

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**EGY GLOBÁLIS THROMBOCYTA FUNKCIÓS TESZT (PFA-100 ZÁRÓDÁSI IDŐ)
ALKALMAZÁSA A THROMBOCYTA FUNKCIÓS ZAVAROK
DIAGNOSZTIKÁJÁBAN**

Dr. Kerényi Adrienne

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László
akadémikus, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET
ÉS
KLINIKAI KUTATÓ KÖZPONT
2005

BEVEZETÉS

A thrombocyták alapvető szerepet játszanak a haemostasisban. A thrombocyta adhézió a sérült érfalhoz, a thrombocyták egymáshoz való aggregációja, a haemostasis szempontjából fontos anyagok szekréciója a thrombocyta granulumokból és az aktivált thrombocyta felszín prokoaguláns hatása egy komplex folyamat részmechanizmusai. E folyamat bármelyik lépésének veleszületetten vagy szerzetten csökkent működése enyhétől-súlyos tünetekkel járó haemorrhagiás diathesist eredményezhet.

A thrombocyta funkciós zavarokat a thrombocyta aktiváció egyes lépéseinek megfelelően csoportosíthatjuk. A leggyakoribb thrombocyta funkciós defektus a von Willebrand betegség, amelynek hátterében a von Willebrand faktor (vWF) mennyiségi ill. minőségi eltérése áll. A vWF egyrészt kötődik az érfal sérülés során szabaddá váló kollagénhez (és egyéb szubendotheliális strukturákhoz), másrészt a thrombocyták felszínén lévő receptorához, a glikoprotein Ib-IX komplexhez (GPIb-IX), így biztosítva a thrombocyták kitapadását a sérült érfalhoz. Magas nyíróaránynál a vWF egy másik thrombocyta receptorhoz, a GPIIb-IIIa-hoz („fibrinogén receptor”) is kötődik, s így a vWF multimer hozzájárul a thrombocyták aggregációjához is. A vWF másik lényeges biológiai szerepe, hogy a keringésben komplexet alkot a VIII-as véralvadási faktorról (FVIII) megvédve azt a proteolitikus lebomlástól. A von Willebrand betegségnek 3 fő típusa van. Az 1-es típusban a vWF mennyisége csökkent, de multimer struktúrája normális. A 2-es típusban a vWF megváltozott multimer struktúrában megnyilvánuló minőségi zavarai állnak fenn; ezen fő csoporton belül több alcsoportot is megkülönböztetünk. A 2A altípusban a vWF funkció zavara a nagy molekula tömegű multimerek hiányával társul, a 2M altípusban a kóros működés (a thrombocytákhoz történő csökkent kötődés) mellett a multimer struktúra intakt. A 2B típusú betegségben fokozott a vWF affinitása a thrombocyta felszínén levő GPIb receptorhoz, amelynek következtében a legnagyobb molekula tömegű multimerek, a thrombocytákhoz való kötődés következtében, eltűnnek a plazmából. Erre a típusra jellemző még a thrombocyták risztocetinre adott, fokozott válaszkészsége. A 2N altípusban a vWF-nak a FVIII- hoz történő kötődése szenved zavart, aminek következtében normális vWF antigén szinthez és risztocetin kofaktor aktivitáshoz alacsony FVIII szint társul. A 3-as típusú, recesszíven öröklődő von Willebrand betegség a legsúlyosabb forma, mivel ez a típus a vWF gyakorlatilag teljes hiányát jelenti.

A Bernard-Sollier syndroma, aminek hátterében a thrombocytákon levő vWF receptor, a GPIb-IX hiánya vagy csökkent vWF kötődést okozó defektusa áll szintén a thrombocyták adhéziós zavarát okozza. A GPIb-IX egy furcsa és ritka defektusa vezet az ún. thrombocyta

típusú pseudo von Willebrand betegséghez. Hasonlóan a 2B típusú von Willebrand betegséghez a vWF itt is fokozottan kötődik receptorához, – ez utóbbi defektusa miatt – aminek következtében itt is hiányoznak a legnagyobb molekula tömegű multimerek. Szintén adhéziós zavart hoz létre a thrombocyták direkt kollagén receptorának (GPIa-IIa) abnormalitása is.

A thrombocytá aktiváció következő lépése a thrombocyták aggregációja, aminek folyamán az aktivált thrombocyták a plazmában jelenlevő fibrinogéne keresztül összekapcsolódnak. A potenciális fibrinogén receptor, a GPIIb-IIIa komplex a nyugvó thrombocytán nem köti a fibrinogént. Ahhoz, hogy a fibrinogén receptor kötő-képessége kialakuljon thrombocytá aktiváló ágensek [ún. primer agonisták: ADP, trombin, tromboxán A_2 (TXA_2)] receptoraikhoz történő kötődése által elindított biokémiai mechanizmusok beindulása szükséges. E primer agonisták receptorainak defektusa aggregációs zavarhoz is vezet, de ez - talán az ADP receptor defektusának a kivételével - szekréción zavart is okoz. A tisztán aggregációs eltérések háttérében afibrinogenaemia (fibrinogén hiány), dysfibrinogenaemia (kóros szerkezetű fibrinogén) ill. a Glanzmann thrombasthenia állhat. Ez utóbbi megbetegedés a thrombocytán levő fibrinogén receptornak, a GPIIb-IIIa-nak a defektusát jelenti.

A thrombocytá szekréción zavarok háttérében a biokémiai mechanizmus, storage pool megbetegedés ill. az adenin nukleotid metabolizmus rendellenességei állhatnak. A biokémiai mechanizmus veleszületett eltéréseit enzim (foszfolipáz, ciklo-oxigenáz, tromboxán szintetáz) defektusok, az előbb említett receptor defektusok, ill. szignál transzdukción zavarok okozhatják. A szerzett eltérések háttérében legtöbb esetben a ciklo-oxigenáz ill. tromboxán szintetáz inhibitorok jelenléte áll. Storage pool megbetegedést a megakaryocytákban a granula képződés hiánya ill. funkcionálisan defektív granulumok képződése okozhat. A storage pool megbetegedések három csoportba sorolhatók. A δ storage pool megbetegedés jelen lehet önállóan vagy más veleszületett betegségekkel társultan. Ez utóbbi csoportba sorolható a Hermansky-Pudlak (HPS), Chédiak-Higashi, Wiskott-Aldrich és TAR szindrómák. Az $\alpha\delta$ storage pool megbetegedésben a thrombocyták α és δ granulumjai is hiányoznak vagy kórosak. A harmadik csoport az α storage pool megbetegedés, ahová a gray platelet syndrome sorolható. A thrombocyták prokoaguláns aktivitásának zavara a Scott szindróma.

A thrombocytá adhézió, aggregáció, szekréción és a prokoaguláns aktivitás zavarát okozó betegségek diagnosztikája számos komplikált, időigényes, drága laboratóriumi tesztet igényel, s e vizsgálatok elvégzése speciális diagnosztikai centrumok feladata. Ugyanakkor

szükség volna egy olyan szűrőtesztre, ami tükrözi a thrombocyták funkció komplexitását és detektálja a thrombocyták funkció zavarainak meglétét.

