

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**A heparin-indukálta thrombocytopenia új aspektusai**

**Dr. Oláh Zsolt**

Témavezető: Dr. Boda Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2012

## **A heparin-indukálta thrombocytopenia új aspektusai**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Oláh Zsolt, okleveles általános orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora

### **A doktori szigorlati bizottság:**

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora  
Dr. Ajzner Éva, Ph.D.

### **A doktori szigorlat időpontja és helye:**

**2012. november 27. 11 óra, a Gyermekklinika Könyvtára**

### **Az értekezés bírálói:**

Dr. Vezendi Klára, Ph.D.  
Dr. Katona Éva, Ph.D.

### **A bírálóbizottság:**

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora  
Dr. Ajzner Éva, Ph.D.  
Dr. Vezendi Klára, Ph.D.  
Dr. Katona Éva, Ph.D.

### **Az értekezés védésének időpontja és helye:**

**2012. november 27. 13 óra, a Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme**

## BEVEZETÉS

A heparint közel egy évszázada fedezték fel és az 1930-as évek végétől alkalmazzák vénás thromboemboliák kezelésére és megelőzésére. A heparinkezelés ritka, de életet veszélyeztető szövődménye a heparin-indukálta thrombocytopenia (HIT). A HIT immunmechanizmus révén, a thrombocyt faktor 4 (PF4)/heparin komplex ellen termelődött IgG izotípusú, thrombocyttaaktiváló autoantitestek közvetítésével alakul ki. Az IgG típusú antitestek termelését a heparinhoz kötött PF4 felszínén megjelenő neoepitopok váltják ki. Ezt követően a PF4/heparin/IgG komplexek az Fc $\gamma$ IIa receptorokon keresztül a thrombocytákat aktiválhatják, mely során újabb, nagy mennyiségű PF4 kerül a keringésbe egyéb, prokoaguláns hatással bíró anyagok és mikropartikulák kíséretében. A thrombocytopeniát elsősorban consumptionnal magyarázzák. A HIT antitestek ugyanakkor az endothel sejteket és a monocytákat is aktiválják, további prokoaguláns irányú változásokat eredményezve. A fenti folyamatok következményeként a HIT - a thrombocytopenia és a heparin alkalmazása ellenére – artériás és vénás thrombosisok fokozott veszélyével társul.

A PF4/heparin komplex elleni antitestek jelenléte csak az esetek kis hányadában okoz klinikailag is nyilvánvaló megbetegedést. Az antitest kimutatása tehát általában szükséges a HIT diagnózisához, de önmagában nem bizonyítja azt.

A HIT-re jellemző a heparinkészítmények alkalmazása mellett kialakuló valódi vagy relatív thrombocytopenia (vérlemezkeszám csökkenése >50%). Az esetek 50%-ában ehhez vénás vagy artériás thromboembolia társul (HITT). A thrombocytopenia időbeli kialakulása alapján a HIT-nek különböző típusait különíthetjük el. A típusos HIT a heparinkezelés 5-10. napja között alakul ki. Rapid HIT során a thrombocytopenia a heparin bevezetését követően már 24 órán belül észlelhető. A késői és a spontán HIT szórványos eseteit szintén leírták már. A HIT diagnózisa elsősorban a klinikai kép alapján merül fel, gyanúja esetén meg kell fontolni a csökkent vérlemezkeszám egyéb lehetséges okait is

(pseudothrombocytopenia, antifosfolipid szindróma, szepszis, stb.). A kórkép fennálltának valószínűségét a klinikai jelek értékelésén alapuló 4T és HEP pontrendszerek segítségével pontosíthatjuk.

A PF4/heparin komplexek ellen termelődött antitestek kimutatására kétféle laboratóriumi teszt áll rendelkezésünkre. A funkcionális tesztek a thrombocyták heparin jelenlétében bekövetkező aktivációját mutatják ki, és ezáltal közvetve az említett antitestek jelenlétét bizonyítják. Az immunológiai tesztek - általában ELISA - közvetlenül és specifikusan a PF4/heparin komplex ellen termelődött antitesteket detektálják. A módszer könnyen elérhető, nagyon szenzitív, specificitása azonban alacsony. A funkcionális vizsgálatok ezzel szemben magas specificitással rendelkeznek, elérhetőségük viszont korlátozott. A HIT antitestek általában 3-4 hónapon át mutathatók ki a keringésben.

