.

Pozitív PaGIA teszt esetén – amennyiben rendelkezésünkre állt – elvégeztük az alábbi HIT irányú ELISA vizsgálatot és/vagy valamely funkcionális tesztet.

ELISA: az alkalmazott ELISA teszt (Zymutest HIA IgG, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, Franciaország) kizárólag az IgG típusú PF4/heparin elleni HIT ellenanyagokat mutatja ki kecskéből származó, humán-IgG Fc részével reagáló poliklonális antitestek által.

HIT/T irányú funkcionális tesztek:

Heparin-indukálta thrombocyta aggregáció (HTAG): egy thrombocytaaggregációs vizsgálatnak felel meg, melyet Chrono-Log 660 aggregométerben (Havertown, PA), 37 °C-on végzünk. Az egészséges donor és a beteg saját thrombocytadús plazmáját (PRP) külön-külön, párhuzamosan vizsgáltuk. A PRP-t citráttal (3.2%) antikoagulált teljes vér 20 percig tartó centrifugálásával (150g) nyertük. PPP készítéséhez a mintákat 15 percen keresztül

centrifugáltuk (2500g) szobahőn, majd az így nyert plazmát ismételten, további 10 percig centrifugáltuk (10000g). Külön a beteg és külön az egészséges donor PRP-hez (200 µl) a HIT/T-re gyanús betegből származó PPP-t mértünk (200 µl), majd heparin nélkül, 0.3 és 100 NE/ml heparin végkoncentrációkat elérve végeztük el a vizsgálatot. Ezzel párhuzamosan a beteg PPP-t egészséges donor PPP-val helyettesítve is megtörtént a fenti vizsgálat.

Pozitív esetben a betegből származó PPP alkalmazása során thrombocyta-aggregáció következik be a kis koncentrációban jelenlevő heparin esetében, míg heparin hiányában és 100 NE/ml heparin jelenlétében thrombocyta-aggregáció nem alakul ki, ahogy a donor PPP-t tartalmazó minták esetében sem. A tesztnél alkalmazott alvadásgátló típusát az határozta meg, hogy a HIT/T-re gyanús klinikai kép mely heparinkészítmény mellett fejlődött ki.

Áramlási citometria: A Tomer és mtsai szerint végzett áramlási citometria az aktivált thrombocyták fokozott annexin-V kötő képességét mutatja ki.⁶³ A módszer leírása röviden a következő: 10 µl egészséges donor PRP-t inkubálunk 10 µl vizsgálandó, betegből származó plazmával, valamint 0.3 NE/ml koncentrációban jelenlevő heparinnal. A vizsgálatokat külön-külön elvégezzük heparin nélkül és betegből származó plazma nélkül is (negatív kontrollok), valamint 100 NE/ml heparin koncentráció mellett is (a diagnózist megerősítő gátló teszt). Félórás szobahőn történő inkubálást követően 5 µl phycoerythrinrel jelölt, a thrombocyták azonosítását szolgáló, 20-szorosára hígított glikoprotein IIb/IIIa (CD41a) elleni antitestet (P2 clone, Immunotech (AMAC) Co., Westbrook, Maine) és 1 µl direkt fluoreszkáló rekombinánt annexin-V-t (Annexin-V FITC, Beckton Dickinson, San Jose, CA) adunk a rendszerhez. HEPES puffert alkalmazva a thrombocyta szuszpenziót 1:4 arányban hígítjuk, majd áramlási cytometriával (FACScan, Beckton Dickinson) vizsgáljuk a thrombocyták annexin-V kötő képességét. A teszt eredménye akkor pozitív, ha a donor thrombocyták legalább 11%-a aktiválódik és 0.3 NE/ml heparin jelenlétében legalább másfélszer annyi vérlemezke lesz

Annexin-V pozitív mint heparin nélkül, illetve 100 NE/ml heparinkoncentráció mellett (Annexin-V ráta >1,5).

Antifoszfolipid antitestek vizsgálata:

LA vizsgálata: A LA irányú szűrővizsgálatok LA érzékenyített APTI (PTT-LA, Diagnostica Stago, Asnieres, Franciaország) és dPT mérésével történtek a gyártó leírása és a már korábban részletezettek szerint. A dPT mérésénél 1:50 és 1:500 arányú tromboplasztin hígítást alkalmaztunk. A keverékes vizsgálat szintén a PTT-LA használatával történt a vizsgálandó és a kevert normál plazma 1:1 arányú összemérését követően. A keveréken mért APTI eredményét akkor tekintettük inkorrigábilisnak, tehát gátlótest jelenlétét valószínűnek, ha a NPP APTI-jéhez viszonyítva több mint 5 másodperccel hosszabb értéket kaptunk. Megerősítő vizsgálatra hexagonális foszfolipid tesztet (StacLOT LA, Diagnostica Stago) alkalmaztunk a gyártó leírása szerint. Utóbbi során a vizsgálandó plazmát 37 °C-on inkubáltuk párhuzamosan hexagonális foszfatidil-ethanolammal (HPE) és nélküle, csak pufferrel. Ezt követően APTI meghatározást végeztünk mindkét minta esetében a PTT-LA használatával. LA jelenlétére utal, ha a HPE jelenlétében mért APTI legalább 8 másodperccel rövidebb a HPE nélküli méréshez képest.

aCL és anti-β2GPI antitestek vizsgálata: Az aCL vizsgálata ELISA technikával történt a gyártó leírása szerint (Quanta Lite™ ACA IgG III, IgM III, INOVA Diagnostics Inc. San Diego, CA), ahogyan az anti-β2GPI detektálása is (Quanta Lite™ β2 GPI IgG, IgM, INOVA Diagnostics Inc.).

4.2 Betegek és módszerek a HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin dPT mérésen alapuló LA tesztekre kifejtett hatásának vizsgálata során

Kontroll (LA negatív) minták: Egészséges egyénektől (25 fő) - tájékoztatásuk és írásos beleegyezésük után – perifériás vénás vérvétel történt. Az önkéntes véradók egyéni és családi anamnézisében nem szerepelt sem vérzékenység, sem thromboticus megbetegedés, illetve előzőleg nem szedtek semmilyen antikoaguláns hatású készítményt vagy nem szteroid gyulladáscsökkentőt.

LA pozitív minták: Előzőleg már igazolt, LA-val rendelkező, de antikoaguláns kezelésben nem részesülő egyének plazma mintái szolgáltak LA pozitív mintaként a vizsgálat során. A LA jelenlétének kimondása a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) nemzetközileg elfogadott és standardizált ajánlásai szerint történt.^{91,92,127}

A LA negatív és LA pozitív egyének thrombocytaszegény plazmáit használtuk fel a továbbiakban a vizsgálni kívánt antikoagulánsok dPT-re és dPT rátára kifejtett hatásának értékeléséhez, ahogy azt az alábbiakban részletezzük.

Vérvétel és mintakezelés: A vérminták levétele 5 ml-es, 0.5 ml 3.2%-os nátrium-citrátot tartalmazó csövekbe (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) történt. PPP előállításához a mintákat 15 percen keresztül centrifugáltuk (2500g) szobahőn, majd az így nyert plazmát ismételten, további 10 percig centrifugáltuk (10000g), hogy a thrombocytaszámot 10 G/l alá csökkentsük. Kevert normál plazmát legalább 20 egészséges véradóból származó PPP azonos térfogatban történő keveréséből nyertünk. Kevert normál plazmát használtunk a DTI-k terápiás koncentrációinak meghatározásához és a tromboplasztin reagens különböző hígításainak dPT rátára kifejtett hatásának vizsgálatához.

Antikoaguláns szerek: A vizsgálatához a lepirudint (50 mg Refludan; Celgene Europe Ltd., Egyesült Királyság) és az argatrobant (250 mg/2.5 mL Argatra; Mitsubishi Pharma

Deutschland GmbH, Düsseldorf, Németország) tartalmazó oldatokat a gyártó utasításai szerint készítettük el. Az előretöltött fecskendőkben található fondaparinux (2.5 mg/0.5 mL Arixtra; GlaxoSmithKline, Greenford, Egyesült Királyság), enoxaparin (10 000 anti-Xa units/mL Clexane; Sanofi Aventis, Budapest, Magyarország) és danaparoid (750 anti-Xa units/0.6 mL Orgaran; Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ) oldatok nem igényeltek további előkészítést. Minden készítményt fiziológiás sóoldattal hígítottunk.

In vitro kísérleteink során a továbbiakban ezen alvadásgátló készítmények emelkedő végkoncentrációit alkalmaztuk a következő felső határokkal: 4.0 µg/mL a DTI-k, 3.0 µg/mL a fondaparinux és 1.2 anti-Xa NE/ml az enoxaparin és danaparoid esetében.

A FXa-inhibitorokat tartalmazó mintákat heparináz (Hepzym, Siemens) hiányában és jelenlétében is vizsgáltuk. A heparinázt 125 NE/ml végkoncentrációban alkalmaztuk az antikoaguláns készítmények hatásának felfüggesztése céljából.

Koagulációs tesztek: A PI és APTI vizsgálatához Innovin és Pathromtin SL (Siemens) reagenseket alkalmaztunk. A vizsgálatok automata koagulométerrel (BCS-XP, Siemens) történtek.

A FXa-inhibitorok koncentrációinak meghatározásához anti-Xa tesztet (Berichrom Heparin, Siemens) használtunk, mely a mesterségesen hozzáadott antitrombin révén kivédi a vizsgálandó mintákban esetlegesen fennálló alacsony antitrombin koncentráció által okozott alámérést.

LMWH kalibrátort (Siemens) használtunk az enoxaparin és a danaparoid, illetve fondaparinux kalibrátort (Diagnostics Stago) a fondaparinux koncentrációjának meghatározásához.

A hígított protrombin időt BCS-XP koagulométerrel mértük az Innovin reagens különböző hígításai mellett (1:50, 1:100, 1:200, 1:500; a reagens hígítása fiziológiás sóoldattal történt), a korábbi leírásoknak megfelelően.¹²⁹ A mérés során 50 µl PPP-hez 50 µl, a célnak megfelelő

mértékben hígított Innovin reagenst adtunk és 300 másodpercig 37 °C-on inkubáltuk. Az alvadás folyamatát és a dPT mérését 50 µl 20 mmol/l koncentrációjú CaCl₂ hozzáadásával indítottuk el. Minden mérést párhuzamosan, ugyanolyan körülmények között legalább kétszer elvégeztünk, majd ezek átlagával számoltunk a továbbiakban.

LA jelenlétének szűréséhez a vizsgált plazma és a NPP hígított protrombin idejének hányadosaként számított dPT rátát használtuk. Előzetes vizsgálatok alapján - ROC görbe analízissel - a dPT ráta felső határértékeként 1.2 került megállapításra. A dPT ráta 1.2 fölötti értéke LA jelenléte mellett szól.

Statisztika: A dPT ráta és a gyógyszer koncentrációk valamint az alvadási idők közötti kapcsolatot lineáris regressziós modell segítségével értékeltük és a Pearson-féle korrelációs együttható számításával fejeztük ki. Statisztikailag $p < 0.05$ értékeknél tekintettük a kapcsolatot szignifikánsnak.

A statisztikai analízishez a GraphPad Prism 4 softwaret (GraphPad Software, San Diego, CA) használtuk.

A vizsgálatot a DEOEC Etikai Bizottsága engedélyezte.

5. EREDMÉNYEK

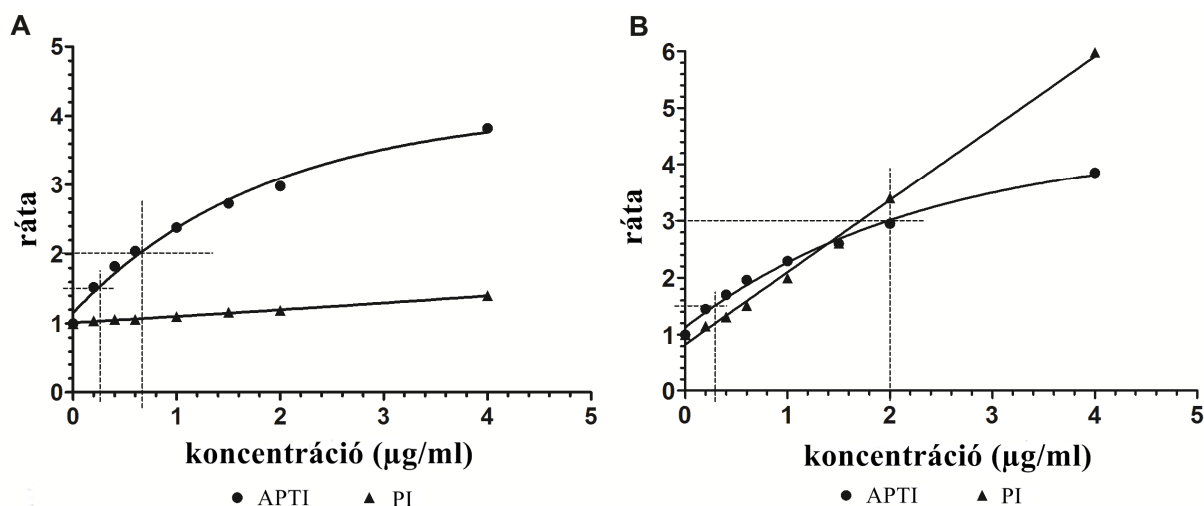
A 2004-2011 közötti időszakban 12 HIT/T-ben szenvedő beteget kezeltünk klinikánkon. Közülük 10 betegnél történt meg valamely APA (aCL, anti- β 2GPI és/vagy LA) vizsgálata és nyolc esetben bizonyult ezek közül legalább egy APA pozitívnak. Négy betegnél csak LA irányú – pozitív eredményt adó - laboratóriumi teszt történt, akik közül hárman lepirudin terápiában részesültek. Utóbbi készítményről tudott, hogy zavarja az APTI és a dRVVT mérésén alapuló LA irányú tesztek értékelhetőségét,¹³⁵ a dPT-re kifejtett hatása viszont nem volt ismert, ezért – a betegek adatainak további értékelése előtt - megvizsgáltuk a HIT/T-ben alkalmazható alternatív antikoaguláns készítmények dPT mérésén alapuló LA tesztekre kifejtett hatását.