Vizsgálataink kezdetén a thrombocyták számlálás mellett a thrombocyták rendszer zavarainak egyetlen általánosan elfogadott in vivo szűrőtesztje a vérzési idő meghatározás volt. Ez a szűrőteszt – a prokoaguláns hatás igen ritka zavarai kivételével – komplex képet nyújt a thrombocyták funkciójáról, de nem megfelelő érzékenységgel. Von Willebrand betegség enyhébb formái normál vérzési idő mellett is előfordulhatnak, az acetilszalicilsav thrombocyták funkciót gátló hatását a vérzési idő alig, sokszor csak a referencia tartományon belül maradó megnyúlással detektálja. További probléma, hogy nehezen standardizálható, csecsemőkön, kisgyermeken nehezen kivitelezhető és a páciens számára is kényelmetlen. Ezekon kívül a vérzéses komplikációk szempontjából prediktív értéke sem megfelelő. Mivel az antithrombocyták szereket egyre szélesebb körben alkalmazzák az artériás thrombosisok megelőzésében, ezek thrombocyták funkcióra kifejtett hatásának monitorozására sorozat vizsgálatokra is szükség lenne. Mindezek alapján komoly igény volt egy olyan, a thrombocyták funkciókat komplexen vizsgáló ex vivo tesztre, mely sorozatvizsgálatokra, monitorozásra is alkalmas, az in vivo viszonyokat leutánozza, és elég érzékeny az enyhe thrombocyták funkció zavarok kimutatására.

A PFA-100-as thrombocyták funkció analizátort ezzel a céllal hozta forgalomba a Dade-Behring cég. A készülék lelke az egyszer használatos patron, melynek egyik nyílásába mérendő a vizsgálathoz használatos citráttal alvadást gátló vér. A patron minta rezervoárja egy fóliával van elválasztva a szívó kapilláristól, mely a mérés kezdetén átszűrja a fóliát. Jól kontrollált és standardizált vákuum segítségével a minta egyenes áramlással egy thrombocyták aktiváló anyagokkal (kollagén és adrenalin vagy kollagén és ADP) átitatott membránnal lezárt kis rezervoárba kerül, amelyen egy kis apertura található. Az apertura úgy van kialakítva, hogy az áramlási viszonyok, mindenekelőtt a nyíró erő a kisartériákban kialakuló áramlási viszonyoknak ($5000-6000\text{ s}^{-1}$) feleljen meg. Az áramló aktivált thrombocyták kitapadnak az apertura falához, majd egymáshoz és fokozatosan eltömítik a nyílást. A készülék ezt az ún. záródási időt méri. A PFA-100 záródási időt a heparin terápiás koncentrációja nem befolyásolja.

További generális ex vivo thrombocyták funkció teszt az O'Brien-féle filter módszer. A PFA-100-al von Willebrand megbetegedésben nyert eredményeinket az O'Brien-féle filter módszerrel kapott eredményekkel dr. Schlammadinger Ágota és munkatársai vetették össze.

CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink célja annak kiderítése volt, hogy a PFA-100 thrombocyta funkciós analizátor (melynek rutin diagnosztikai alkalmazására vizsgálataink kezdetén még csak sporadikus közlések voltak) mennyire használható egyes öröklött ill. szerzett thrombocyta funkciós zavarok diagnosztikájában. E problémakört az alábbi négy fő területen vizsgáltuk:

- 1/ A thrombocyta adhézió és aggregáció defektusát jelentő von Willebrand betegség diagnosztikája, ahol mindeddig nem állt megfelelő szűrőteszt rendelkezésre.
- 2/ A thrombocyta aggregáció és szekréciónak egyes ritka öröklött zavarainak (Glanzmann thrombasthenia, Hermansky-Pudlak syndroma) diagnosztikája.
- 3/ Az acetilszalicilsav (ASA) által többnyire terápiás célból előidézett szerzett szekréciónak zavar diagnosztikája, ill. az ASA hatékonyságának a megítélése.
- 4/ A thrombolyticus terápia által előidézett esetleges thrombocyta funkciós zavar detektálása, ill. ennek alapján a vérzés veszélyének az előrejelzése.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Plazma alvadási idők, koagulációs faktorok és fibrinogén meghatározás

A 105 mmol/L pufferolt nátrium citrátossal alvadásgátolt vérből centrifugálással (2000xg, 20 min, 22 °C) nyert plazmákból alvadási időket: protrombin időt (PI), aktivált parciális thromboplastin időt (APTI), trombin időt (TI), reptiláz időt, valamint a módosított Clauss módszer szerint fibrinogén szintet határoztunk meg. Az alvadási faktorok (FVIII, FIX, FXI, FXII) aktivitását egyfázisú APTI alapú teszttel végeztük.

Vérzési idő meghatározás

A vérzési idő meghatározást Simplate II R (Organon Technika, Turnhout Belgium) egyszer használatos eszközzel végeztük. A gyártó által megadott referencia tartomány 2,5-9,5 min.

PFA-100 záródási idő meghatározása

A betegek mintáiból és a referencia tartomány megállapításához 31 egészséges, normál haemostasis szűrőteszteket mutató egyén mintájából elvégeztük a PFA-100 thrombocyta funkció analizátorral a záródási idők meghatározását kollagén/adrenalin és kollagén/ADP patronnal.

Thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálat

Az ADP (10 $\mu\text{mol/L}$), adrenalin (10 mg/L), mikrofibrilláris kollagén (1 és 5 mg/L) és arachidonsav (500 $\mu\text{g/mL}$) hatására létrejött thrombocyta dús plazma aggregációját és szekrécióját ill. a trombin (5 U/mL) hatására létrejött ATP szekréciót lumiaggregométerrel teszteltük. A denz testekből felszabaduló ATP monitorozása biolumineszcenciás módszerrel történt.

Áramlásos citometriás vizsgálatok

A Glanzmann thrombasthenia igazolása során a thrombocytákat az előre és oldalra szórt fény intenzitás, valamint a GPIb/IX receptor expressziója alapján Becton Dickinson FacScan készüléken kapuztuk. A GPIb/IX receptor komplexet fluoreszcein-izotiocanáttal (FITC) jelölt CD42a antitesttel azonosítottuk. A GPIIb jelöléshez fikoeritreinnel jelölt, a GPIIIa identifikálásra FITC-el jelölt monoklonális antitesteket használtunk.

A vérzési idő és a PFA-100 záródási idő összehasonlítása örökletes thrombocyta funkciók defektusokban

A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája

A von Willebrand betegség diagnózisának felállításához és típusának megállapításához az alábbi paramétereket határoztuk meg:

A risztocetin indukálta agglutináció vizsgálata 0,6 mg/mL és 1,2 mg/mL risztocetin koncentrációkkal történt.

A vWF antigén meghatározását (vWF:Ag) immunturbidimetriás módszerrel (Liatest, Diagnostica Stago, Asnieres, France) végeztük.

A vWF risztocetin kofaktor aktivitást (vWF R:Co) a Helena (Beaumont, TX, USA) kitjével határoztuk meg.

A vWF multimer analízise SDS-agaróz gélelektroforézissel,

a FVIII aktivitás meghatározása egyfázisú APTI alapú alvadási teszttel történt.

A vizsgálatokban 32 von Willebrand beteg vett részt, akik az alábbi altípusokba tartoztak: 1-es típus: n=22; 2A típus: n=2; 2B típus: n=4; 2N típus: n=1; 3-as típus: n=3.

A Hermansky Pudlak syndroma diagnosztikája

Az albinó gyermekek thrombocyta funkciójának részletes vizsgálatát intézetünkben Pap és mtsai közölték. A diagnózis felállítása a thrombocyták lumiaggregometriás vizsgálatával, a

thrombocyták ADP/ATP tartalmának biolumineszcenciás módszerrel történő meghatározásával, a thrombocytákban található denz testecskék számának mepakrin tesztel végzett meghatározásával és a CD63, denz granulum membránfehérje áramlásos citometriás kimutatásával történt. A vizsgálatokban 10 albinó beteg vett részt, közülük ötnél Hermansky-Pudlak syndroma (HPS) volt igazolható.

