

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**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

TARTALOMJEGYZÉK

	oldalszám
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	4
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉK.....	5
1. BEVEZETÉS.....	6
2. CÉLKITŰZÉS.....	14
3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
3.1. Vérvétel.....	15
3.2. Plazma alvadási idők, koagulációs faktorok és fibrinogén meghatározás.....	15
3.3. Vérzési idő meghatározás.....	15
3.4. Thrombocyta szám meghatározás.....	16
3.5. Thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálat.....	16
3.6. Alvadék retrakció vizsgálata.....	16
3.7. Áramlásos citometriás vizsgálatok.....	16
3.8. A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája.....	17
3.9. A Hermansky Pudlak syndroma diagnosztikája.....	18
3.10. A PFA-100 záródási idő referencia tartományának meghatározása.....	18
3.11. A vérzési idő és a PFA-100 záródási idő összehasonlítása örökletes thrombocyta funkciós defektusokban.....	18
3.12. Az acetilszalicilsav PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata.....	19
3.13. A streptokinase PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata.....	19
4. EREDMÉNYEK	21
4.1. A PFA-100 záródási idők referencia tartományának meghatározása.....	21
4.2. A PFA-100 thrombocyta funkciós analizátor alkalmazhatósága a von Willebrand megbetegedés diagnosztikájában.....	21
4.2.1. A vérzési idő és a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási idő összehasonlítása	21
4.2.2. A vérzési idő és a kollagén/ADP patronnal mért PFA-100 záródási idő összehasonlítása.....	23
4.3. A PFA-100 záródási idők mérésének alkalmazhatósága egyéb öröklött thrombocyta funkciós zavarok (Glanzmann thrombasthenia, Hermansky-Pudlak syndroma) diagnosztikájában.....	23
4.3.1. Glanzmann thrombasteniás beteg laboratóriumi diagnosztikája.....	23

4.3.2. PFA-100 záródási idők Hermansky-Pudlak szindrómában.....	28
4.4 Az acetilszalícilsav PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata.....	29
4.5. A streptokináz PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata.....	33
4.5.1. Az vérmintákhoz in vitro adott streptokinase hatása a PFA-100 záródási időkre.....	31
4.5.2. Ex vivo vizsgálatok akut myocardialis infarctuson átesett betegek thrombolyticus kezelése során.....	34
5. MEGBESZÉLÉS.....	38
ÖSSZEFOGLALÁS.....	49
IRODALOMJEGYZÉK.....	50
PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	57
Az értekezéshez felhasznált közlemények.....	57
Az értekezéshez fel nem használt egyéb közlemények.....	58
FÜGGELÉK- Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	59

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus, egyetemi tanárnak, hogy a témavezetőm lett, és érdeklődésemet e téma felé irányította. Köszönöm a nélkülözhetetlen segítségét, szakmai és erkölcsi támogatását, és azt a szakmai és emberi példamutatást, amit tőle tanultam.

Köszönettel tartozom Dr. Kappelmayer János intézetvezető, egyetemi docensnek a Glanzmann thrombasthenia diagnosztikájában nyújtott értékes segítségéért.

Köszönöm Dr. Hársfalvi Jolán, egyetemi docensnek a von Willebrand multimer analízis elvégzéséhez nyújtott pótolhatatlan segítségét.

Köszönet illeti a klinikus kollégákat és munkatársaikat, Prof. Dr. Boda Zoltánt, Prof. Dr. Kiss Csongort, Dr. Pap Zoltánt, Dr. Schlammadinger Ágotát, Dr. Soltész Pált, Dr. Szegedi Istvánt és Dr. Veres Katalint, akikkel öröm volt együtt dolgozni.

Köszönöm a KBMPI és KKK valamennyi dolgozójának, hogy tanulhattam tőlük illetve, hogy munkámat mindig segítették; külön köszönettel tartozom Bhattoa-Buzás Edina titkárnőnek, Haramura Gizella vezető analitikusnak, a Haemostasis részleg egykori és jelenlegi minden dolgozójának és a KBMPI kettes telepén dolgozó és ügyelő asszisztenseknek. A dolgozatban bemutatott ábrák elrendezéséért Antal Csabát illeti köszönet.

Szeretném megköszönni családomnak a segítségüket, türelmüket, és azt, hogy a dolgozat megírásához szükséges „szabadidőt” is biztosították számomra.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

PFA-100: PFA-100 thrombocytá funkció analizátor

vWF:	von Willebrand faktor
vWF:Ag:	von Willebrand faktor antigén
vWF R:Co:	von Willebrand faktor riztocetin kofaktor
TXA ₂ :	tromboxán A ₂
ASA:	acetilszalicilsav
ADP:	adenozin diphosphate
ATP:	adenozin triphosphate
F VIII:	VIII-as véralvadási faktor
F IX:	IX-es véralvadási faktor
F XI:	XI-es véralvadási faktor
F XII:	XII-es véralvadási faktor
PI:	protrombin idő
APTI:	aktivált parciális tromboplasztin idő
TI:	trombin idő
SDS:	nátrium dodecyl szulfát
EDTA:	etilén-diamin-tetraecetsav
SK:	streptokinase
AMI:	acut myocardialis infarctus
DDAVP:	desmopressin
HPS:	Hermansky-Pudlak syndroma
FDP:	fibrin(ogén) degradációs termék

1. BEVEZETÉS

A thrombocyták alapvető szerepet játszanak a haemostasisban, s e funkciójukat komplex biokémiai mechanizmusok támogatják(1). 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. Haemorrhagiás diathesist okozhatnak vasculopathiak, coagulopathiák, a leggyakoribb kiváltó tényező azonban a celluláris mechanizmus zavara, amit a csökkent thrombocyta szám mellett a thrombocyta funkció defektusai idéznek elő. Thrombocyta funkciós zavarokat okozhat a thrombocyták egyes funkcióihoz szükséges plazma faktorok (von Willebrand faktor (vWF), fibrinogén) hiánya vagy kóros volta, ill. a thrombocyták egyes struktúrális vagy funkcionális szempontból fontos fehérjéinek a defektusa.

A thrombocyta funkciós zavarokat a thrombocyta aktiváció egyes lépéseinek megfelelően csoportosíthatjuk. A leggyakoribb thrombocyta funkciós defektus a von Willebrand betegség, amelyben a thrombocyták adhéziója (2), és magas nyíró aránynál aggregációja (3) is zavart szenved a plazmában levő vWF mennyiségi ill. minőségi eltérése miatt. A vWF egy 270 kD molekula tömegű monomerekből álló diszulfid hidakkal összekötött multimer, melyben a multimerek molekulatömege 600 és 20.000 kD között változik. A plazmában lévő multimer struktúra kialakításában proteolitikus hatások, mindenekelött az ADAMTS13 proteáz által történő limitált proteolízis (4-6) is szerepet játszanak. A vWF egyrészt kötődik az érfal sérülés során szabaddá váló kollagénnel (és egyéb szubendotheliális struktúrákhoz), másrészt a thrombocyták felszínén lévő receptorához, a glikoprotein Ib-IX komplexhez (GPIb-IX), így biztosítva a thrombocyták kitapadását a sérült érfalhoz. Magas nyíróarányánál 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. Ez a magyarázata annak, hogy súlyos von Willebrand faktor hiányban a FVIII szintje is alacsony.

A von Willebrand betegségnek 3 fő típusa van (7). Az 1-es típusban a von Willebrand faktor mennyisége csökkent, de multimer struktúrája normális. A 2-es típust a von Willebrand faktor minőségi zavarai okozzák; ezen fő csoporton belül több alcsoportot is

megkülönböztetünk. A 2A altípusban a von Willebrand faktor 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 von Willebrand faktor 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 von Willebrand faktornak a VIII-as alvadási faktorhoz történő kötődése szenved zavart, aminek következtében normális von Willebrand faktor 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 von Willebrand faktor gyakorlatilag teljes hiányát jelenti.

A Bernard-Soluiet syndroma, aminek háttérében a thrombocytákon levő von Willebrand faktor receptor, a GPIb-IX hiánya vagy csökkent vWF kötődést okozó defektusa áll szintén a thrombocyták adhézión 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, s e miatt itt is hiányoznak a legnagyobb molekula tömegű multimerek, csak itt a fokozott kötődést nem a vWF, hanem a GPIb-IX abnormalitása okozza. Ugyancsak adhézión zavarát okoz a thrombocyták direkt kollagén receptorának (GPIa-IIa) abnormalitása, mivel a sérült érfalhoz való kitapadásban ennek a kapcsolatnak is szerepe van.

A thrombocyta aktiváció következő lépése a thrombocyták aggregációja, aminek folyamán az aktivált thrombocyták a plazmában jelenlevő fibrinogénn 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 thrombocyta aktiváló ágensek [ún. primer agonisták: adozin difoszfát (ADP), trombin, tromboxán A₂ (TXA₂)] receptoraikhoz történő kötődése által elindított biokémiai mechanizmusok beindulása szükséges. E primer agonisták receptorainak defektusa aggregációs zavarhoz is vezet, de ez - az ADP receptor defektusának a kivételével – jelentős részben szekréción zavar következménye. 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 thrombocyta szekréción zavarok hátterében 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 transzdukciós zavarok okozhatják. A szerzett eltérések hátterében legtöbb esetben a ciklo-oxigenáz ill. tromboxán szintetáz inhibitorok jelenléte áll. Storage pool megbetegedést a megakaryocytákban a granula képződés hiánya ill. funkcionálisan defektív granulomok 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, 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 syndrome. A betegség hátterében az áll, hogy a trombin és kollagén aktiváció során a foszfatidilszerin nem kerül ki a thrombocyta membrán külső felszínére, továbbá nem jön létre mikrovezikuláció a thrombocytákon trombin, kollagén és C5-C9 hatására. Ezen eltérések következtében csökken az aktív V-ös, X-es, VIII-as és IX-es alvadási faktorok kötődése az aktivált thrombocyta felszínén, azaz csökken a prokoaguláns aktivitás.

A thrombocyta adhézió, aggregáció, szekréción és a prokoaguláns aktivitás zavarát okozó betegségek diagnosztikája és differenciál diagnosztikája sokszor számos vizsgálati módszer együttes, diagnosztikai algoritmusok által meghatározott alkalmazását igényli. A thrombocyta funkcionális zavarok diagnosztikája számos komplikált, időigényes, drága laboratóriumi teszt elvégzését teszi szükségessé, s e vizsgálatok elvégzése speciális diagnosztikai centrumok feladata. Ugyanakkor szükség volna egy olyan szűrőtesztre, ami tükrözi a thrombocyta funkcionális komplexitását és detektálja a thrombocyta funkcionális betegségek meglétét.

Vizsgálataink kezdetén a thrombocyta számlálás mellett a thrombocyta rendszer zavarainak egyetlen általánosan elfogadott in vivo szűrőtesztje a vérzési idő meghatározás volt, s az egyszer használatos eszközzel végzett vérzési idő meghatározás tűnt a legalkalmasabbnak a thrombocyta funkcionális eltérések detektálására. A vérzési idő egyike a legrégebbi teszteknek, amit a mai napig használnak a klinikai gyakorlatban (8). Először 1901-ben Milian, francia élettanász publikált a bőrön ejtett sebést követő vérzési idő meghatározásról. Duke 1910-ben közölte a fülcimpa vérzési idő meghatározás módszerét.

Duke írta le a vérzési idő meghatározásnak azt a formáját, amit a mai napig is használunk, a bőrön ejtett seb szélének szűrőpapírral meghatározott időintervallumonként való érintését. Ivy, a sebészorvos volt az, aki a következő számottevő változtatást vezette be a vérzési idő meghatározás kivitelezésében. Az ő nevéhez fűződik a vérnyomásmérő mandzsetta alkalmazásával biztosított standard nyomás bevezetése, amit az alkar belső oldalán ejtett sebzés helyétől proximálisan, vagyis a felkaron alkalmazott. A standard sebzés létrehozására alkalmas eszközök (Simplate, Surgicut) kereskedelmi forgalomba kerülése után a módosított Ivy vérzési idő meghatározás került előtérbe. Egy 1972-ben megjelent közlemény (9) egyértelműen a módosított Ivy vérzési idő meghatározást javasolta alkalmazandó módszerként, arra a következtetésre jutva, hogy a standardizált vérzési idő meghatározás a thrombocyták haemostasisban kifejtett szerepét in vivo körülmények között vizsgálja, ezért szisztémás szűrővizsgálatként alkalmazható a klinikai gyakorlatban.

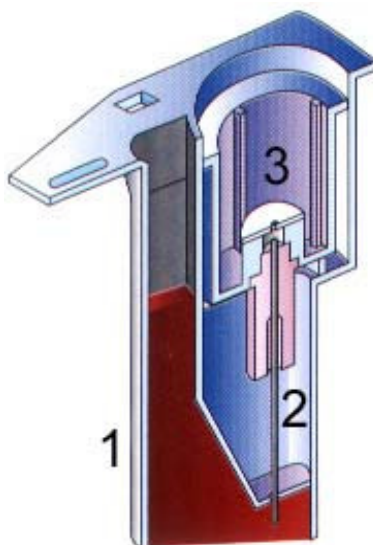
Ez a szűrőteszt – a prokoaguláns hatás igen ritka zavarai kivételével – komplex képet nyújt a thrombocyták funkciójáról, de nem megfelelő érzékenyséű. Von Willebrand betegség enyhébb formái normál vérzési idő mellett is előfordulhatnak, az acetilszalicilsav thrombocytá funkció gátló hatását a vérzési idő alig, sokszor csak a referencia tartományon belül maradó megnyúlással detektálja. További probléma, hogy nehezen standardizálható, csecsemőkön, kisgyermeken nehezen kivitelezhető, kényelmetlen a beteg számára és sorozatvizsgálatokra sem alkalmas. Ezekon kívül a vérzéses komplikációk szempontjából prediktív értéke sem megfelelő (10-13).