A HIT/T kezelése során a kórkép korai stádiumban való felismerése és a szövődmények megelőzése az elsődleges cél. HIT/T gyanúja esetén a heparinkezelés minden formáját azonnal fel kell függeszteni és valamely direkt trombin inhibítort (DTI) (rekombinált hirudin, bivalirudin, argatroban) vagy faktor Xa (FXa)-gátlót (danaparoid, fondaparinux) kell bevezetni. DTI alkalmazásakor a kezelés laboratóriumi kontrolljára az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI), míg az indirekt FXa-gátlók laboratóriumi kontrolljára szükség esetén az anti-Xa aktivitás mérése szolgál. HIT/T-ben fokozott elővigyázatosságot igényel a kumarinszármazékok beállítása a kumarin-indukálta bőrnekrozis és a vénás végtagi gangréna kialakulásának fokozott veszélye miatt.

A gyakorlatban komoly problémát jelenthet a HITT és az antifosfolipid szindróma (APS) elkülönítése. A két kórkép között mind a patomechanizmust, mind a klinikai képet illetően jelentős hasonlóságok és átfedések észlelhetők. A laboratóriumi vizsgálatok szintén zavart keltőek lehetnek, APS-ban ugyanis ELISA technikával gyakran mutathatók ki - valódi HIT-et nem okozó - PF4 elleni antitestek. Elméletileg antifosfolipid antitestek (APAk) is gyakrabban

jelenhetnek meg HIT-ben, utóbbit azonban nagy betegcsoporton még senki sem vizsgálta.

Az APS-t klinikailag thrombosisok és/vagy szülészeti komplikációk jellemzik, melyhez IgG és/vagy IgM típusú APAk – anti-cardiolipin (aCL) és/vagy anti- $\beta$ 2GPI és/vagy lupus antikoaguláns (LA) - tartós jelenléte társul. Az aCL és anti- $\beta$ 2GPI kimutatása ELISA technikával történik, lényegesen bonyolultabb azonban a LA bizonyítása. A LA irányú laboratóriumi szűrővizsgálat során két eltérő alvadási utat vizsgáló, foszfolipid-függő alvadási tesztet kell elvégezni, melyek a hígított Russell vipera mérge idő (dRVVT) és egy APTI alapú módszer, alacsony foszfolipid tartalom mellett. A hígított protrombin idő (dPT) mérésén alapuló, rekombinált tromboplasztint alkalmazó teszt szintén széles körben használt, megbízható és érzékeny módszer LA kimutatására.

A LA kimutatását célzó laboratóriumi tesztek értékelését a különböző alvadásgátló készítmények befolyásolhatják a megnyúlt alvadási idők miatt. A széles körben alkalmazott kis molekulatömegű heparinkészítmények (LMWH), illetve a HIT-ben alkalmazható DTI-k és FXa-gátlók LA tesztekre kifejtett hatásával kapcsolatban azonban hiányosak az információink. Ennek ellenére bizonyos körülmények között a LA azonnali vizsgálata lehet indokolt az alkalmazott kezeléstől és a thrombosis időbeni közelségétől függetlenül. Ezért fontos, hogy megfelelő ismeretekkel rendelkezünk a különböző alvadásgátló készítmények LA tesztekre gyakorolt hatásáról. In vitro kísérletekkel már igazolták, hogy a heparin és a DTI-k terápiás koncentrációi befolyásolják a közös út vizsgálatán alapuló dRVVT és az intrinszik alvadási utat mérő LA-érzékenyített APTI vizsgálatok eredményeit. Mivel a HIT-ben alkalmazható lepirudin és FXa inhibitorok a terápiás tartományban alig vannak hatással a protrombin időre, kíváncsiak voltunk az e tekintetben eddig nem vizsgált extrinszik alvadási út értékelésén alapuló LA tesztekre kifejtett hatásukra is. Az elvégzett kísérletek azért is fontosak, mert a dPT mérésén alapuló teszt részét képezi a LA kimutatását célzó vizsgálati algoritmusnak a Debreceni Egyetemen.

## **CÉLKITÚZÉSEK**

1. A Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének II. sz. Belgyógyászati Klinikáján 2004-2011 között HIT/T miatt kezelt betegek adatait retrospektív módon értékelve vizsgálni kívántuk az antifosfolipid 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.