A vizsgálatban részt vett még 1 Glanzmann thrombastheniás egyén is. E betegek mintáiból a vérzési idő és PFA-100 záródási idők meghatározásán kívül elvégeztük a thrombocyták szám meghatározását, ill. a betegség fennállását igazoló diagnosztikai tesztek.

Az ASA PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

A vizsgálatok a laboratórium dolgozói közül kikerülő 4 önkéntes egyén mintáin történtek, akik 500 mg egyszeri dózisú Aspirint (Bayer) vettek be. Vérzési idő, PFA-100 záródási idők, továbbá thrombocyták aggregációs és szekréción vizsgálatokat végeztünk az ASA bevétele előtt, ill. 24 órával utána. Valamennyi vérmintából meghatároztuk a thrombocyták számot is. Két egyén esetében - a vérzési idő kivételével - további időpontokban is történtek vizsgálatok.

A streptokinase PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

A streptokinase (SK, Kabikinase) PFA-100 záródási időkre in vitro kifejtett hatásának vizsgálata 7 egészséges, gyógyszermentes egyén vérmintáján történt. A vérmintákhoz olyan mennyiségű SK-t adtunk, hogy a minták 50 ill. 250 U/mL végkoncentrációjú SK-t tartalmazzanak, majd azokat 4 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A kontroll mintákhoz a SK oldat térfogatával megegyező térfogatú fiziológiás só oldatot adtunk. A vérmintákból thrombocyták számot, PFA-100 záródási időket, továbbá trombin időt határoztunk meg.

A SK thrombocyták funkcióira in vivo kifejtett hatásának megítélésére 33 akut myocardialis infarktuszban (AMI) szenvedő thrombolyticus terápiában részesülő beteg vérmintáit vizsgáltuk. A betegek 1,5 millió egység streptokinaset kaptak intravénásan. Ebből 250000 egységet intravénás bolusban kaptak közvetlenül a diagnózis felállítása után, majd a maradék 1.250.000 egységet 1 órán keresztül folyamatos infúzióban kapták. A betegek 250 mg ASA-t tartalmazó tablettát is bevettek. A vérmintákat a terápiát megelőzően, majd 2, illetve 4-6 órával a kezelés kezdetét követően vettük. A mintákból véralvadási szűrőtesztek (PI, APTI, TI), PFA-100 záródási idők, ill. thrombocyták szám meghatározások történtek.

EREDMÉNYEK

PFA-100 záródási idők referencia tartományának meghatározása

31 egészséges, normál haemostasis szűrőteszteket mutató egyénen elvégeztük mindkét patronnal a záródási idő meghatározást. A mért értékek normál eloszlást mutattak, s a vizsgálatok eredményeként ($x \pm 2$ SD): a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő referencia intervalluma 55-118 sec, míg a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő referencia tartománya 63-142 sec.

A PFA-100 thrombocytá funkciók analizátor alkalmazhatósága a von Willebrand megbetegedés diagnosztikájában

A vérzési idő és a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási idő összehasonlítása

Az elvégzett vérzési idő meghatározások eredményei alapján a 32 von Willebrand betegségben szenvedő beteget három csoportba soroltuk. A megnyúlt vérzési időt (≥ 10 perc) mutató betegek esetében a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási idő is egyöntetűen kóros értéket adott. Betegeink közül ebbe a csoportba kilenc 1-es típusú, a két 2A típusú, egy 2B típusú és mindhárom 3-as típusú von Willebrand beteg (összesen 15 beteg) tartozott. Kiemelendő, hogy nagyszámú (13) beteg esetében záródás egyáltalán nem volt megfigyelhető.

A második csoportot azok a betegek (nyolc 1-es típus, egy 2B típus és a 2N variáns) alkották, akiknek a vérzési ideje a referencia tartomány felső részébe esett (7,5-9,5 perc). Ezen csoportban két beteg kivételével, azaz a betegek 80 %-ánál a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási idő szintén megnyúlt volt. A záródási idő a referencia tartományon belül volt egy 1-es típusú beteg és a 2N típusú beteg esetében. Utóbbi esetben, tekintve, hogy az abnormalitás a FVIII kötés csökkenését eredményezi nem is volt várható a thrombocytá funkciót jelző záródási idő megnyúlása.

A harmadik csoport betegeinek (öt 1-es típusú és két 2B típusú) a vérzési ideje a referencia intervallum alacsonyabb tartományában volt (< 7.5 perc). Megnyúlt záródási időt kaptunk három 1-es típusú von Willebrand beteg esetében, a többiek - beleértve két enyhe 2B típusú beteget is - záródási ideje a referencia tartományon belül volt.

A 2N variánstól eltekintve a vizsgált betegek közül a vérzési idő meghatározás csak 15 beteg esetében mutatott kóros értéket, azaz a vérzési idő szenzitivitása mindössze 48,4 % volt.

Ezzel szemben a kollagén/adrenalinus patronnal mért záródási idő jóval magasabb, 83,9 %-os szenzitivitást mutatott. Ez a teszt a 2N variáns kivül csak néhány enyhe 1-es és 2B típusú betegnél nem jelzett eltérést.

A vérzési idő és a kollagén/ADP patronnal mért PFA-100 záródási idő összehasonlítása

A kollagén/ADP patronnal mért záródási idők elemzése is a fent ismertetett három csoport szerint történt. Azt tapasztaltuk, hogy - három 1-es típusú von Willebrand beteg kivételével - azon betegeknél akiknél a vérzési idő megnyúlt volt mérhetetlenül hosszú volt a PFA záródási idő is. E csoportban a záródási idő két beteg esetében volt a referencia tartományon belül. Ezen betegeknek azonban a vérzési ideje is csak enyhe megnyúlást mutatott (10 ill. 11,5 perc). A második csoportban (vérzési idő 7,5-9,5 perc) három betegnek normál volt a kollagén/ADP záródási ideje. Közülük kettőnek a kollagén/adrenalinnal mért záródási idő is a referencia tartományon belül volt. A harmadik csoportban (vérzési idő <7,5 min) a hét betegből csak kettőnél mértünk megnyúlt záródási időt. Vizsgálataink alapján a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő teszt szenzitivitása - a 2N típusú betegről eltekintve - 74,2%-os.

Schlammdinger Ágota és Boda Zoltán (II. sz Belgyógyászati Klinika) velünk kollaborációban a PFA-100 záródási időket az O'Brien filter teszt eredményeivel hasonlította össze von Willebrand betegeknél. A két teszt hasonló eredményeket adott, az O'Brien filter teszt szenzitivitása citrátos vérrel a különböző retenciós és záródási cseppszám paramétereket vizsgálva 82,1 és 89,3%-nak adódott.

A PFA-100 záródási idők mérésének alkalmazhatósága egyéb öröklött thrombocyta funkciós zavarok (Glanzmann thrombasthenia, Hermansky-Pudlak syndroma) diagnosztikájában

Glanzmann thrombasteniás beteg laboratóriumi diagnosztikája

Hat hónapos fiú csecsemőt vizsgáltunk haemorrhagiás diathesis irányába. A koraszülött csecsemőnek születéskor elhúzódó köldökvérzése volt és a szűrőcsatornákból is vért, de a vérzékenység oka ekkor nem került diagnosztizálásra. Fél évesen került felvételre a DOTE Gyermekklinikájára inguinális sérv műtéti megoldása céljából. Felvételt követően a szűrőcsatornákból vért, s profúz orrvérzés is fellépett nála. Azóta - a diagnózis felállítását követően - a beteg ismételt jelentkezett a klinikán súlyos vérzéses tünetekkel. Családi anamnézise - vérzékenység szempontjából - negatív volt.