Mivel az antithrombocytá szereket egyre szélesebb körben alkalmazzák az artériás thrombosisok megelőzésében, ezek thrombocytá funkcióra kifejtett hatásának monitorozására sorozat vizsgálatokra is szükség lenne. Egy megfelelő komplex teszt hiányában az egyes részfunkciók aggregometriás, biokémiai és egyéb módszerekkel történő vizsgálata került előtérbe. E vizsgálatok azonban statikus jellegűek, vagy pl. aggregometria esetén az in vivo áramlási viszonyoktól durván eltérő körülmények között kerülnek kivitelezésre. Mindezek alapján komoly igény volt egy olyan, a thrombocytá funkciókat komplexen vizsgáló ex vivo tesztre, mely sorozatvizsgálatokra, monitorozásra is alkalmas, az in vivo viszonyokat leutánozza, és elég érzékeny az enyhe thrombocytá funkció zavarok kimutatására.

A PFA-100-as thrombocytá funkció analízátort ezzel a céllal hozta forgalomba a Dade-Behring cég (Miami, FL, USA). Ez a készülék nem előzmények nélkül került kialakításra. A Kratzer és Born által leírt elvek alapján (14) von der Goltz által 1991-ben kifejlesztett Thrombostat 4000-nek (15) egy lényegesen megújított változata.



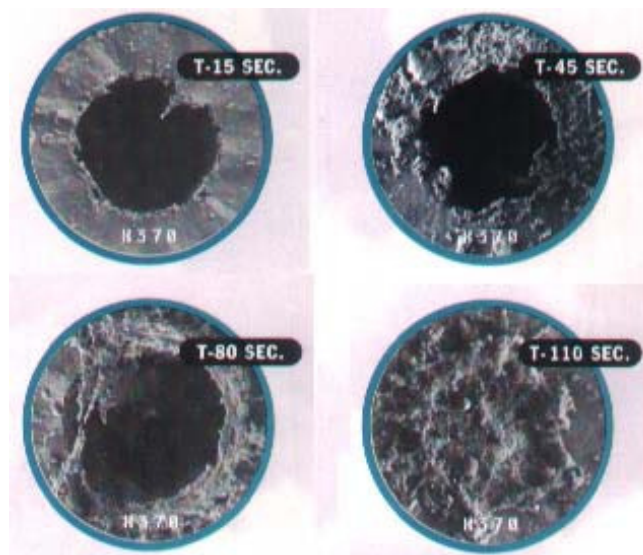
1. ábra A PFA-100 készülék



2. ábra A PFA-100 készülék patronja. 1: minta rezervoár 2: szívókapilláris 3: membrán aperturával

A készülék lelke az egyszer használatos patron, melynek egyik nyílásába mérendő a vizsgálathoz használatos 0,8 ml citráttal alvadésgátolt vér. A készülékbe egyszerre két patron helyezhető, és a vérminta bemérése után 3,1 perc inkubációs idő következik. A patron minta rezervoárja egy fóliával van elválasztva a szívó kapillárístól, mely a mérés kezdetén átszűrja a

fóliát és kontaktusba kerül a mintával. Jól kontrollált és standardizált vákuum segítségével a minta egyenletes áramlással egy membránnal lezárt kis rezervoárba kerül, amelyen egy kis kör alakú nyílás (apertura) található. A nitrocellulóz membrán thrombocytá aktiváló anyagokkal van átítatva. Kétféle patron van forgalomba, az egyikben az aktiváló ágens kollagén és adrenalin, a másikban kollagén és ADP. A vérminta tehát kontaktusba kerül az aktiváló ágensekkel és vákuum hatására a membránon lévő aperturán keresztül az aktivált thrombocyták nagy sebességgel tovább áramlanak. 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 (16, 17). Az áramló aktivált thrombocyták kitapadnak az apertura falához, majd egymáshoz és fokozatosan eltömítik a nyílást.



3. ábra Az aktivált thrombocyták által elzárt membrán apertura PFA-100 analizátorban

A teljes elzáródást a készülék egy mikroprocesszoros vákuum szenzorral észleli, s ezt az ún. záródási időt méri. Amennyiben 300 sec alatt sem történik meg az elzáródás, úgy a készülék az eredményt nagyobb mint 300 sec-nak adja meg. A thrombocytá aggregációval ellentétben a PFA-100 záródási időben nincs szignifikáns eltérés annak függvényében, hogy a mintát nátrium citrátot vagy direkt trombin inhibitor tartalmazó vérvételi csőbe veszik (18). A PFA-100 záródási időt a heparin terápiás koncentrációja nem befolyásolja (18, 19), továbbá eddig nem publikált megfigyelés az, hogy a beteg által szedett nitroglicerín sincs hatással rá.

További generális ex vivo thrombocytá funkciós teszt az O'Brien-féle filter módszer (20). E tesztben antikoagulált teljes vért áramoltatunk át egy üvegszálakból álló szűrőn 40

Hgmm nyomással. Az első 5 másodpercben (a filterteszt első fázisa) és a 20-40 másodperc között (második fázis) a szűrőn átjutó cseppeket felfogjuk, meghatározzuk a thrombocyta számot és a kiindulási vérlemezke szám ismeretében a visszatartott thrombocyták mennyiségét kiszámoljuk. A módszert a záró cseppszámmal (definíció szerint 5 másodperc alatt legfeljebb egy csepp jut át a filteren) és a százalékban megadott thrombocytaretenciával jellemezzük. A teszt bizonyos esetekben haszonnal alkalmazható, de nehezen standardizálható, az eredmények kiértékelése nehezkesebb, ezért az általános diagnosztikai gyakorlatban használata nem terjedt el. A PFA-100-al von Willebrand megbetegedésben nyert eredményeinket az O'Brien-féle filter módszerrel kapott eredményekkel dr. Schlammadinger Ágota és munkatársai vetették össze (21).

Egy újabb, diagnosztikai potenciállal bíró ex vivo thrombocyta funkciós teszt, ill. az elvégzéséhez szükséges készülék jelenleg áll kifejlesztés alatt. A készülékben egy álló lap és forgó kúp (plate and cone) egymáshoz viszonyított elmozdulása biztosítja a magas nyíróarányt, s a lemezre kitapadt thrombocyták analízise szolgáltatja az eredményt (22-24). Ennek korábbi, házilag előállított változata már eddig is jól szolgálta a tudományos kutatást, s ez évben hozta ki a Dia-Med cég (Dia Med Holding AG, Cressier sur Morat, Switzerland) a kutató munkára alkalmas változatát, DiaMed Impact-R néven. A diagnosztikai alkalmazásra hivatott változat forgalomba hozatala azonban - a cég ismételt ígéretei ellenére - még mindig várat magára.

2. 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 szekréció egyes ritka öröklött zavarainak (Glanzmann thrombasthenia, Hermansky-Pudlak syndroma) diagnosztikája.

3/ Az acetilszalicilsav (ASA) által többnyire terápiás célból előidézett szerzett szekréciós zavar diagnosztikája, ill. az ASA hatékonyságának a megítélése.

4/ A thrombolyticus terápia által esetlegesen előidézett thrombocyta funkciós zavar detektálása, ill. ennek alapján a vérzéses komplikációk veszélyének az előre jelzése.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vérvétel

A haemostasis vizsgálatokhoz a vért 5 ml-es 0,5 ml 105 mmol/L pufferolt nátrium citrátot tartalmazó vacutainer (Beckton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) csövekbe vettük. A thrombocytá számoláshoz és a áramlásos citometriás vizsgálatokhoz a vérvétel EDTA (K₃)-ot tartalmazó vacutainer (Beckton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) csövekbe történt. Az alvadék retrakció vizsgálatához natív vacutainer (Beckton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) csőbe vett vérmintát használtunk.

3.2. Plazma alvadási idők, koagulációs faktorok és fibrinogén meghatározás

A thrombocytá szegény plazmát (PPP) a vérminták nagy fordulatszámon való centrifugálásával (2000xg, 20 min, 22 °C) állítottuk elő. A plazma alvadási idők (a reptiláz idő kivételével), a koagulációs faktorok és a fibrinogén meghatározása STA Compact (Diagnostica Stago, Asnieres, France) koagulométerrel történt. A *protrombin idő* (PI) méréséhez Dade Innovin (Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, USA), az *aktivált parciális thromboplastin idő* (APTI) méréséhez PTT-automate (Diagnostica Stago, Asnieres, France) reagenst használtunk. A *reptiláz idő* mérését KC 1A (Amelung, Lemgo, Germany) koagulométeren F.T.H. 50-Reptilase reagenssel (Diagnostica Stago, Asnieres, France) végeztük. Az *alvadási faktorok* (FVIII, FIX, FXI, FXII) aktivitását egyfázisú APTI alapú teszttel, a megfelelő hiányplazmák (Diagnostica Stago, Asnieres, France) segítségével határoztuk meg. A *trombin idő* (TI) , valamint a *fibrinogén szint* (módosított Clauss módszer szerint) meghatározásához a Reanal (Budapest) reagenseit használtuk.

3.3. Vérzési idő meghatározás

A vérzési idő meghatározást Simplate II R (Organon Teknika, Turnhout Belgium) egyszer használatos eszközzel végeztük. A Glanzmann thrombastheniás beteg vérzési idejét Surgicutt (International Technidyne Corporation, New Jersey, USA) egyszer használatos eszközzel határoztuk meg. A gyártók által megadott referencia tartomány 2,5-9,5 min.

3.4. Thrombocytá szám meghatározás

A thrombocytá számot Sysmex K-4500 hematológiai automatával (Toa Medical Electronics Co., LTD. Kobe, Japan) határoztuk meg.

3.5. Thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálat

A vérminták egy részéből centrifugálással (120xg, 15 perc, 22 °C) thrombocyta dús plazmát (PRP) szeparáltunk, amit thrombocyta aggregációra és szekrécióra teszteltünk a vérvételt követő 4 órán belül. A thrombocyta dús plazmát a vizsgálatokig ill. a vizsgálatok alatt 37°C-on tároltuk. A thrombocyta dús plazmában a thrombocyta számot a beteg saját thrombocyta szegény plazmája segítségével egyöntetűen 260 G/L-re állítottuk. Az ADP (10 µmol/L), adrenalin (10 mg/L), mikrofibrilláris kollagén (1 és 5 mg/L) és arachidonsav (500 µg/mL) hatására létrejött thrombocyta aggregációt és szekréciót ill. a trombin (5 U/mL) hatására létrejött adenosin trifoszfát (ATP) szekréciót Chrono-Log (Havertown, PA, USA) 810-CA lumiaggregométerrel teszteltük. A denz testekből felszabaduló ATP monitorozása biolumineszcenciás módszerrel történt. Az aggregáció esetében kiszámoltuk a maximális transzmisszió változást és az aggregációs görbe meredekségét, a szekréció értékelésénél pedig meghatároztuk a 10¹¹ thrombocytából felszabadult ATP mennyiségét.

3.6. Alvadék retrakció vizsgálata

A retrakció vizsgálatánál a teljes alvadékot, vagy a rekalcifikált thrombocyta dús plazma alvadékát 1 óráig 37°C-on inkubáltuk majd az alvadék kiemelése után meghatároztuk a visszamaradt szérum térfogatát és ezt kivonva a teljes térfogathoz a retrahált alvadék %-os arányát adtuk meg.

3.7. Áramlásos citometriás vizsgálatok

A Glanzmann thrombasthenia igazolására az áramlásos citometriás vizsgálatokat Becton Dickinson (Rutherford, NJ, USA) FacScan készüléken végeztük. A thrombocytákat az előre és oldalra szórt fény intenzitás valamint a GPIb-IX receptor expressziója alapján kapuztuk. A GPIb-IX receptor komplexet fluoreszcein-izotiocanáttal (FITC) jelölt CD42a (Becton Dickinson Rutherford, NJ, USA) antitesttel azonosítottuk. A GPIIb jelöléshez fikoeritreinnel jelölt (Dako A/S, Glostrup, Denmark), a GPIIIa identifikálásra FITC-el jelölt (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) monoklonális antitesteket használtunk. A mérések során 10.000 sejt adatait értékeltük, az eredményeket list-mode file-ban tároltuk és Lysis II program segítségével analizáltuk.

3.8. A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája

A von Willebrand betegség diagnózisának felállításában és típusának megállapításában a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően jártunk el. A thrombocyta szám, a vérzési idő és PFA-100 záródási teszteken kívül az alábbi paramétereket határoztuk meg:

A risztocetin indukálta agglutináció vizsgálata Chrono-Log (Havertown, PA) 810-CA lumiaggregométerben 0,6 mg/mL és 1,2 mg/mL risztocetin koncentrációkkal történt.

A vWF antigén meghatározása (vWF:Ag) immunturbidimetriás módszerrel (Liatest, Diagnostica Stago, Asnieres, France) STA Compact (Diagnostica Stago, Asnieres, France) koagulométerrel történt a gyártó cég használati utasítása szerint.

A vWF risztocetin kofaktor (vWF R:Co) aktivitás meghatározását a Helena (Beaumont, TX, USA) kitjével végeztük Chrono-Log 810-CA lumiaggregométeren. A teszt kivitelezése során mindenben követtük a gyártó cég által előírtakat.

A vWF multimer szerkezetének molekulasúly szerinti analízisét nátrium dodecyl-szulfát (SDS) agarózgél-elektroforézissel, immunoblottal és immunkémiai jelzéssel végeztük. A plazma proteineket először SDS és urea jelenlétében denaturáltuk, majd SDS tartalmú agaróz gélen molekulasúly szerint elektroforetikusán szétválasztottuk. Újabb elektroforézissel (elektro-blot) a proteineket egy nitrocellulóz membránra vittük. Ezután a membránt blokkoló oldatban inkubáltuk, hogy a protein mentes helyeket lekössük, majd mosás után peroxidázzal jelzett humán vWF ellenes antitesttel inkubáltuk. Újabb mosás alkalmával eltávolítottuk a nem kötött antitesteket, majd a membránt szubsztrát oldatba tettük, s a vízben nem oldható termék a vWF multimernek megfelelő sávokat jól láthatóvá tette (25-28).