5.1 A HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin dPT mérésén alapuló LA tesztekre kifejtett hatása¹³⁶

A direkt trombin inhibitorok terápiás koncentrációi és hatásai a rutin alvadási tesztekre

Az argatroban és a lepirudint külön-külön kevert normál plazmához adva 0 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.6 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 1.5 μ g/ml, 2.0 μ g/ml és 4.0 μ g/ml végkoncentrációkkal történtek vizsgálatok, mely során az APTI és PI mérésével dózis-hatás görbéket készítettünk. A lepirudin és az argatroban APTI-re kifejtett hatása hasonló lefutású telítési görbét mutat (3. ábra). Lepirudin esetében az alap APTI 1.5-2-szeres megnyúlását tekintjük terápiás hatásúnak,²⁰ melyet vizsgálatainkban a 0.26–0.67 μ g/ml közötti koncentrációtartományban sikerült elérni (3/A ábra). A lepirudint emelkedő koncentrációkban alkalmazva a PI/INR nem mutatott jelentős változást. Az argatroban kezelés során a kontroll APTI 1.5-3-szoros értékét kell elérni a terápiás hatáshoz,²⁰ mely az általunk készített dózis-hatás görbe alapján 0.3-2.0

$\mu\text{g/ml}$ koncentrációtartományak felel meg (3/B ábra). Argatroban esetében a PI kifejezett, jól mérhető megnyúlását észleltük.



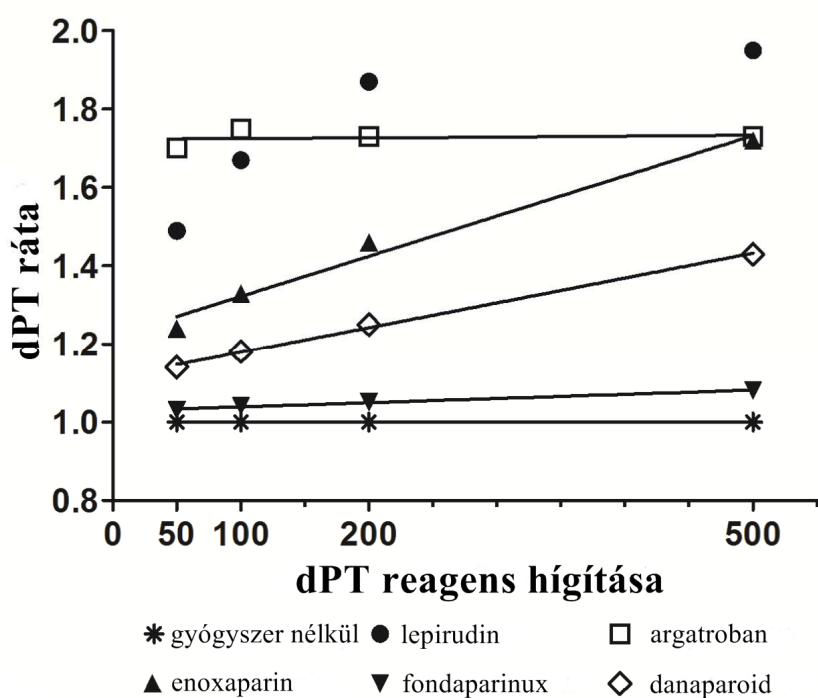
3. ábra: A lepirudin (A) és argatroban (B) hatása az APTI és PI rátákra kevert normál plazmában vizsgálva.

A szaggatott vonalak a különböző alvadásgátló készítmények terápiás koncentrációinak felső és alsó határát mutatják.

A tromboplasztin reagens hígításának hatása a dPT-re és a dPT rátára

Mivel a különböző laboratóriumok a reagens eltérő koncentrációit alkalmazhatják a dPT mérése során, elsőként a tromboplasztin 1:50, 1:100, 1:200 és 1:500 arányú hígításának dPT-re kifejtett hatását vizsgáltuk kevert normál plazmát és a vizsgált gyógyszerek előre meghatározott koncentrációit alkalmazva (DTI-k és fondaparinux esetében $0 \mu\text{g/ml}$, $0.2 \mu\text{g/ml}$, $0.4 \mu\text{g/ml}$, $0.6 \mu\text{g/ml}$, $1.0 \mu\text{g/ml}$; enoxaparin és danaparoid esetében 0 anti-Xa NE/ml , $0.2 \text{ anti-Xa NE/ml}$, $0.4 \text{ anti-Xa NE/ml}$, $0.6 \text{ anti-Xa NE/ml}$, $1.0 \text{ anti-Xa NE/ml}$). A dPT ráta és az Innovin reagens hígításának mértéke között – a lepirudin kivételével – lineáris kapcsolatot találtunk (4. ábra). A tromboplasztin hígítási arányát növelve tehát a dPT és a dPT

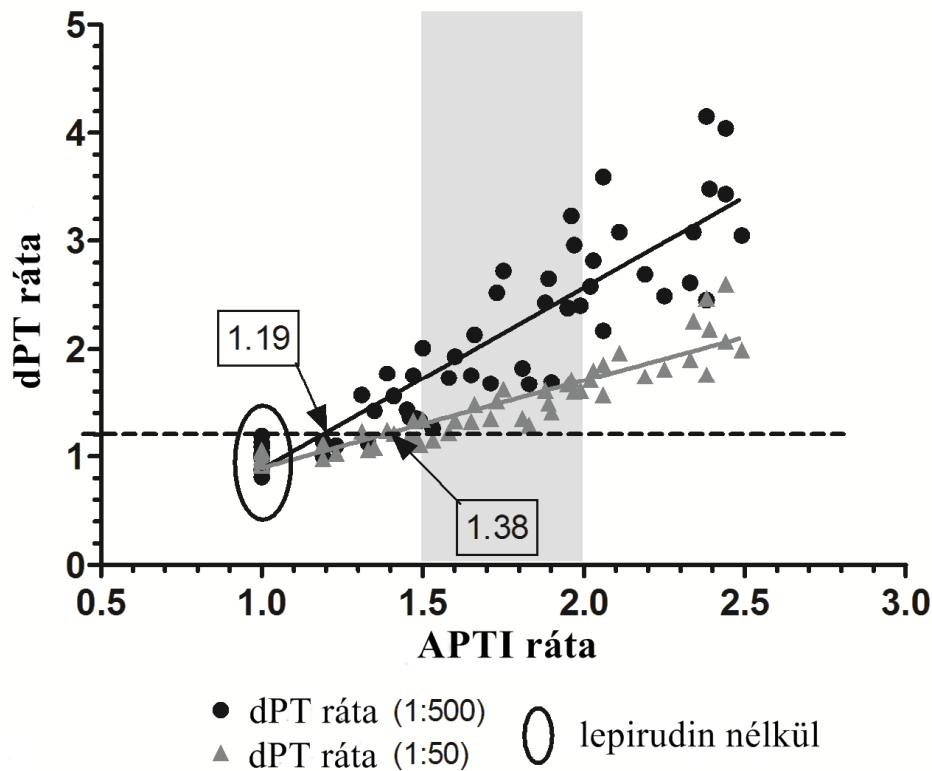
ráta is fokozatos emelkedést mutatott a vizsgált antikoagulánsok esetében. Egyedül az argatroban mutatott a reagens egy adott hígításánál közel állandó, de a gyógyszer koncentrációjától függően változó mértékben emelkedett dPT rátát. Ahogy azt már fentebb említettük, a lepirudin alkalmazott koncentrációi mellett nem lineáris, hanem telítési görbét kaptunk. A tromboplasztin reagens hígításának dPT rátára kifejtett hatása egyébként annál kifejezettebb volt, minél nagyobb volt az alkalmazott gyógyszerkoncentráció. Mivel igazoltuk, hogy a reagens hígításával a dPT ráta is növekvő tendenciát mutat, a továbbiakban két kifejezetten eltérő, egy kis és egy nagy hígítású reagenssel (1:50 és 1:500) végeztünk kísérleteket, hogy lefedjük a gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott tromboplasztin koncentrációkat.



4. ábra: A tromboplasztin reagens hígításának hatása a dPT rátára kevert normál plazmával vizsgálva a különböző antikoagulánsok jelenlétében (0.4 µg/ml a DTI-k és a fondaparinux, 0.4 NE/ml anti-Xa az enoxaparin és a danaparoid esetében) és azok hiányában

Direkt trombin inhibitorok hatása a dPT rátára LA negatív mintákban

A DTI-k hatására a dPT ráta jelentősen, koncentrációfüggő módon emelkedett. Mivel a DTI-k hatását a gyakorlatban leggyakrabban az APTI mérésével monitorozzuk, a DTI-k adott koncentrációi által a dPT rátában okozott változás és az APTI megnyúlás közötti kapcsolatot is vizsgáltuk, hogy eredményeink a gyakorlatban is hasznosíthatóak legyenek. Egészséges, LA negatív donorok PPP mintáit vizsgálva a klinikai gyakorlatban előforduló lepirudin koncentrációk alkalmazása mellett a dPT ráta lineáris emelkedését találtuk a növekvő APTI ráta függvényében (1:50 hígítású tromboplasztin reagens: $r=0.9259$, $p<0.0001$; 1:500 hígításnál: $r=0.9012$, $p<0.0001$). Az 1:500 hígítású reagens esetében 1.19-es ($0.03 \mu\text{g/ml}$ lepirudin), míg az 1:50 hígítású reagensnél 1.38-as ($0.15 \mu\text{g/ml}$ lepirudin) APTI rátánál értük el az 1.2-es dPT ráta határértéket (5. ábra). Adataink alapján tehát a dPT ráta már a terápiás tartomány alatti lepirudin koncentrációk mellett is meghaladja az 1.2-es határértéket. Argatroban esetében szintén a terápiás tartomány alatt, már a tanulmányban alkalmazott legkisebb, 1.4-es APTI rátát eredményező gyógyszerkoncentráció ($0.2 \mu\text{g/ml}$) mellett is álpozitivitást észleltünk a dPT rátán alapuló LA teszt során mind az 1:500, mind az 1:50 Innovin hígításnál.



5. ábra: A dPT ráta alakulása az APTI ráta függvényében különböző koncentrációban (0-1.2 µg/ml) alkalmazott lepirudin mellett egészséges, LA negatív egyének mintáiban

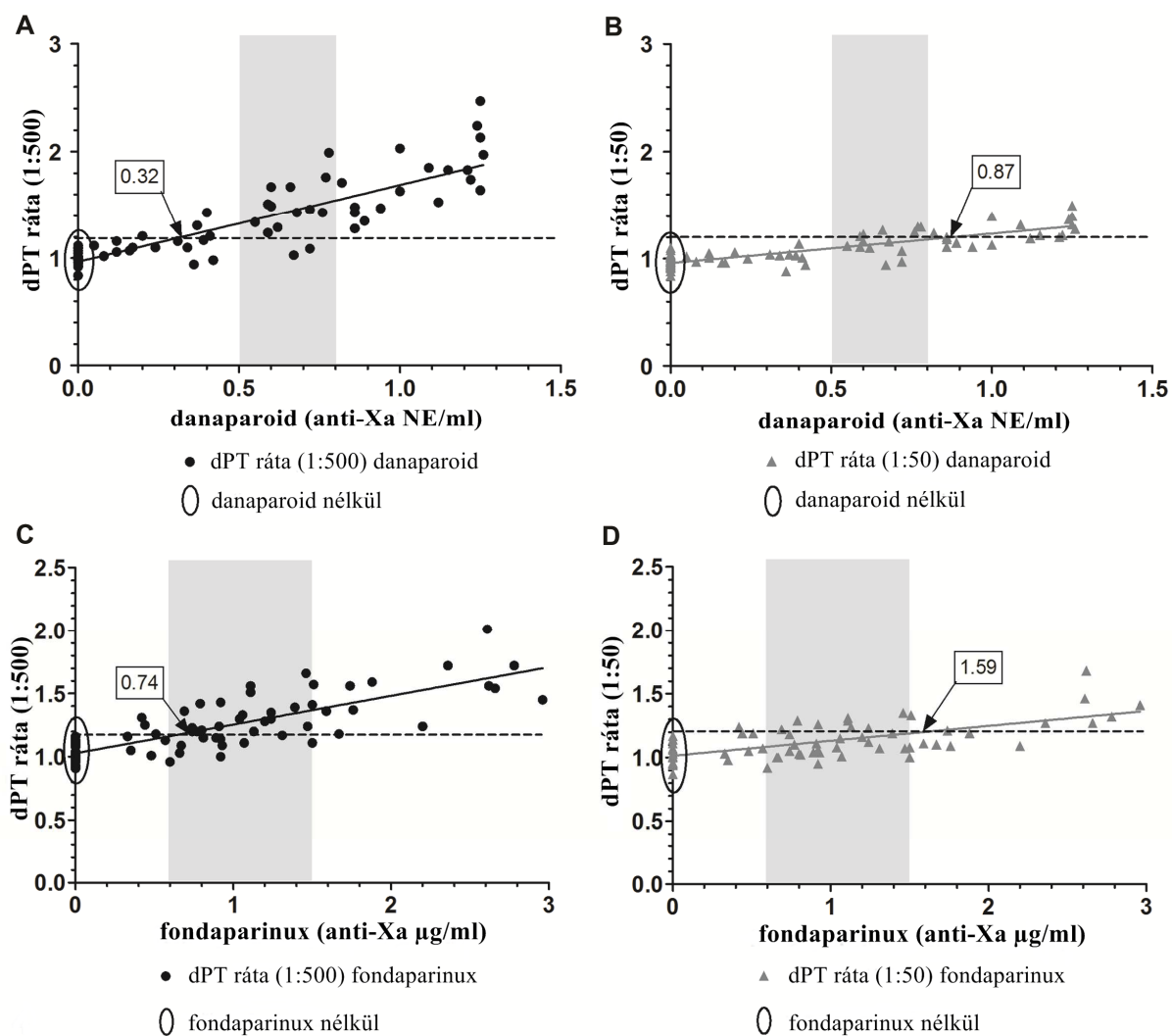
A vízszintes szaggatott vonal a dPT ráta felső határértékét jelzi. A szürke zóna a lepirudin terápiás tartományának felel meg. A keretbe foglalt számok azokat a lepirudin jelenlétében elért APTI rátákat jelzik, amelyeknél elérjük a dPT ráta felső határértékét (1.2).