A thrombocyta rendszer szűrőtesztjei közül referencia tartományban levő thrombocytaszám mellett jelentősen megnyúlt, nagyobb mint 20 perces vérzési időt észleltünk.

A PFA-100 záródási idők szintén kórosnak bizonyultak, sem a kollagén/ADP sem a kollagén/adrenalin patront használva nem észleltünk záródást. Az alvadási alaptesztek közül az APTI 48,5 sec volt, azaz szignifikáns megnyúlást mutatott. Egyéb szűrőtesztekben nem észleltünk lényeges eltérést. A vérzési idő és az APTI együttes megnyúlása leggyakrabban a thrombocytá adhézió zavarára utal, mivel a von Willebrand faktor a VIII-as alvadási faktor szállító molekulája is. A betegnél észlelt APTI megnyúlás normál plazmával korrigálható volt. Elvégeztük az előfázis faktorok aktivitásának mérését. A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a megnyúlt APTI háttérében a némileg csökkent IX-es és XI-es alvadási faktor aktivitások állnak. Ezen értékek azonban nem magyarázták a beteg súlyos vérzéses tüneteit.

A normál VIII-as faktor szint mellett, a von Willebrand faktor antigén 130% (referencia tartomány 50-160%), a risztocetin kofaktor aktivitás 78% (referencia tartomány 50-160%) volt, amely értékek kizárják a von Willebrand betegséget. A nagy dózisú risztocetin aggregáció azonban szokatlanul furcsa eltérést, reverzibilis aggregációt mutatott, ami csak a rendkívül ritka, aggregációs zavarnál, a Glanzmann thrombastheniánál szokott előfordulni. Egyéb aggregáló ágensekkel végzett vizsgálatok során a beteg thrombocytái alakváltozást ugyan mutatnak, azaz az aktiváló ágens lekött a receptorához, de a thrombocyták egyik aktiváló ágens hatására sem aggregálódnak. Az ATP szekréció ADP aktiváció esetében hiányzik, kollagén és arachidonsav aktiváció esetében azonban csak csökkent, ami az aggregáció hiányának másodlagos következménye. A nagy dózisú trombin, mely a szekréció aggregációtól független erőteljes ingere, közel normál ATP szekréciót okozott. A thrombocytá aggregációs és szekréciós vizsgálatok eredményei egyértelműen a thrombocytá aggregáció zavarát bizonyították. Az aggregáció során a thrombocytákat fibrinogén kapcsolja össze, így afibrinogenaemiában, egyes dysfibrinogenaemiákban nem jön létre aggregáció. A beteg fibrinogén szintje a referencia tartományban volt és a dysfibrinogenaemiákra érzékeny reptiláz idő is csak enyhén nyúlt meg, így az eredmények a fibrinogén receptor defektusára, a Glanzmann thrombastheniára utalnak.

A diagnózis megerősítésére végzett áramlásos citometriás vizsgálatok a felszíni GPIIb erősen csökkent mennyiségét verifikálták. A von Willebrand faktor receptorának egyik komponense a GPIX ellenes fluoresceinnel jelölt antitest mind a kontroll mind a beteg thrombocytáival jól reagált, míg a fikoeritreinnel jelzett GPIIb ellenes antitesttel csak a kontroll thrombocyták reagáltak. Hasonlóképpen nem adott fluoreszcenciás jelet a GPIIb-IIIa komplex (fibrinogén receptor) ellen termelődött fluoreszens festékkel jelölt antitest sem. Az elvégzett vizsgálatok a Glanzmann thrombasthenia diagnózisát bizonyították

Az eset további molekuláris genetikai és fehérje biokémiai elemzését Losonczy Gergely munkatársunk végezte, aki kimutatta, hogy a betegséget okozó mutáció (egy nukleotid deléció keret leolvasási eltéréssel és következményes korai stop kodonnal) a GPIIb molekula génjében van. E munka az ő PhD értekezésének lesz része.

PFA-100 záródási idők Hermansky-Pudlak szindrómában

Intézetünkben korábban Pap és mtsai közölték az albinó gyermekek thrombocytá funkciók zavarainak vizsgálatát. A vizsgált tíz albinó gyermek közül öt esetében igazolták a HPS (albinizmus, thrombocytá storage pool megbetegedés, a csontvelőben, ill. a RES sejtekben ceroid szerű pigment lerakódása) fennállását, mely enyhétől közepes vérzéses tünetekkel járt. A vérzési idő mindnyájuknál erőteljesen megnyúlt volt. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő három beteg esetében volt megnyúlt, egy esetben mérhetetlenül hosszú, egy betegnél pedig a referencia tartomány felső részébe esett. Kollagén/ADP patronnal mind az öt beteg esetében referencia tartományon belüli értéket kaptunk.

Az ASA PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

Az 500 mg egyszeri dózisu Aspirin bevitelére vállalkozott 4 személy vizsgálata során megállapítható, hogy a vérzési idő alig reagál az Aspirinre, hasonlóképpen a kollagén/ADP-vel átítatott membránt tartalmazó patronokkal sem észleltünk lényeges változást a záródási időben. Ezzel szemben a kollagén/adrenalinval stimulált rendszerben az ASA a záródási idők drasztikus megnyúlását eredményezte. A megnyúlás két esetben is 300 sec alatt sem záródó aperturát jelentett. Az egyik egyén esetében az alkalmazott, nagy ASA dózis ellenére a záródási idő csak 142 sec-ra nyúlt meg, ami hangsúlyozza, hogy az ASA érzékenység egyénenként lényegesen eltérő lehet. A kollagénnel és adrenalinval aktivált minták eredményei jó korrelációt mutattak az ATP felszabadulás egyöntetű nagyarányú csökkenésével. Az aggregáció kevésbé érzékeny az ASA hatásra, mint a szekréció. Az ADP aggregáció alig csökkent, a kis dózisu kollagén, az arachidonsav és adrenalin aggregáció viszont érzékenyebb indikátora az ASA hatásnak.

Két egyén esetében a vérzési idő kivételével további időpontokban is történtek PFA-100 záródási idő meghatározások, aminek célja az ASA hatás időbeliségének a követése volt. Ez esetben is csak a kollagén/adrenalin patron jelezte az ASA hatását, ez azonban a tabletta bevétele után 4 órával már igen érzékenyen. Az Aspirin hatása 3-4 nap múlva már alig volt észlelhető.

A streptokinase PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

Az vérmintákhoz in vitro adott streptokinase hatása a PFA-100 záródási időkre

7 egészséges egyén vérmintáihoz 50 ill. 250 U/mL SK-t adtunk in vitro. A fibrinolitikus rendszer aktiválódását a mintákból mért megnyúlt trombin idők igazolták. 50 U/mL SK hatására a kollagén/ADP patronnal mért záródási időben jelentős, több mint 30 sec-os, megnyúlás 1 esetben volt tapasztalható. Ennek a SK mennyiségnek ötszörösét alkalmazva még 2 másik minta esetében tapasztaltunk jelentős záródási idő megnyúlást. Az 50 ill. 250 U/mL SK hatására több mint 100 sec-os megnyúlást észleltünk a kollagén/adrenalinral mért záródási időben 4 ill. 5 minta esetében. Záródási idő rövidülést egy esetben sem tapasztaltunk. Valamennyi vérmintából elvégeztük a thrombocytá szám meghatározást, amelyek a referencia tartományon belül voltak.

