

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Az aszpirin trombocita ciklooxygenáz-1-re kifejtett  
hatásának kimutatása**

**Dr. Kovács Emese Gyöngyvér**

**Debreceni Egyetem  
Laki Kálmán Doktori Iskola  
Debrecen  
2014**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Az aszpirin trombocita ciklooxygenáz-1-re kifejtett hatásának kimutatása**

**Dr. Kovács Emese Gyöngyvér**

**Témavezető:**

**Prof. Dr. Muszbek László**  
**akadémikus**



**Debreceni Egyetem**  
**Laki Kálmán Doktori Iskola**  
**Debrecen**  
**2014**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                        | 2  |
| SUMMARY .....                                                                                              | 4  |
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....                                                                                  | 6  |
| BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                                      | 7  |
| CÉLKITŰZÉSEK .....                                                                                         | 15 |
| ANYAG ÉS MÓDSZER.....                                                                                      | 16 |
| 1. Vizsgált populáció, beválasztási és kizárási kritériumok .....                                          | 16 |
| 2. Az aszpirin kezelés és a mintagyűjtés protokollja .....                                                 | 16 |
| 3. Monoklonális antitestek generálása a COX-1 nem acetilált és acetilált formái ellen .....                | 17 |
| 4. Az acetilált és nem acetilált COX-1 kimutatása trombocita lizátumban Western blottinggal .....          | 19 |
| 5. Módosított TXB <sub>2</sub> assay a trombociták AA-indukálta TXB <sub>2</sub> -képzésének mérésére..... | 20 |
| 6. A trombocita funkció vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel .....                                  | 22 |
| 7. Statisztikai analízis .....                                                                             | 30 |
| EREDMÉNYEK .....                                                                                           | 31 |
| 1. A vizsgált populáció jellemzői .....                                                                    | 31 |
| 2. Az aszpirin terápia hatása az AA-indukált trombocita TXB <sub>2</sub> -képzésre .....                   | 31 |
| 3. A trombocita COX-1 acetiláció egy hetes aszpirin terápia során.....                                     | 32 |
| 4. Az aszpirin hatás vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel .....                                     | 35 |
| 4.1. A PFA-100 CEPI záródási idők- és a VN Aspirin Assay eredményeinek értékelése .....                    | 35 |
| 4.2. A trombocita aggregációs- és szekréciós vizsgálatok eredményeinek értékelése .....                    | 38 |
| MEGBESZÉLÉS.....                                                                                           | 41 |
| IRODALOMJEGYZÉK.....                                                                                       | 46 |
| AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK .....                                                           | 51 |
| TÁRGYSZAVAK.....                                                                                           | 52 |
| KEYWORDS .....                                                                                             | 52 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....                                                                                   | 53 |
| FÜGGELÉK.....                                                                                              | 54 |

## ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

A második módszer arachidonsav indukciót követően trombociták által képzett tromboxán  $A_2$  inaktív, stabil metabolitjának, a tromboxán  $B_2$ -nek a mennyiségét méri trombocita dús plazmában. Ez a módszer a trombociták tromboxán  $B_2$  képző kapacitását határozza meg és közvetetten jelzi az aszpirin által előidézett ciklooxygenáz-1 gátlást.

A két referencia módszerrel 108 kis dózisú aszpirt szedő egészséges önkéntesen vizsgáltuk az aszpirin hatást. Az önkénteseket egy hétig napi egy alkalommal 100 mg enteroszolvens bevonatos aszpirrrel kezeltük. A vérmintákat az első aszpirin bevétele előtt, azt követően 24 órával ill. 168 órával nyertük (0. napos, 1. napos és 7. napos minták). Az aszpirin kezelés elkezdését követő 7. napon nyert valamennyi mintában a trombocita ciklooxygenáz-1 teljes acetilációját figyeltük meg, míg a kiindulási (0. napos) mintákban csak nem acetilált ciklooxygenáz-1 volt jelen. Ennek megfelelően a 7. napon a trombociták

tromboxán B<sub>2</sub> képző kapacitásának teljes gátlását tapasztaltuk, azaz a 108 önkéntes közül egy sem volt rezisztens az aszpirin hatására.