Faktor Xa inhibitorok hatása a dPT rátára LA negatív mintákban

A dPT ráta az anti-Xa aktivitás függvényében lineárisan emelkedik minden vizsgált FXa inhibitor esetében (1:500 tromboplasztin hígítás esetén: enoxaparin, $r=0.9633$, $p<0.0001$; danaparoid, $r=0.8704$, $p<0.0001$; fondaparinux, $r=0.7877$, $p<0.0001$; 1:50 tromboplasztin hígítás esetén: enoxaparin, $r=0.9425$, $p<0.0001$; danaparoid, $r=0.8339$, $p<0.0001$; fondaparinux, $r=0.6511$, $p<0.0001$), habár az illesztett egyenesek meredeksége eltérő volt a különböző készítményeknél (6. és 7. ábra). Az illesztett egyenesek egyenletéből számítva

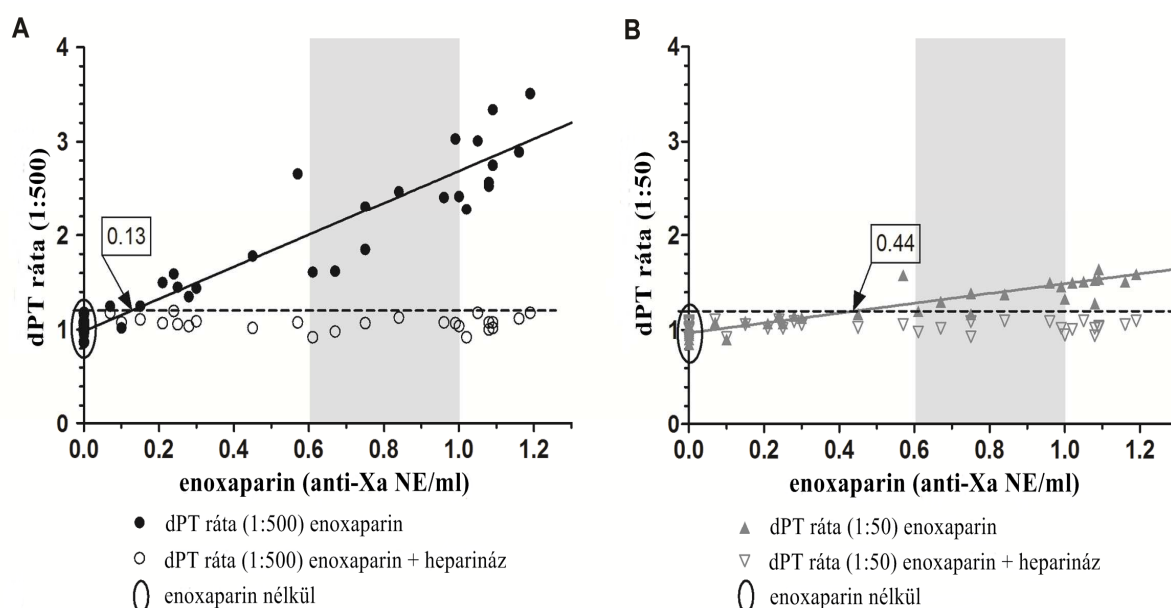
1:500 hígítású Innovin reagens esetében a következő anti-Xa értékeknél érték el a dPT ráta 1.2-es határértékét: enoxaparin, 0.13 NE/ml; danaparoid, 0.32 NE/ml; fondaparinux, 0.74 µg/ml. Ugyanezek az értékek 1:50 hígítású reagens esetében: enoxaparin, 0.44 NE/ml; danaparoid, 0.87 NE/ml; fondaparinux, 1.59 µg/ml.

Heparináz hozzáadásával a fondaparinux és az enoxaparin alvadásgátló hatása csaknem teljesen felfüggeszthető volt az alkalmazott gyógyszer-koncentrációk mellett, 0.15 µg/ml illetve 0.15 NE/ml anti-Xa aktivitás alatti értékeket eredményezve. Ezzel szemben a danaparoid hatását csak 0.9 NE/ml aktivitásig volt képes az alkalmazott mennyiségű heparináz hatástalanítani. Ennek ellenére a heparináz alkalmazásával csak az enoxaparint tartalmazó minták dPT ráta értéke csökkent a kiindulási, gyógyszer nélkül mért szintekre (7. ábra). A dPT ráta értéke heparináz hatására a fondaparinux és danaparoid esetében is csökkent ugyan, de szignifikáns mértékben emelkedett maradt, így ezen gyógyszerek dPT rátán alapuló LA tesztre kifejtett álpozitivitást okozó hatását a heparináz nem tudta felfüggeszteni (a heparináz tartalmú minták eredményei nem kerültek ábrázolásra az ábrák átláthatósága érdekében).



6. ábra: A dPT ráta alakulása az anti-Xa aktivitás függvényében különböző koncentrációban alkalmazott danaparoid vagy fondaparinux mellett egészséges, LA negatív egyének mintáiban

A vízszintes szaggatott vonal a dPT ráta felső határértékét jelzi. A szürke zóna a készítmények terápiás tartományának felel meg. A keretbe foglalt számok azokat az anti-Xa aktivitásokat jelzik, amelyeknél elérjük a dPT ráta felső határértékét (1.2) danaparoid vagy fondaparinux jelenlétében.



7. ábra: A dPT ráta alakulása az anti-Xa aktivitás függvényében különböző koncentrációban alkalmazott enoxaparin mellett egészséges, LA negatív egyének mintáiban

A vízszintes szaggatott vonal a dPT ráta felső határértékét jelzi. A szürke zóna a készítmény terápiás tartományának felel meg. A keretbe foglalt számok azokat az anti-Xa aktivitásokat jelzik, amelyeknél elérjük a dPT ráta felső határértékét (1.2) enoxaparin jelenlétében.

Habár heparináz hatására az anti-Xa értékek 0.15 NE/ml alá csökkennek, a heparinázt tartalmazó és heparináz nélküli minták párokként kerültek ábrázolásra. Minden üres kör és háromszög a különböző koncentrációban alkalmazott enoxaparint tartalmazó minták heparinázzal kezelt párjainak felelnek meg.

Antikoagulánsok hatása a dPT-re és dPT rátára LA pozitív mintákban

LA pozitív PPP mintákban a dPT ráta további emelkedést mutatott minden vizsgált antikoaguláns jelenlétében. A heparináz a LA pozitív plazmák esetében is csak az enoxaparint tartalmazó mintákban csökkentette a dPT ráta értékét a kiindulási szintre, de álnegatív értékeket nem eredményezett.

5.2 HIT/T-ben szenvedő betegek retrospektív vizsgálata

A további vizsgálatokból – részben az előzőekben ismertetett eredmények birtokában - kizártuk azokat a betegeket, akiknél nem történt APA irányú vizsgálat (2/12), vagy csak a LA értékelését végezték el DTI, danaparoid vagy fondaparinux terápia mellett (3/12). Az 5. táblázatban kerültek összefoglalásra a további vizsgálatra alkalmas betegek adatai.

Beteg	Kor (év), nem	HIT/T klinikai megnyilvánulása	HIT (eredmény)	4T/ HEP pont	APA típusa
P1	76, férfi	heparin bőrnekrozis, MVT, vénás végtagi gangréna	PaGIA (-) ELISA (-) HTAG (+)	6/11	aCL IgG + IgM, LA (enoxaparin, heparináz mellett)
P2	64, nő	heparin bőrnekrozis, MVT, vénás végtagi gangréna	ELISA (+) áramlási citometria (+)	5/6	aCL IgG + IgM, LA (lepirudin mellett)
P3	80, férfi	MVT, vénás végtagi gangréna	PaGIA (+) HTAG (+)	7/14	aCL IgM, LA (danaparoid mellett)
P4	87, nő	ischaemiás stroke	PaGIA (+) HTAG (+)	7/9	aCL IgM, anti- β2GPI IgM, LA (enoxaparin, heparináz mellett)
P5	66, nő	MVT + PE	PaGIA (+) HTAG (+)	5/6	Negatív (enoxaparin, heparináz mellett)
P6	80, nő	MVT	PaGIA (+) HTAG (+)	6/8	Negatív (enoxaparin, heparináz mellett)
P7	74, férfi	csak HIT	PaGIA (+) HTAG (+)	5/8	LA (terápia nélkül)

5. táblázat: A 2004-2011 között HIT/T diagnózissal klinikánkon kezelt betegek adatai

Az APAk közül vastagon szedve szerepelnek az egyértelműen pozitív eredmények, tehát a magas titerben mérhető antitestek és a LA jelenléte, ha az utóbbit célzó laboratóriumi vizsgálat értékelhető volt.

A vizsgálatra alkalmas betegcsoport elsősorban súlyos artériás (1/7) vagy vénás (5/7) thrombosissal társult HIT (6/7) eseteket foglalt magában és mindössze egy betegnél észleltünk izolált thrombocytopeniát a HIT klinikai megnyilvánulásaként. Három betegnél

fordult elő vénás végtagi gangréna. A hét betegből négy esetében egyértelműen bizonyítható volt legalább egyféle APA (anti- β 2GPI vagy aCL antitest magas titerben, illetve LA) jelenléte, két beteg esetében APA biztosan nem volt kimutatható, egy betegnél (P3) pedig az aCL IgM detektálható volt ugyan, de csak a magas titert kijelölő határérték közvetlen közelében. A négy APA-tel rendelkező betegből háromnál lehetett nagy valószínűséggel és megbízhatóan igazolni LA jelenlétét, melyhez egy esetben (P1) magas titerben aCL IgM, egy másik esetben (P4) alacsony titerű aCL IgM és anti- β 2GPI IgM antitestek társultak. A harmadik LA pozitív betegnél egyéb APA vizsgálat nem történt. A negyedik APA-tel rendelkező betegnél (P2) magas titerben IgG típusú aCL antitest került kimutatásra. A P2 és P3 betegnél végzett LA irányú vizsgálatok eredményét nem fogadtuk el, az értékelhetőséget zavarta ugyanis az alkalmazott lepirudin vagy danaparoid terápia. Hangsúlyozzuk, hogy az esetek nagy részében nem volt minden APA vizsgálva, leginkább az anti- β 2GPI vizsgálata maradt el (mindössze két esetben történt meg). A vizsgálat természetéből adódóan - retrospektív vizsgálat lévén – nem volt módunk az észlelt hiányosságok pótlására.

Két – alább részletesen is tárgyalt és jól dokumentált – beteg esete azonban kiemelt figyelmet érdemel. Náluk az APAk 3 hónap múlva már nem voltak kimutathatóak, így az APS diagnózisa kizárható volt. A többi betegnél az APAk ismételt vizsgálata nem történhetett meg, mert két beteg a HITT akut szakában hunyt el (P3, P4), egy beteg (P7) nem jelentkezett kontroll vizsgálatra, további két betegnél pedig már az első vizsgálatnál sem volt APA kimutatható.

Esetismertetés (P1)

A 76 éves férfi beteget traumás bal oldali combnyaktörés miatt operálták. Műtét előtt thrombocytaszáma 160 G/l volt. Hat órával a műtétet követően napi 1x60 mg enoxaparin indult szubkután, profilaxis céljából. A műtét utáni negyedik napon – tekintettel az előzményi adatokban szereplő visszatérő alsó végtagi mélyvéna thrombosisokra és a műtét előtti tartós

orális antikoaguláns kezelésre – LMWH védelemben az acenokumarin visszaállítását is elkezdtek. Nyolc nappal a műtét után bal alsó végtagi fájdalom és ödéma alakult ki, majd 24-36 óra alatt végtagi gangréna fejlődött ki a terápiás INR és normál tartományban mérhető vérlemezkeszám ellenére (INR: 2.9; thrombocytaszám: 150 G/l) (8/A ábra). Color-doppler vizsgálat akut, proximális mélyvéna thrombosit igazolt, tökéletesen megtartott artériás keringés mellett. A háttérben a kumarin kezeléshez társuló szövődményt – kumarin-indukálta bőrnekrozist – feltételeztek, ezért az acenokumarint elhagyták, K-vitamint alkalmaztak és az enoxaparin adagját terápiás szintre (2x60 mg/nap sc.) emelték. A műtét utáni 12. napon történt laboratóriumi vizsgálat során 51 G/l vérlemezkeszámot mértek, majd a beteg átvételre került klinikánkra. Habár a klinikai kép megfelelt HITT-nek, sem a PaGIA, sem az ELISA vizsgálat nem igazolta PF4/heparin elleni antitest jelenlétét, miközben LA, valamint kis titerben IgG és nagy titerben IgM típusú aCL antitest került kimutatásra. Ismerve a HIT/T irányában végzett immunológiai tesztek magas szenzitivitását és kiváló negatív prediktív értékét, a laboratóriumi adatokra támaszkodva folytattuk a terápiás dózisban alkalmazott enoxaparin kezelést. A műtétet követő 14. napon az enoxaparin injekció beadási helyén bőrnekrozis alakult ki (8/B ábra), bár az ismételten elvégzett PaGIA vizsgálat negatív eredménye továbbra is a PF4/heparin antitestek hiányát támogatta. Az ekkor elvégzett HTAG vizsgálat azonban az enoxaparin kis koncentrációja mellett (0.3 és 0.5 NE/ml) pozitívnak bizonyult, támogatva a HITT és annak szövődményeként kialakult kumarin-indukálta vénás végtagi gangréna diagnózisát. Az enoxaparin helyett rekombinált hirudinnal folytatva az alvadásgátló kezelést a HITT klinikai tünetei egyértelmű javulást mutattak, a vérlemezkeszám emelkedésnek indult, majd normalizálódott. A vénás végtagi gangréna és heparin okozta bőrnekrozis miatt több műtét, debridement, bőrátültetés, plasztikai sebészeti beavatkozás történt, melyek eredményeként végül csak a bal I. és V. lábujjak eltávolítására volt szükség, a sebek pedig jó eredménnyel gyógyultak. Az első vizsgálat után 3 hónapon belül elvégzett

ismételt vizsgálat APA-t már nem mutatott ki. Hirudin védelemben acenokumarin kezelés került beállításra szövődménymentesen.⁴⁰



8. ábra: A heparin-indukálta thrombocytopenia ritka szövődményei

8/A ábra: Kumarin okozta vénás végtagi gangréna

8/B ábra: Heparin okozta bőrnekrozis az enoxaparin injekciók beadási helyén

Esetismertetés (P2)