## **BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **HIT/T-ben szenvedő betegek retrospektív vizsgálata**

Betegek: Retrospektív módon vizsgáltuk azt a 12 beteget, akiket 2004 és 2011 között a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének II. sz. Belklinikáján kezeltünk HIT/T miatt. A HIT/T diagnózisát akkor állítottuk fel, ha

1. a thrombocytaszám csökkenés mértéke elérte vagy meghaladta a kiindulási érték 50%-át valamely heparinkészítmény alkalmazása mellett, és
2. a 4T és/vagy HEP érték alapján a klinikai kép elsősorban HIT/T fennálltát valószínűsítette (4T és/vagy HEP érték  $\geq 5$  pont), és
3. a HIT irányú laboratóriumi teszt pozitív eredményt adott.

Módszerek: A HIT antitesteket kimutató laboratóriumi vizsgálatok nem voltak egységesek, az elérhető módszerek idővel változtak, fejlődtek.

HIT irányú immunológiai tesztként partikulált gél immunoassay (PaGIA) (DiaMed AG) és/vagy ELISA (Zymutest HIA IgG, Hyphen BioMed) vizsgálatok történtek minden betegnél. Pozitív eredmény esetén az alábbi funkcionális tesztek valamelyikét szintén elvégeztük.

A heparin-indukálta thrombocytá aggregáció (HTAG) vizsgálatát Chrono-Log 660 aggregométerrel (Havertown, PA) végeztük, mely során egészséges donor thrombocytadús plazmájához betegből származó thrombocytaszegény plazmát (PPP) és heparint adtunk. HIT/T esetén thrombocytá-aggregáció alakul ki a heparin kis koncentrációját (0.3 NE/ml) alkalmazva.

Az áramlási citometria (FACScan, Beckton Dickinson) során az aktivált thrombocyták fokozott annexin-V kötő képességét mutatjuk ki heparin jelenlétében.

A LA irányú szűrővizsgálatok LA érzékenyített APTI (PTT-LA, Diagnostica Stago) és dPT ráta (Siemens) mérésével történtek a gyártók leírásai szerint. A dPT ráta mérésénél 1:50 és 1:500 arányú tromboplasztin (Innovin) hígítást alkalmaztunk. A keverékes vizsgálat szintén a PTT-LA használatával történt, a

vizsgálandó és a kevert normál plazma (NPP) 1:1 arányú összemérését követően. Megerősítő vizsgálatra hexagonalis foszfolipid tesztet (Staclot LA, Diagnostica Stago) alkalmaztunk.

Az aCL és az anti- $\beta$ 2GPI antitestek kimutatása ELISA technikával történt (Quanta Lite™ ACA IgG III, IgM III és Quanta Lite™  $\beta$ 2GPI IgG, IgM, INOVA Diagnostics Inc.).

### **A HIT-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a dPT meghatározásán alapuló lupus antikoaguláns tesztekre**

LA negatív minták: Egészséges egyénektől - tájékoztatásuk és írásos beleegyezésük után – perifériás vénás vérvétel történt. A donorok előzőleg semmilyen antikoaguláns hatású készítményt vagy nem-szteroid gyulladáscsökkentőt nem szedtek.

LA pozitív minták: Előzőleg már igazolt, LA-sal rendelkező, de antikoaguláns kezelésben nem részesülő egyének plazmái szolgáltak LA pozitív mintaként a vizsgálat során. A LA jelenlétének kimondása a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság aktualizált és standardizált ajánlásai szerint történt.

LA negatív és LA pozitív egyének mintáinak thrombocytaszegény plazmáit használtuk fel a továbbiakban a vizsgálni kívánt antikoagulánsok dPT-re és dPT rátára kifejtett hatásának értékeléséhez, illetve thrombocytaszegény NPP-t 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) és az argatrobant (250 mg/2.5 ml Argatra) tartalmazó oldatokat a gyártó utasításai szerint készítettük el. Az előretöltött fecskendőkben található fondaparinux (2.5 mg/0.5 ml Arixtra), enoxaparin (10 000 anti-Xa NE/ml Clexane) és danaparoid (750 anti-Xa NE/0.6 ml Orgaran) oldatok nem igényeltek további előkészítést.