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

Az új, általunk kidolgozott referencia módszerekkel kapott eredmények azt bizonyítják, hogy egészséges populációban a kémiai ("valós") aszpirin rezisztencia, ha egyáltalán létezik, ritkaságnak számít. Véleményünk szerint, csak az acetilált- és nem acetilált ciklooxygenáz-1-et egyértelműen elkülönítő referencia módszerek által validált arachidonsav agonistát használó módszerek alkalmasak az aszpirin trombocita gátló hatásának megítélésére.

## SUMMARY

Low dose aspirin therapy is widely used in the prevention of acute atherothrombotic complications. It irreversibly acetylates the Ser529 residue in cyclooxygenase-1 and prevents thromboxane A<sub>2</sub> formation from arachidonic acid in platelets.

Laboratory methods currently used to detect this antiplatelet effect of aspirin provide variable results. Comparison with reference method(s) is required to validate these routinely used methods. As aspirin is ineffective in preventing acute vascular events in some patients, and some of the routine laboratory methods give inconsequent results the term "aspirin resistance" was introduced. This term has not been unequivocally defined creating difficulties in the interpretation of results and also in setting up recommendations for the treatment of patients.

We developed two novel reference methods that directly and indirectly assess the acetylation of platelet cyclooxygenase-1 by aspirin. The first direct method uses two monoclonal anti-human-cyclooxygenase-1 antibodies one of which only detects acetylated (inactivated) cyclooxygenase-1, while the other only reacts with active (non-acetylated) cyclooxygenase-1. The antibodies were raised against acetylated and non-acetylated nonapeptides corresponding to the amino acid sequence of human cyclooxygenase-1 525-533 residues. Using Western blotting technique the antibodies clearly distinguished between acetylated and non-acetylated cyclooxygenase-1 in platelet lysate.

The second method measures the arachidonic acid-induced formation of thromboxane B<sub>2</sub>, the inactive, stable metabolite of thromboxane A<sub>2</sub> in vitro in platelet rich plasma. This method determines the thromboxane B<sub>2</sub> producing capability of platelets and indirectly detects the inhibition of cyclooxygenase-1 by aspirin.

Using the aforementioned methods we analyzed the effect of aspirin among 108 healthy volunteers. The volunteers involved in the study received daily 100 mg enteric-coated aspirin for one week. Blood samples were collected before, 24 hours and 168 hours after the first dose of aspirin (day 0, day 1 and day 7 samples). In all samples obtained on day 7 following the initiation of aspirin treatment cyclooxygenase-1 in the platelets was fully acetylated whereas only non-acetylated cyclooxygenase-1 was present in the day 0 platelets. Further, thromboxane B<sub>2</sub> production by day 7 of platelets was completely blocked, i.e. none of the 108 healthy individuals was resistant to the effect of aspirin.

The results obtained with the reference methods on the healthy individuals were compared to the results of the following, in the clinical practice generally used routine laboratory tests for the determination of aspirin's effect: PFA-100 closure time with collagen/epinephrine cartridge, VerifyNow Aspirin Assay, platelet aggregation and ATP secretion using arachidonic acid, ADP, epinephrine and collagen as agonists.

Comparing the pre-treatment and day 7 values with the results obtained with the reference methods, laboratory tests that use arachidonic acid as platelet agonist (arachidonic acid-induced platelet aggregation/secretion and VerifyNow Aspirin Assay) showed high discriminative power. In contrast, results obtained on day 7 and day 0 by the other tests showed considerable overlap, i.e., they demonstrated false positive aspirin resistance in a part of the cases.