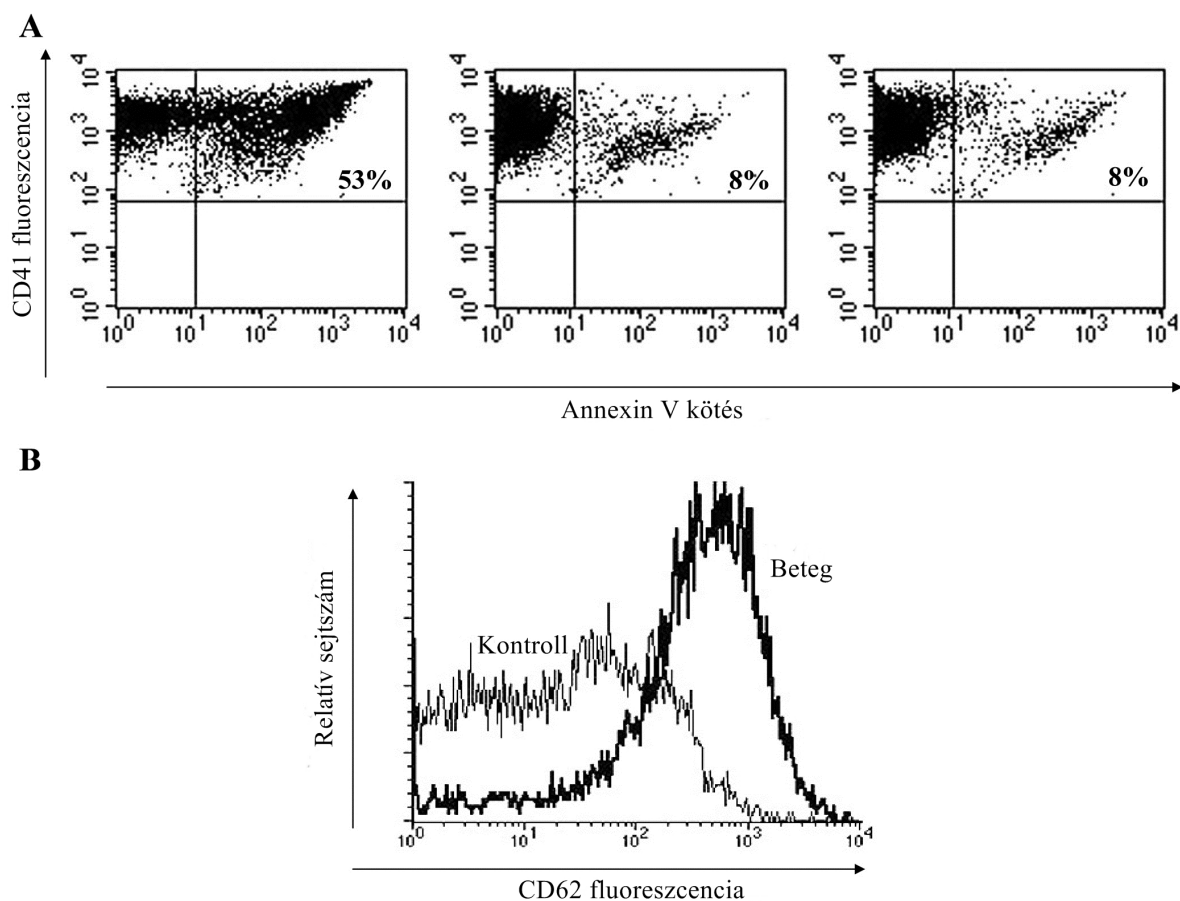
A 64 éves nőbeteg felvételére 6 napja fennálló lázas állapot miatt került sor a lakóhely szerint illetékes fekvőbeteg intézménybe. Anamnézisében 6 éve ismert polycythaemia vera (PV) szerepelt, melyhez sem vérzés, sem thrombosis nem társult ez idő alatt. Napi 500 mg hydroxyurea mellett vércépében érdemi eltérés nem mutatkozott. Felvételekor szisztémás gyulladásra utaló fizikális jeleket (láz, tachycardia) észleltek emelkedett C-reaktív protein szinttel. A hemokultúra - három egymást követő mintában - methicillin-rezisztens *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) jelenlétét igazolta. Habár a szepszis forrására nem derült fény, célzott antibiotikum terápia (napi 100 mg doxycyclin per os és 1000 mg amikacin iv.) alkalmazása mellett állapota rendeződött, szepszise megszűnt. Kezelése során a beteg heparin készítményt semmilyen formában nem kapott. Centrális vénás kanül beültetésére nem került

sor, a perifériás vénás katéter pedig minden alkalommal fiziológias sóoldattal került lezárásra. Kórházi kezelése során a beteg vérlemezkeszámát 228 és 314 G/l között mérték, mely elbocsátásakor, 12 napi kezelés után, 259 G/l volt. Öt nappal később háziorvosa profilaxis céljából napi 1x40 mg enoxaparin indított szubkután a bal láb enyhe fájdalma miatt, bár mélyvéna thrombosisra utaló fizikális jelek nem voltak. A beteg ekkor kapott először heparinkészítményt, majd 36 órával később, két szubkután adott enoxaparin inj. után, thrombocytopenia miatt (86 G/l) került felvételre klinkánkra, infekcióra utaló klinikai jelek nélkül. Felvételekor mindkét váll területén - az enoxaparin injekciók beadási helyein - erythemás környezetben bőrnekrozist (9/A ábra), valamint a bal felső és alsó végtagok fájdalmas duzzanatát és a bal kéz és lábfej livid elszíneződését észleltük. Ezt követően, 24 órán belül a bal oldali végtagok distalis részein proximalis irányba terjedő végtagi gangréna alakult ki (9/B és C ábra). A color-doppler vizsgálat a bal vena femoralis, poplitea, brachialis, axillaris és subclavia akut thrombosisát írta le, a végtagok tökéletes artériás keringése mellett. A közben elvégzett laboratóriumi vizsgálatok magas titerben aCL IgG-t (Quanta Lite™ ACA IgG III, IgM III, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, USA) igazoltak, a HIT/T mellett felvetve APS gyanúját. LA és anti-β2GPI (Quanta Lite™ β2GPI IgG, IgM, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, USA) nem volt kimutatható. A PF4/heparin elleni antitestek laboratóriumi vizsgálata előtt elvégzett értékelés a 4T (5 pont) és a HEP modell (6 pont) szerint is valószínűsítette a HITT fennálltát. A HIT antitesteket kimutató PaGIA vizsgálat (DiaMed AG, Cressiers/Morat, Svájc) egyértelműen pozitív eredményt adott. Ezután – 48 órával az első enoxaparin injekció beadását követően, a klinikai felvételnél levett mintából - HIT irányában ELISA (Zymutest HIA IgG, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, Franciaország) és funkcionális tesztek is végeztünk. Az ELISA teszt eredménye erősen pozitívnak (2.89 OD egység, határérték: 0.5) bizonyult, bizonyítván a nagy mennyiségű IgG típusú HIT antitest jelenlétét. A HITT diagnózisa további megerősítést nyert az áramlási

citometriai vizsgálatok (annexin V-kötés, P-selectin, mikropartikulák kimutatása és mérése) során (10. ábra). Az egészséges donor vérlemezkék 53%-a aktiválódott 0.3 NE/ml heparin jelenlétében, míg heparin nélkül és 100 NE/ml heparin jelenlétében mindössze 8%-a. A P-selectin - mint általános thrombocytaaktivációs marker – expressziója szintén jelentősen megemelkedett a vérlemezkék felszínén a heparin farmakológiai koncentrációja mellett. A klinikai kép és a laboratóriumi vizsgálatok thrombosiszal, vénás végtagi gangrénával és heparin okozta bőrnekrozissal társuló rapid-HITT-nek felelt meg annak ellenére, hogy a beteg előzetesen heparinkészítményt nem kapott, a felvétele előtt alkalmazott két injekció kivételével. Az enoxaparin azonnali elhagyását követően rekombinált hirudin kezelés indult, mely az APTI 1.5-2.5-szeres megnyúlását eredményezte. Annak ellenére, hogy a heparin elhagyása után 48 órával a thrombocytaszám már a referencia tartományban volt mérhető (196 G/l), a vénás végtagi gangréna a bal kéz és a bal láb amputációját tette szükségessé. Ezt követően rekombinált hirudin védelemben acenokumarin terápia került sikeresen beállításra, és elindult a beteg rehabilitációs kezelése. Három hónappal az első vizsgálatot követően APA már nem volt kimutatható, így az APS diagnózisa kizárható volt.¹³⁷



9. ábra: Heparin-indukálta bőrnekrozis az enoxaparin beadási helyén a bal felkaron (A), valamint vénás végtagi gangréna a bal felső (B) és a bal alsó végtagon (C).



10. ábra: Funkcionális HIT teszt áramlási citometria alkalmazásával.

10/A ábra: A betegből származó PPP-t inkubáltuk az egészséges donor PRP-vel kis (0.3 NE/ml - bal oldali panel) és nagy mennyiségű (100 NE/ml - középső panel) heparin jelenlétében, illetve heparin nélkül (jobb oldali panel). Thrombocytaaktiváció csak a heparin farmakológiai koncentrációja (0.3 NE/ml) mellett volt kimutatható (a donor thrombocyták 53%-a volt Annexin V pozitív, szemben a többi esetben észlelt 8%-kal).

10/B ábra: Az egészséges donor thrombocyták felszínén expresszált P-selectin (CD62) mennyisége beteg vagy kontroll PPP és 0.3 NE/ml heparin jelenlétében. A beteg PPP-vel történt inkubációt követően észlelt jelentősen emelkedett P-selectin expresszió az intenzív thrombocytaaktivációt jelzi.

6. MEGBESZÉLÉS

A 2004-2011 között HIT/T diagnózissal kezelt betegeinknél retrospektív vizsgálat során nagy arányban észleltük valamely APA - de különösen az aCL és a LA - jelenlétét. A HITT klinikumával társuló APAk jelenléte, így az APS és a HITT elkülönítése komoly differenciáldiagnosztikai problémát okozott számunkra és okozhat mások számára is a gyakorlatban. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy ezek a betegek a laboratóriumi vizsgálatok során – ahogyan az a saját betegeinknél is történt - általában már valamilyen antikoaguláns kezelésben is részesülnek. A LA kimutatását célzó laboratóriumi tesztek a különböző alvadásgátló készítmények eltérő módon befolyásolhatják a megnyúlt alvadási idők miatt.^{92,135,138} A jelenleg érvényes ajánlások ezért - ahogy erre az irodalmi áttekintés során már kitértem - a VKA kezelés megszakítását követően 1-2 héttel javasolják a LA kivizsgálását.⁹² Az alvadásgátló kezelés azonban nem függeszthető fel közepes vagy nagy thrombosisrizikó esetén. Ha erre mégis sor kerülne, valamely LMWH készítménnyel áthidaló terápia alkalmazása indokolt. VTE esetén az induló kezelés általában szintén valamely heparinkészítménnyel történik. Az LMWH készítmények LA tesztekre kifejtett hatásával kapcsolatban viszont nem rendelkezünk elegendő információval. Bizonyos körülmények között – például heparin-indukálta thrombocytopeniában - a heparinok helyett valamely alternatív parenterális antikoaguláns készítmény – DTI-k vagy faktor Xa-gátlók - alkalmazása válik szükségessé. Más esetekben, mint például katasztrofális APS gyanúja esetén, a LA azonnali vizsgálata indokolt, az alkalmazott kezeléstől és a thrombosis időbeni közelségétől függetlenül. A fentiek ismeretében alapvetően fontos tehát a klinikai gyakorlatban, hogy megfelelő ismeretekkel rendelkezünk a különböző alvadásgátló készítmények LA tesztekre gyakorolt hatásáról.

A heparin mind a dRVVT-n, mind az APTI-n alapuló LA tesztek eredményét befolyásolja, ezért egyes reagensek ma már heparint semlegesítő hatású anyagot is tartalmaznak.⁹² In vitro kísérletekkel igazolták, hogy a DTI-k terápiás koncentrációi szintén befolyásolják a közös út vizsgálatán alapuló dRVVT és az intrinszik alvadási utat mérő LA-érzékenyített APTI vizsgálatok eredményeit, míg a fondaparinux nincs hatással a dRVVT-re.^{92,135,138} Mivel a HIT/T-ben alkalmazható lepirudin és FXa inhibitorok a terápiás tartományban alig vannak hatással a protrombin időre, kíváncsiak voltunk az ezen készítmények által az extrinszik alvadási út vizsgálatán alapuló LA tesztekre kifejtett hatásokra, melyet ezt megelőzően még senki sem vizsgált. Az elvégzett kísérletek azért is fontosak voltak számunkra, mert a dPT mérésén alapuló teszt részét képezte és képezi jelenleg is a LA kimutatását célzó vizsgálati algoritmusnak a Debreceni Egyetemen.

6.1 A HIT/T-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a dPT meghatározáson alapuló LA tesztekre

A rekombinánt tromboplasztin reagens által meghatározott dPT széles körben elterjedt, jól dokumentált és szenzitív szűrőteszt a LA kivizsgálása során.¹²⁸⁻¹³¹ A laboratóriumok jelentős hányada - az ECAT (External quality Control of diagnostic Assays and Tests) független, laboratóriumi minőségkontrollal foglalkozó alapítvány felmérése szerint közel 50% - használja a dPT-t a LA szűrővizsgálata során, a javasolt egyéb tesztek mellett.^{139,140} Korábbi tanulmányokban a megnyúlt dPT érték a thrombosis emelkedett kockázatával társult, továbbá ROC analízis alapján a dPT ráta prediktív értéke egy thrombosis kialakulásával kapcsolatban jobbnak bizonyult a napjainkban legszélesebb körben használt dRVVT teszténél.^{112,131} Általánosságban tehát elmondható, hogy a hígított tromboplasztint alkalmazó PI alapú tesztek magas specificitással és szenzitivitással rendelkeznek a LA kimutatása tekintetében, akár anti- β 2GPI, akár anti-protrombin antitestek okozzák is azt.¹²⁸⁻¹³¹ A United Kingdom National

Quality Assessment Scheme által végzett vizsgálatban a külső kontroll minták LA irányú kivizsgálása során dPT-t szűrőtesztként használó laboratóriumok minden esetben pontos eredményt szolgáltatottak.¹⁴¹

A gyakorlatban eltérő, de leggyakrabban 1:50, 1:100, 1:200 és 1:300 hígítású Innovin reagenst alkalmaznak a dPT meghatározása során.¹²⁸⁻¹³¹ A LA pozitív és negatív minták elkülönítésében a reagens 1:200-as hígítása szolgáltatja a legpontosabb eredményeket, egy másik vizsgálatban azonban kisebb hígítások esetében sem észlelték a szenzitivitás csökkenését, és az 1:50 hígítást szintén megfelelőnek találták a LA szűrővizsgálatára.^{129,130,134}

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a tromboplasztin reagens hígításának növelésével egyre emelkedő dPT rátát kapunk a vizsgált alvadásgátló készítmények esetében. Egyedüli kivételt az argatroban jelentett, amely egy adott gyógyszerkoncentráció mellett emelkedett, de közel állandó dPT rátát eredményezett, függetlenül a reagens hígításának mértékétől. Munkánk során - az eredmények birtokában - az Innovin rekombinált tromboplasztin két jelentősen eltérő – 1:50 és 1:500 – hígítását alkalmaztuk, hogy lefedjük a gyakorlatban használt hígításokat és így eredményeink minél szélesebb körben alkalmazhatóak legyenek.