A továbbiakban ezen alvadásgátló készítmények emelkedő koncentrációit alkalmaztuk a vizsgálandó plazmamintákban, lefedve a terápiás tartományt is. A FXa-gátlókat tartalmazó mintákat heparináz (Hepzym, Siemens) hiányában és jelenlétében is vizsgáltuk.

Koagulációs tesztek: A protrombin idő (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. LMWH kalibrátort (Siemens) alkalmaztunk az enoxaparin és a danaparoid, illetve fondaparinux kalibrátort (Diagnostica Stago) a fondaparinux koncentrációjának meghatározásához.

A dPT-t BCS-XP koagulométerrel mértük az Innovin reagens különböző hígításai mellett (1:50, 1:100, 1:200, 1:500; a reagens hígítása fiziológiás sóoldattal történt). LA jelenlétének szűréséhez a vizsgált plazma és a NPP hígított protrombin idejének hányadosaként számított dPT rátát használtuk. A dPT ráta helyi felső határértékeként korábbi vizsgálatok alapján 1.2 került megállapításra, így 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) használtuk.

A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Helyi Etikai Bizottsága engedélyezte.

## **EREDMÉNYEK**

A 2004-2011 közötti időszakban 12 HIT/T-ben szenvedő beteget kezeltünk klinikánkon. Közülük 10 betegnél történt meg valamely APA (aCL, anti- $\beta$ 2GPI és/vagy LA) vizsgálata és nyolc esetben bizonyult ezek közül legalább egy 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, a dPT-re kifejtett hatása viszont nem volt ismert, ezért – a betegek adatainak további értékelése előtt - megvizsgáltuk a HIT-ben alkalmazható alternatív antikoaguláns készítmények dPT mérésén alapuló LA tesztekre kifejtett hatását.

### **A HIT-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a dPT meghatározásán alapuló lupus antikoaguláns tesztekre**

#### Direkt trombin inhibitorok terápiás koncentrációi és hatásai az alvadási tesztekre

Az argatroban és a lepirudint külön-külön NPP-hez adva az APTI és PI mérésével dózis-hatás görbéket készítettünk. A lepirudin és az argatroban APTI-re kifejtett hatása hasonló lefutású telítési görbét mutatott. Lepirudin esetében az alap APTI 1.5-2-szeres megnyúlását tekintjük terápiás hatásúnak, melyet vizsgálatainkban a 0.26–0.67  $\mu$ g/ml közötti koncentrációtartományban értünk el. A lepirudint emelkedő koncentrációkban alkalmazva a PI/INR nem mutatott jelentős változást. Az argatroban kezelés során az alap APTI 1.5-3-szoros értékét kell elérni a terápiás hatáshoz, mely az általunk készített dózis-hatás görbe alapján 0.3-2.0  $\mu$ g/ml koncentrációtartománynak felel meg. Argatroban esetében a PI kifejezett, jól mérhető megnyúlását észleltük.

#### 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 hígításainak dPT-re kifejtett hatását vizsgáltuk NPP-t és a vizsgált gyógyszerek előre meghatározott koncentrációit alkalmazva. A dPT ráta

és az Innovin reagens hígításának mértéke között – a lepirudin kivételével – lineáris kapcsolatot találtunk. A tromboplasztin hígítási arányát növelve a dPT és a dPT ráta is fokozatos növekedést mutatott. Az eredmények ismeretében a továbbiakban két jelentősen eltérő hígítású reagenssel (1:50 és 1:500) végeztünk kísérleteket, hogy lefedjük a gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott tromboplasztin koncentrációkat.

#### Direkt trombin inhibitorok hatása a dPT rátára LA negatív mintákban

A DTI-k hatására a dPT ráta jelentősen, koncentrációfüggő módon emelkedett. A 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. 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. 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 gyógyszer-koncentráció (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.

#### 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, habár az illesztett egyenesek meredeksége eltérő volt a különböző készítményeknél. Az illesztett egyenesek egyenletéből számítva 1:500 hígítású Innovin reagens esetében a következő anti-Xa értékeknél értük el a dPT ráta 1.2-es határértékét: enoxaparin, 0.13 NE/ml; danaparoid, 0.32 NE/ml; fondaparinux, 0.74  $\mu\text{g/ml}$ . Ugyanezek az értékek 1:50 hígítású reagens esetében: enoxaparin, 0.44 NE/ml; danaparoid, 0.87 NE/ml; fondaparinux, 1.59  $\mu\text{g/ml}$ .