Our results obtained with the newly developed reference methods prove that chemical ("true") aspirin resistance, if it exists, must be a rarity among healthy individuals. In our opinion, only assays that use arachidonic acid as agonist are useful for establishing the antiplatelet effect of aspirin.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                    |                                                                       |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| AA:                | arachidonsav                                                          |
| acCOX-1:           | acetilált ciklooxygenáz-1 enzim                                       |
| anti-acCOX-1:      | az acetilált COX-1- re specifikus monoklonális antitest               |
| anti-nacCOX-1:     | a nem acetilált COX-1-re specifikus monoklonális antitest             |
| ARU:               | Aspirin Reaction Unit                                                 |
| BCA protein assay: | bichinchoninic sav (bichinchoninic acid) protein assay                |
| BSA:               | bovin szérum albumin                                                  |
| CEPI:              | PFA-100 kollagén/epinefrines patron                                   |
| CV:                | variációs koefficiens                                                 |
| COX-1:             | ciklooxygenáz-1 enzim                                                 |
| COX-2:             | ciklooxygenáz-2 enzim                                                 |
| $\Delta T\%$ :     | transzmisszió változás százaléka                                      |
| IQR:               | interkvartilis tartomány                                              |
| KLH:               | óriás lyukas csigából kinyert hemocianin (keyhole limpet hemocyanine) |
| LL:                | luciferin-luciferáz reagens                                           |
| nacCOX-1:          | nem acetilált ciklooxygenáz-1 enzim                                   |
| PBS:               | foszfát puffer (phosphate-buffered saline)                            |
| PDP:               | trombocita depletált plazma                                           |
| PGI <sub>2</sub> : | prosztaciklin                                                         |
| PLA <sub>2</sub> : | foszfolipáz A <sub>2</sub>                                            |
| PRP:               | trombocita dús plazma                                                 |
| SD:                | standard deviáció                                                     |
| SDS-PAGE:          | nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézis              |
| TMB:               | 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin szubsztrát                              |
| TXA <sub>2</sub> : | tromboxán A <sub>2</sub>                                              |
| TXB <sub>2</sub> : | tromboxán B <sub>2</sub>                                              |
| VN Aspirin Assay:  | VerifyNow <sup>®</sup> Aspirin Assay                                  |

## BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A trombociták a megakariociták főként trombopoetin által szabályozott proliferációját és differenciációját követően azok citoplazmájából fűződnek le. Nyugalmi állapotban átmérőjük 2-4  $\mu\text{m}$ , granulumokat ( $\alpha$ , denz és lizoszómák), mitokondriumot, felülettel közlekedő csatorna rendszert és denz tubuláris rendszert tartalmaznak [1]. A trombocita DNS genommal nem, csak némi megakariocita eredetű mRNS-el és a fehérje szintézishez szükséges transzlációs apparátussal rendelkezik, ami csak igen limitált mértékű fehérje szintézishez elegendő [2]. A trombociták normál esetben a keringésben  $150-400 \times 10^9/\text{L}$  koncentrációban találhatók meg, életidejük 7-10 nap [1].