A FVIII aktivitás meghatározása egyfázisú APTI alapú alvadási teszttel történt.

Megjegyezzük, hogy újabban a von Willabrand betegség diagnosztikájában a fenti tesztek mellett a kollagén kötődés mértékének a meghatározását is használják, vizsgálataink idején azonban e tesz kifejlesztése még nem történt meg.

A von Willebrand betegségben szenvedő betegek altípusba sorolása az alábbiak szerint történt: Az 1-es típusban a vWF:Ag és a vWF R:Co aktivitás arányosan csökken, a multimer szerkezet azonban normális. A 2A altípusban a von Willebrand faktor funkció zavarát a nagy molekula tömegű multimerek hiánya okozza, ezért a vWF R:Co aktivitás a vWF:Ag szinthez képes aránytalanul csökkent, jelezve a kóros funkciójú molekula szintézisét. A 2B típusú betegségben fokozott a vWF kapcsolódása a thrombocyta felszínén levő GPIb receptorhoz, amelynek következtében a legnagyobb molekula tömegű multimerek eltűnnek a plazmából. A fokozott kötődést a 0,6 mg/mL risztocetin koncentrációra adott aggregációs válasz jelzi, ez a risztocetin koncentráció normál vWF ill. más típusú kóros vWF esetén nem

okoz aggregációt. A 2N altípusban a von Willebrand faktornak a VIII-as alvadási faktorhoz való kötődése szenved zavart, aminek következtében normális vWF:Ag szinttel és vWF R:Co aktivitással alacsony FVIII szint társul. A 3-as típus a von Willebrand betegség legsúlyosabb formája. Ez a típus a vWF hiányával társul, amit a diagnosztikai tesztek egyértelműen jeleznek.

3.9. A Hermansky Pudlak syndroma diagnosztikája

Az albinó gyermekek thrombocyta funkciójának részletes vizsgálatát intézetünkben Pap és munkatársai közölték (29). A diagnózis felállítása a thrombocyták lumiaggregometriás vizsgálatán kívül az alábbi tesztek segítségével történt: a thrombocyták teljes ADP és ATP tartalmának meghatározása Holmsen és munkatársai által közölt biolumineszcenciás módszerrel (30), a thrombocytákban található denz testecskék számának meghatározása mepakrin teszttel (31), denz granulum membránfehérje (CD63) áramlásos citometriás kimutatása (29).

3.10. A PFA-100 záródási idő referencia tartományának meghatározása

31 egészséges, normál haemostasis szűrőtesztet mutató egyén mintájából a vérvétel után fél órán belül elvégeztük a PFA-100 thrombocyta funkció analizátorral a záródási idők meghatározását kollagén/adrenalin és kollagén/ADP patronnal.

3.11. A vérzési idő és a PFA-100 záródási idő összehasonlítása örökletes thrombocyta funkciók zavarokban

A vizsgálatokban 32 von Willebrand beteg vett részt, akik az alábbi altípusokba tartoztak (7): 1-es típus: n=22, 2A típus: n=2, 2B típus: n=4, 3-as típus: n=3. Az egyik beteg esetében a klasszifikáció nem volt egyértelmű. Ismételt vizsgálattal is normál risztocetin kofaktor aktivitást (84%, referencia tartomány: 58-166 %) kaptunk, a von Willebrand Faktor antigén (177 %) valamivel a referencia tartomány (50-160 %) felett volt normál multimer strukturával. A betegnél a VIII-as alvadási faktor igen alacsony aktivitást (1%) mutatott, a beteg thrombocytái 0,6 mg/mL risztocetinre aggregálódtak. Az alacsony FVIII aktivitás alapján a beteget a 2N típusba soroltuk, feltehetően e csoport egyik különleges variánsa.

A vizsgálatban részt vett még 1 Glanzmann thrombastheniás és 10 albino beteg. Ez utóbbiak közül ötnél Hermansky-Pudlak syndroma volt igazolható. E betegek mintáiból a vérzési idő és PFA-100 záródási idők meghatározásán kívül elvégeztük a thrombocyta szám meghatározását, ill. a betegség fennállását igazoló diagnosztikai teszteket (lásd korábban).

3.12. Az acetilszalicilsav (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 záródás idők, továbbá thrombocytá aggregációs és szekréción vizsgálatokat végeztünk az ASA bevétele előtt, ill. 24 órával utána. Valamennyi vérmintából meghatároztuk a thrombocytá számot is. Két egyén esetében - a vérzési idő kivételével - további időpontokban is történtek vizsgálatok.

3.13. A streptokinase PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

A streptokinase (SK; Kabikinase, Pharmacia and Upjohn, Stockholm, Sweden) 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 thrombocytá számot, PFA-100 záródási időket, továbbá trombin időt határoztunk meg.

A SK thrombocytá funkcióra in vivo kifejtett hatásának megítélésére 33 acut myocardialis infarktusból (AMI) szenvedő thrombolyticus terápiában részesülő beteg vérmintáit vizsgáltuk. Az AMI diagnózisa a WHO standard kritériumainak megfelelően történt. 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 thrombolyticus kezelés indítása után 2 órával nem frakcionált heparin infúziót kaptak a betegek 1000 U/mL kezdő dózissal, melyet az APTI függvényében aktuálisan módosítottak. A vérmintákat a terápiát megelőzően, majd 2, illetve 4-6 órával a kezelés kezdetét követően vettük. A mintákból meghatároztuk a véralvadás alaptesztjeit (PI, APTI, TI), a PFA-100 záródási időket ill. a thrombocytá számot.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A PFA-100 záródási idők referencia tartományának meghatározása

A cég csak tájékoztatónak szánt leírása szerint a referencia tartomány kollagén/ADP stimulus esetében 71-114 sec, kollagén/adrenalin stimulus esetében pedig 96-170 sec. Mi 31 egészséges, normál haemostasis szűrőteszteket mutató egyéneken elvégeztük mindkét patronnal a záródási idő meghatározást. Az mért értékek normál eloszlást mutattak, s a vizsgálatok eredményeként az alábbi referencia tartományokat ($\bar{x} \pm 2$ SD) állapítottuk meg: kollagén/ADP patronnal mért záródási idő 55-118 sec, kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő 63-142 sec. Megjegyezzük, hogy rendszerünkben a referencia tartományok alsó határa alacsonyabb, mint a Dade által megadott értékek, ami arra utal, hogy ajánlatos minden laboratóriumnak saját referencia tartományt meghatározni. A kollagén/ADP stimulusra mért referencia tartomány alsó határának két másik közlemény is - az általunk mérthez hasonlóan - rövidebb záródási időket adott meg (5, 32).

4.2. A PFA-100 thrombocytá funkció analízátor alkalmazhatósága a von Willebrand megbetegedés diagnosztikájában

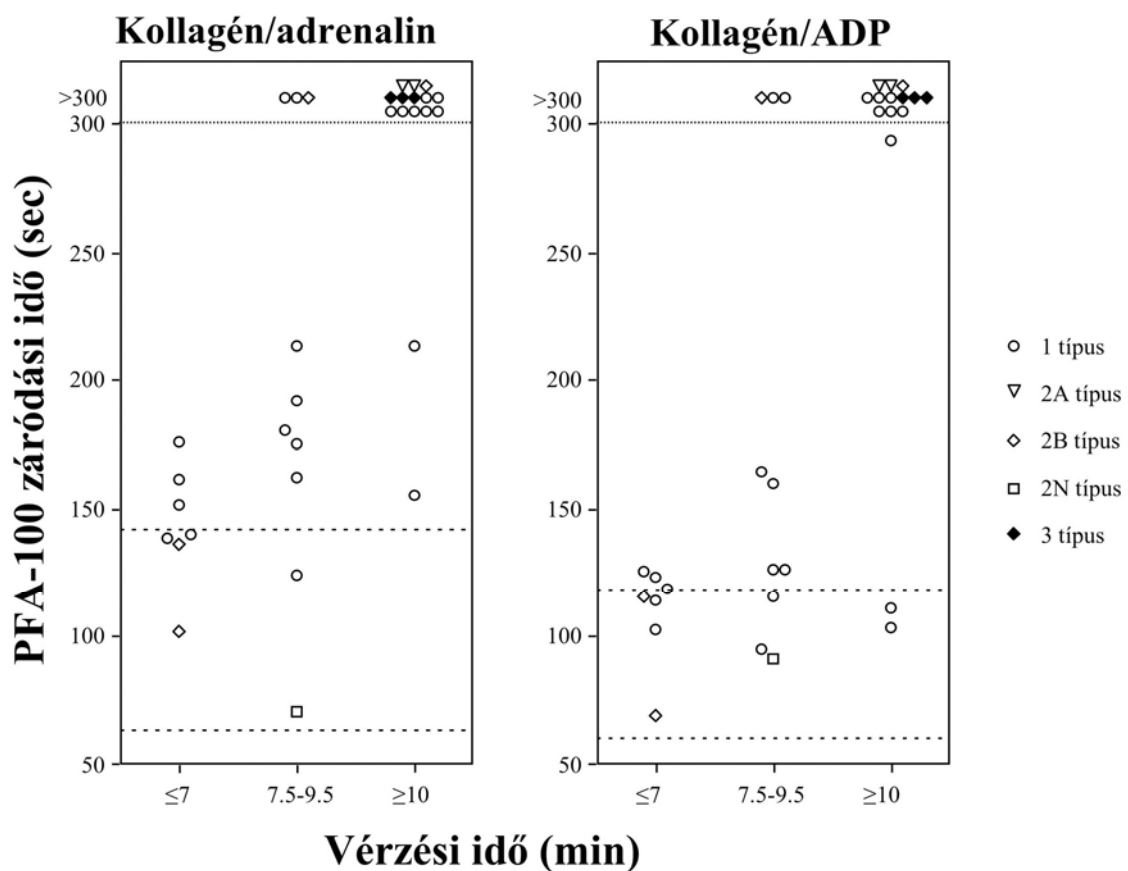
4.2.1. A vérzési idő és a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási idő összehasonlítása

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 (4. ábra). 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 ($\leq 7,0$ 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 variánst nem számítva, 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/adrenalinos 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.



4. ábra A von Willebrand betegek PFA-100 záródási ideje különböző vérzési idők esetén. A záródási időket kollagén/adrenalin és kollagén/ADP patronnal határoztuk meg. A pontozott vonal feletti értékek a 300 sec-nál nem záródó mintákat jelölik. A szaggatott vonalak közötti részek a záródási idők referencia tartományát jelzik (63-142 sec a kollagén/adrenalin patron, 55-118 sec a kollagén/ADP patron esetében). A templáttal (Simplate II) meghatározott vérzési idő referencia tartománya 2,5-9,5 min.

4.2.2. 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-100 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/adrenalin mérésű záródási idő is a referencia tartományon belül volt. A harmadik csoportban (vérzési idő $\leq 7,0$ perc) a hét betegből háromnál mértünk megnyúlt záródási időt. Vizsgálataink alapján a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő teszt szenzitivitása - a 2N típusú betegtől eltekintve - 74,2%-os.

Schlammadinger Ágota és Boda Zoltán (II. sz Belgyógyászati Klinika) velünk kollaborációban a PFA-100 záródási időket az O'Brien filter teszt eredményeivel hasonlították 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% volt (21).

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

4.3.1. 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 okát ekkor nem állapították meg. Fél évesen került felvételre a DOTE Gyermekklinikájára inguinális sérv műtéti megoldása céljából. Felvételt követően a szűrőcsatornákból vért, s profúz orrvérzés is fellépett. 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 (1. táblázat). A PFA-100 záródási idők szintén kórosnak bizonyultak, sem a kollagén/ADP sem a kollagén/adrenalin patronnal használva nem észleltünk záródást.