Heparináz hozzáadásával a dPT ráta értéke csak az enoxaparint tartalmazó mintákban csökkent a kiindulási, gyógyszer nélkül mért szintekre, fondaparinux és danaparoid esetében pedig csökkent ugyan, de szignifikáns mértékben emelkedett és álpozitív maradt.

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

LA pozitív PPP mintákban a dPT ráta további emelkedést mutatott minden vizsgált antikoaguláns esetében. A LA negatív mintákhoz hasonlóan a LA pozitív plazmák esetében is csak az enoxaparint tartalmazó mintákban csökkentette a dPT ráta értékét a kiindulási szintre a heparináz alkalmazása.

#### **HIT/T-ben szenvedő betegek retrospektív vizsgálata**

A további vizsgálatból – in vitro kísérleteink alapján - 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).

A vizsgálatra alkalmas betegcsoport elsősorban súlyos artériás (1/7) vagy vénás (5/7) thrombosisal társult HITT (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- $\beta$ 2GPI vagy aCL antitest magas titerben, illetve LA) jelenléte, két beteg esetében APA biztosan nem volt igazolható, egy betegnél pedig az aCL IgM detektálható volt ugyan, de csak a magas titert kijelölő határérték közvetlen közelében. Két beteg esete kiemelt figyelmet érdemel, mivel náluk az APAk 3 hónap múlva már nem voltak kimutathatóak, így az APS diagnózisa biztosan kizárható volt. Ezeket az eseteket további részletes elemzésre és ismertetésre is érdemesnek találtuk.

#### Esetismertetés (P1)

A 76 éves férfi beteget traumás bal oldali combnyaktörés miatt operálták. Műtét előtti thrombocytaszáma 160 G/l volt. Hat órával a műtétet követően napi 1x60

mg enoxaparin indult szubkután, profilaxis céljából. A műtét utáni negyedik napon – tekintettel a korábbi visszatérő alsó végtagi mélyvéna thrombosisokra – enoxaparin védelemben az acenokumarin visszaállítását is elkezdték. Nyolc nappal a műtét után bal alsó végtagi fájdalom és ödéma, majd végtagi gangréna alakult ki. Color-doppler vizsgálat heveny, proximális mélyvéna thrombosisot igazolt, megtartott artériás keringés mellett. A háttérben a kumarin kezeléshez társuló szövődmenyt – kumarin-indukálta bőrnekrozist – feltételeztek, ezért az acenokumarint elhagyták és az enoxaparin adagját terápiás szintre (2x60 mg/nap) emelték. A műtét utáni 12. napon már csak 51 G/l vérlemezkeszámot mértek. 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. A laboratóriumi adatok alapján tovább folytattuk az enoxaparin kezelést. A műtétet követő 14. napon az enoxaparin injekció beadási helyén bőrnekrozis alakult ki, bár az ismételten elvégzett PaGIA vizsgálat negatív eredménye továbbra is a PF4/heparin antitestek hiányát támogatta. Ennek ellenére a HTAG vizsgálat az enoxaparin kis koncentrációja mellett pozitívnak bizonyult, támogatva a HITT és az annak szövődmenyeként 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 emelkedett. A vénás végtagi gangréna és heparin-okozta bőrnekrozis miatt debridement és több plasztikai műtét történt bőrátültetéssel, melyek eredményeként végül csak a bal I. és V. lábujjak eltávolítására volt szükség, a sebek pedig jó eredménnyel gyógyultak. Az első alkalom után 3 hónappal elvégzett ismételt vizsgálat APA-t már nem mutatott ki. Rekombinált hirudin védelemben acenokumarin kezelés került beállításra szövődmenymentesen.