Ex vivo vizsgálatok acut myocardialis infarctuson átesett betegek thrombolyticus kezelése során

A vizsgált 33 AMI-ban szenvedő beteg közül vizsgálatunk kezdetekor mindössze 1 esetben mértünk megnyúlt (132 sec) záródási időt kollagén/ADP patronnal. A thrombolyticus terápia során a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő nem változott vagy nem szignifikáns megnyúlást mutatott a betegek 2/3-ánál. 11 beteg esetében 30 sec-nál hosszabb (31-97 sec között) megnyúlást tapasztaltunk, ami a thrombolyticus terápia következménye volt. Ezen esetek közül kettőnél a záródási idő még így is a referencia tartományban maradt. A kollagén/ADP patronnal mért záródási idő - a kollagén/adrenalinral mért meghatározott záródási idővel ellentétben - ASA-ra érzéketlen, ezért az általa észlelt megnyúlás okozója olyan kóros thrombocytá funkciós eltérés, amelynek hátterében ASA-tól független faktorok állnak. Egyértelműen bizonyított, hogy a kollagén/adrenalinral mért meghatározott záródási idő nagymértékben érzékeny az ASA-ra. Ez lehetővé teszi a terápia válasz ill. a betegek terápia együttműködésének, "compliance"-ének egyértelmű detektálását. A 33 beteg közül 7 szedett ASA-t az AMI kialakulását megelőzően. A kollagén/adrenalinral mért meghatározott záródási idő mindegyikükönél a referencia tartomány felett volt (öt esetben 300 sec felett). Érdekes megfigyelés, hogy 3 betegnél, akiknél a kollagén/adrenalinral mért záródási idő kiinduláskor 300 sec felett volt, a záródási idő átmenetileg csökkent és csak 4 óra elteltével tért vissza a thrombolysis előtti értékre.

Az AMI-t megelőzően ASA terápián nem levő betegek 58 %-a (15/26) mutatott 120 sec-nál nagyobb kollagén/adrenalinus patronnal meghatározott záródási idő megnyúlást ASA hatására, és legtöbbjüknel ez a megnyúlás meghaladta a 250 sec-ot. Ezen reszponder betegeknek egy része korai választ mutatott, mivel a záródási idő megnyúlás 2 órán belül elérte a maximumát, míg a többieknel a maximális megnyúlás eléréséhez 4 órára volt szükség. Az ASA bevétele ellenére 5 betegnel a záródási idő a referencia tartományon belül maradt. Rajtuk kívül még volt 2 olyan beteg, akiknel a kiindulási záródási idő kismértékben megnyúlt volt ugyan (187 és 170 sec), de záródási idejük az ASA bevételét követően nem változott. Összességében a nonreszponderek száma 7 volt (záródási idő megnyúlás: <50 sec), ami a betegek 27%-át jelentette. 4 egyénnél a záródási idő megnyúlás 51 és 120 sec között volt, záródási idejük azonban nem haladta meg a 250 sec-ot.

MEGBESZÉLÉS

Az öröklött vérzékenységek diagnosztikájában a legtöbb problémát a von Willebrand betegség, ill. annak egyes alcsoportjai okozzák. A von Willebrand faktor szintjének vércsoport-függése, időszaki változásai nehezen értékelhetővé teszik az egyébként enyhe, vagy alig észlelhető tünetekkel járó, de esetleges műtétek, szülés stb. esetén súlyos vérzéses komplikációkat okozó betegségek diagnózisát. Nagyszámú egészséges egyén vizsgálata során az volt kimutatható, hogy a 0-s vércsoportba tartozó egyének vWF szintje alacsonyabb, mint az A, B és AB csoportba tartozóké. A von Willebrand betegek több mint 65%-ának 0-ás a vércsoportja.

A von Willebrand betegség diagnosztikája és klasszifikációja egy komplex laboratóriumi tesztek egész sorát magába foglaló időigényes és költséges folyamat. A diagnózishoz szükséges teszteknek mindenképpen magába kell foglalni a vWF antigén, vWF R:Co aktivitás és FVIII aktivitás meghatározását, amit esetenként már a diagnózis érdekében is ki kell egészíteni a klasszifikációhoz szükséges tesztekkel, így a risztocetin aggregációval, a vWF multimer meghatározással, kollagén kötő kapacitás meghatározásával, keverékes aggregációs vizsgálatokkal, vWF receptor vizsgálatokkal, hogy csak a legfontosabbakat említsem. Mindemellett, a laboratóriumi eredmények, 1-es és 2-es típusú megbetegedés esetén sokszor nem jól korrelálnak a klinikai tünetek súlyosságával. Mindezek miatt régóta felmerült egy megfelelő szűrőteszt igénye, ill. egy olyan globális teszt iránti igény, mely megfelelően tükrözi a vérzékenység súlyosságát. Mindeddig a korrekten kivitelezett vérzési

időt tartották nyilván egyetlen szűrőtesztként, ennek azonban - ahogyan ezt saját vizsgálataink is mutatták - igen alacsony a szenzitivitása, és az esetek mintegy 50%-ában nem jelzi a betegség fennállását. Egyes tanulmányokban közölt értékek ennél valamivel magasabb, 65,5 %-os és 59,1 %-os szenzitivitás értékekről is beszámolnak. Az eltérések hátterében az eltérő beteganyag állhat.

Fressinaud és munkatársai 60 von Willebrand beteg esetében vizsgálták a PFA-100 záródási idő szűrőtesztként való alkalmazhatóságát. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő általuk meghatározott szenzitivitása megfelel az általunk kapott értéknek (96,5 vs 83,9 %). A teszt csak néhány enyhe von Willebrand beteg esetében nem jelzett eltérést. Egy másik közlemény 95,5 %-os szenzitivitást talált 44 von Willebrand beteg vizsgálata során. A kollagén/ADP patronnal mért záródási idő esetében Fressinaud és munkatársai 100 %-os szenzitivitást közöltek. Ezt a mi eredményeink nem támasztják alá. A mi beteganyagunk esetében ezzel a patronnal a szenzitivitás csak 74,2 % volt. Három betegünkél, akiknek a vWF:Ag értéke 28 és 31% között volt, a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő a referencia tartományba esett, igaz annak felső részébe. Az 1-es, 2A és 3-as típusú von Willebrand betegek esetében kapott eredményeink megfelelnek a Fressinaud és munkatársai által közölt értékeknek. A 2N típusú von Willebrand betegünk záródási ideje a referencia tartományban volt. A 2B típusú betegek eredményei kevésbé egyértelműek. Vizsgálataink során a négy 2B típusú beteg közül kettőnél, míg más közleményben három beteg közül kettőnél a záródási idő 300 sec felett volt, azaz záródás nem következett be. Ezen betegek vWF R:Co aktivitása a referencia tartomány alatt volt. Mindkét tanulmányban egy betegnek csökkent volt a thrombocyta száma. A másik két 2B típusú betegünknek normál vWF R:Co és thrombocyta száma volt referencia tartományon belüli vérzési és záródási időekkel. Fressinaud és munkatársai egy olyan 2B típusú betegről számolnak be, akinek a vWF R:Co a referencia tartományon belül van és a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő kis mértékben megnyúlt. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a 2B típusú von Willebrand betegekél a PFA-100 záródási idők variabilitást mutatnak az aktuális vWF szintnek megfelelően.