1. táblázat A haemostasis alaptesztjeinek eredménye a vizsgált betegnél

Teszt	Beteg	Referencia tartomány
Vérzési idő (min)	>20	2,5-9,5

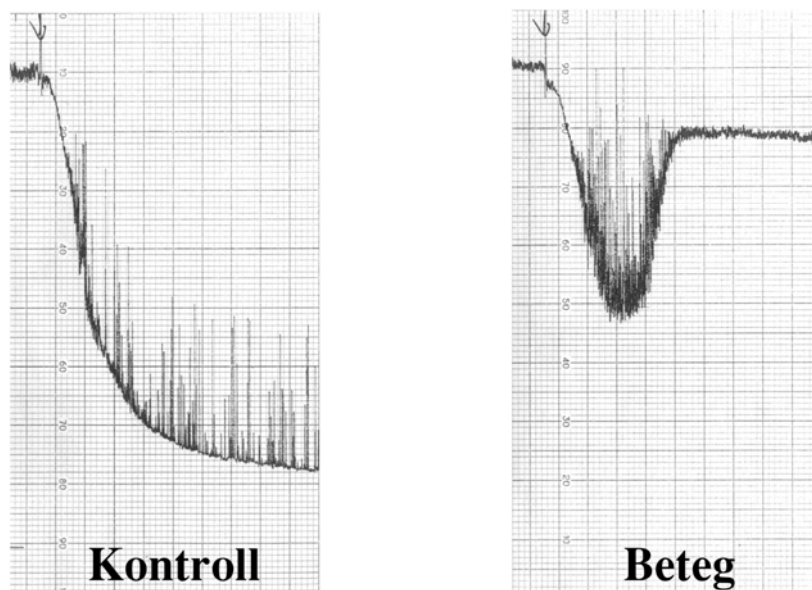
Thrombocyta szám (G/L)	235	150-400
PFA-100 záródási idő (sec)		
Kollagén/ADP	>252	55-118
Kollagén/adrenalin	>292	63-142
APTI (sec)	48,5	34,0
Protrombin idő (sec)	11,4	9,4
Trombin idő (sec)	20,6	15,5
Reptiláz idő (sec)	23,4	18,9
Fibrinogén (g/L)	1,87	1,5-4,0

2. táblázat Az előfázis faktorok aktivitása a vizsgált betegnél

Faktor	Beteg	Referencia tartomány
Faktor VIII (%)	196	70-140
Faktor IX (%)	48	70-140
Faktor XI (%)	47	70-140
Faktor XII (%)	70	70-140

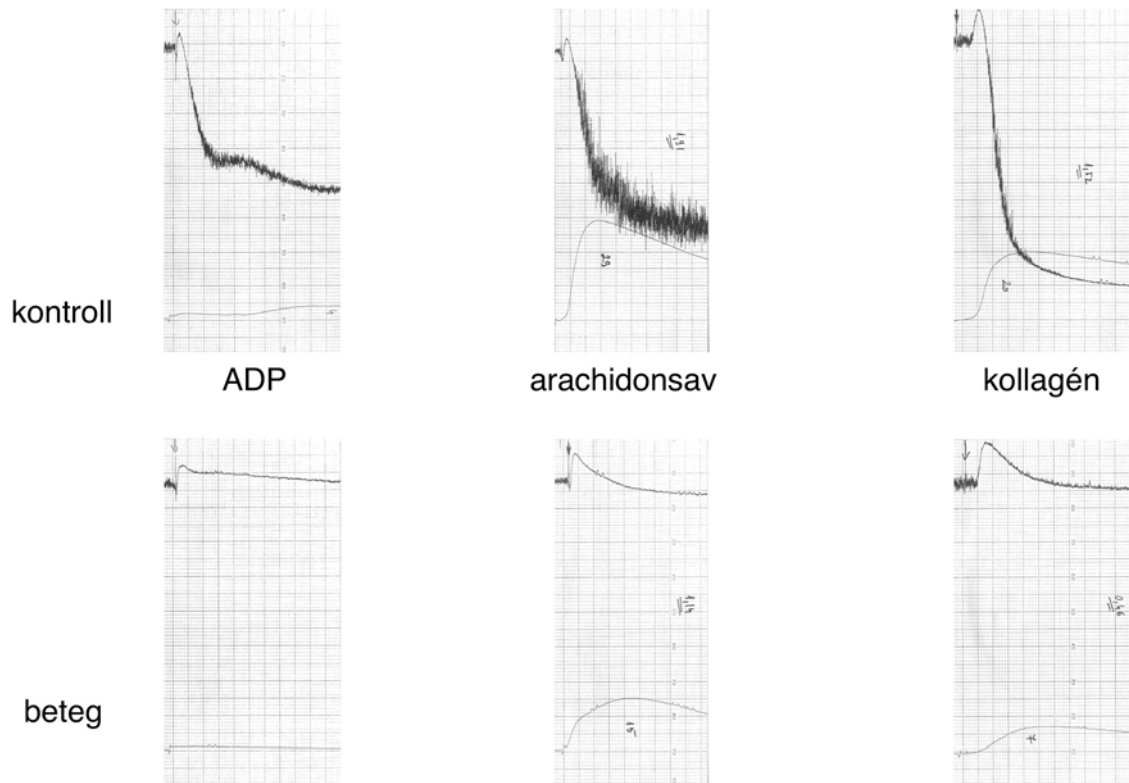
Az alvadási alaptesztek közül az APTI 48,5 sec volt, azaz szignifikáns megnyúlást mutatott, egyéb szűrőtesztekben nem észleltünk lényeges eltérést. A vérzési idő és az APTI együttes megnyúlása leggyakrabban a thrombocyta adhézió zavarára utal, mivel a von Willebrand faktor a VIII-as alvadási faktor szállító molekulája is. A betegnél észlelt APTI megnyúlás normál plazmával korrigálható volt. Elvégeztük az előfázis faktorok aktivitásának mérését (2. táblázat). A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a megnyúlt APTI hátterében a némileg csökkent IX-es és XI-es alvadási faktor aktivitások állnak. Ezen értékek azonban nem magyarázták a beteg súlyos vérzéses tüneteit.

A normál tartományt is meghaladó 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 (5. ábra), ami csak a rendkívül ritka, aggregációs zavarnál, a Glanzmann thrombastheniánál szokott előfordulni.



5. ábra A risztocetin aggregáció (1,2 mg/mL risztocetin) vizsgálata

Egyéb aggregáló ágensekkel végzett vizsgálatok során az aggregáció teljes hiányát észleltük (6. ábra). A 6. ábrán egy kontroll és a beteg thrombocyta lumiaggregometriás görbéit láthatjuk. A felülről induló görbék az aggregációt, az alulról indulók pedig a biolumineszcenciás módszerrel meghatározott ATP szekréciót reprezentálják. A kontrollnál a fénytranszmisszió átmeneti csökkenése (melyet a görbe emelkedése reprezentál) a thrombocyták alakváltozásának eredményeképpen jön létre. Ezt követi az aggregációnak megfelelő kifejezett transzmisszió fokozódás (a görbe nagymértékű süllyedése). Jól látható, hogy a beteg thrombocytái alakváltozást ugyan mutatnak, azaz az aktiváló ágens leköttődik a receptorához, de a thrombocyták egyik aktiváló ágens hatására sem aggregálódnak. Az ATP szekréció ADP aktiváció esetében hiányzik, kollagén és arachidonsav esetében azonban csak csökkent (6. ábra, 3. táblázat), ami az aggregáció hiányának másodlagos következménye. A nagy dózisu trombin, mely a szekréció aggregációtól független erőteljes ingere, közel normál ATP szekréciót idézett elő (3. táblázat). A thrombocyta aggregációs és szekréciós vizsgálatok eredményei egyértelműen a thrombocyta 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 (1. táblázat), így az eredmények a fibrinogén receptor defektusára, a Glanzmann thrombastheniára utalnak.

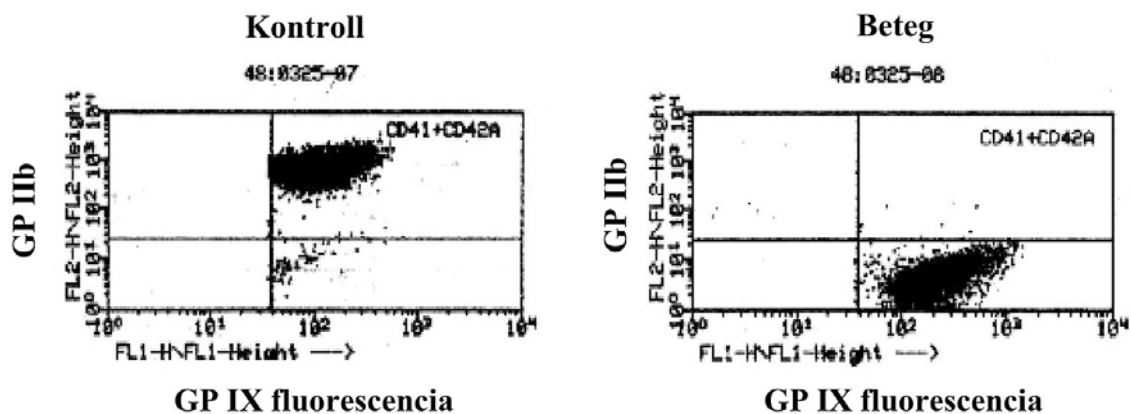


6. ábra Glanzmann thrombastheniás beteg lumiaggregometriás görbéi

3. táblázat Az ATP szekréció lumiaggregometriás mérése a vizsgált betegnél

Aktiváló ágens	thrombocyta „release”	
	(μmol ATP/10 ¹¹ thrombocyta)	
	Beteg	Kontroll
ADP (10 μmol/L)	0	0,46
Adrenalin (10 μg/mL)	0	1,10
Kollagén (1 μg/mL)	0,11	0,95
(5 μg/mL)	0,46	1,52
Arachidonsav (500 μg/mL)	1,14	1,91
Trombin (5 U/mL)	2,42	3,15

A diagnózis megerősítésére végzett áramlások citometriás vizsgálatok a felszíni GPIIb erősen csökkent mennyiségét verifikálták (7. ábra). A 7. ábrán jól látható, hogy a von Willebrand faktor receptorának egyik komponense a GPIX ellenes fluoresceinnel jelölt antitest mind a kontroll mind a beteg thrombocytaival jól reagál. A fikoeritreinnel jelzett GPIIb ellenes antitesttel azonban csak a kontroll thrombocyta reagálnak. A beteg esetében a fibrinogén receptor komponens a GPIIb nem volt detektálható, ezért a thrombocytaknak megfelelő pontok az intenzív felületi fluoreszcenciás jelnek megfelelően az origótól távol a jobboldali alsó quadránsban helyezkednek el. Hasonlóképpen nem adott fluoreszcenciás jelet a GPIIb-IIIa komplex (fibrinogén receptor) ellen termelődött fluoreszens festékkel jelölt antitest sem (az ábrán nem szerepel). Az elvégzett vizsgálatok a Glanzmann thrombasthenia diagnózisát bizonyították. A teljes vér alvadék retrakciós vizsgálatok bizonytalan eredményt adtak, ezért a retrakciós vizsgálatokat megismételtük thrombocyta dús plazmából készült alvadékkal. Utóbbi esetben az eredmény egyértelműen negatív lett (nem volt retrakció). Ez volt a második, közölt hazai Glanzmann thrombastheniás eset, egy korábbi közlés egyetemünk II. számú Belklinikájáról történt (33).



7. ábra A felületi GPIX (CD42a) és GPIIb (CD41) detektálása thrombocytaikon áramlások citometriával

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

4.3.2. PFA-100 záródási idők Hermansky-Pudlak szindrómában

Intézetünkben korábban Pap és munkatársai közölték az albinó gyermekek thrombocytá funkciós zavarainak vizsgálatát (29). Öt gyermek esetében igazolták a Hermansky-Pudlak szindróma (HPS) (albinizmus, thrombocytá storage pool megbetegedés, a csontvelőben, ill. a RES sejtekben ceroid szerű pigment lerakódása) fennállását, mely enyhétől közepes súlyosságú vérzékenységgel járt. A vérzési idő mindannyiuknál erőteljesen megnyúlt volt (4. táblázat). 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. Öt gyermek esetében HPS nem volt igazolható. Közülük négyénél referencia tartományon belüli vérzési idő és záródási idő volt megfigyelhető, egy gyermeknél azonban mindkét patronnal megnyúlt záródási időt mértünk, ami enyhe thrombocytá aggregációs és szekréción zavarral társult. A beteg további, von Willebrand betegség irányú kivizsgálására sajnos nem kerülhetett sor, mivel a beteggel nem tudtuk érdemben felvenni a kapcsolatot.

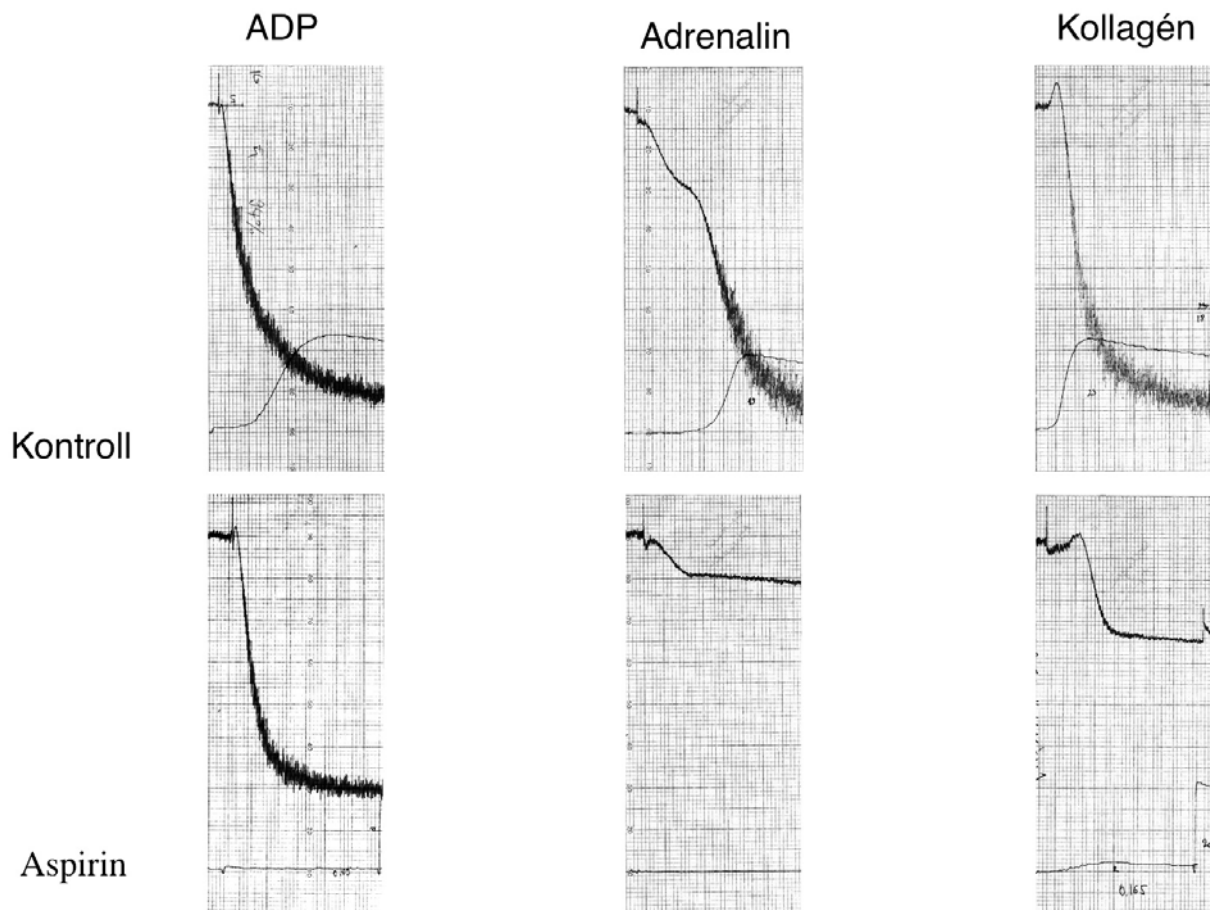
4. táblázat. A PFA-100 záródási idők és a vérzési idő összehasonlítása HPS-ás és HPS-ben nem szenvedő albinó gyermekek esetében

Beteg	Vérzési idő (min)	Záródási idő (sec)	
		Kollagén/adrenalin	Kollagén/ADP
albinó gyermekek HPS nélkül			
1	3.5	81	74
2	8.5	110	90
3	5.0	114	93
4	5.0	74	85
5	8.0	160	170
HPS-s albinó gyermekek			
1	>15.0	222	75
2	>15.0	>300	100
3	>15.0	168	88
4	>15.0	139	78
5	>15.0	175	75

Referencia tartományok: vérzési idő: 2.5-9.5 min; kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő: 63-142 sec; kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő: 55-118 sec.