### Esetismertetés (P2)

A 64 éves nőbeteget methicillin-rezisztens *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) szepszis miatt kezelték, mely célzott antibiotikum terápia alkalmazása mellett megszűnt. Kezelése során a beteg heparinkészítményt semmilyen formában nem kapott. A vérlemezkeszámot 228 és 314 G/l között mérték, mely az elbocsátáskor 259 G/l volt. Öt nappal később háziorvosa profilaxis céljából napi 1x40 mg enoxaparin indított szubkután. A beteg ekkor kapott először heparinkészítményt, majd 36 órával később, két szubkután adott enoxaparin inj. után, thrombocytopenia miatt (86 G/l) került felvételre klinkánkra. Felvételekor mindkét váll területén - az enoxaparin injekciók beadási helyein - bőrnekrozist észleltünk, majd 24 órán belül a bal oldali végtagok distalis részein végtagi gangréna alakult ki. A color-doppler vizsgálat mindkét bal oldali végtag mélyvénáinak akut thrombosisát írta le, tökéletes artériás keringés mellett. A közben elvégzett laboratóriumi vizsgálatok magas titerben aCL IgG-t igazoltak, felvetve APS gyanúját a klinikai kép alapján véleményezhető HITT mellett. LA és anti- $\beta$ 2GPI nem volt kimutatható. A PF4/heparin komplex elleni antitesteket kimutató PaGIA és ELISA tesztek erősen pozitív eredményt adtak, bizonyítván a nagy mennyiségű IgG típusú HIT antitest jelenlétét. A HIT diagnózisa további megerősítést nyert az áramlási citometriai vizsgálatok során. A klinikai kép és a laboratóriumi eredmények alapján vénás végtagi gangrénával és heparin-okozta bőrnekrozissal társuló rapid-HITT volt véleményezhető, bár a beteg korábban heparinkészítményt nem kapott. Az enoxaparin azonnali elhagyását követően rekombinált hirudin kezelés indult és a thrombocytaszám 48 óra múlva már a referencia tartományban volt mérhető (196 G/l). Ennek ellenére a vénás végtagi gangréna a bal kéz és a bal láb amputációját tette szükségessé. Ezt követően rekombinált hirudin védelemben acenokumarin terápia került beállításra. Három hónappal az első vizsgálatot követően APA már nem volt kimutatható, így az APS diagnózisa kizárható volt.

## **MEGBESZÉLÉS**

Nagy arányban észleltük valamely APA - de különösen az aCL és a LA – jelenlétét HIT/T diagnózissal kezelt betegeinkben. A HITT klinikumával társuló APAk jelenléte komoly differenciáldiagnosztikai problémát okozhat az APS és a HITT elkülönítése során. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy ezek a betegek általában már valamilyen antikoaguláns kezelésben is részesülnek, mely a LA kimutatását célzó laboratóriumi tesztek értékelhetőségét befolyásolhatja. Ezért betegeink adatainak értékelése előtt in vitro vizsgálatokkal tisztáztuk a HIT-ben alkalmazható antikoagulánsok és az enoxaparin hatását a dPT mérésén alapuló LA tesztekre.

### **A HIT-ben alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a dPT meghatározásán alapuló lupus antikoaguláns tesztekre**

A rekombinánt tromboplasztin reagens által meghatározott dPT széles körben elterjedt, jól dokumentált és érzékeny szűrőteszt a LA kivizsgálása során. A dPT meghatározásához a rekombinánt tromboplasztin (Innovin) eltérő hígításait alkalmazzák. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a tromboplasztin reagens hígításának növelésével egyre emelkedő dPT rátát kapunk a vizsgált alvadásgátló készítmények esetében. Az eredmények birtokában további munkánk során az Innovin rekombinánt tromboplasztin két jelentősen eltérő – 1:50 és 1:500 – hígítását alkalmaztuk, hogy lefedjük a gyakorlatban is használt hígításokat.

A DTI hatású argatroban és lepirudin jelentős mértékben növeli a dPT és dPT ráta értékét már a terápiás gyógyszer-koncentrációk szintje alatt is. Ezen gyógyszerek alkalmazása mellett tehát a dPT mérésén alapuló LA tesztek értékelése nem megbízható.

A FXa-gátlók emelkedő koncentrációi lineárisan növelték a dPT ráta értékét, szintén magukban hordozva az álpozitív, 1.2 fölötti eredmény elérésének lehetőségét. A különböző FXa-gátlóknak azonban eltérő mértékű hatása volt a

dPT rátára: az enoxaparin okozta a dPT legnagyobb fokú megnyúlását, majd danaparoid és fondaparinux a sorrend.

Habár a heparináz képes volt az összes vizsgált FXa-gátló hatását felfüggeszteni 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 teljesen felfüggeszteni.