A DTI hatású argatroban és lepirudin jelentős mértékben növelte a dPT és dPT ráta értékét, álpozitív eredményt okozva ezáltal már a terápiás gyógyszerkoncentrációk szintje alatt is. Ezen gyógyszerek alkalmazása mellett tehát a dPT mérésén alapuló LA tesztek értékelése nem megbízható, álpozitív eredménnyel kell számolni.¹³⁶

A faktor Xa-gátló danaparoid, enoxaparin és fondaparinux alvadásgátló hatását az anti-Xa aktivitás mérésével tudjuk meghatározni és követni. Danaparoid esetében 0.5-0.8 NE/ml, enoxaparin esetében pedig 0.6-1.0 NE/ml anti-Xa aktivitás felel meg a terápiás tartománynak.⁷⁵ A fondaparinux terápiás céllal történő alkalmazása során 0.6-1.5 µg/ml, profilaxis esetén 0.1-0.5 µg/ml plazmakoncentrációkat mértek.¹⁴²

A FXa-gátlók emelkedő koncentrációi lineárisan növelték a dPT ráta értékét, szintén magukban hordozva az álpozitív, 1.2 fölötti eredmény elérésének lehetőségét.¹³⁶ Utóbbi bekövetkezte annál valószínűbb, minél magasabb az adott egyén alap, gyógyszer jelenléte nélkül mérhető dPT rátája. A különböző FXa-gátlóknak azonban eltérő mértékű hatása van a dPT rátára: az enoxaparin okozza a dPT legnagyobb fokú megnyúlását, majd danaparoid és fondaparinux a sorrend. Ismert, hogy az enoxaparin és a danaparoid az anti-Xa aktivitás mellett antitrombin aktivitással is bír. Az anti-Xa/anti-IIa hányados az enoxaparin esetében 3.9, a danaparoid esetében >20, míg fondaparinux esetében végtelen, hiszen utóbbi csak a FXa-t gátolja. Mindez magyarázatot ad a készítmények rutin alvadási tesztekre és dPT rátára kifejtett, egymástól eltérő hatásaira.

Habár LA szűrésére a dPT ráta meghatározása a fondaparinux és a danaparoid esetében megbízhatónak tűnik 1:50-es reagens hígításnál, hiszen a dPT rátát az anti-Xa függvényében ábrázolva az illesztett egyenes az 1.2-es dPT rátát csak a terápiás tartomány felett éri el, néhány egyéni minta esetében mégis tapasztalni lehetett álpozitív eredményt már a terápiás, ritkán az az alatti tartományban is. Az 1:500 hígítású reagens esetében az összes vizsgált FXa-gátló már alacsony, terápiás tartomány alatti koncentrációban álpozitív eredményt mutatott.

Habár a heparináz képes volt az összes vizsgált faktor Xa-gátló hatását felfüggeszteni vagy jelentősen mérsékelni az anti-Xa eredmények alapján, a dPT ráta értéke csak az enoxaparin esetében csökkent a gyógyszer nélkül is mérhető alapszintre. A dPT ráta tehát heparináz hozzáadását követően pontosan mérhető, és így a LA szűrőtesztjeként is jól alkalmazható marad enoxaparin terápia mellett. Ezzel szemben a fondaparinux és a danaparoid dPT rátára kifejtett hatását a heparináz sem képes felfüggeszteni.¹³⁶

Kísérleteink alapján a további vizsgálatokból kizártuk azokat a betegeket, akiknél csak LA irányú vizsgálat történt valamely DTI vagy faktor Xa-gátló alkalmazása mellett. Az ő esetükben a LA pozitivitás ugyanis az alvadásgátlók által okozott laboratóriumi interferencia

eredményeként is kialakulhatott. Kivételt azok a betegek képeztek, akik a laboratóriumi vizsgálatoknál még enoxaparint kaptak, és az LMWH hatását in vitro heparinázzal függesztették fel.

A továbbiakban a vizsgálatban maradó hét beteg eredményeinek ismeretében emelem ki azokat az új vagy ritka szempontokat, amelyek ismerete a HIT/T patomechanizmusában, diagnosztikájában vagy kezelésében fontos lehet.

6.2 Heparin-indukálta thrombocytopeniában szenvedő betegek retrospektív vizsgálata

6.2.1 HIT/T-hez társuló antifoszfolipid antitest pozitivitás

Számos vizsgálat igazolta már, hogy immunológiai tesztek során APS-ban az átlag populációhoz képest nagyobb gyakorisággal (5-20%) mutathatók ki HIT antitestek akkor is, ha a klinikai kép alapján kicsi a HIT/T valószínűsége, vagy a beteg semmilyen heparinkészítményt nem kapott előzőleg.¹⁴³⁻¹⁴⁵ 2009-ben Pazner és mtsai SLE-ben és/vagy APS-ban szenvedő betegek 76.2%-ában (32/42) igazolt ELISA és/vagy PaGIA vizsgálattal HIT antitesteket.⁶⁷ Ezen betegek mintáit tovább vizsgálva kimutatták, hogy 81.3%-ban a jelenlevő antitestek az önálló, nem komplexben elhelyezkedő PF4-gyel is reagálnak. Az immunológiai tesztek pozitivitása – az esetek nagy többségében – a heparin nagy koncentrációja ellenére is fennmaradt, míg a funkcionális tesztek negatív eredményt adtak. Az adatok tehát a valódi, heparinfüggő és thrombocytaaktiváló HIT antitestek jelenléte ellen szóltak és elsősorban az önálló PF4 ellen termelődött antitestek jelenlétét valószínűsítették, melyek a HIT ELISA tesztekben álpozitív eredményt szolgáltatnak komolyabb klinikai következmények nélkül. Magyarozatként a következő elméletek léteznek: 1. APS-ban a PF4 egy újonnan azonosított célantigén lehet, mely ellen antitestek termelődhetnek;⁶⁷ 2. APS-ban a thrombocyták aktivációja során PF4 kerül a keringésbe, mely képes kötődni az endothel

sejtek felszínén található heparán-szulfáthoz és az így létrejött komplex PF4 része ellen antitestek termelődhetnek akár heparin jelenléte nélkül is.¹⁴⁶ Ezen túlmenően nem vethető el azonban az APAk és a PF4 közötti keresztreaktivitás lehetősége sem.

A fentiekkel szemben mindössze egy tanulmányról tudunk, mely az APAk jelenlétét értékelte HIT/T-ben.¹⁴⁷ A tanulmány csak az aCL antitesteket vizsgálta, és a betegek 1/3-ában (9/27) mutatta ki azokat. A vizsgálók szerint azonban az aCL jelenléte és a HIT-ben észlelt thrombosisok kialakulása között nem lehetett ok-okozati kapcsolatot bizonyítani, miután az IgG típusú aCL antitestek elsősorban a thrombosisal nem társuló HIT esetekben fordultak elő. Úgy vélték, hogy az aCL magas aránya elsősorban az idős betegcsoporttal, a társbetegségekkel és a vizsgálat idejéhez közel végzett orvosi beavatkozásokkal, műtétekkel lehetett kapcsolatos. Fontos megjegyezni, hogy az APA kimutathatóságának pontos időtartama nem volt ismert, csak egyszeri titer meghatározás történt a tanulmányban. Az általunk vizsgált hét betegből négy esetben lehetett kimutatni LA-t vagy nagy titerben aCL antitestet, de emellett további, kis titerű antitest pozitivitást is észleltünk a legtöbb esetben. A kis betegszám ellenére megállapítható, hogy HIT/T-ben szenvedő betegeink esetében az APA irányú laboratóriumi vizsgálatok az átlagpopulációhoz képest nagyobb arányban adtak pozitív eredményt. Ennek három magyarázata lehetséges: 1. a HIT/T és az APS gyakori együttes előfordulása; 2. keresztreaktivitás az APAk és HIT antitestek között; 3. valódi APAk gyakori és átmeneti jelenléte HIT/T-ben, APS nélkül. A két részletesen tárgyalt eset (P1, P2) a HIT/T és az APS társulása ellen szól és a 2. illetve 3. pontban foglaltak valamelyikét valószínűsíti. A keresztreaktivitás lehetősége nem vethető el, de a különböző APAk kimutatását célzó eltérő típusú laboratóriumi tesztek pozitivitása a keresztreaktivitás elméletét kevésbé támogatja. A vizsgált beteganyagra egyébként jellemző volt a súlyos HIT kifejlődése kiterjedt artériás és/vagy vénás thrombosisok társulásával. A két részletesen bemutatott esetben közös – az egyébként igen ritkán fellépő – heparin-indukálta bőrnekrozis és végtagi gangréna együttes

megjelenése is. Mindkét eset további érdekessége az APAk átmeneti jelenléte, mely csak a HITT akut szakára korlátozódott és három hónap elteltével már nem volt kimutatható. Ezek alapján az APS diagnózisa kizárható volt. A két eset önmagában nem bizonyító erejű ugyan, de mindenképpen fel kell vesse az APAk esetleges patogenetikai és prognosztikai szerepét HITT-ben, a HIT-hez társuló thrombosisokban és ezen belül a ritka szövődmények – mint heparin okozta bőrnekrozis és vénás végtagi gangréna - kialakulásában.^{40,137} Az APAk kimutatását célzó laboratóriumi tesztek átmeneti, a HIT/T akut szakára korlátozódó pozitivitását – legjobb tudomásunk szerint - elsőként írtuk le valódi esetek kapcsán, habár már létezett elmélet, amely az APAk kialakulásának elméleti lehetőségét taglalja HIT/T-ben.^{40,137,146} Ezen teória szerint a HIT antitestek – elsősorban az endothel károsításán keresztül - a sejtmembrán foszfolipidjeiben konformációváltozást idézhetnek elő, mely az így felszínre került neoepitopok ellen APAk kialakulásához vezethet. A jelenség ismerete differenciáldiagnosztikai szempontból is fontos, hiszen az APAk egyszeri detektálása alapján nem mondható ki az APS diagnózisa és – amennyiben klinikailag is felmerül a gyanú – HIT/T lehetőségére is gondolni kell. Az általunk részletezett P1 beteg esetében az APAk kimutatása, a HIT irányú immunológiai tesztek negativitása és a thrombosis kialakulásakor mért normál thrombocytaszám együttesen eredményezte a késlekedést a helyes diagnózis felállításában. Eredményeink alapján szükségesnek látszik az APAk vizsgálata nagy létszámú, HIT/T-ben szenvedő betegcsoportban, mely tisztázhatja az APAk lehetséges patogenetikai és/vagy prognosztikai szerepét ezen betegeknél, illetve az esetleges keresztreaktivitás fennálltát a HIT és az antifoszfolipid antitestek között.

6.2.2 A HIT/T ritka formái és klinikai tünetei eseteink kapcsán

Heparin-indukálta thrombocytopenia PF4/heparin elleni antitest jelenléte nélkül

A HIT/T-ben leggyakrabban és jellemzően előforduló antitestek a PF4/heparin komplex ellen irányulnak. HIT/T-ben szenvedő betegek kevesebb mint 5%-ában azonban nem mutathatók ki ezek a típusos HIT antitestek, habár a thrombocytaktivációs próbák kis koncentrációjú heparin jelenlétében pozitív eredményt adnak.^{148,149} Ezekben az esetekben PF4-gyel rokon kemokinek ellen irányuló antitesteket mutattak ki és hoztak összefüggésbe a HIT/T kialakulásával. Először 1996-ban írták le a neutrophil-aktiváló peptid-2 (NAP-2) vagy interleukin-8 (IL-8) elleni antitestek jelenlétét HIT-ben, míg egészséges kontroll csoportban, autoimmun betegekben és egyéb eredetű thrombocytopeniákban nem találtak hasonló antitesteket.¹⁵⁰ A thrombosis ezekben a betegekben a típusos antitesttel rendelkező HIT-ben észlelthez hasonló arányban fordult elő. Kísérletes adatok elsősorban az IL-8 elleni antitestekkel kapcsolatban láttak napvilágot.^{149,151} Az IL-8 40%-os, a NAP-2 60%-os aminosav homológiát mutat a PF4-gyel.¹⁵⁰ Az IL-8 a neutrophil granulocyták aktivációját okozza, de képes kötődni a heparinhoz is, továbbá IL-8 receptorok találhatók a thrombocyták felszínén. Az anti-IL-8 jelenlétével társuló HIT/T kapcsán kimutatták, hogy sem az antitest IL-8-hoz való kötődéséhez, sem a thrombocytaktivációhoz nem feltétlenül szükséges a heparin jelenléte, utóbbi azonban mégis jelentősen fokozza in vitro a trombin termelődését.¹⁴⁹ Az anti-IL-8 IgG antitest kötődik a thrombocyták felszínén található IL-8-hoz, majd az FcγRIIa receptoron keresztül a thrombocyták aktivációja következik be. A heparin feltehetően az IL-8 sűrűségét képes jelentős mértékben megnövelni a thrombocyták felszínén és ilyen módon idéz elő klinikailag megnyilvánuló, heparinfüggő vérlemezke-aktivációt és prothromboticus állapotot. P1 betegünk esetében is valamely PF4-gyel rokon kemokin ellen irányuló antitest játszhatott főszerepet a HITT kialakulásában. Ez magyarázatot ad az immunológiai tesztek ismételten negatív eredményére, melyek a PF4/heparin elleni antitestek

hiányát igazolták, és a HTAG teszt pozitivitására. A gyakorlatban fontos tehát annak ismerete, hogy negatív immunológiai tesztek ellenére is – bár nagyon ritkán – előfordulhat HIT/T. A klinikailag gyanús esetekben ezért a negatív ELISA teszt ellenére is el kell végezni valamely HIT vizsgálatára alkalmas funkcionális tesztet, vagy - utóbbi hiányában - a kezelést a HIT/T-nek megfelelően kell folytatni.

Heparin okozta bőrnekrozis

A heparin okozta bőrnekrozis a HIT/T igen ritka, bőrre lokalizált megnyilvánulásaként értelmezhető. Szövettani vizsgálattal a bőr kis ereiben thrombus mutatható ki gyulladásal és az epidermis nekrozisával kísérvé.⁴⁴ A nekrozis általában kis kiterjedésű, néhány cm-es, ritkán azonban a 10 cm-t is meghaladhatja, amint az P1 betegünk esetében is történt. A heparin első adagja és a nekrozis megjelenése között eltelt idő széles határok között változhat (1-17 nap), átlagosan 7.6 ± 3.4 nap.⁴⁴ Az első tünet egy erythemás, szubkután laesio megjelenése ödemával és fájdalommal, általában az injekció beadási helyén, majd bullák kifejlődése után alakul ki a bőrnekrozis. Ritkán a heparin injekció beadási helyétől távol is észlelték már megjelenését. A klinikai lefolyás – a HIT-nek megfelelő kezelés bevezetése mellett – kisméretű laesio esetén általában eseménytelen, és gyógyulás várható, nagy kiterjedésű nekrozis esetén azonban sebészeti beavatkozás, debridement, plasztikai műtétek válhatnak szükségessé. A heparin okozta bőrnekrozis patomechanizmusa általában megegyezik a HIT-nél ismertetettel, legtöbbször annak részjelenségeként alakul ki. A folyamat eredményeként a bőr kis ereiben thrombosisok fejlődnek ki, melynek nekrozis lesz a következménye. Ritkán ismételt helyi traumák, ugyanoda, egymás után több alkalommal adott injekciók is okozhatnak nekrozist, illetve III-as típusú hiperszenzitivitási reakciók lehetséges szerepét is felvetették már kialakulásukban.⁴⁴ Kezelése a szükség szerinti lokális sebellátás mellett megegyezik a HIT(T) terápiájával. A heparin okozta bőrnekrozis kifejlődésében egyéb hajlamosító tényezők szerepe szintén feltételezhető, hiszen a HIT/T

eseteknek csak ritka velejárója. Mindkét részletesen bemutatott esetünkben ilyen közös tényező lehetett az APAk jelenléte, illetve a P2 beteg esetében a polycythaemia vera fennállása.