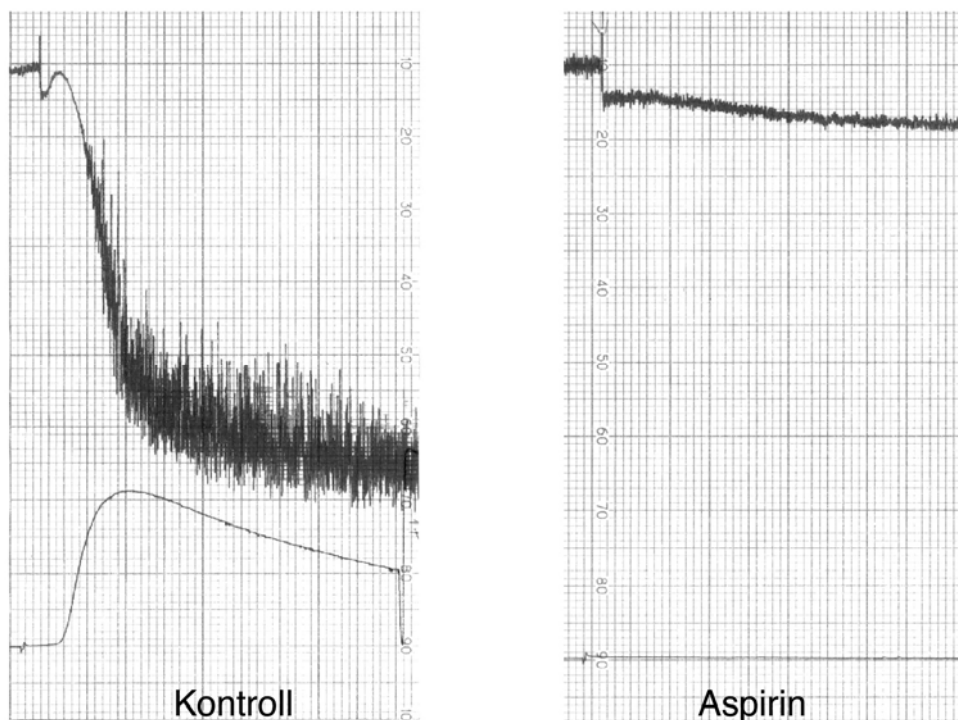
4.4. Az acetilszalicilsav (ASA) PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

Az ASA thrombocyta funkcióra kifejtett hatásának vizsgálata a laboratórium dolgozói közül kikerülő önkénteseken történtek. A dóziszfüggés kiküszöbölésének érdekében a preventív dózisként alkalmazott 50-100 mg helyett lényegesen nagyobb, 500 mg egyszeri dózisú Aspirin (Bayer) bevitelére vállalkozott 4 személy. A gyógyszer bevétele előtt thrombocyta funkciós vizsgálatokra vért vettünk, melyből elvégeztük az aggregációs és szekrációs lumiaggregometriás vizsgálatokat, ill. meghatároztuk a PFA-100 záródási időket. Ezeken kívül elvégeztük a vérzési idő meghatározást is. A vizsgálatokat az Aspirin bevétele után 24 órával minden vizsgált személy esetében megismételtük. Valamennyi vérmintából meghatároztuk a thrombocyta számot is, ez azonban minden esetben a referencia tartományba esett.



8. ábra Az ASA hatás detektálása lumiaggregometriás vizsgálatokkal. Felülről induló vastag vonalak: aggregometriás görbe. Alulról induló vékony vonalak: ATP felszabadulás biolumineszcenciás követése. Felső sor: ASA kezelés előtt, alsó sor: ASA kezelés után egy nappal. A kollagén aggregáció 1 mg/L kollagénnel történt.

Az ASA hatás hagyományos aggregometriás, ill. lumiaggregometriás módszerekkel történő detektálását a 8. és 9. ábrán mutatjuk be. Az ábrán a felülről induló vastagabb vonalak az aggregációs görbéket, az alulról induló vékonyabb vonalak a biolumineszcenciás módszerrel követett ATP szekréciónak reprezentálják. A fenti sor egy egészséges egyén regisztrátumait mutatja, míg az alsó sor lumiaggregometriás görbéi ugyanazon személytől 500 mg Aspirin bevétele után 1 nappal nyert vérmintából elvégzett vizsgálatok eredményeit demonstrálja. Az ADP aggregáció nem csökkent lényegesen, az adrenalin indukálta aggregáció viszont egyfázisúvá vált és az ASA a kis dózisú kollagén által indukált aggregációt is csökkentette. A arachidonsav indukálta aggregáció az ASA hatására gyakorlatilag megszűnt (9. ábra). Az ASA-val kezelt egyéneknél ATP szekréciónak vagy egyáltalán nem vagy csak minimális mértékben volt detektálható.



9. ábra Az ASA hatása az arachidonsav által indukált thrombocytá aggregációra és szekréciónak

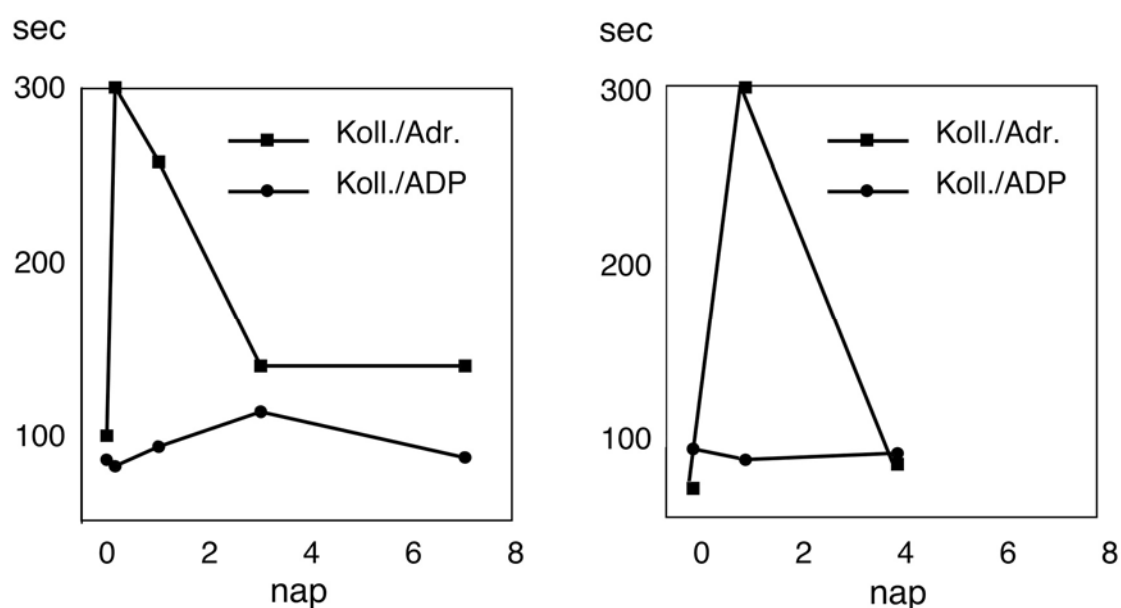
Az 500 mg egyszeri dózisú Aspirin bevitelére vállalkozott 4 személy vizsgálata során megállapítható, hogy a vérzési idő alig reagál az Aspirinre, hasonlóképpen a kollagén/ADP-vel átítatott membránt tartalmazó patronokkal sem észleltünk lényeges változást a záródási időben (5. táblázat). Ezzel szemben a kollagén/adrenalin által 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 záródási ideje az alkalmazott, nagy ASA dózis ellenére is csak 142 sec-ra nyúlt meg, ami aláhúzza, hogy az ASA érzékenység egyénenként lényegesen eltérő lehet. A kollagénnel és adrenalinnal 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 dózisú kollagén, az arachidonsav és adrenalin aggregáció viszont érzékenyebb indikátora az ASA hatásnak (8. és 9. ábra).

5. táblázat Az ASA kezelés hatása a különböző thrombocyta funkciós paraméterekre önkéntes személyeken

Személy	ASA kezelés	PFA-100 záródási idő (sec)		Vérzési idő (min)	Felszabadult ATP/10 ¹¹ thrombocyta			Maximális transzmisszió változás (%)		
		Kollagén/ adrenalin patron	Kollagén/ ADP patron		Kollagén	Adrenalin	ADP	Kollagén	Adrenalin	ADP
P.M.	előtt	78	80	3,5	2,92	1,97	1,52	81	79	81
	után	142	75	5,0	0,53	0,00	0,00	32	25	69
SZ.L.	előtt	90	75	6,0	1,35	1,08	0,79	71	88	72
	után	>300	81	7,5	0,19	0,00	0,12	9	27	59
S.S.	előtt	69	92	5,0	1,73	1,83	2,4	90	100	94
	után	>300	86	5,5	0,17	0,00	0,09	30	15	75
D.J.	előtt	99	87	9,0	1,35	2,26	1,60	100	90	100
	után	257	95	9,0	0,24	0,00	0,30	33	53	84

A thrombocyta vizsgálatokat közvetlenül az ASA bevétele előtt és 24 órával annak bevétele után végeztük.



10. ábra A két önkéntesen mért ASA hatás időbeni lefutása PFA-100 készüléken tesztelve

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 (10. ábra). 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 fentieknél lényegesen kisebb dózisú ASA hatásának eredményeiről a következő fejezetben számolunk be.

4.5. A streptokináz PFA-100 záródási időkre kifejtett hatásának vizsgálata

A fibrinolitikus terápia szövödményeként vérzés alakulhat ki, aminek hátterében a thrombolysis következtében kialakuló thrombocyta funkció károsodás áll. Munkánk során kíváncsiak voltunk arra, hogy a PFA-100-as készülék képes-e jelezni ezt a vérlemezke defektust. A klinikai vizsgálatok elkezdése előtt in vitro kísérleteket végeztünk.

4.5.1. 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 thrombocyták szám meghatározást, amelyek a referencia tartományon belül voltak és a kísérlet során nem mutattak csökkenést. Az in vitro kísérlet eredményei azt mutatják, hogy a fibrinolitikus rendszer aktiválódásának hatására bekövetkező thrombocyták funkció defektust a PFA-100 záródási idő jelzi. Ennek alapján feltételeztük, hogy a készülék alkalmas a thrombolitica terápia okozta károsodott thrombocyták funkció kimutatására.

4.5.2. Ex vivo vizsgálatok acut myocardialis infarctuson átesett betegek thrombolitica kezelése során

A thrombolitica terápia kezdete után már 2 órával minden beteg esetében megnyúlt TI-t, APTI-t és PI-t mértünk, ami a „lyticus állapotot” fennállásának a jele. A thrombocyták szám a referencia tartományban volt és szignifikáns változás egyik betegnél sem következett be a vizsgált időtartam alatt.

A PFA záródási idő vizsgálatok eredményeit a 6. és 7. táblázat foglalja össze, míg a 11. ábra az egyes betegek záródási időben bekövetkezett jellegzetes időbeli változásait mutatja. A vizsgált 33 AMI-ban szenvedő beteg közül vizsgálatunk kezdetekor mindössze 1 esetben mértünk megnyúlt (132 sec) záródási időt kollagén/ADP patronnal (6. táblázat). A thrombolitica terápia során a kollagén/ADP patronnal mért záródási idő nem változott vagy csak minimális megnyúlást mutatott a betegek 2/3-ánál (11. ábra, pl: 10, 12, 13-as számú beteg). 11 beteg esetében 30 sec-nál hosszabb (31-97 sec között) megnyúlást tapasztaltunk, ami a thrombolitica terápia következménye volt (11. ábra pl: 1-es és 4-es számú beteg). Ezen esetek közül kettőnél a záródási idő még így is a referencia tartományban maradt (pl: 1-es beteg). A kollagén/ADP patronnal mért záródási idő - a kollagén/adrenalinral mért záródási idővel ellentétben - ASA-ra érzéketlen, ezért az általa észlelt megnyúlás okozója olyan kóros thrombocyták funkció eltérés, amelynek hátterében ASA-tól független faktorok állnak (34-36).