In vitro kísérleteink eredményei alapján a további vizsgálatokból kizártuk azokat a betegeket, akiknél csak LA irányú vizsgálat történt valamely DTI vagy FXa-gátló alkalmazása mellett. Esetükben a LA pozitívitas ugyanis az alvadászátlók által okozott laboratóriumi interferencia eredményeként is kialakulhatott. Kivételt azok a betegek képeztek, akik a laboratóriumi vizsgálat idején még enoxaparint kaptak, és az LMWH hatását in vitro heparinázzal felfüggesztették. A továbbiakban a vizsgálatban maradó hét beteg eredményeinek ismeretében emelem ki azokat az új vagy ritka elemeket, amelyek ismerete a HIT patomechanizmusában, diagnosztikájában vagy kezelésében fontos lehet.

## **HIT/T-ben szenvedő betegek retrospektív vizsgálata**

### HIT-hez társuló antifoszfolipid antitest pozitívitas

Az általunk vizsgált hét betegből négy esetben lehetett kimutatni LA-t vagy nagy titerben aCL antitesteket, de emellett további, kis titerű antitest pozitívitas a legtöbb esetben észleltünk. Ennek három magyarázata lehetséges: 1. a HIT/T és az APS gyakori társulása; 2. keresztreaktivitas az APAk és HIT antitestek között; 3. valódi APAk gyakori és átmeneti jelenléte HIT/T-ben, APS nélkül. A két részletesen tárgyalt eset a HIT/T és az APS társulása ellen szól. A súlyos HIT kifejlődése kiterjedt artériás és/vagy vénás thrombosisokkal, az egyébként igen ritka heparin-indukálta bőrnekrozis és vénás végtagi gangréna társulása és az APAk átmeneti, a HIT/T akut szakára korlátozódó jelenléte fel kell vesse az

APAk esetleges patogenetikai és prognosztikai szerepét HITT-ben. Az APAk átmeneti pozitivitását HIT/T-ben elsőként írtuk le a két részletesen tárgyalt eset kapcsán, melynek ismerete differenciáldiagnosztikai szempontból is fontos lehet. Eredményeink alapján további vizsgálatok szükségesek az APAk HIT/T-ben betöltött lehetséges szerepének tisztázása céljából.

#### 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. Az esetek kevesebb mint 5%-ában azonban immunológiai tesztekkel nem mutathatók ki ezek a típusos HIT antitestek, habár a thrombocytaaktivációs próbák pozitív eredményt adnak. Ezekben az esetekben PF4-gyel rokon kemokinek - neutrophil-aktiváló peptid-2 (NAP-2) vagy interleukin-8 (IL-8) - ellen irányuló antitesteket mutattak ki és hoztak összefüggésbe a HIT kialakulásával. P1 betegünk esetében is valamely PF4-gyel rokon kemokin elleni antitest játszhatott főszerepet a HITT kifejlődésében. Ez magyarázatot ad az immunológiai tesztek ismételt negatív eredményére és a HTAG teszt pozitivitására. A klinikailag gyanús esetekben ezért negatív immunológiai tesztek birtokában is el kell végezni valamely funkcionális HIT tesztet.

##### Vénás végtagi gangréna társulása HITT-tel

A vénás végtagi gangréna a thrombosisos végtag acralis részeit érinti, míg az artériás keringés teljes mértékben megtartott. Patomechanizmusa megegyezik a kumarin-indukálta bőrnekrozisával. A HITT-ben fellépő kumarin okozta végtagi gangréna viszonylag magas arányát (12.1%) azonban a HIT-tel együttjáró fokozott trombingeneráció és prokoaguláns tényezők magyarázzák. A vénás végtagi gangréna incidenciája a HITT megfelelően irányított kezelésével jelentősen csökkenthető. Betegeinknél három esetben alakult ki vénás végtagi gangréna. Kiemelten is kell foglalkoznunk a P2 beteggel, akinél az igen súlyos,

két végtagot is érintő és amputációhoz vezető vénás végtagi gangréna K-vitamin antagonistá (VKA) alkalmazása nélkül alakult ki. Az irodalomban elméletileg leírják ugyan ennek lehetőségét, jól dokumentált esetet azonban nem találtunk. A HITT önmagában – VKA alkalmazása nélkül – tehát 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.