Vénás végtagi gangréna társulása HIT-tel

Warkentin és mtsai 1997-ben, 158 HIT-ben szenvedő beteg vizsgálata során ismerték fel elsőként, hogy a HIT-tel társuló végtagi ischaemia az esetek egy részében nem artériás elzáródás eredménye, hanem vénás végtagi gangréna áll a háttérben.⁸⁷ A vénás végtagi gangréna általában a HIT felismerése után, a heparin elhagyása és a kumarin kezelés indítását követően lép fel, míg az artériás elzáródás a kórlefolyás korábbi szakaszában, gyakran a HIT első jeleként észlelhető.^{87,88} A vénás végtagi gangréna a thrombotikus végtag acralis részeit érinti, az artériás keringés pedig teljes mértékben megtartott. Ennek megfelelően a szövettani vizsgálat a szövetek nekrozisát, valamint a végtag nagy és kis vénáinak thrombosisát igazolja az artériák érintettsége nélkül. Bár viszonylag ritkán fordul elő, mégis nagyobb arányban felelős a HIT-ben szükségessé váló végtag-amputációkért, mint az artériás elzáródás.^{87,88} Patomechanizmusa megegyezik a kumarin-indukálta bőrnekroziséval, ezért klinikailag ezen betegség súlyosabb megnyilvánulási formájának is tartják. A K-vitamin-függő alvadási faktorok, valamint a protein C és protein S féléletideje jelentősen eltér egymástól. Kumarinkezelés mellett leghamarabb a legrövidebb féléletidővel rendelkező FVII és protein C szintje kezd el csökkenni, míg a FX és FII koncentrációja csak fokozatosan, napok alatt éri el az alvadásgátló hatást biztosító értéket. Ennek következményeként a VKA kezelés első 48-96 órájában a prothromboticus tényezők kerülhetnek túlsúlyba, különösen társuló PC vagy PS deficiencia esetén.^{87,88,152} A FVII rövid féléletidejével és így szintjének gyors csökkenésével magyarázzák azt a jól dokumentált jelenséget, hogy a vénás végtagi gangréna megjelenésekor általában inkább emelkedett, a terápiás tartomány feletti INR értékeket mérnek (INR átlagosan 5.0-5.8), különösen ha a VKA nagy adagú bevezető dózisát alkalmazták.^{87,88} A kumarin-okozta bőrnekrozis jelenségét elsőként 1943-ban írták le, de csak 1954-ben hozták

egyértelműen összefüggésbe a VKA készítmények alkalmazásával.^{153,154} Előfordulási gyakorisága irodalmi adatok szerint 1:100 – 1:10000 között változik és általában a kezelés 3-7 napja között alakul ki.⁸⁸ Annak ellenére, hogy a vénás végtagi gangrénát és a kumarin okozta bőrnekrózist ugyanazon megbetegedés különböző súlyosságú klinikai megnyilvánulásának tartják, a két jelenség egymástól jól elkülöníthető jegyekkel rendelkezik. A kumarin-okozta bőrnekrózis elsősorban a zsírban gazdag centrális területeket – emlők, comb, glutealis tájék, ritkábban arc, végtagok – érinti, a bőrre lokalizálódik, és gyakran veleszületett thrombophiliával társul. Ezzel szemben a kumarin okozta vénás végtagi gangréna nem csak a bőr szöveteit érinti, elsősorban szerzett thrombophiliával – leginkább HITT és malignus betegségek – társul, és amint arra már fentebb kitértünk, lokalizációja is más.⁸⁸ A folyamat erythemás, fájdalmas bőrlaesioként indul, majd petechiák és haemorrhagiás bullák kialakulásán keresztül nekrózisig progrediál. HITT-ben való előfordulási gyakoriságát illetően eltérő adatokat találhatunk az irodalomban (0-12.1%). Ennek egyik oka, hogy sok vizsgáló nem ismeri fel vagy nem kezeli önálló entitásként, és a HITT megnyilvánulásaként tartja számon. A másik fő ok, hogy a vénás végtagi gangréna incidenciája a HITT megfelelően irányított kezelésével jelentősen csökkenthető. A jelenség leírásakor, tehát korai adatok szerint a vénás végtagi gangréna a VKA-val kezelt, HITT-ben szenvedő betegek 12.1%-ában fordult elő.⁸⁷ A HITT-ben fellépő kumarin okozta végtagi gangréna viszonylag magas arányban észlelt kialakulását a már fentebb részletezett mechanizmuson túl a HIT/T-tel együttjáró fokozott trombingeneráció és prokoaguláns tényezők magyarázzák. A helyi sebellátás és esetleges plasztikai műtétek mellett gyakran amputációt tesz szükségessé. Kezelése egyébként megegyezik az alapbetegség, a HITT kezelésével. A vénás végtagi gangréna megelőzése érdekében hangsúlyozni kell a kumarin bevezetésénél betartandó szabályokat: 1. mindig valamely, a heparint helyettesítő alternatív antikoaguláns védelmében kell a VKA kezelést beállítani; 2. VKA csak az akut HITT lezajlása után, a thrombocytaszám

rendeződését követően (>150 G/l thrombocytaszám esetén), megnyugtató klinikai kép mellett indítható; 3. kis kezdő adaggal, telítő dózis alkalmazása nélkül kell a kezelést bevezetni.^{20,88} A ma érvényes ajánlások szerint akut HIT/T diagnózisának felállításakor, amennyiben a betegnél éppen VKA kezelés beállítása zajlik, a VKA azonnali elhagyása mellett kis dózisú K-vitamin alkalmazása ajánlott a lehetséges szövődmények kivédése érdekében.²⁰ Az általunk vizsgált beteganyagban az öt VKA kezelésben részesülő betegből kettő esetében alakult ki vénás végtagi gangréna. A P3 számú betegnél a kumarinkezelés még a HIT/T akut szakában került bevezetésre, mely - a ma már ismert ajánlások betartásával - elkerülhető lett volna. A P1 számú betegnél a mélyvéna thrombosis és a vénás végtagi gangréna kialakulása – ahogyan erre már korábban is felhívtuk a figyelmet - megelőzte a thrombocytopenia kifejlődését, mely lehetetlenné tette a szövődmény kivédését.⁴⁰ Kiemelten kell foglalkozzunk a P2 számú beteggel, akinél az igen súlyos, két végtagot is érintő és amputációhoz vezető vénás végtagi gangréna VKA alkalmazása nélkül alakult ki.¹³⁷ Az irodalomban elméletileg leírják ugyan ennek lehetőségét, jól dokumentált esetet azonban nem találtunk. Esetünk jól példázza a HIT/T során fellépő igen intenzív prokoaguláns hatások túlsúlyba kerülését és annak lehetséges súlyos következményeit. A HITT önmagában – VKA alkalmazása nélkül – csak igen ritkán okoz vénás végtagi gangrénát, ezért egyéb társuló tényezők szerepét is keresnünk kell a háttérben. Esetünkben a végtagi gangréna kialakulásában a HITT mellett az APAk oki szerepe is felvethető.

6.3 Rapid HITT előzetes heparinexpozió nélkül

A HIT/T-ben észlelhető PF4/heparin elleni immunválasz számos, nehezen magyarázható sajátossággal rendelkezik. Típusos HIT/T esetén a betegek egy részénél akár már a heparinkezelés 5. napján IgG típusú PF4/heparin elleni antitesteket detektálhatunk nagy titerben.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Az elsődleges immunválasz során ezzel szemben kezdetben csak IgM típusú

antitestek termelődnek, melyek általában 4-5 nap után válnak kimutathatóvá. Leghamarabb néhány nappal ezt követően, de általában a 20-25. nap tájékán jelennek meg – általában kis titerben - az IgG típusú antitestek. HIT/T során immunmemória nem alakul ki a PF4/heparin komplexszel szemben, illetve a PF4/heparin elleni antitestek a HIT/T lezajlása után gyorsan, általában 60-80 nap alatt eltűnnek a keringésből,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ míg szekunder immunválasz során a termelődött antitestek tovább, általában még évekig kimutathatók a vérben.

Greinacher és mtsai elképzelése szerint a PF4-gyel szembeni immunizálódás első, korai szakasza egy T-sejt függő folyamat, mely során bizonyos marginális zóna eredetű B-sejtekben megtörténik az izotípusváltás IgM-ről IgA-ra és IgG-re.¹⁵⁶ Ezek a B-sejtek a memóriasejtektől eltérően viselkednek, és általában nem aktiválódnak. Az aktiválódásukhoz az antigén ismételt jelenlétén kívül feltehetően egyéb társuló tényező - például gyulladásos folyamat - is szükséges, és ezek együttesen váltják ki ezen B-sejtek szaporodását és az IgG gyors, pár nap után már észlelhető termelődését. Ezt követően a folyamatban résztvevő B-sejtek gyorsan inaktiválódnak.

A rapid-HIT/T kifejlődését a heparinkezelés idején a vérben már eleve jelenlevő IgG típusú antitestekkel magyarázzák, melyek – a hagyományos elképzelés szerint - az immunrendszer közelmúltban lezajlott heparin expozíciója révén alakulhattak ki.⁴⁷ Meglepő módon azonban korábban heparint soha nem kapó egyénekből álló egészséges populációban is 4.4%-os arányban sikerült IgG típusú anti-PF4/heparin antitesteket kimutatni, illetve a periodontitis és a HIT antitestek megjelenése között is szignifikáns kapcsolatot találtak.^{155,158} Leírták továbbá a spontán HIT fogalmát is, amikor klinikailag HIT/T képe bontakozik ki típusos antitestek jelenlétével, miközben a betegek sem előzetesen, sem a betegség kifejlődésekor nem kaptak heparint.⁴⁹⁻⁵² Ezek alapján feltételezhető volt, hogy a PF4 a heparin mellett egyéb molekulákhoz is kötődhet, mely során hasonló vagy ugyanazon neoepitopok kerülhetnek a PF4 felszínére, mint a PF4-heparin kötődés során. Greinacher és mtsai kimutatták, hogy a PF4

képes bizonyos baktériumok felszínén található polianionokhoz is kapcsolódni.¹⁵⁵ Az anti-PF4/heparin antitestek az így létrejött PF4/baktérium komplexszel szemben keresztreaktivitást mutattak, és a baktérium felszínén található PF4-hez is kötődtek. Ezt követően mesterségesen hoztak létre egerekben elhúzódó peritonitist, következményes szepszist, és azt tapasztalták, hogy az egerekben HIT antitestek jelentek meg heparin alkalmazása nélkül is. A kísérletek alapján feltételezték, hogy a PF4 elleni korai immunizáció nem csak heparin, hanem egyéb, a PF4-hez kötődni képes polianionok jelenlétében is megtörténhet. Ezek a polianionok lehetnek baktériumok felszínén, a keringésbe kerülhetnek chondroitin-szulfát formájában ortopédiai műtétek során, vagy jelen lehetnek heparán-szulfátként az endothel felszínén. A felvázolt elmélet magyarázatot ad a spontán HIT/T kialakulására, illetve a P2 betegnél a szeptikus folyamatot követően kifejlődő rapid-HITT-re is. Utóbbi esetében az események sorrendje a következő lehetett: 1. a szepszis során az aktiválódott trombocytákból felszabaduló PF4 az MRSE felszínén található polianionokhoz kötődik és konformációváltozást szenved el, melynek eredményeként neoepitopok kerülnek a felszínre; 2. ezen neoepitopok ellen primer immunválasz során dominálón IgM, majd ezt követően kisebb mennyiségben IgG antitestek termelődnek; 3. enoxaparin alkalmazása, PF4/enoxaparin komplexek kialakulása; 4. a szepszis során a PF4/MRSE ellen termelődött, a PF4/enoxaparin komplexszel keresztreakáló, a heparin alkalmazásakor még a keringésben található IgG típusú antitestek rapid-HITT kialakulását idézik elő.¹³⁷ A szepszist követően, előzetes heparinexpozíció nélkül kialakuló rapid-HITT első, jól dokumentált esete (P2) támogatja Greinacher munkacsoportjának elméletét, és felhívja a figyelmet arra, hogy rapid-HITT lehetősége nem zárható ki előzetes heparinexpozíció hiányában sem. Ennek ismerete különösen fontos annak tudatában, hogy a gyakorló orvosokat segítő, napjainkban használatos 4T és HEP modellek rapid HIT/T gyanúja esetén feltételként szabják a heparin megelőző 31--100 napban történő alkalmazását.^{20,53-55}

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A heparin-indukálta thrombocytopenia (HIT) a heparinkezelés ritka, de életet veszélyeztető szövődménye. Immunmechanizmus révén, thrombocytaaktiváló IgG típusú PF4/polianion, leggyakrabban PF4/heparin komplex elleni antitestek közvetítésével alakul ki.

12 HIT-ben szenvedő betegünk retrospektív vizsgálata során az antifoszfolipid antitestek (APAk) gyakori előfordulását észleltük. Elsőként írtuk le az APAk átmeneti, csak a HIT heveny szakára korlátozódó jelenlétét, melynek ismerete fontos lehet a HIT és az antifoszfolipid szindróma (APS) elkülönítése során. Adataink – az esetleges keresztreaktivitás lehetősége mellett - felvetik az antifoszfolipid antitestek lehetséges patogenetikai szerepét a HIT-hez társuló thrombosisok (HITT) és a ritka szövődmények (heparin okozta bőrnekrozis, vénás végtagi gangréna) kialakulásában. Demonstráltuk, hogy rapid HITT kialakulhat szepszist követően, előzetes heparinexpozíció nélkül is, mely támogatja a PF4-gyel fedett baktériumok által kiváltott korai immunizáció új elméletét HIT-ben. Bemutattuk a HIT néhány ritka szövődményét és a betegség egy különleges, a hagyományos PF4/polianion ellen irányuló antitestek hiányában kifejlődő típusát is. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy vénás végtagi gangréna ritkán kumarinkezelés nélkül is kialakulhat HIT-ben.

In vitro vizsgálatokat végeztünk továbbá, hogy meghatározzuk a HIT-ben alkalmazható alternatív antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hígított tromboplasztin idő (dPT) ráta mérésen alapuló lupus antikoaguláns (LA) tesztekre kifejtett hatását. Megállapítottuk, hogy mind a direkt trombin-, mind az indirekt FXa inhibitorok álpozitív eredményeket okoznak és így zavarják a dPT mérésén alapuló LA teszteket. Megbízható LA szűrőteszt marad azonban a dPT mérése az enoxaparin jelenléte ellenére is, ha közben – in vitro - heparinázt alkalmazunk. Eredményeink a jövőben segítséget nyújthatnak a HIT diagnosztikájában és differenciáldiagnosztikájában, valamint hozzájárulhatnak a kórkép jobb megértéséhez.