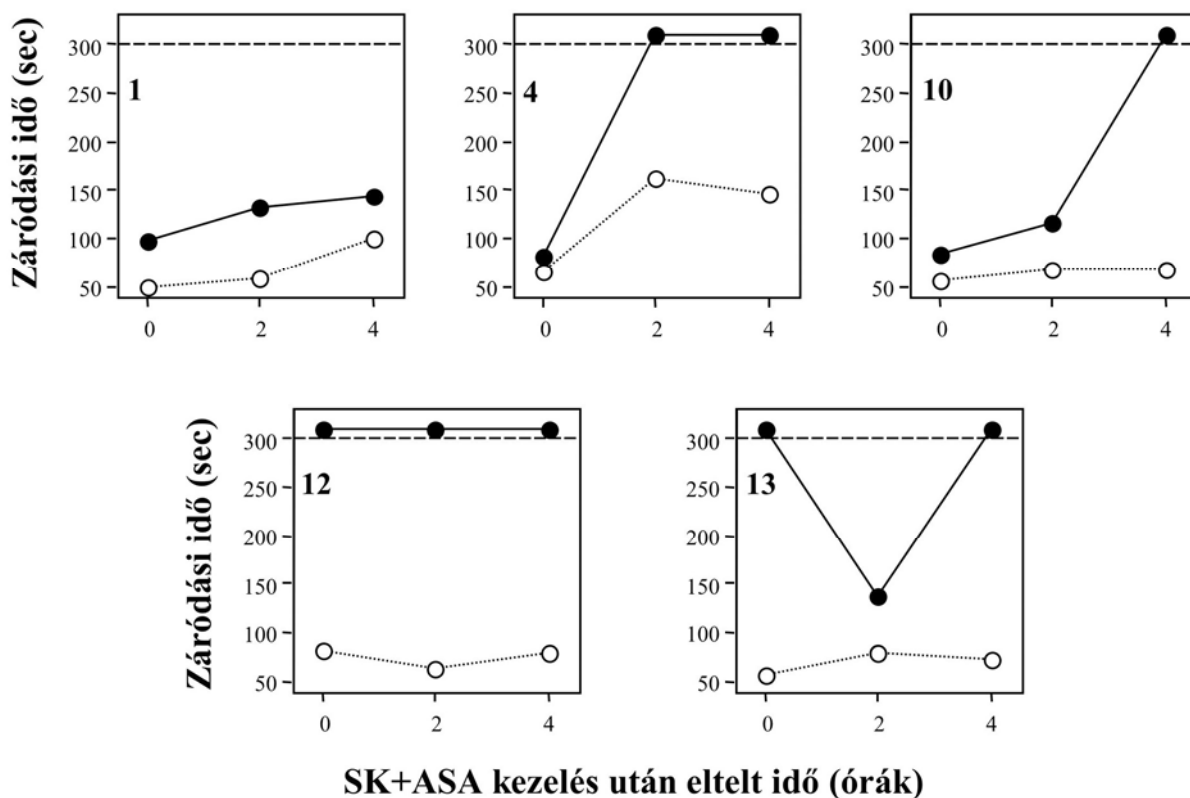
6. táblázat A thrombolitica terápia hatása a kollagén/ADP patronnal mért PFA-100 záródási időre AMI-s betegek esetében

Záródási idő	Betegszám		
	SK előtt	SK után 2 órával	SK után 4-6 órával
referencia tartományban	32 (97%)	30 (91%)	24 (73%)

(≤ 118 sec)	(45-112 sec)	(46-108 sec)	(54-112 sec)
referencia tartomány felett	1 (3%)	3 (9%)	9 (27%)
(>118 sec)	(132 sec)	(119-162 sec)	(122-145 sec)
a megnyúlás 0-30 sec között	n.é.	29 (88%)	22 (67%)
a megnyúlás mértéke >30 sec	n.é.	4 (12%)	11 (33%)

Zárójelbe tettük a mért záródási idő tartományokat. SK: streptokinase; n.é.: nem értelmezhető

Az irodalmi adatok és saját munkánk is egyértelműen bizonyítja, hogy a kollagén/adrenalinus patronnal meghatározott záródási idő nagymértékben érzékeny az ASA-ra. Ez lehetővé teszi a terápiás válasz ill. a betegek terápiás együttműködésének, "compliance"-ének egyértelmű detektálását (34-37). A 33 beteg közül 7 szedett ASA-t az AMI kialakulását megelőzően. A kollagén/adrenalinus patronnal meghatározott záródási idő mindegyikőjükénél a referencia tartomány felett volt (öt esetben 300 sec felett; reprezentatív példák: 11. ábra, 12-es, 13-as beteg). Érdekes megfigyelés, hogy 3 betegnél, akiknél a kollagén/adrenalinus patronnal mért záródási idő kiinduláskor 300 sec felett volt, a záródási idő átmenetileg csökkent és csak 4 óra elteltével tért vissza a thrombolysis előtti értékre (11. ábra pl: 13-as beteg).



11. ábra A PFA-100 záródási idők változása néhány thrombolyticus terápiában részesült AMI-ban szenvedő beteg esetében. A betegek streptokinase infúziót és ASA kezelést kaptak. A streptokinase terápia kezdete után 2 órával nem frakcionált heparin infúzió adását is megkezdték. A záródási idő kollagén/adrenalin (—) és kollagén/ADP (o.....o) patronnal lett meghatározva. A kis ábrák bal felső sarkába írt számok a különböző betegeket jelölik.

Az AMI-t megelőzően ASA terápian nem levő betegek kollagén/adrenalinossal meghatározott záródási idő értékeit a 7. táblázat mutatja. A betegek 58 %-a (15/26) mutatott 120 sec-nál nagyobb záródási idő megnyúlást ASA hatására, és legtöbbjüknél ez a megnyúlás meghaladta a 250 sec-ot. Ezen reszponder betegeknél egy része korai választ mutatott, mivel a záródási idő megnyúlás 2 órán belül elérte a maximumát (11. ábra, pl: 4-es beteg), míg a többieknél a maximális megnyúlás eléréséhez 4 órára volt szükség (11. ábra, pl: 10-es beteg). Az ASA bevétele ellenére 5 betegnél a záródási idő a referencia tartományon belül maradt. Rajtuk kívül még volt 2 olyan beteg, akiknél a kiindulási záródási idő kismértékben megnyúlt volt ugyan (187 és 170 sec), de záródási idejük az ASA bevitelét követően nem változott. Összességében a nonreszponderek száma 7 volt (záródási idő megnyúlás: <50 sec), ami a betegek 27%-át jelentette. 4 egyénnél (15%) a záródási idő megnyúlás 51 és 120 sec között volt, záródási idejük azonban nem haladta meg a 250 sec-ot. 15 beteg (58%) esetében igen jelentős >120 sec megnyúlást észleltünk.

7. táblázat Az ASA kezelés hatása a kollagén/adrenalin patronnal mért PFA-100 záródási időre thrombolyticus terápiában részesülő AMI-s betegek esetében.

Záródási idő	Betegszám	
	ASA előtt	ASA után 4 órával
referencia tartományban (63-142 sec)	22 (85%)	5 (19%)
referencia tartományon kívül (143-250 sec)	4 (15%)	8 (31%)
referencia tartományon kívül (>250 sec)	0 (0%)	13 (50%)
a megnyúlás mértéke 0-50 sec	n.é.	7 (27%)
a megnyúlás mértéke 51-120 sec	n.é.	4 (15%)
a megnyúlás mértéke >120 sec	n.é.	15 (58%)

Az AMI kialakulását megelőzően ASA terápiában részesülő betegek nem lettek figyelembe véve. n.é.: nem értelmezhető

5. MEGBESZÉLÉS

A PFA-100 záródási időt befolyásolja a vérvételi csőben levő anticoagulans koncentrációja, mivel a nagyobb citrát koncentráció valamelyest megnyújtja a záródási időt (32). Vizsgálataink során 0,105 mol/L pufferolt citrátot tartalmazó vérvételi csöveket használva (n=31) kollagén/adrenalin tartalmú patronnal 63-142 sec közötti, míg kolladén/ADP patron esetében 55-118 sec közötti záródási idő referencia tartományt kaptunk. Hasonló citrát koncentrációnál Harrison és munkatársai (n=20) (38) és Carcao és munkatársai (n=30) (39) is hasonló referencia intervallumot határoztak meg. Magasabb (0,129 mol/L) pufferolt citrát használatakor Fressinaud és munkatársai (n=91) kollagén/adrenalin záródási idő esetében 80-160 sec közötti, kolladén/ADP záródási idő esetében 59-120 sec közötti referencia tartományt kaptak (40). Hasonlóan magas citrát koncentrációnál Mammen és munkatársai kollagén/adrenalin záródási idő esetében igen széles referencia tartományt (94-191 sec) állapítottak meg 206 egészséges egyén mintájából, az eredmények 90%-os középső intervalluma alapján (34). Tekintettel arra, hogy az International Society of Thrombosis and Haemostasis Standardization and Scientific Committee-je a haemostasis diagnosztikai vizsgálatokhoz történő vérvételhez egyértelműen a 0.105 mol/L citrát koncentrációt ajánlja, úgy gondoljuk a PFA-100 vizsgálatokhoz is ezt a citrát koncentrációt és az ennek megfelelő referencia tartományt kell használni.

Az öröklött vérzékenységek diagnosztikájában a legtöbb problémát a von Willebrand betegség, ill. annak egyes alcsoportjai okozzák. E betegségcsoport egyrészt különböző, diagnosztikai szempontból is elkülöníthető algoritmust igénylő alcsoportokból áll, másrészt a von Willebrand faktor szintjének vércsoport-függése, időszakos változásai nehezen értékelhetővé teszik az egyébként enyhe, vagy alig észlelhető tünetekkel járó, de esetleges műtétek, szülés stb. esetén súlyos vérzéses komplikációkat okozó betegségek diagnózisát. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy az AB0 vércsoport típusnak is lényeges hatása van a vWF szintre (41, 42). A vWF alegység nagymértékben glikozilált és az N-oligoszaharidok AB0 vércsoport determinánsokkal rendelkeznek. A von Willebrand faktorban jelenlevő A, B és H antigének befolyásolják a von Willebrand faktor keringésben való jelenlétét, élettartamát. 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. Ezért egyesek ún. AB0 vércsoport típus specifikus referencia tartományok használatát javasolják. Érdekes, hogy a von Willebrand betegek több mint 65%-ának 0-ás a vércsoportja (41).

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, vWF multimer meghatározás és FVIII aktivitás meghatározását, amit esetenként már a diagnózis érdekében is ki kell egészíteni a klasszifikációhoz szükséges tesztekkel, így a riztocetin aggregációval, a 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 jelezte a betegség fennállását. Egyes tanulmányokban közölt értékek ennél valamivel magasabbak, 65,5 %-os (40) és 59,1 %-os (34) szenzitivitás értékekről is beszámolnak. Az eltérések hátterében az eltérő beteganyag állhat.

Munkacsoportunk egyike volt annak a néhány laboratóriumnak, amelyek egyidőben kezdték (és közölték) az akkor még új thrombocyta funkciós analizátor, a PFA-100 készülék ilyenirányú tesztelését. Fressinaud és munkatársai 60 von Willebrand beteg esetében vizsgálták a PFA-100 záródási idő szűrőtesztként való alkalmazhatóságát (40). 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 (34). A kollagén/ADP patronnal mért záródási idő esetében Fressinaud és munkatársai 100 %-os szenzitivitást közöltek (40). Ezt a mi eredményeink nem támasztják alá. A mi beteganyagunk esetében ezzel a patronnal a szenzitivitás csak 74,2 % volt. Három betegünkénél, akiknek a vWF:Ag értéke 0,28 és 0,31 U/mL (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 (40). 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 (40) 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 (40) 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 betegeknek a PFA-100 záródási idők variabilitást mutatnak az aktuális vWF szintnek megfelelően.

Összegezve, az eredmények alapján megállapítható, hogy a PFA-100 záródási idő a vérzési időnél lényegesen érzékenyebb szűrőteszt a von Willebrand betegség diagnosztikájában. Eredményeinket azóta mások is megerősítették, ill. felhasználták, amit bizonyít az a mintegy 20 idézet melyben e munkánkra hivatkoznak. Mindezek alapján ajánlható, hogy von Willebrand betegség gyanúja esetén a PFA-100 záródási idő meghatározás része legyen a kivizsgálási panellnek. A vérzési időnél érzékenyebb volta elsősorban az enyhe ill. a közepes súlyosságú 1-es típusú betegek esetében szembetűnő. Ennél érzékenyebb szűrőteszt azóta sem áll rendelkezésre. A kollagén/adrenalin patron használatának eredményességét befolyásolhatja a széleskörűen alkalmazott ASA, melyre e patron igen érzékeny. Ezért a két patron együttes használata tekinthető a legmegfelelőbb eljárásnak. A teszt pozitivitása ráutaló klinikai tünetek esetén feltétlen indikációja a további részletes kivizsgálásnak. Tekintettel arra, hogy a szenzitivitás nem éri el a 100%-ot véleményünk szerint ráutaló klinikai tünetek és egyéb haemostasis rendellenesség kizárása után negatív eredmény esetén is el kell végezni a kivizsgálást. Annak eldöntésére, hogy a záródási idők alkalmasak-e a vérzékenység súlyosságának a megítélésére jelen vizsgálatok nem alkalmasak, de ezeknek nem is ez volt a célja. Mindenesetre, az eredmények alapján további ilyen irányú vizsgálatok indokoltnak látszanak, s a teszt feltehetően alkalmas a terápia hatékonyságának a megítélésére is. A desmopressin (DDAVP) fontos helyet foglal el az 1-es típusú von Willebrand betegek kezelésében. Több közlemény számol be arról, hogy DDAVP terápia hatására a betegeknek az eredetileg megnyúlt záródási idő csökken, így a PFA-100 záródási idő alkalmasnak tekinthető a DDAVP kezelés monitorozására (43, 44).