Mindezek alapján ajánlható, hogy von Willebrand betegség gyanúja esetén a PFA-100 záródási idő meghatározás legyen része a kivizsgálási panellnek. A vérzési időnél érzékenyebb volta elsősorban az enyhe ill. a közepes 1-es típusú betegek esetében szembetűnő. Az 1-es típusú von Willebrand betegek kezelésére alkalmazott DDAVP terápia hatására a betegekél az eredetileg megnyúlt záródási idő csökken, így a PFA-100 záródási idő alkalmasnak tekinthető a DDAVP kezelés monitorozására is.

A thrombocytá aggregáció zavarát a fibrinogén hiánya ill. kóros volta, valamint az egyes fibrinogén receptor (GPIIb-IIIa) komponensek defektusa (Glanzmann thrombasthenia) idézhet elő. A vérzéses tüneteket mutató beteg igen hosszú vérzési ideje normál thrombocytá szám mellett súlyos thrombocytá funkciós defektusra utalt, amit megerősített, hogy a PFA-100-al egyik patronnal sem észleltünk záródást. Az aggregációs görbéken a thrombocyták alakváltozásának megfelelő jel (a fénytranszmisszió átmeneti csökkenése) jól látszik, azaz az aggregáló ágensek lekötődtek a thrombocytá membránhoz és aktiválták az alakváltozáshoz szükséges biokémiai mechanizmusokat. Aggregációt azonban nem tudtak indukálni. Azon ágensek (arachidonsav, trombin, nagy dózisú kollagén) esetében, amelyeknél az aggregáció nem játszik szerepet a szekréció elősegítésében a szekréciót kiváltó biokémiai mechanizmusok is működésbe léptek, s közel normál ATP szekréció volt észlelhető. Tekintettel arra, hogy a beteg fibrinogén szintje normális, az aggregációs zavar hátterében csak a fibrinogén receptor hiánya vagy kóros volta állhat. A felületi membrán áramlásos citometriás vizsgálata a fibrinogén receptor defektusát meg is erősítette, azaz a Glanzmann thrombasthenia diagnózisa bizonyítottnak tekinthető. A Glanzmann thrombastheniának három típusa van. Az I. típusban a GPIIb-IIIa gyakorlatilag teljes hiányakor a véralvadék összehúzódása nem történik meg, míg II. típusban, ahol valamennyi fibrinogén receptor található a felszínen, az alvadék retrakciója közel normális. A harmadik ún. variáns típusban a GPIIb-IIIa mennyisége normál, de kóros receptor komponens szintetizálódik. A három típus gyakorisága: 78% (I. típus), 14% (II. típus) és 8% (variáns). Losonczy Gergely kollégám molekuláris genetikai és fehérje biokémiai vizsgálatai bizonyították, hogy itt I. típusú Glanzmann thrombastheniáról van szó.

Saját eredményünk és a szakirodalomban közölt nyolc beteg eredménye is egyértelműen bizonyítják, hogy a PFA-100 záródási idők megnyúlása a Glanzmann thrombastheniás megbetegedéseket is jól detektálja.

A PFA-100 záródási idők storage pool betegségek diagnosztikájában való alkalmazhatóságával mindössze három közlemény foglalkozik. Két közleményben, összesen 5 beteg vizsgálatáról számoltak be, ezen esetekben azonban a storage pool betegség típusa nem volt pontosan identifikálva. Az öt beteg közül egynél csak a kollagén/adrenalin patronnal határozták meg a záródási időt, ami szignifikáns megnyúlást mutatott. A maradék négy betegnél egyik patronnal sem volt megfigyelhető záródás. A harmadik közleményben hat HPS-ás beteg záródási idejeit határozták meg. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő mindegyik beteg esetében megnyúlt, bár négy esetben az értékek éppen csak a referencia tartomány felett voltak. A kollagén/ADP patronnal csak két betegnél kaptak nagymértékben

megnyúlt záródási időt, három betegnél a záródási idő csak enyhe megnyúlást mutatott, egy betegnek pedig normál záródási időt mértek. A mi vizsgálatunkban egyik betegnek sem volt megnyúlt záródási ideje a kollagén/ADP patron alkalmazása során. Ennek magyarázata az lehet, hogy a HPS-ás beteg thrombocytaiból ugyan hiányzik a denz granuláris ADP, de a thrombocyták aktiváció biokémiai mechanizmusa általában megtartott. A kollagén/ADP patronban maga a membrán az ADP forrás, ezért a kollagén/ADP záródási időben nem várható megnyúlás. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő az öt beteg közül négyénél megnyúlást mutatott, a maradék egy betegnél pedig a referencia intervallum felső részében, de még a normál tartományban volt. Ugyanakkor mind az öt beteg vérzési ideje nagymértékben megnyúlt volt. A HPS-ában kapott részben ellentmondó adatok abból is adódhatnak, hogy e megbetegedés sem genetikailag, sem fenotípusosan nem egységes. Eredmények arra utalnak, hogy a PFA-100 záródási idő nem jobb szűrőteszt a vérzési időnél a storage pool megbetegedés diagnosztikájában.

Az ASA a ciklooxygenáz enzim egy szerin reziduuma (Ser529) acetilálva megakadályozza az arachidonsavból a ciklikus endoperoxidok képződését, ezáltal a thrombocyták aktivációjában, mindenekelőtt a szekréciónak mechanizmusában alapvető szerepet játszó tromboxán A_2 (TXA_2) képződését. Az ASA rezisztenciával kapcsolatos legtöbb problémát az ASA rezisztencia fogalmi meghatározásával kapcsolatos bizonytalanságok okozzák. Az ASA rezisztencia kétféleképpen is értelmezhető. A ciklooxygenáz Ser529 aminosaván az acetilálás elmaradása kémiai rezisztencia, melynek persze több különböző oka is lehet. A terápia hatékonyságának elmaradása klinikai (terápiás) rezisztencia. Jól tudjuk, hogy a betegek egy része kémiai rezisztencia hiányában sem válaszol a terápiára.

Az ASA hatékonyságát vizsgáló laboratóriumi módszerek csak és kizárólag a kémiai rezisztencia felderítésére vállalkozhatnak. Az ASA antithrombocyták szerként történő széleskörű alkalmazása - elsősorban az artériás thromboticus történések megelőzésére - szükségessé tette/teszi olyan tesztek bevezetését, melyek gyorsan és adekvát módon adnak tájékoztatást a beteg részéről történő terápiás együttműködésről (compliance-éről), a gyógyszer kémiai hatékonyságáról, ill. az esetleges kémiai ASA rezisztencia meglétéről.

Az ASA thrombocyták funkcióját gátló hatásának követésére nem alkalmas az ASA (vagy a szalicilsav) direkt, plazmából történő kimutatása sem, mivel ez a két anyag gyors kinetikát követ, - az ASA csak mintegy fél óráig detektálható a keringésben -, ezzel szemben a thrombocytákra kifejtett hatásuk több napig tart. A vérzési idő érzéketlen az ASA-ra és sorozat vizsgálatokra alkalmatlan. Az aggregációs vizsgálatok közül még a legegyszerűbb eredményeket az arachidonsav aggregáció vizsgálata adja. Az aggregációnak az ATP

szekréciónal történő együttes mérése (lumiaggregációs vizsgálatok) lényegesen megkönnyíti az eredmények értékelését, ez azonban drága műszert (és vegyszert) igénylő, időigényes, csak laboratóriumban elvégezhető vizsgálat. A PFA-100 záródási idő mérése gyors, a betegágy mellett is kivitelezhető. Vizsgálataink, mások vizsgálataival megegyezően azt igazolták, hogy a PFA-100-as készülék alkalmas az ASA hatás detektálására.