#### Rapid HITT előzetes heparinexpozíció nélkül

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. Greinacher és mtsai azonban igazolták, hogy a PF4 képes bizonyos baktériumok felszínén levő polianionokhoz is kapcsolódni, melyekkel szemben a humán anti-PF4/heparin antitestek keresztreakciót mutatnak. Kísérleteikben egerekben mesterségesen kiváltott idült peritonitis és sepsis során HIT antitestek jelentek meg heparin alkalmazása nélkül is. Ezen vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a PF4/heparin elleni korai immunizáció a PF4-hez kötődni képes egyéb polianionok jelenlétében is megtörténhet. A felvázolt elmélet magyarázatot ad a P2 betegnél a szeptikus folyamatot követően kifejlődő rapid-HITT-re is, ahol az események sorrendje a következő lehetett: 1. a sepszis során az aktiválódott trombocytákból felszabaduló PF4 az MRSE felszínén található polianionokhoz kötődik és neoepitopok kerülnek a felszínre; 2. ezen neoepitopok ellen primer immunválasz során dominálón IgM, majd ezt követően IgG antitestek termelődnek, melyek keresztreakálnak a PF4/heparin komplexszel is; 3. enoxaparin alkalmazása, PF4/enoxaparin komplexek kialakulása; 4. a sepszis során a PF4/MRSE ellen termelődött, még a keringésben jelenlevő IgG típusú antitestek kötődnek a PF4/heparin komplexhez; 5. rapid-HITT kialakulása előzetes heparin alkalmazása nélkül. A sepszist követően, előzetes heparinexpozíció nélkül kialakuló rapid-HITT első,

jól dokumentált esete (P2) támogatja Greinacher munkacsoportjának új elméletét, és felhívja a figyelmet arra, hogy rapid-HITT lehetősége nem zárható ki előzetes heparinexpozíció hiányában.

## **7. ÖSSZEFOGLALÁS - ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK**

### **A heparin-indukálta thrombocytopeniában (HIT) alkalmazható antikoaguláns készítmények és az enoxaparin hatása a hígított protrombin idő (dPT) meghatározásán alapuló lupus antikoaguláns (LA) tesztekre**

- A direkt trombin inhibitor hatással bíró argatroban és lepirudin jelentős mértékben növeli a dPT és dPT ráta értékét már a terápiás gyógyszer-koncentrációk szintje alatt is. Ezen gyógyszerek alkalmazása mellett a dPT mérésén alapuló LA tesztek értékelése nem megbízható, álpozitív eredménnyel kell számolni.
- A dominálónan faktor Xa gátlóhatással bíró enoxaparin, danaparoid és fondaparinux eltérő, de szignifikáns mértékben növeli a dPT és dPT ráta értékét. Ezen gyógyszerek alkalmazása mellett a dPT mérésén alapuló LA tesztek értékelése szintén nem megbízható, álpozitív eredmény lehetőségével kell számolni.
- A heparináz – az anti-Xa aktivitás mérése alapján - az összes vizsgált FXa inhibitor hatását képes felfüggeszteni a terápiás gyógyszer-koncentrációk mellett, a dPT és a dPT ráta értéke azonban csak az enoxaparin esetében csökken a gyógyszer nélkül is mérhető alapszintre.
- Enoxaparin terápia esetén, heparináz alkalmazása mellett a dPT mérésén alapuló LA szűrőtesztek jól értékelhetőek és megbízhatóan alkalmazhatóak. Fondaparinux és danaparoid kezelés esetén heparináz alkalmazása mellett is előfordulnak álpozitív eredmények a dPT mérésén alapuló LA tesztekben.

## **Heparin-indukálta thrombocytopeniában szenvedő betegek retrospektív vizsgálata**

- A HIT/T diagnosztikája során számolni kell az átmeneti antifoszfolipid antitest (APA) pozitivitás lehetőségével, mely komoly differenciáldiagnosztikai problémát okozhat.
- Eredményeink alapján fel kell vessük 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.
- HITT diagnózisa nem zárható ki a PF4/heparin(polianion) elleni antitestek hiányában. HITT mellett szóló klinikai kép esetén negatív immunológiai tesztek ellenére is el kell végezni valamely funkcionális tesztet HIT irányában.
- A HITT-hez társuló – általában kumarinkészítmények alkalmazásával kapcsolatban kifejlődő - vénás végtagi gangréna K-vitamin antagonistá használata nélkül is kialakulhat.
- Rapid-HITT diagnózisa nem zárható ki előzetes heparinexpozíció hiányában sem.

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., Schlamadinger, 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 arteriális 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 gátlótestes haemophilia sikeres immuntolerancia-indukciós kezelése: Esetbemutatás.  
*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