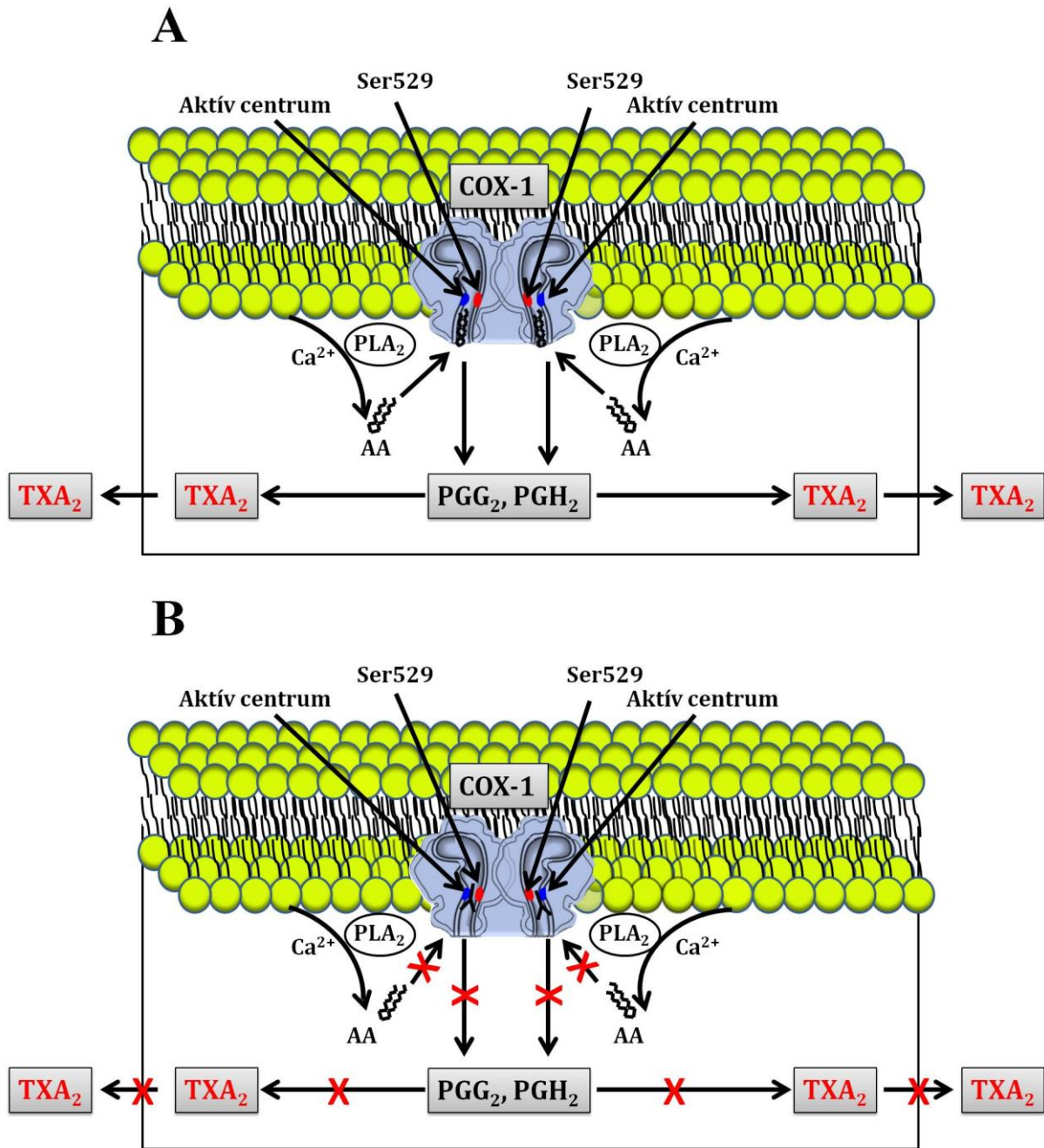
Elsődleges feladatuk a primér hemosztázis biztosítása szöveti traumát vagy érfal sérülést követően. Érfal sérülést megelőzően a trombocitákat a prosztaciklin, az endotél sejtek által termelt nitrogén monoxid és az endotél sejtek felszínén lévő CD39 ADP-áz tartja nyugalmi állapotban. Az érfal sérülés helyszínén a vérzés megállítását célzó trombocita dugó kialakulását a szubendoteliális mátrix hirtelen szabaddá váló kollagénje és a lokális trombin generáció indítja el. A trombociták a kollagénnel és a von Willebrand faktorral kölcsönhatásba lépve aktiválódnak és egy elsődleges fedőréteget képeznek, majd az általuk szekretált  $\text{TXA}_2$ , ADP és más vérlemezke agonisták hatására, melyek többsége a trombocita felszínén megtalálható - G proteinhez kapcsolt - receptorok ligandja, a trombociták aktiválódnak. Az aktiváció során a trombociták felszínén a glikoprotein IIb-IIIa komplex konformáció változása révén kialakul a fibrinogén receptor. A fedő trombocita réteghez fibrinogénnel keresztül további trombociták kapcsolódnak. Végül a növekedő hemosztatikus dugóban a véralvadás során képződött keresztkötött fibrinháló stabilizálja a trombocita aggregátumot [1].

Patológias körülmények között a trombocita aggregáció/aktiváció szerepet játszik a koszorúér betegség, a stroke, a perifériás artériás érbetegség ischaemiás komplikációinak patomechanizmusában [1]. Bár a vérlemezkek adhéziója az erodált vagy megrepedő ateromás plakkot elfedő válasznak is tekinthető, az ezt követő trombus képződés, átmeneti ischaemiához vagy infarctushoz, s ezen keresztül súlyos szervkárosodáshoz vezethet [3].

A trombocita funkcióban kiemelt jelentőségű a telítetlen 20 szénatomos zsírsav származék családba tartozó eikozanoidok szintézise. Az eikozanoidok jelentős képviselője a trombociták által a denz vagy az  $\alpha$  granulumokban nem tárolt és mindig újonnan képzett tromboxán  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), mely kifejezetten erős vazokonstriktor [4] és vérlemezke aktivátor,

elősegíti a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációját és atherogén hatással bír [5]. A trombocita TXA<sub>2</sub> receptort aktiválva irreverzibilis trombocita aggregációt indukál és felerősíti a vérlemezkék különböző agonistákra adott válaszreakcióját [6-8].