Mindez azonban nem jelenti a kémiai ASA rezisztencia meghatározásának megoldását, mivel emelkedett von Willebrand faktor ristocetin kofaktor aktivitás esetében előfordulhat a záródási idő megnyúlás elmaradása arachidonsav aggregációval bizonyított ASA hatásra. Mindenképpen szükség lenne egy 100%-os, akár körülményes izotóp jelölésű vagy tömegspektrometriás referencia módszerre, melynek az egyéb klinikai módszerekkel nagyszámú beteganyagon történő összehasonlítása megoldást adhatna a leghatékonyabb klinikai laboratóriumi módszer kiválasztására.

A thrombolyticus terápia az AMI egyik akut terápiás lehetősége. A thrombolyticus ágensek korai adása alacsonyabb mortalitást és a kamrai funkció megtartását eredményezi. A különböző plazminogén aktivátorok által okozott thrombolysisnek azonban korlátai is vannak. Teljes reperfüziót csak a betegek kb. felénél eredményeznek és a rekanalizált coronáriák 10-15%-ánál reokklúzió lép fel. Vérzés még a modern thrombolyticus ágensek használatakor is előfordulhat, intracraniális vérzés a betegek 0,3-1,5%-ánál lép fel. Mind a vérzéses komplikáció mind a reokklúzió a thrombocytá dysfunkcióval van összefüggésben. A kísérletes és klinikai megfigyelések azt igazolják, hogy a plazmin generáció aktiválhatja is és gátolhatja is a thrombocytákat. A kezdeti thrombocytá aktivációt károsodott thrombocytá funkció kialakulás követi. A thrombocytá aktiváció megelőzésére és az ennek következtében kialakuló reokklúzió megakadályozására a thrombolyticus terápiát ASA adásával egészítik ki. A thrombolyticus terápia bevezetése óta megvan az igény egy olyan adekvát laboratóriumi teszt(ek) bevezetésére, ami a thrombolyticus terápiában részesülő betegek vérzéses rizikóját előre jelezheti. Sajnos az alvadási tesztek, amelyek a lyticus állapotot képesek jelezni, ezt az igényt nem elégítik ki. Ez idáig a standardizált vérzési idő, a thrombocytá rendszer szűrőtesztje 69 %-os szenzitivitással és 69 %-os specificitással bizonyult a legjobb vizsgálati módnak a thrombolysis alatti spontán vérzés előrejelzésében. A vérzési idő kivitelezése az egyszer használatos eszközzel viszonylag gyors és egyszerű, de nehéz standardizálni, a prediktív értéke csak 43%-os és a thrombolysis alatt történő sorozatvizsgálatokra nem alkalmazható. A thrombolyticus terápia fent említett másik szövődménye a thrombocytá aktiváció. Ennek kimutatására jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan, a mindennapi diagnosztikában is használható laboratóriumi teszt, amelyet a reokklúzió előrejelzésére

használhatnánk, jóllehet az ADP indukálta thrombocytá aggregációt már megkísérelték erre a célra felhasználni.

A vizsgálataink során a thrombolyticus terápiát megelőzően tapasztalt kollagén/ADP patronnal mért megnyúlt záródási idő thrombocytá funkciók zavarra utal, ami fokozott vérzésveszéllyel járhat. A betegek harmadánál - akiknek a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő a thrombolyticus terápiát megelőzően normál volt - a thrombolysis során szignifikáns záródási idő megnyúlás volt kimutatható. Mivel az ASA semmilyen hatással sincs a kollagén/ADP patronnal mért záródási időre, ezért ennek a thrombolyticus terápia során bekövetkező megnyúlása a ciklooxygenáz úttól eltérő mechanizmusú thrombocytá funkció károsodásra utal. Az ASA-ra érzéketlen kollagén/ADP patron segítségével lehetővé válik a thrombocytá funkció thrombolysis alatt történő követése, a thrombolysis által okozott csökkent thrombocytá funkció kimutatása, még akkor is, ha a beteg ASA kezelésben részesült. Az AMI-ban szenvedő betegek thrombolyticus kezelése során meghatározott PFA-100 záródási idők az ASA kezelés hatásosságának megállapítására is alkalmasak. A thrombolyticus terápiát megelőzően végzett kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő meghatározás az AMI bekövetkezése előtt a betegnél alkalmazott preventív célú ASA terápia hatásosságáról ad felvilágosítást. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő megnyúlás elmaradása az ASA hatástalanságára vagy a beteg nem megfelelő terápia együttműködésére utal. A thrombolyticus terápia protokoll magában foglalja az ASA adását is, ennek hatásossága a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő meghatározásával követhető. Bár a fibrinolitikus terápia is okozhat megnyúlást, a megnyúlás hiánya azonban egyértelműen az ASA terápia hatástalanságára utal. A 26 beteg közül 7-nél nem volt kollagén/adrenalin záródási idő megnyúlás kimutatható, azaz valamilyen ok miatt e betegek nonreszponderek voltak. Érdekes megfigyelés, hogy 3 betegnél, akik az AMI kialakulását megelőzően ASA kezelés alatt álltak, az eredetileg megnyúlt (>300 sec) kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő 2 órával a thrombolyticus terápia elindítása után szignifikáns csökkenést mutatott. A PFA-100-as készüléket a thrombocytá funkció csökkent működésének a kimutatására hozták létre, nem pedig a thrombocytá aktiváció detektálására. Ez az oka annak, hogy a patronokban levő membrán thrombocytá aktiváló anyagok kombinációival impregnálták. A referencia intervallumoknak megfelelő viszonylag rövid záródási idő pedig megnehezíti az apertura felgyorsult záródásának érzékelését. Mindössze egy, frissen publikált közlemény számol be AMI alatt a betegek rövidült záródási idejéről. Ez in vivo thrombocytá aktivációra vagy a thrombocyták aktiváló anyagokra bekövetkező emelkedett érzékenységére utalhat. Egy nagymértékben megnyúlt záródási idő (mint pl. a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási

idő ASA-t szedő reszponder betegekben) rövidülése az in vivo thrombocytá aktiváció érzékeny indikátora lehet. Ma már egyértelműen elfogadott, hogy a thrombolyticus terápiának, ugyanúgy mint a plazminnak, kettős hatása van a thrombocytákra. A vérlemezkék aktuális válasza függ a kezelés időtartamától, az aktuális plazmin koncentrációtól és az egyéni variációktól. A thrombolysis során keletkező FDP és a PAR1 trombin receptor plazmin által történő degradálása gátolja a thrombocytá aggregációt, ami a thrombocytá funkció defektus elsődleges oka lehet. A vWF thrombolysis alatt bekövetkező degradációja szintén szerepet játszhat, a vWF receptor (GPIb-IX) proteolízise azonban úgy tűnik, nem vesz részt ebben a folyamatban. Ugyanakkor a plazmin és a plazminogén aktivátorok a thrombocyták aggregációját, szekréciját, a citoplazmatikus Ca^{2+} emelkedését, inozitol trifoszfát szintézisét és protein kináz C aktivációt okozhatják, s fokozzák a thrombocyták válaszát számos kis dózisú aggregáló anyagra. A plazmin ugyanott képes hasítani és aktiválni a trombin receptort, mint maga a trombin, s így aktiválhatja a thrombocytákat. Továbbá a thrombocytá membrán GPIIb amino terminális végének limitált proteolízisével a GPIIb-IIIa komplexet aktív fibrinogén receptorrá transzformálja. Ezen komplex mechanizmusok összessége az egyéni válaszkészség függvényében a károsodott thrombocytá funkció révén vérzéses szövődményben vagy a fokozott thrombocytá aktiváció következtében reokklúzióban manifesztálódhat.