A thrombocyta aggregáció az elsődleges thrombocyta dugó kialakulásának fontos lépése, melyben a fibrinogén, mint plazma kofaktor, vagy magas nyíróaránynál a vWF a thrombocyta membrán glikoprotein IIb-IIIa (CD41-CD62) komplexhez (fibrinogén receptor) kötődve kapcsolja össze a thrombocytákat (45). A fibrinogén hiánya ill. kóros volta, valamint

az egyes fibrinogén receptor komponensek defektusa (Glanzmann thrombasthenia) egyaránt előidézhethet aggregációs zavart. A Glanzmann thrombasthenia tehát egy olyan haemorrhagiás diathesis, melyet az említett thrombocyta felületi membrán glikoproteinek veleszületett hiánya, számuknak jelentős csökkenése vagy kóros volta idéz elő (46). E betegség igen ritka, az irodalomban eddig kevesebb, mint 200 esetet, közülük hazánkban mindössze két esetet írtak le. Az öröklésmenet autoszomális recesszív. A klinikai tünetek elsősorban purpura, epistaxis, gingivalis haemorrhagia, menorrhagia, ritkábban gastrointestinalis vérzés és haematuria. Trauma vagy sebészi beavatkozások is súlyos vérzéssel járhatnak. Munkánk egyik részében egy újonnan felismert eset kapcsán ismertetjük a Glanzmann thrombasthenia laboratóriumi diagnosztikáját, ill. a PFA-100 záródási idők e betegben észlelt eltérését.

A beteg igen hosszú vérzési ideje normál thrombocyta szám mellett súlyos thrombocyta funkciós defektusra utalt, amit megerősített, hogy a PFA-100-al egyik patronnal sem észleltünk záródást. Az elvégzett lumiaggregációs vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az aggregáló ágensek leköttöttek a thrombocyta membránhoz és aktiválták az alakváltozáshoz szükséges biokémiai mechanizmusokat, aggregációt azonban nem tudtak indukálni. Azon ágensek (arachidonsav, trombin, nagy dózísú kollagén) esetében, amelyeknél az aggregáció nem játszik szerepet a szekréció indukálásában ill. elősegítésében, a szekréciót kiváltó biokémiai mechanizmusok is működésbe léptek, s trombin esetében közel normál ATP szekréció volt észlelhető, azaz sem a szekrécióhoz vezető biokémiai mechanizmusok, sem a denz testecskékben (δ -granulumokban) lévő ADP/ATP nem hiányzott. Tekintettel arra, hogy a beteg fibrinogén szintje normális volt, 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 bizonyítottan tekinthető. A Glanzmann thrombastheniának három típusa van (46). 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) (47, 48). Losonczy Gergely kollégám molekuláris genetikai és fehérje biokémiai vizsgálatai bizonyították, hogy itt I. típusú Glanzmann thrombastheniáról van szó.

A szakirodalom nyolc Glanzmann thrombastheniás beteg esetében végzett PFA-100 záródási idő meghatározásról számol be (34, 38, 40). Az eredmények, beleértve saját

eredményünket 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 (37, 40). Az öt beteg közül egynél csak a kollagén/adrenalin patronnal határozták meg a záródási időt, ami szignifikáns megnyúlást mutatott (37). A maradék négy betegnél egyik patronnal sem volt megfigyelhető záródás (40). A harmadik közleményben hat Hermansky-Pudlak syndromás beteg záródási idejeit határozták meg. Kollagén/adrenalin patronnal a záródási idő mindegyik beteg esetében megnyúlt, bár négy esetben az értékek éppen csak a referencia tartomány felett voltak (38). 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 vizsgálatainkban egyik Hermansky-Pudlak syndromás betegnek sem volt megnyúlt záródási ideje a kollagén/ADP patron alkalmazása során. Ennek magyarázata az lehet, hogy a Hermansky-Pudlak syndromás beteg thrombocytaiból hiányzik ugyan a denz granuláris ADP, de a thrombocyta 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 Hermansky-Pudlak syndromában kapott részben ellentmondó adatok abból is adódhatnak, hogy e megbetegedés sem genetikailag, sem fenotípusosan nem egységes. Jelenleg hét gént ismerünk, amelyek felelősek a Hermansky-Pudlak syndroma (HPS) létrejöttéért. A géneket ért defektusoknak megfelelően a syndromának 7 típusa van (HPS1-HPS7). Míg az oculocutan albinizmus és a vérzéses tünetek mind a hét típusban megjelennek, a tüdőfibrózis és a colitis elsősorban a HPS1-ben és a HPS3-ban jellemző (49, 50, 51). A végleges konklúzió levonásához nagyobb betegszámon történő további vizsgálatok szükségesek. Az eddigi eredmények mindenesetre arra utalnak, hogy a storage pool megbetegedés diagnosztikájában a PFA-100 záródási idő nem jobb szűrőteszt a vérzési időnél.

Munkánk során a készüléket először az ASA szedését követően kialakuló enyhe thrombocyta funkciós zavar detektálása szempontjából vizsgáltuk. Annak, hogy vizsgálatainkhoz ezt a rendszert választottuk az alábbi két oka volt: egyrészt egy enyhe

thrombocytá funkciók zavarán akartuk tesztelni a készülék érzékenységét, másrészt a vascularis thromboticus megbetegedések primer és secunder prevenciójában kiterjedten alkalmazzák az ASA-t (52), s egyre nagyobb az igény az ASA thrombocytákra kifejtett hatását adekvátan, gyorsan detektáló haemostasis diagnosztikai módszerre. Fel szeretnénk hívni a hazai laboratóriumi diagnosztikai és klinikai szakemberek figyelmét egy, a vizsgálatok idején újnak számító módszer ilyen irányú alkalmazására.

Az ASA a ciklooxygenáz enzim egy szerin reziduuma (Ser529) (53) acetilálva megakadályozza az arachidonsavból a ciklikus endoperoxidok képződését, ezáltal a thrombocytá aktivációban, mindenekelőtt a szekréción mechanizmusában alapvető szerepet játszó tromboxán A₂ (TXA₂) képződést (54). Az ASA rezisztencia kérdése és főleg annak diagnosztikai eszközökkel történő megállapítása ma is sokat vitatott kérdés, melyben a nemzetközi állásfoglalások sem adnak egyértelmű útmutatást. Megítélésünk szerint a 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. Ezen a betegcsoporton új, klinikai vizsgálatsorozatok megindításával a jövőben feltehetően érdekes megfigyeléseket fognak közölni a klinikai kutatók. Egy másik fontos kérdés, hogy a kémiai rezisztencia ellenére lehet-e hatékony az ASA terápia. Bár ezt a lehetőséget sem lehet teljesen kizárni, az ASA prevenció hatékonyságára a TXA₂ képződés gátlásán kívül nincs elfogadott magyarázat, s arra sincs meggyőző adat, hogy a TXA₂ képződés gátlásának bizonyított hiánya esetén egy adott betegcsoporton az ASA terápia hatékony volna.

Az ASA hatékonyságát vizsgáló laboratóriumi módszerek csak és kizárólag a kémiai rezisztencia felderítésére vállalkozhatnak, a terápiás rezisztencia felderítése e módszerektől indokolatlan elvárás. Az ASA antithrombocytá 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 (55).

Az ASA thrombocytá funkciót gátló hatásának követésére nem alkalmas az ASA (vagy a szalicilsav) direkt, plazmából történő kimutatása sem. 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 (56). A vérzési idő érzéketlensége és sorozat

vizsgálatokra való alkalmatlansága miatt szóba sem jöhet az ASA hatásának detektálására. A szekrécio egyidejű detektálása nélkül végzett aggregometriás vizsgálatok értékelése sok buktatót rejt magában. Az ADP aggregáció primer fázisa nem szekrécio függő, azaz a TXA₂ képződésének gátlása nem befolyásolja. Nem könnyű megkeresni (és értékelni) azt az ADP dózist melynél a primer és szekunder aggregáció elkülönítve értékelhető lenne. Egyébként is a szekunder aggregáció alacsony Ca²⁺ koncentrációnál (pl. citráttal antikoagulált plazmában) észlelhető artefaktum (57), aminek mérése elvileg sem adekvát egy gyógyszer hatékonyságának értékelésénél. Az adrenalin aggregáció az esetek egy részében egészséges egyéneken is vagy hiányzik vagy erősen csökkent. Az ASA hatása a kollagén aggregációra a kollagén koncentráció függvényében változik, s ez a változás nagyfokú egyéni érzékenységet mutat. Az aggregációs vizsgálatok közül még a legegyszerűbb eredményeket az arachidonsav aggregáció vizsgálata adja. Az aggregációnak az ATP szekrécioval történő együttes mérése (lumiaggregációs vizsgálatok) lényegesen megkönnyíti az eredmények értékelését, ez azonban drága műszert (és vegyszert) igénylő, időigényes, a komplex in vivo viszonyokat csak igen áttételesen tükröző, csak laboratóriumban elvégezhető vizsgálat. A PFA-100 záródási idő mérése gyors, a betegágy mellett is kivitelezhető, az in vivo körülményeket legjobban megközelítő vizsgálati módszer. Vizsgálataink, mások vizsgálataival megegyezően (34, 37, 56) azt igazolták, hogy a PFA-100-as készülék alkalmas az ASA hatás detektálására. Kétségtelen, hogy a PFA-100 használata ma már az e célra alkalmazott laboratóriumi tesztek közül előkelő helyet foglal el, nemzetközi ajánlásokban szerepel (58). Mindez azonban nem jelenti azt, hogy a kémiai ASA rezisztencia meghatározása megoldottnak tekinthető (59, 60) a PFA-100-as készülék alkalmazásával. Chakroun és mtsai közleményükben felhívják a figyelmet arra a tényre, hogy emelkedett von Willebrand faktor riztocetin kofaktor aktivitás esetében előfordulhat a záródási idő megnyúlás elmaradása arachidonsav aggregációval bizonyítottan hatékony ASA kezelést követően (61). Mindenképpen szükség lenne egy 100%-os érzékenységű akár körülményes izotóp jelöléses vagy tömegspektrometriás referencia módszerre, melynek az egyéb klinikai módszerekkel nagyszámú beteganyagban történő összehasonlítása megoldást adhatna a leghatékonyabb klinikai laboratóriumi módszer kiválasztására.

A thrombolyticus terápia az AMI egyik akut terápiás lehetősége (62). A thrombolyticus ágensek korai adása alacsonyabb mortalitást és a kamrai funkció megtartását eredményezi. A különböző plazminogén aktivátorok által okozott thrombolysisnek azonban korlátai is vannak (63, 64). 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 (62-66). Mind a vérzéses komplikáció mind a korai 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 (67, 68). 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 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 (68, 69). Ez idáig a standardizált vérzési idő, a thrombocytá rendszer szűrőtesztje 69 %-os szenzitivitással és 69%-os specificitással bizonyult a legjobb vizsgálati módnak a thrombolysis alatt bekövetkező spontán vérzések előrejelzésében (68, 70, 71). 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 (70, 71). 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 (72).

A vizsgálataink során a thrombolyticus terápiát megelőzően tapasztalt kollagén/ADP patronnal mért megnyúlt záródási idő thrombocytá funkció 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 (34, 56), ezért ennek a thrombolyticus terápia során bekövetkező megnyúlása az ASA-tól független thrombocytá funkció károsodásra utal. Az ASA-ra érzéketlen kollagén/ADP patron segítségével tehát 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 felvilágosítást ad az AMI kialakulását megelőzően alkalmazott preventív célú ASA terápia hatásosságáról. A kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő megnyúlás elmaradása az ASA hatástalanságára vagy a beteg nem megfelelő terápiás együttműködésére utal. A thrombolyticus terápiás protokoll magában foglalja az ASA adását is, ennek hatásossága a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő meghatározásával követhető. Bár a fibrinolyticus 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. Ez az adat is a thrombolysis alatt végzett PFA-100 vizsgálatoknak a fontosságára hívja fel a figyelmet.

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 thrombocyták funkció csökkent működésének a kimutatására hozták létre, nem pedig a thrombocyták aktiváció detektálására. Ez az oka annak, hogy a patronokban levő membrán thrombocyták 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 thrombocyták aktivációra vagy a thrombocyták aktiváló anyagokra bekövetkező emelkedett érzékenységre utalhat (73). Egy nagymértékben megnyúlt záródási idő (mint pl. a kollagén/adrenalin patronnal mért záródási idő ASA-t szedő reszponder betegekben) rövidülése az in vivo thrombocyták aktiváció érzékeny indikátora lehet.

Ma már egyértelműen elfogadott, hogy a thrombolyticus terápiának, ugyanúgy mint a plazminnak, kettős hatása van a thrombocytákra (67). A vérlemezkék aktuális válasza függ a kezelés időtartamától, az aktuális plazmin koncentrációtól és az egyéni variációktól. A thrombolysis során keletkező fibrin(ogén) degradációs produktumok (FDP) és a PAR1 trombin receptor plazmin által történő degradálása (74) gátolja a thrombocyták aggregációt, ami a thrombocyták funkció defektus elsődleges oka lehet. A vWF trombolysis alatt bekövetkező degradációja (75) szintén szerepet játszhat, a vWF receptor (GPIb-IX) proteolízise azonban úgy tűnik nem vesz részt ebben a folyamatban (76). Ugyanakkor a plazmin és a plazminogén aktivátorok a thrombocyták aggregációját, szekrécióját, a citoplazmatikus Ca^{2+} emelkedését, inozitol trifoszfát szintézisét és protein kináz C aktivációt

okozhatják (74, 77-81), s fokozzák a thrombocyták válaszát számos kis dózisú aggregáló anyagra (81). A plazmin ugyanott képes hasítani és aktiválni a trombin receptort, mint maga a trombin (74, 82), s így aktiválhatja a thrombocytákat. Továbbá a thrombocyta membrán GPIIb amino terminális végének limitált proteolízisével a GPIIb-IIIa komplexet aktív fibrinogén receptorrá transzformálja (83). Ezen komplex mechanizmusok összessége az egyéni válaszkészség függvényében a károsodott thrombocyta funkció révén vérzéses szövődményben vagy a fokozott thrombocyta aktiváció következtében reokklúzióban manifesztálódhat.