A trombocita TXA<sub>2</sub> képzés első lépésében a trombocitát aktiváló agonisták hatására felszabaduló Ca<sup>2+</sup> által aktivált foszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a membrán foszfolipidekből arachidonsavat (AA) szabadít fel. Az AA-at a prosztaglandin-H-szintáz-1 alakítja ciklikus endoperoxidokká (1A ábra és 2. ábra). A prosztaglandin-H-szintáz-1, a mieloperoxidáz család hemoproteinje, kétféle enzimatisz aktivitással is rendelkezik. A ciklooxygenáz (COX) aktivitás az AA-ból prosztaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)-t képez, melyet az enzim peroxidáz aktivitása prosztaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)-vé alakít. Ez az arachidonsav lehasadásától a PGH<sub>2</sub>-ig terjedő folyamat számos sejtben végbemegy, majd a különböző szövetekben, sejtekben specifikus izomerázok PGH<sub>2</sub>-ből prosztanoidokat: PGD<sub>2</sub>-t, PGE<sub>2</sub>-t, PGF<sub>2α</sub>-t, prosztaciklint (PGI<sub>2</sub>), ill. TXA<sub>2</sub>-t képeznek. A trombocitákban ez a specifikus izomeráz, a tromboxán szintetáz felelős a TXA<sub>2</sub> képződésért.



1. ábra. (A) A trombocita  $\text{TXA}_2$  képzés sémás ábrázolása. A COX-1 homodimer katalitikus üregében egymás közelében helyezkedik el az aktív centrum és az aszpirin hatásmechanizmusa szempontjából jelentős 529-es szerin reziduum (Ser529). (B) A COX-1 Ser529 acetiláció következményeinek sémás ábrázolása. Az aszpirin a COX-1 Ser529 acetilációja által megakadályozza az aktív centrum elérhetőségét az AA által.



**2. ábra. A COX-1 és az AA komplexének szerkezete.** A UCSF Chimera programcsomag 1.7-es szoftverével készült ábrán a helikális szerkezeti elemeket narancs, a  $\beta$ -szalagokat lila színnel jelöltük. A proteint három domén alkotja: N-terminális EGF (Epidermal Growth Factor)-szerű-domén (az ábrán jobbra lent), a membránhoz kötődésért felelős helikális szerkezeti elemekből álló domén (az ábra alsó részén) és egy nagy C-terminális katalitikus domén. A fekete pálcika modellel ábrázolt arachidonsav molekula felületét áttetsző fekete színnel jelöltük. A Ser529 aminosav zölddel jelölve az arachidonsavat kötő üreg mellett látható.

Gerincesekben a proszttaglandin-H-szintáz enzimnek ismert egy második izoformája is, a proszttaglandin-H-szintáz-2 vagy COX-2. A COX izoenzimek aminosav szekvenciája kb. 60%-ban egyezik meg [8]. Mindkettő membránhoz kötött homodimer, alegységeinek tömege kb. 70 kDa. A COX-1 a konstitutív PGH<sub>2</sub> képzésért felelős [8-10], míg a COX-2 expressziót elsősorban különféle patológiás folyamatok indukálják [11], melyek közt jelentős szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok.

Az aszpirin vagy acetilszalicilsav a gyógyászatban az egyik elsőként használt szintetikus vegyület, 1899 júniusában került a gyógyszerpiacra, hosszú ideig lázcsillapító, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatásai miatt került alkalmazásra. Az aszpirin jótékony hatása aterotrombotikus betegségek akut komplikációinak a megelőzésében a 20. század közepétől ismert [12-14]. Azóta a kis dózisú, napi 75-100-mg-os aszpirin terápia az akut miokardiális infarktus vagy stroke prevenciójának alapeleme lett [15-19].