A thrombocytá funkció thrombolyticus terápia alatti monitorozása fontos információkkal szolgálhat a thrombocyták aktuális válaszaról. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a PFA-100 záródási idő mérése megfelelő módszer a thrombolyticus terápia során bekövetkező thrombocytá funkció defektus kimutatására. Valószínű, hogy a kollagén/ADP patronnal mért megnyúlt záródási idő háttérben álló thrombocytá funkció károsodás vérzéses szövődményekre hajlamosít. Szintén feltételezhető az is, hogy az AMI kialakulását megelőzően ASA terápián levő betegek kollagén/adrenalin patronnal mért megnyúlt záródási idejének a thrombolyticus terápia során bekövetkező rövidülése in vivo thrombocytá aktivációra utal, ami a reokklúzió fokozott veszélyét hordozhatja magában. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét PFA patron használatával a thrombolyticus terápia okozta károsodott thrombocytá funkció és az ASA hatásossága egyidejűleg vizsgálható.

Összegezve, az irodalmi adatok és saját munkánk tapasztalatai arra utalnak, hogy a PFA-100-as készülék a kollagén/adrenalin és kollagén/ADP patron együttes használatával alkalmas a veleszületett és a szerzett thrombocytá funkció zavarok kimutatására, akár mint új típusú szűrőteszt, akár mint a hagyományos vizsgálatokat kiegészítő eljárás.

ÖSSZEFOGLALÁS

A thrombocyt funkciós zavarok in vivo szűrőtesztje a vérzési idő meghatározás, ami azonban nem megfelelő érzékenységű, nehezen standardizálható, kényelmetlen a páciens számára és sorozatvizsgálatokra sem alkalmas. Ezen hátrányok kiküszöbölése céljából hozta forgalomba a Dade-Behring cég a PFA-100 thrombocyt funkció analizátort. A készülék lelke az egyszer használatos patron, melynek egyik nyílásába mérendő a vizsgálathoz használatos citráttal alvadásgátolt vér. Jól kontrollált és standardizált vákuum segítségével a minta egyenes áramlással egy thrombocyt aktiváló anyagokkal (kollagén és adrenalin vagy kollagén és ADP) átítatott membránnal lezárt kis rezervoárba kerül, amelyen egy apertura található. Az áramló aktivált thrombocyták kitapadnak az apertura falához majd eltömítik a nyílást. A készülék ezt az ún. záródási időt méri. Vizsgálataink célja annak kiderítése volt, hogy a PFA-100-as készülék mennyire használható a veleszületett thrombocyt funkciós betegségek (vW betegség, Glanzmann thrombasthenia, HPS) és az ASA által előidézett szerzett szekréciós zavar diagnosztikájában, továbbá a thrombolyticus terápia által előidézett thrombocyt funkciós zavar detektálásában. Vizsgálatainkban 32 vW beteg, 1 Glanzmann thrombastheniás, 5 HPS-ás és 33 AMI-ban szenvedő thrombolyticus és ASA terápiában részesülő beteg vett részt. A vW betegeknél a vérzési idő szenzitivitása 48,4 % volt, a kollagén/adrenalinos patronnal mért záródási idő 83,9 %-os, míg a kollagén/ADP-s záródási idő 74,2 %-os szenzitivitást mutatott. A Glanzmann thrombastheniás betegnél egyik patronnal sem észleltünk záródást. A vérzési idő mind az 5 HPS-ás betegnél megnyúlt volt. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő 4 beteg esetében volt megnyúlt, 1 betegnél pedig a referencia tartomány felső részébe esett. Kollagén/ADP patronnal mind az 5 betegnél referencia tartományon belüli értéket kaptunk. Az ASA hatás vizsgálata során megállapítható, hogy a vérzési idő és a kollagén/ADP záródási idők nem reagálnak az ASA-ra, míg a kollagén/adrenalin záródási idők nagymértékben megnyúltak. Az AMI-s betegek harmadánál kollagén/ADP záródási idő megnyúlást mértünk jelezve a thrombocyt funkció csökkenését. A kollagén/adrenalin patron használatával mindössze a betegek kétharmadánál tapasztaltunk adekvát választ az ASA kezelésre. Három betegnél, akik az AMI-t megelőzően preventív célú ASA terápiában részesültek, a kiinduláskor kollagén/adrenalinos patronnal mért megnyúlt záródási idő átmenetileg csökkent. Eredményeink arra utalnak, hogy a PFA-100-as készülék mindkét patron együttes használatával alkalmas a veleszületett és a szerzett thrombocyt funkciós zavarok kimutatására.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A Ph.D. értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Kerényi A**, Muszbek L. Az Aspirin hatás tesztelése PFA-100-al, egy új thrombocyta funkció analizátorral. *Klin Kísérl Lab Med* 1998;25:4-9.
2. **Kerényi A**, Szegedi I, Sarudi S, Kappelmayer J, Kiss Cs, Muszbek L: A Glanzmann thrombasthenia II. típusa. *Klin Kísérl Lab Med* 1998;25:162-8.
3. **Kerényi A**, Schlamadinger Á, Ajzner É, Szegedi I, Kiss Cs, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thromb Res* 1999;96:487-92.

Impakt faktor: 1,323

4. Schlamadinger Á, **Kerényi A**, Muszbek L, Boda Z. Comparison of O'Brien filter test PFA-100 platelet analyzer in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Thromb Haemost* 2000;84:88-89.

Impakt faktor: 4,91

5. **Kerényi A**, Soltész P, Veres K, Szegedi Gy, Muszbek L. Monitoring platelet function by PFA-100 closure time measurements during thrombolytic therapy of patients with myocardial infarction. *Thromb Res* 2005;116:139-44.

Impakt faktor: 1,541

6. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss Cs, Kappelmayer J, Vereb Gy, **Kerényi A**, Balogh I, Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2005;93:904-9.

Impakt faktor: 3,413

Az impakt faktor a megjelenés éve szerint lett figyelembe véve.

Egyéb közlemények

1. Ajzner É, **Kerényi A**, Szakony Sz, Muszbek L. A lupus anticoagulans laboratóriumi diagnosztikája. *Klin Kísérl Lab Med* 2000;27:170-80.

2. Boda Z, Schlammadinger Á, László P, Lakos G, **Kerényi A**, Pfliegler Gy, Rázsó K, Pósn E. Nagy dózisú kis molekulatömegű heparin profilaxis sikere antifoszfolipid szindrómás terhesekben. Orv Hetil 2003;144:1134-4.
3. Veres K, Lakos G, **Kerényi A**, Szekanecz Z, Szegedi Gy, Shoenfeld Y, Soltész P. Antiphospholipid antibodies in acute coronary syndrome. Lupus 2004;13:423-7.
Impakt faktor: 1,942
4. Oláh L, Csepány T, Bereczky Zs, **Kerényi A**, Misz M, Kappelmayer J, Csiba L. A Természetes antikoaguláns fehérjék aktivitásának vizsgálata akut ischaemiás strokeban. Ideggyogy Sz 2005;58:33-9.