SUMMARY

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a rare, but life-threatening complication of heparin therapy. It is an immune-mediated disorder caused by platelet activating IgG type antibodies to PF4/polianion, primarily PF4/heparin complexes.

A high incidence of antiphospholipid antibodies (APAs) was observed in our 12 patients with HIT by a retrospective analysis. We were the first to report on the transient presence of APAs limited to the acute phase of HIT. The knowledge of this phenomenon can be important in the differential diagnosis of HIT and antiphospholipid antibody syndrome (APS). Beside the possibility of cross reactivity, our data should raise the potential casual role of APAs in the development of thrombosis and other rare complications such as heparin-induced skin necrosis and venous limb gangrene associated with HIT. We presented a case of rapid onset HIT developing after a septicemia without previous heparin exposure, which advocates the new theory of preimmunization by PF4 coated bacteria in HIT. We demonstrated some rare complications of the disease and an extraordinary form of HIT evolving in the absence of classical HIT antibodies to PF4/polianion. We call the attention that venous limb gangrene can be associated with HIT even in the absence of VKA therapy.

Furthermore, in vitro experiments were performed to determine the effects of the anticoagulants used in HIT and enoxaparin on diluted prothrombin time (dPT)-based lupus anticoagulant (LA) tests. We provided evidence, that both the direct thrombin and indirect factor Xa inhibitors influence dPT assay for LA causing false positivity. However, dPT seems to be a reliable test for LA screening during enoxaparin therapy after neutralization by heparinase.

Our results will help in the diagnostics and differential diagnostics of HIT and contribute to the better understanding of this interesting disorder.

IRODALOM

1. Weismann RE, Tobin RW: Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *AMA Arch Surg.* 1958; 76: 219-227.
2. Rhodes GR, Dixon RH, Silver D: Heparin-induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. *Surg Gynecol Obstet.* 1973; 136: 409-416.
3. Udvardy M, Boda Z, Rák K: A heparin okozta thrombocytopeniáról. *Orv Hetil.* 1978; 119: 1607-1610.
4. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2009;7(Suppl. 1): 9-12.
5. Alberio L. Heparin-induced thrombocytopenia: some working hypotheses on pathogenesis, diagnostic strategies and treatment. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15: 456-464.
6. Kelton JG. The Pathophysiology of Heparin-Induced Thrombocytopenia: Biological Basis for Treatment. *Chest* 2005; 127: 9S-20S .
7. Boda Z. Heparinindukálta thrombocytopenia (HIT) és trombózis (HITT) In: Boda Z: Vénás tromboembóliák – antikoaguláns terápia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2010; 255-267.
8. Oláh Zs. Heparin-indukálta thrombocytopenia – a heparinkezelés ritka, de életveszélyes szövődménye. *Magyar Családorvosok Lapja.* 2011/8: 13-17.
9. Zucker MB, Katz IR. Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991; 198: 693-702.
10. Greinacher A, Pötsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization

- of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost.* 1994; 71(2): 247-251.
11. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1992; 68(1): 95-96.
 12. Kelton JG, Smith JW, Warkentin TE, Hayward CP, Denomme GA, Horsewood P. Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood.* 1994; 83(11): 3232-3239.
 13. Chong BH, Fawaz I, Chesterman CN, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol.* 1989; 73(2): 235-240.
 14. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelton JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1994; 84(11): 3691-3699.
 15. Warkentin TE, Sheppard JI. Generation of platelet-derived microparticles and procoagulant activity by heparin-induced thrombocytopenia IgG/serum and other IgG platelet agonists: a comparison with standard platelet agonists. *Platelets.* 1999; 10(5): 319-326.
 16. Kelton JG, Sheridan D, Santos A, Smith J, Steeves K, Smith C, Brown C, Murphy WG. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. *Blood.* 1988; 72: 925-930.

17. Chong BH, Murray B, Berndt MC, Dunlop LC, Brighton T, Chesterman CN. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood*. 1994; 83: 1535-1541.
18. Arepally G, Poncz M, Cines DB. Immune vascular injury in heparin-induced thrombocytopenia. In: *Heparin-induced thrombocytopenia*, 4th edn. Informa Healthcare. 2007: 209-225.
19. Pouplard C, Iochmann S, Renard B, Herault O, Colombat P, Amiral J, Gruel Y. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2001; 97: 3300-3302.
20. Linkins L, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, Crowther M, American College of Chest Physicians. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (9th Edition). *Chest*. 2012; 141(2Suppl): 495S-530S.
21. Warkentin TE, Sheppard JA, Moore JC, Moore KM, Sigouin CS, Kelton JG. Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia: how much class do we need? *J Lab Clin Med*. 2005; 146(6): 341-346.
22. Warkentin TE. HIT paradigms and paradoxes. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(1Suppl): 105-117.
23. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood*. 2005; 106(8): 2710-2715.

24. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med.* 1995; 332: 1330-1335.
25. Prandoni P, Siragusa S, Girolami B, Fabris F; BELZONI Investigators Group. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients treated with low-molecular-weight heparin: a prospective cohort study. *Blood.* 2005;106:3049-3054.
26. Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2000; 96(5): 1703-1708.
27. Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, Reilly MP, Arepally G, Weisel JW, Nagaswami C, Cines DB, Sachais BS. Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2005; 105(1): 131-138.
28. Warkentin TE. Fondaparinux: does it cause HIT? Can it treat HIT? *Expert Rev Hematol.* 2010; 3: 567-581.
29. Lindhoff-Last E, Nakov R, Misselwitz F, Breddin HK, Bauersachs R. Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *Br J Haematol.* 2002; 118(4): 1137-1142.
30. Warkentin TE. New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest.* 2005;127:35S-45S.
31. Sanson BJ, Lensing AW, Prins MH, Ginsberg JS, Barkagan ZS, Lavenne-Pardonge E, Brenner B, Dulitzky M, Nielsen JD, Boda Z, Turi S, Mac Gillavry MR, Hamulyák K, Theunissen IM, Hunt BJ, Büller HR. Safety of low-molecular-weight heparin in pregnancy: a systematic review. *Thromb Haemost.* 1999; 81(5): 668-672.

32. Lepercq J, Conard J, Borel-Derlon A, Darmon JY, Boudignat O, Francoual C, Priollet P, Cohen C, Yvelin N, Schved JF, Tournaire M, Borg JY. Venous thromboembolism during pregnancy: a retrospective study of enoxaparin safety in 624 pregnancies. *BJOG*. 2001; 108(11): 1134-1140.
33. Fausett MB, Vogtlander M, Lee RM, Esplin MS, Branch DW, Rodgers GM, Silver RM. Heparin-induced thrombocytopenia is rare in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185(1): 148-152.
34. Warkentin TE, Sheppard JA, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2006; 108(9): 2937-2941.
35. Hassel K. Heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management. *Thromb Res*. 2008; 123: S16-S21.
36. Chong BH, Isaacs A. Heparin-induced thrombocytopenia: What clinicians need to know. *Thromb Haemost*. 2009; 101: 279-283.
37. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med*. 1996; 101(5): 502-507.
38. Nand S, Wong W, Yuen B, Yetter A, Schmulbach E, Gross Fisher S. Heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis: incidence, analysis of risk factors, and clinical outcomes in 108 consecutive patients treated at a single institution. *Am J Hematol*. 1997; 56(1): 12-16.
39. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost*. 2005; 94: 132–135.
40. Olah Z, Bereczky Z, Szarvas M, Boda Z. Coagulation: cascade! *Lancet*. 2011;378:740.

41. Warkentin TE. Heparin-induced skin lesions. *Br J Haematol.* 1996; 92(2): 494-497.
42. Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J, Kelton JG. Heparin-induced skin lesions and other unusual sequelae of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome: a nested cohort study. *Chest.* 2005; 127(5): 1857-1861.
43. Bircher AJ, Harr T, Hohenstein L, Tsakiris DA. Hypersensitivity reactions to anticoagulant drugs: diagnosis and management options. *Allergy.* 2006; 61: 1432-1440.
44. Handschin AE, Trentz O, Kock HJ, Wanner GA. Low molecular weight heparin-induced skin necrosis – a systematic review. *Langenbecks Arch Surg.* 2005; 390: 249-254.
45. Zalcborg JR, McGrath K, Dauer R, Wiley JS. Heparin-induced thrombocytopenia with associated disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol.* 1983; 54(4): 655-657.
46. Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med.* 2001; 135(7): 502-506.
47. Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1286-1292.
48. Oláh Zs, Boda Z. Heparin indukálta thrombocytopenia. *Magyar Belorvosi Archívum.* 2009; 62: 241-246.
49. Warkentin TE, Makris M, Jay RM, Kelton JG. A spontaneous prothrombotic disorder resembling heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* 2008; 121: 632–6.

50. Jay RM, Warkentin TE. Fatal heparin-induced thrombocytopenia (HIT) during warfarin thromboprophylaxis following orthopedic surgery: another example of 'spontaneous' HIT? *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 1598–1600.
51. Pruthi RK, Daniels PR, Nambudiri GS, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) during postoperative warfarin thromboprophylaxis: a second example of postorthopedic surgery 'spontaneous' HIT. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 499-501.
52. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2006; 107: 2346–2353.
53. Warkentin TE, Heddle NM. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep*. 2003; 2: 148-157.
54. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 759-765.
55. Cuker A, Arepally G, Crowther MA, Rice L, Datko F, Hook K, Propert KJ, Kuter DJ, Ortel TL, Konkle BA, Cines DB. The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 2642-2650.
56. Francis JL. A critical evaluation of assays for detecting antibodies to the heparin-PF4 complex. *Semin Thromb Hemost*. 2004; 30(3): 359-368.
57. Fratantoni JC, Pollet R, Gralnick HR. Heparin-induced thrombocytopenia: confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood*. 1975; 45: 395-401.

58. Greinacher A, Amiral J, Dummel V, Vissac A, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion*. 1994; 34: 381–385.
59. Fazakas B, Sári B, Boda Z, Rák K. Thrombocyta-ellenes plasma-faktor aggregometriás vizsgálata heparin okozta thrombocytopeniában. *Orv Hetil*. 1982; 123: 201-205.
60. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 1991; 66: 734-736.
61. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1986; 67: 27-30.
62. Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, Hayward CP, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. *Br J Haematol*. 1996; 95: 724–731.
63. Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997; 98: 648-656.
64. Morel-Kopp MC, Aboud M, Tan CW, Kulathilake C, Ward C. Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Thromb Res*. 2010; 125: 234-239.
65. Morel-Kopp MC, Tan CW, Brighton TA, McRae S, Baker R, Tran H, Mollee P, Kershaw G, Joseph J, Warf C. Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT. *Thromb Haemost*. 2012; 107: 575-583.

66. Amiral J, Pouplard C, Vissac AM, Walenga JM, Jeske W, Gruel Y. Affinity purification of heparin-dependent antibodies to platelet factor 4 developed in heparin-induced thrombocytopenia: biological characteristics and effects on platelet activation. *Br J Haematol.* 2000; 109: 336-341.
67. Pauzner R, Greinacher A, Selleng K, Althaus K, Shenkman B, Seligsohn U. False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1070-1074.
68. Lindhoff-Last E, Gerdson F, Ackermann H, Bauersachs R. Determination of heparin-platelet factor 4-IgG antibodies improves diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2001; 113: 886-890.
69. Warkentin TE, Sheppard JJ, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(8): 1304-1312 .
70. Zwicker JJ, Uhl L, Huang WY, Shaz BH, Bauer KA. Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(12): 2133-2137.
71. Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P. Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet.* 1999; 354: 1525-1526.
72. Whitlatch NL, Kong DF, Metjian AD, Arepally GM, Ortel TL. Validation of the high-dose heparin confirmatory step for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2010; 116: 1761-1766.
73. ten Berg MJ, van den Bemt PM, Huisman A, Schobben AF, Egberts TC, van Solinge WW. Compliance with platelet count monitoring recommendations and management of possible heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized patients receiving low-molecular-weight heparin. *Ann Pharmacother.* 2009; 43(9): 1405-1412.

74. Wallis DE, Workman DL, Lewis BE, Steen L, Pifarre R, Moran JF. Failure of early heparin cessation as treatment for heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* 1999; 106: 629-635.
75. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (9th Edition). *Chest.* 2012; 141(2Suppl): 24S-43S.
76. Hassel K. The Management of Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia Who Require Anticoagulant Therapy. *Chest.* 2005; 127: 1S-8S.
77. Huhle G, Hoffmann U, Hoffmann I, Liebe V, Harenberg JF, Heene DL. A new therapeutic option by subcutaneous recombinant hirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia type II: a pilot study. *Thromb Res.* 2000; 99(4): 325-334.
78. Fischer KG, Liebe V, Hudek R, Piazzolo L, Haase KK, Borggrefe M, Huhle G. Antihirudin antibodies alter pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant hirudin. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 973-982.
79. Magnani HN. An analysis of clinical outcomes of 91 pregnancies in 83 women treated with danaparoid (Orgaran®). *Thromb Res.* 2010; 125: 297-302.
80. Warkentin TE, Cook RJ, Marder VJ, Shepard JI, Moore JC, Eriksson BI, Greinacher A, Kelton JG. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies in orthopedic surgery patients receiving antithrombotic prophylaxis with fondaparinux or enoxaparin. *Blood.* 2005; 106: 3791-3796.
81. Warkentin TE, Davidson BL, Büller HR, Gallus A, Gent M, Lensing AWA, Piovella F, Prins MH, Segers AEM, Kelton JG. Prevalence and risk of preexisting heparin-induced thrombocytopenia antibodies in patients with acute venous thromboembolism. *Chest.* 2011; 104(2): 366-373.

82. Kuo KHM, Kovacs MJ. Successful treatment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) with fondaparinux. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 999-1000.
83. Lobo B, Finch C, Howard A, Minhas S. Fondaparinux for the treatment of patients with acute heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 2008. 99: 208-214.
84. Grouzi E, Kyriakou E, Panagou I, Spiliotopoulou I. Fondaparinux for the treatment of acute heparin-induced thrombocytopenia: a single-center experience. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010; 16: 663-667.
85. Warkentin TE, Pai M, Sheppard JI, Schulman S, Spyropoulos A, Eikelboom JW. Fondaparinux treatment of acute heparin-induced thrombocytopenia (HIT) confirmed by the serotonin-release assay: a 30-month, 16-patient case series. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(12): 2389-2396.
86. Krauel K, Hackbarth C, Füll B, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: in vitro studies on the interaction of dabigatran, rivaroxaban, and low-sulfated heparin, with platelet factor 4 and anti-PF4/heparin antibodies. *Blood.* 2012; 119(5): 1248-1255.
87. Warkentin TE, Elavathil LJ, Hayward CPM, Johnston MA, Russett JI, Kelton JG. The pathogenesis of venous limb gangrene associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med.* 1997; 127: 804–812.
88. Bartholomew JR. Transition to an oral anticoagulant in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Chest.* 2005; 127(2 Suppl): 27S-34S.
89. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306.