Különböző nagy esetszámú tanulmányokat elemző metaanalízisek alapján a preventív aszpirin terápia fokozott rizikójú betegcsoporton a vaszkuláris halál és a nem fatális vaszkuláris események kialakulásának előfordulását 15% ill. 30%-al csökkenti [15-19]. Ezen belül az aszpirin hatására a nem fatális miokardiális infarktus kialakulásának gyakorisága 34%-kal, a nem fatális stroke 25%-kal és a vaszkuláris vagy ismeretlen eredetű halál gyakorisága egyhatodával csökken. Azon betegek esetében, akiknél a vérzéses rizikó más okok miatt nem fokozott, a vérzéses szövődmények kialakulásának marginális emelkedésének negatív hatását a kedvező protektív hatás szignifikánsan felülmúlja [15, 17, 20].

Az akut vaszkuláris események kialakulásának primér prevencióját elemző metaanalízis szerint a kis dózisú aszpirin alkalmazása manifeszt vaszkuláris megbetegedés hiányában csökkenti a vaszkuláris események előfordulását, de az abszolút rizikó csökkenés lényegesen kisebb, mint szekunder prevencióban [18].

A kis dózisú aszpirin terápia fent részletezett kedvező hatásának mechanizmusa intenzív kutatás tárgyát képezte. Ma már egyértelmű, hogy ez a hatás az aszpirin trombocita gátló szerepének tulajdonítható, mely a trombocita COX-1 gátlásával, az enzim 529-es szerin (Ser529) reziduumának acetilációja által valósul meg [8, 16, 21] (1B ábra). Emellett az aszpirin nagyobb dózisban a gyulladásos citokinek [22] és a szabad oxigén gyökök [23] felszabadulásának mértékét is csökkenti.

Az aszpirin a sejtmembránon keresztül a trombocitába diffundál, ezt követően a denz tubuláris rendszer membránjában lévő COX-1 szűk, alapvetően hidrofób csatornájába jut, mely az enzim katalitikus üregéhez vezet (1B ábra). Feltehetőleg először az Arg120-hoz kapcsolódik, mely közös dokkoló site a nem-szteroid gyulladáscsökkentő szerek számára,

majd a COX-1 aktív site üreg falában elhelyezkedő Ser529-et kovalensen módosítja. Az átészterezési reakció során az in silico vizsgálatok szerint a Ser529-H $\gamma$  - ASA karboxil-csoport oxigénje közötti kötés kialakulása párhuzamosan történik a Ser529-O $\gamma$ - ASA C (acetilszalicilsav karbonil) kötés kialakulásával [24]. Az acetiláció megakadályozza, hogy az AA elérje az aktív centrumot, azaz megghiúsítja a TXA<sub>2</sub> képzést (1B ábra). A gátlás irreverzibilis és kiterjed a trombocita teljes élettartamára.

Az indukálható ciklooxygenáz-2 enzim (COX-2) Ser516 oldalláncának hasonló mértékű acetilációjához a COX-1 acetilációhoz viszonyítva 10-100x-os acetilszalicilsav koncentráció szükséges. Ennek valószínű oka az, hogy a COX-2 nagyobb katalitikus üregében a Ser516 és az ASA relatív orientációja kevésbé segíti elő az acetilációt [21, 25].

Az acetilszalicilsav gyorsan szívódik fel a gyomor és a vékonybél felső szakaszának nyálkahártyáján keresztül. A bevonatmentes aspirin a plazmában 20 perccel a bevételt követően detektálható, csúcskoncentrációját 30-40 perc múlva éri el [3]. Az enteroszolvens bevonatos készítmények esetében ez csak 3-4 órával a bevételt követően várható [26]. A hagyományos aspirin szisztémás biológiai hozzáférhetősége körülbelül 40-50%-os, melytől független a COX-1 gátlás hatásfoka, ugyanis a szalicilsav már a portális keringésben találkozhat a vérlemezkékkel ahol a trombociták a szisztémás keringésre jellemző koncentrációnál lényegesen magasabb gyógyszer szintnek vannak kitéve [26]. Az aspirin féléletideje a plazmában 15-20 perc [16]. A trombocita TXA<sub>2</sub> képzés és a trombocita aggregáció gátlás szempontjából, krónikus aspirin terápia esetén, az enteroszolvens bevonatos és a hagyományos készítmények egyformán hatékonyak [27].