A thrombocyta funkció thrombolyticus terápia alatti monitorozása fontos információkkal szolgálhat a thrombocyták aktuális válaszáról. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a PFA-100 záródási idő mérése megfelelő módszer a thrombolyticus terápia során bekövetkező thrombocyta funkció defektus kimutatására. Valószínű, hogy a kollagén/ADP patronnal mért megnyúlt záródási idő háttérében álló thrombocyta 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 thrombocyta aktivációra utal, ami a reokklúzió fokozott veszélyét hordozhatja magában. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét PFA patron használatával a thrombolyticus terápia okozta károsodott thrombocyta 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 thrombocyta funkciós zavarok kimutatására, akár mint új típusú szűrőteszt, akár mint a hagyományos vizsgálatokat kiegészítő eljárás.

ÖSSZEFOGLALÁS

A thrombocyta funkciós zavarok in vivo szűrőtesztje a vérzési idő meghatározás, ami nem megfelelő érzékenységű, nehezen standardizálható és sorozatvizsgálatokra sem alkalmas. Ezen hátrányok kiküszöbölése céljából került forgalomba a PFA-100 thrombocyta funkció analizátor. 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 egyenletes áramlással egy thrombocyta 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 thrombocyta funkciós betegségek (vW betegség, Glanzmann thrombasthenia, HPS) és az ASA által előidézett szekréción zavar diagnosztikájában, továbbá a thrombolyticus terápia által előidézett thrombocyta 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 betegeknel 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 thrombocyta 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 thrombocyta funkciós zavarok kimutatására.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Lippincott, Philadelphia 1994.
2. Savage B, Salvidar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-97.
3. Goto S, Ikeda J, Salvidar E et al. Distinct mechanism of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Inv* 1998;101:479-86.
4. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997;89:3097-103
5. Furlan M, Robles R, Lamie B. Partial purification and characterization of protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-34.
6. Tsai HM. Von Willebrand Factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med* 2002;80:639-47.
7. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1994;71:520-5.
8. Michelson AD. Platelets. Academic Press, London 2002:283-9.
9. Harker LA, Slichter SJ. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* 1972;287:155-9.
10. Italian Working Group. Spectrum of von Willebrand's disease: A study of 100 cases. *Br J Haematol* 1977;35:101-112
11. Rodgers RPC, Levin J. A critical appraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Haemost* 1990;16:1-20.
12. Lind SE. The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 1991;77:2547-52.
13. De Caterina R, Lanza M, Manca G, Strata GB, Maffei S, Salvatore L. Bleeding time and bleeding: an analysis of the relationship of bleeding time test with parameters of surgical bleeding. *Blood* 1994;84:3363-70.
14. Kratzer MMA, Born GVR. Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis* 1985;15:357-62
15. von der Goltz V. U.S. Patent 5051239 1991
16. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RS, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyser - PFA-100. *Semin Thromb Haemost* 1995;21(Suppl 2):106-12.

17. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. Characterisation of an in vitro platelet function analyser, PFA-100. *Clin Appl Thromb Hemost* 1996;2:241-9.
18. Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ. The effect of antiplatelet drugs, heparin and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100), *Clin Appl Thromb Hemost* 1999;5:122-30.
19. Hézard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droulle C, Elaerts J, Potron G, Nguyen P. Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of cE3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. *Thromb Haemost* 2000;83:540-4.
20. O'Brien JR, Salmon GP. Shear stress activation of platelet glycoprotein IIb/IIIa plus von Willebrand factor causes aggregation: filter blockage and the long term bleeding time in von Willebrand's disease. *Blood* 1987;70:1354-61.
21. Schlammadinger Á, Kerényi A, Muszbek L, Boda Z. Comparison of O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyzer in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Thromb Haemost* 2000;84:88-89.
22. D. Varon, I. Lashevski, B. Brenner, R. Beyar, N. Lanir, I. Tamarin, N. Savion. Cone and Plate(let) Analyzer: Monitoring glycoprotein IIb-IIIa antagonists and von Willebrand disease replacement therapy by testing platelet deposition under flow conditions. *Am. Heart J.* 135: S187-S193, 1998.
23. D. Varon, R. Dardik, B. Shenkman, S. Kotev-Emeth, N. Farzame, I. Tamarin, N. Savion. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb. Res.* 85: 283-294, 1997
24. M. Szarvas, P. Oparaugo, M. L. Udvardy, J. Tóth, T. Szántó, L. Daróczy, Gy. Vereb and J Hársfalvi. Differential platelet deposition onto collagen in cone-and-plate and parallel plate flow chambers. 2005. közlésre elfogadva.
25. Furlogand BL, Peake IR. An electroblotting technique for the detection of factor VIII / von Willebrand factor multimers in plasma. *Br J Haematol* 1983;53:641-53.
26. Ruggeri ZM, Zimmermann TS. Variant von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 1980;65:1318-25
27. Ruggeri ZM, Zimmermann TS. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood* 1981;57:1140-3

28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4
29. Pap Z, Ajzner É, Kiss Cs, Emődy J, Závodszy I, Horváth A, Muszbek L. Thrombocytá funkció zavar albinó gyermekekben. *Orvosi Hetilap* 1997;8:467-71
30. Holmsen H, Storm E, Day HJ. Determination of ATP and ADP in blood platelets: A modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972;46:489-501.
31. Lorez HP, Da Prada M, Rendu F, Pletscher A. Mepacrine, a tool for investigating the 5-hydroxytryptamine organelles of blood platelets by fluorescence microscopy. *J Lab Clin Med* 1977;89:200-6.
32. Heilman EJ, Kundu SK, Sio R, Garcia C, Gomez R, Christie DJ. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system. *Thromb Res* 1997;87:159-64.
33. Boda Z, Rák K. Athrombia essentialis: az elsődleges thrombocytá aggregáció zavara. *Orv Hetil* 1983;124:435-7.
34. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ. PFA-100 system: A new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:195-202.
35. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of Aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2000;83:316-21.
36. Roller RE, Dorr A, Ulrich S, Pilger E. Effect of Aspirin treatment in patients with peripheral arterial disease monitored with the platelet function analyzer PFA-100. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:277-81.
37. Kundu SK, Sio R, Mitu A, Ostgaard RA. Evaluation of platelet function by PFA-100. *Clin Chem* 1994;40:1827-8.
38. Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, Savidge GF, Pasi J, Machin SJ. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coag Fibrinol* 1999;10:25-31.
39. Carcao MD, Blanchette VS, Dean JA, He L, Kern MA, Stain AM, Sparling CR, Stephens D, Ryan G, Freedman J, Rand ML. The platelet function analyzer (PFA-100): a novel in-vitro system for evaluation of primary haemostasis in children. *Br J Haematol* 1998;101:70-3.

40. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. Screening for von Willebrand disease with a new analyser using high shear stress: A study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-31.
41. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, Montgomery RR. The effect of AB0 blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691-5
42. Percy ME, Rusk AC, Garvey MB, et al. Carrier detection in hemostasis of logistic discrimination. *Am J Med Genet* 1998;31:871-9.
43. Favaloro EJ, Kershaw G, Bukuya M, Hertzberg M, Koutts J. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder (vWD) and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100 and vWF:CBA as combined diagnosis strategies. *Haemophilia* 2001;7:180-9.
44. Franchini M. The platelet function analyzer (PFA-100): an update on its clinical use. *Clin Lab* 2005;51:367-72.
45. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice.* Lippincott, Philadelphia 1994;508-23.
46. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice.* Lippincott, Philadelphia 1994;652-72.
47. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. *Blood* 1990;75:1383-1395.
48. Tuddenham EGD, Cooper DN. *The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders.* Oxford University Press, New York 1994;410-420.
49. Tomita Y, Suzuki T. Genetics of pigmentary disorders. *Am J Med Genet* 2004;131C:75-81.
50. Garrison NA, Yi Z, Cohen-Barak O, Huizing M, Hartnell LM, Gahl WA, Brilliant MH. P gene mutations in patients with oculocutaneous albinism and findings suggestive of Hermansky-Pudlak syndrome. *J Med Genet* 2004;41:86-9.
51. Huising M, Hess R, Dorward H, Claassen DA, Helip-Wooley A, Kleta R, Kaiser-Kupfer MI, White JG, Gahl WA. Cellular, molecular and clinical characterization of patients with Hermansky-Pudlak syndrome type 5. *Traffic* 2004;5:711-722.
52. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice.* Lippincott, Philadelphia 1994;1379-95.
53. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 2004;126:234S-64.
54. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice.* Lippincott, Philadelphia 1994;590-602.

55. Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR et al. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 1993;24:345-9.
56. Bohner J, von Pape KW, Wiebersinsky W, Aland E, Wuttke M, Dölp R. Serial assessment of platelet function with the PFA-100 test system following a single 300 mg dose of acetylsalicylic acid. *Clin Lab* 1997;43:673-5.
57. Mustard JF, Perry DW, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA. Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol.* 1975;228:1757-65.
58. Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao K. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin resistance. *Tromb Haemost* 2005;3:1309-11.
59. Campbell CL, Steinhubl SR. Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance? *Thromb Haemost* 2005;3:665-9.
60. Eikelboom JW, Hankey GJ. Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events? *J Am Cardiol Coll* 2003;41:966-8.
61. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, Lecrubier C, Samama MM, Hatmi M, Elalamy I: In vitro aspirinresistance detected by PFA-100TM closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *British J Haematol* 2004;124:80-5.
62. Collen D. Thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 1997;78:742–6.
63. Marzilli M. From the experimental myocardial infarction to the clinical acute myocardial infarction: limitations of thrombolytic therapy. *Intern J Cardiol* 1995;49:S71–5.
64. Fox KA. Have we reached the limit with thrombolytic therapy? *Cardiovasc Drugs Ther* 1999;13:211–6.
65. Rao AK, Pratt C, Berke A, Jaffe A, Ockene I, Schreiber TL, Bell WR, Knatterud G, Robertson TL, Terrin ML. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial– phase I: hemorrhagic manifestations and changes in plasma fibrinogen and the fibrinolytic system in patients treated with recombinant tissue plasminogen activator and streptokinase. *J Am Cardiol Coll* 1998;11:1–11.
66. Gore JM, Sloan M, Price TR, Randall AM, Bovill E, Collen D, Forman S, Knatterud GL, Sopko G, Terrin ML. Intracerebral haemorrhage, cerebral infarction, and subdural hematoma after acute myocardial infarction and thrombolytic therapy in the thrombolysis in myocardial infarction study. *Circulation* 1991;83:448–59.
67. Coller BS. Platelets and thrombolytic therapy. *N Eng J Med* 1990;322:33–42.

68. Hirsch DR, Goldhaber SZ. The bleeding time: Its potential utility among patient receiving thrombolytic therapy. *Am Heart J* 1990;119:160–7.
69. Marder VJ. Relevance of changes in blood fibrinolytic parameters during thrombolytic therapy. *Am J Med* 1987;83:15–9.
70. Gimple LW, Gold HK, Leinbach RC, Collier BS, Werner W, Yasuda T, Johns JA, Ziskind AA, Finkelstein D, Collen DC. Correlation between template bleeding times and spontaneous bleeding during treatment of acute myocardial infarction with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 1989;80:581–8.
71. Hirsch DR, Goldhaber SZ. Bleeding time and other laboratory tests to monitor the safety and efficiency of thrombolytic therapy. *Chest* 1990;97:124S–31S.
72. Nordt TK, Moser M, Kohler B, Ruef J, Peter K, Kübler W, Bobe C. Augmented platelet aggregation as predictor of reocclusion after thrombolysis in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998;80:881–6.
73. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:1392-7.
74. Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* 1999;38:4572-85.
75. Adelman B, Michelson AD, Loscalzo J, Greenberg J, Handin RI. Plasmin effect on platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions. *Blood* 1985;65:32-40.
76. Winters KJ, Eisberg PR, Jaffe AS, Santoro SA. Dependence of plasmin-mediated degradation of platelet adhesive receptors on temperature and Ca^{2+} . *Blood* 1990;76:1546-57.
77. Niewiarowski S, Senyi AF, Gilles P. Plasmin-induced platelet aggregation and platelet release reaction. Effect on haemostasis. *J Clin Invest* 1973;52:1647-59.
78. Schafer AI, Mass AK, Ware JA, Johnson PC, Rittenhouse SE, Salzman EW. Platelet protein phosphorylation, elevation of cytosolic calcium, and inositol phospholipid breakdown in platelet activation induced by plasmin. *J Clin Invest* 1986;78:73-9.
79. Guccione MA, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Harfenist EJ, Rand ML, Greenberg JP, Perry DW, Mustard JF. Effect of plasmin on rabbit platelets. *Thromb Haemost* 1985;53:8-14.

80. Penny WF, Ware JA. Platelet activation and subsequent inhibition by plasmin and recombinant tissue-type plasminogen activator. *Blood* 1992;79:91-8.
81. Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA. Pretreatment of human platelets with plasmin inhibits responses to thrombin, but potentiates responses to low concentrations of aggregating agents, including the thrombin receptor activating peptide, SFLLRN. *Thromb Haemost* 1997;77:741-7.
82. Vouret-Craviari V, Grall D, Chambard J-C, Rasmussen UB, Pouysségur J, Van Obberghen-Schilling E. Post-translational and activation-dependent modification of the G protein-coupled thrombin receptor. *J Biol Chem* 1995;270:8367-72.
83. Rabhi-Sabile S, Pidard D. Exposure of human platelets to plasmin results in the expression of irreversibly active fibrinogen receptors. *Thromb Haemost* 1995;73:693-701.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Kerényi A**, Muszbek L. Az Aspirin hatás tesztelése PFA-100-al, egy új thrombocytá 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.

Az értekezéshez fel nem használt 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, Schlamadinger 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. Természetes anticoaguláns fehérjék aktivitásának vizsgálata akut isvhaemiás strokeban. *Ideggyogy Sz* 2005;58:33-9.