90. Sangle NA, Smock KJ. Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135: 1092-1096.
91. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1995; 74(4): 1185–1190.
92. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand HJ, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 1737-1740.
93. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7: 330-339.
94. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, Palomo I, Harris EN, Meroni PL. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34: 236–250.
95. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus*. 2010; 19: 460–469.
96. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quéré I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 1019–1027.

97. Gastineau DA, Kazmier FJ, Nichols WL, Bowie EJ. Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. *Am J Hematol*. 1985; 19(3): 265–275.
98. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med*. 1980; 92(2, pt 1) : 156–159.
99. Galli M, Daldossi M, Barbui T. Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 1994; 71: 571-575.
100. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010; 376: 1498-1509.
101. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, Khamashta MA, Shoenfeld Y. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. 2003; 12: 530–534.
102. Lansberg MG, O'Donnell MJ, Khatri P, Lang ES, Nguyen-Huynh MN, Schwartz NE, Sonnenberg FA, Schulman S, Vandvik PO, Spencer FA, Alonso-Coello P, Guyatt GH, Akl EA. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (9th Edition). *Chest*. 2012; 141(2Suppl): 601S-636S.
103. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ, Svensson PJ, Veenstra DL, Crowther M, Guyatt GH. Evidence-based management of anticoagulant therapy: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (9th Edition). *Chest*. 2012; 141(2Suppl): 152S-184S.

104. Bates SM, Greer JA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos AM, Vandvik PO. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (9th Edition). Chest. 2012; 141(2Suppl): 691S-736S.
105. Daum G. Lipids of Mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1985; 822: 1-42.
106. Pangborn M. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. J Biol Chem. 1942; 143: 247–256.
107. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Beta 2-glycoprotein-I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. Atherosclerosis. 1987; 63: 109–114.
108. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, Zwaal RF. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. Biochim Biophys Acta. 1986; 884(1): 142–149.
109. Schousboe I, Rasmussen MS. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by beta 2-glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I. Thromb Haemost. 1995; 73(5): 798–804.
110. Shi W, Chong BH, Hogg PJ, Chesterman CN. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. Thromb Haemost. 1993; 70(2): 342–345.
111. Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. Beta 2-Glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. Thromb Haemost. 1996; 75(1): 49–55.
112. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, Wisloff F, Marziali S, Morboeuf O, Barbui T. Clinical significance of different antiphospholipid

- antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood*. 2007; 110: 1178-1183.
113. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors of thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003; 101: 1827-1832.
 114. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2003; 102: 2717-2723.
 115. Wong RC, Favaloro EJ. A consensus approach to the formulation of guidelines for laboratory testing and reporting of antiphospholipid antibody assays. *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34(4): 361–372.
 116. Greer JP, Foerester J, Rodgers GM, Glader B, eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
 117. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990; 334:1544-1547.
 118. de Laat BH, Derksen RHW, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG. β 2GPI-dependent lupus anticoagulant activity highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2004; 104: 3598-3602.
 119. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Illiceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 1147-1152.
 120. Favaloro EJ, Wong RCW. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49(3): 447–461.

121. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1952; 31: 621–622.
122. Bowie EJ, Thompson Jr JH, Pascuzzi CA, Owen Jr CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963; 62: 416–430.
123. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb.* 1972; 1: 75–95.
124. Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. A clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood.* 1976; 48(4): 499–509.
125. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid syndrome: antibodies, antigens, and autoimmune response *Thromb Haemost.* 1999; 82: 656-661.
126. Ortel TL. Laboratory diagnosis of the lupus anticoagulant. *Curr Rheumatol Rep.* 2012; 14: 64-70.
127. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost.* 1991; 65(3): 320–322.
128. Arnout J. Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 83-91.
129. Arnout J, Vanrusselt M, Huybrechts E, Vermeylen J. Optimization of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of a recombinant tissue thromboplastin. *Br J Haematol.* 1994; 87: 94-99.
130. Devreese KMJ. Evaluation of a new commercial dilute prothrombin time in the diagnosis of Lupus Anticoagulants. *Thromb Res.* 2008; 123: 404-411.
131. Nakai K, Wada H, Nakatani K, Kamikura Y, Mastumoto T, Kobayashi T, Tonomura H, Tono Y, Ohyabu M, Ota S, Yamada N, Besho Y, Yamada E, Ikejiri M, Abe Y,

- Nobori T. Usefulness of a diluted protrombin time for accurately diagnosing antiphospholipid syndrome. *Vascular Disease Prevention*. 2009; 6: 25-29.
- 132.Exner T. Comparison of two simple tests for the lupus anticoagulant. *Am J Clin Path*. 1985; 83: 215-218.
- 133.Triplett DA, Brandt JT, Kaczor D, Schaeffer J. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am J Clin Path*. 1983; 79: 678-682.
- 134.Liestøl S., Jacobsen EM, Wisløff F. Dilute prothrombin time-based lupus ratio test. Integrated LA testing with recombinant tissue thromboplastin. *Thromb Res*. 2002; 105: 177-182.
- 135.Genzen JR, Miller JL. Presence of direct thrombin inhibitors can affect the results and interpretation of lupus anticoagulant testing. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124: 586-593.
- 136.Olah Z, Szarvas M, Bereczky Z, Kerenyi A, Kappelmayer J, Boda Z. Direct thrombin inhibitors and factor Xa inhibitors can influence the diluted prothrombin time used as the initial screen for lupus anticoagulant. *Arch Pathol Lab Med*. (accepted for publication).
- 137.Olah Z, Kerenyi A, Kappelmayer J, Schlammadinger A, Razso K, Boda Z. Rapid-onset heparin-induced thrombocytopenia without previous heparin exposure. *Platelets*. 2012; 23: 495-498.
- 138.Gosselin RC, King JH, Janatpur KA, Dager WH, Larkin EC, Owings JT. Effects of pentasaccharide (Fondaparinux) and direct thrombin inhibitors on coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128: 1142-1145.
- 139.Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Plumhoff EA, McKay H, Nichols WL, Meijer P, Hayward CP. Are laboratories following published recommendations for lupus

- anticoagulant testing? An international evaluation of practices. *Thromb Haemost.* 2009;101:178-184.
140. Jennings I, Kitchen S, Kitchen DP, Woods TAL, Walker D. ISTH/SSC lupus anticoagulant testing guidelines: how far have these been adopted by laboratories? *J Thromb Haemost.* 2011;9:2117-2119.
 141. Jennings I, Mackie I, Arnout J, Preston FE. Lupus anticoagulant testing using plasma spiked with monoclonal antibodies: performance in the UK NEQAS proficiency testing programme. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 2178-2184.
 142. Depasse F, Gerotziafas GT, Busson J, Van Dreden P, Samama MM. Assessment of three chromogenic and one clotting assays for the measurement of synthetic pentasaccharide fondaparinux (Arixtra) anti-Xa activity. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 346-348.
 143. Lasne D, Saffroy R, Bachelot C, Vincenot A, Rendu F, Papo T, Aiach M, Piette JC. Tests for heparin-induced thrombocytopenia in primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 1997; 97: 939.
 144. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Adamczuk Y, Pombo G, Carreras LO. Antiplatelet factor 4-heparin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 1999; 95: 271-279.
 145. de Larranaga G, Martinuzzo M, Bocassi A, Fressart MM, Forastiero R. Heparin-platelet factor 4 induced antibodies in patients with either autoimmune or alloimmune antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 373-373.
 146. Hoppensteadt DA, Walenga JM. The relationship between the antiphospholipid syndrome and heparin-induced thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008; 22(1): 1-18.

147. Gruel Y, Rupin A, Watier H, Vigier S, Bardos P, Leroy J. Anticardiolipin antibodies in heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Res.* 1992;67: 601-606.
148. Bounameaux C, Boehlen F, Membré A, Genné D, Pouplard C, Regnault V, de Moerloose P. Heparin-induced thrombocytopenia associated with interleukin-8-dependent platelet activation in a patient with antiphospholipid syndrome. *Eur J Haematol.* 2007; 79: 550-553.
149. Regnault V, Maistre E, Carteaux JP, Gruel Y, Nguyen P, Tardy B, Lecompte T. Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. *Blood.* 2003; 101: 1419-21.
150. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud E, Poncz M, Meyer D. Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood.* 1996; 88: 410-416.
151. Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Vissac AM, Delahousse B, Gruel Y. Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol.* 1997; 99: 273-280.
152. Stirling Y. Warfarin-induced changes in procoagulant and anticoagulant proteins. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; 6: 361–373.
153. Lood EP, Redish MH, Bociek SJ, Shapiro S. Thrombophlebitis migrans disseminata: report of a case in which gangrene of a breast occurred. *NY S J Med.* 1943; 43: 1121.
154. Verhagen H. Local haemorrhage and necrosis of the skin and underlying tissues, during anti-coagulant therapy with dicumarol or dicumacyl. *Acta Med Scand.* 1954; 148: 453–462.

- 155.Krauel K, Pötschke C, Weber C, Kessler W, Fürll B, Ittermann T, Maier S, Hammerschmidt S, Bröker BM, Greinacher A. Platelet factor 4 binds to bacteria-inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2011; 117(4): 1370-1378.
- 156.Greinacher A, Kohlmann T, Strobel U, Sheppard JA, Warkentin TE. The temporal profile of the anti-PF4/heparin immune response. *Blood*. 2009; 113(20): 4970-4976.
- 157.Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Cook RJ, Kelton JG. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2009; 113(20): 4963-4969.
- 158.Greinacher A, Holtfreter B, Krauel K, Gatke D, Weber C, Ittermann T, Hammerschmidt S, Kocher T. Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease. *Blood*. 2011;118(5): 1395-1401.

Iktatószám: DEENKÉTK/274/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Oláh Zsolt

Neptun kód: EAWYOC

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, Z.**, Kerényi, A., Kappelmayer, J., Schlammadinger, Á., Rázsó, K., Boda, Z.: Rapid-onset heparin-induced thrombocytopenia without previous heparin exposure.
Platelets. 23 (6), 495-498, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2011.650245>
IF:1.847 (2011)
2. **Oláh, Z.**, Szarvas, M., Bereczky, Z., Kerényi, A., Kappelmayer, J., Boda, Z.: Direct thrombin inhibitors and factor Xa inhibitors can influence the diluted prothrombin time used as the initial screen for lupus anticoagulant.
Arch. Pathol. Lab. Med. "közlésre elfogadva", 2012.
IF:2.577 (2011)
3. **Oláh Z.**: Heparin-indukálta thrombocytopenia: A heparinkezelés ritka, de életveszélyes szövődménye.
Magyar Csalorv. L. 8, 13-17, 2011.
4. **Oláh, Z.**, Bereczky, Z., Szarvas, M., Boda, Z.: Coagulation: Cascade!
Lancet. 378 (9792), 740, 2011.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60875-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60875-1)
IF:38.278
5. **Oláh Z.**, Boda Z.: Heparin indukálta thrombocytopenia.
Magyar Belorv. Arch. 62 (4), 241-246, 2009.



További Közlemények

6. Árokszállási, A., Ilonczai, P., Rázsó, K., **Oláh, Z.**, Bereczky, Z., Boda, Z., Schlammadinger, Á.:
Acquired haemophilia: An often overlooked cause of bleeding - experience from a Hungarian
tertiary care centre.
Blood Coagul. Fibrinolysis. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MBC.0b013e3283551102>
IF:1.238 (2011)
7. Boda, Z., Rázsó, K., Szarvas, M., **Oláh, Z.**, Ilonczai, P., Veréb, Z., Rajnavölgyi, É.: Repeated
application of autologous bone marrow-derived stem cell therapy in patients with severe
Buerger's disease.
Stem Cell Disc. 01 (01), 16-19, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/scd.2011.11002>
8. Boda, Z., Udvardy, M., Rázsó, K., Farkas, K., Tóth, J., Jámbor, L., **Oláh, Z.**, Ilonczai, P., Szarvas, M.,
Kappelmayer, J., Veréb, Z., Rajnavölgyi, É.: Stem cell therapy: A promising and prospective
approach in the treatment of patients with severe Buerger's disease.
Clin. Appl. Thromb. Hemost. 15 (5), 552-560, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177.1076029608319882>
IF:1.351
9. Boda Z., Udvardy M., Farkas K., Tóth J., Jámbor L., Soltész P., Rázsó K., **Oláh Z.**, Ilonczai P.,
Szarvas M., Litauszky K., Hunyadi J., Sipos T., Kappelmayer J., Veréb Z., Rajnavölgyi É.:
Autológ csontvelői eredetű őssejtterápia eredménye előrehaladott perifériás artériás
érbetegségben.
Orv. Hetil. 149 (12), 531-540, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28125>
10. Ilonczai, P., Schlammadinger, Á., **Oláh, Z.**, Rázsó, K., Bereczky, Z., Boda, Z.: Temporarily
successful eradication therapy in acquired haemophilia with high inhibitor titer: A case report
with a new protocol.
Thromb. Haemost. 100 (1), 149-150, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH07-06-0422>
IF:3.803
11. Ilonczai P., Schlammadinger Á., **Oláh Z.**, Rázsó K., Bereczky Z., Boda Z.: Terápiarezisztens nagy
titerű szerzett gátlóteszt haemophilia sikeres immuntolerancia-indukciós kezelése:
Esetbemutató.
Hematológia-transzfuziológia. 40, 45-48, 2007.

12. Ilonczai P., Jámbor L., Bereczky Z., **Oláh Z.**, Boda Z.: Antitrombin- és protein-S-deficiencia, FII-G20210A heterozigóta mutáció - egy fiatal nőbeteg súlyos mélyvéna-thrombosisa. *Hematológia-transzfuziológia*. 39, 5-9, 2006.

Összesített impakt faktor: 49.094

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 42.702

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

Debrecen, 2012.09.11



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Boda Zoltán professzor úrnak, hogy munkámhoz kezdettől fogva támogató és inspiráló légkört biztosított, melyben a haemostaseológia iránti érdeklődésem elmélyülhetett; emellett gazdag ismeretanyaggal, magabiztos irányítással és emberséggel segített át azokon a felmerülő kisebb-nagyobb akadályokon, melyek olykor nehezítették előrejutásomat.

Köszönettel tartozom Szarvas Mariann tudományos munkatársamnak, aki a laboratóriumi kutatómunkában és az eredmények értékelésében nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Hálával tartozom Bereczky Zsuzsának, a Klinikai Kutató Központ docensének a lelkiismeretes és odaadó szakmai és emberi segítségért.

Köszönöm Kappelmayer János professzor úrnak és Kerényi Adrienne adjunktus nőnek, hogy tanácsaikkal és hasznos ötleteikkel építő módon segítették elő kutatómunkámat.

Végül, de nem utolsó sorban az elmúlt évek erőfeszítéseimhez nélkülözhetetlen volt családom türelme és támogató szeretete.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**