Napi 30 mg aspirin adagolása egy hét után a trombocita TXA<sub>2</sub> képzés szérumban mért teljes szupresszióját okozza [28], mely kumulatív alakul ki [29]. A kis dózisú aspirin kezelés során alkalmazott napi 75-100 mg-os dózis meghaladja a teljes farmakodinámiás hatáshoz szükséges minimálisan hatékony dózist, a gyógyszerre adott válaszreakciót tekintve bizonyos fokú interindividuális variabilitást is engedélyezve [16]. A keringésből való gyors kiválasztódása ellenére, az aspirin gátló hatása a vérlemezke egész élettartamára kiterjed a COX-1 irreverzibilis inaktivációjának következtében. A trombociták nem tudnak COX-1-et szintetizálni, tehát az aspirin hatását csak a vérlemezkék újraképzésével lehet megfordítani [30].

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

eredmények értelmezését és a terápiás javaslatok kialakítását. A korábbiakban számos tanulmányban vizsgálták az aszpirin rezisztencia előfordulásának gyakoriságát és a kapott eredmények széles tartományban, 5-66%-ig szórtak [31-33].

Az "aszpirin rezisztencia" fogalmát elvileg négyféleképpen is meghatározhatjuk:

- 1.) Kémiai (valós) aszpirin rezisztencia: trombocitákban lévő COX-1 enzim 529-es szerinje nem acetilálható aszpirinnel.
- 2.) Laboratóriumi „aszpirin rezisztencia”: az aszpirinre adott csökkent válasz egy adott laboratóriumi teszttel mérve.
- 3.) Bizonyos esetekben a fokozott trombocita turnover miatt a fiatal és még nem acetilált trombociták képződésének és keringésbe való felszabadulásának folyamata felgyorsul [34-36].
- 4.) Klinikai "aszpirin rezisztencia" (klinikai hatástalanság): az aszpirin nem védte meg a beteget egy bekövetkezett akut vaszkuláris eseménytől.

A fokozott trombocita turnover, bár klinikailag lehet jelentős, nem értelmezhető "aszpirin rezisztencia" jelenséggént, ugyanis a dozírozás gyakoriságának változtatásával az acetilszalicilsavra adott válasz mértéke megnövelhető [37]. A klinikai hatástalanság egyedileg csak retrospektíve állapítható meg, a hatástalanság populációs szinten történő értékeléséhez pedig statisztikai feldolgozás szükséges. Az akut aterotrombotikus események megelőzésének sikertelensége nem feltétlenül a COX-1 acetiláció hiányának tulajdonítható, ugyanis az aszpirin az AA-nál erősebb trombocita agonisták, mint pl. a nagy dózisú kollagén vagy trombin által kiváltott trombocita aktiváció gátlására nem képes. Természetesen iszkémiás vaszkuláris esemény nem aterotrombotikus mechanizmussal is kialakulhat, pl. embóliás mechanizmus, hialinos vagy mikroaterómás okklúzió, aorta disszekció vagy például vaszkulitis, ahol az aszpirin klinikai hatásossága kevésbé várható.

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

rezisztencia gyakoriságának a megállapításához, ill. a rutin módszerek megbízhatóságának értékeléséhez.

## CÉLKITŰZÉSEK

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

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

2. Egy módszer kifejlesztése, mely trombocita dús plazmában (platelet rich plasma; PRP) a trombociták által AA hatására képződött tromboxán B<sub>2</sub>-nek (TXB<sub>2</sub>) - a TXA<sub>2</sub> stabil, inaktív végtermékének - a mennyiségét méri. Ez a módszer a trombociták TXB<sub>2</sub>-képző kapacitását határozza meg és közvetetten jelzi az aszpirin által kifejtett COX-1 gátlás jelenlétét vagy annak hiányát.

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

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

# ANYAG ÉS MÓDSZER

## 1. Vizsgált populáció, beválasztási és kizárási kritériumok

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

Az alábbi előzetes (a priori) kizárási kritériumokat alkalmaztuk: az aszpirin kezelés ellenjavallatai (pl. ismert aszpirin intolerancia, fokozott vérzéses rizikó, terhesség, szoptatás), krónikus betegségek, ismert vérlemezke defektusok és a megelőző két hétben bármilyen gyógyszeres terápia alkalmazása (az orális antikonceptívek kivételével). Kizárást eredményezett továbbá az alkalmazott kis dózisú aszpirin kezelés során az aszpirin kezelés mellékhatásainak jelentkezése, bármilyen más gyógyszer bevétele vagy a további vérvételi alkalmaktól való elzárkózás.

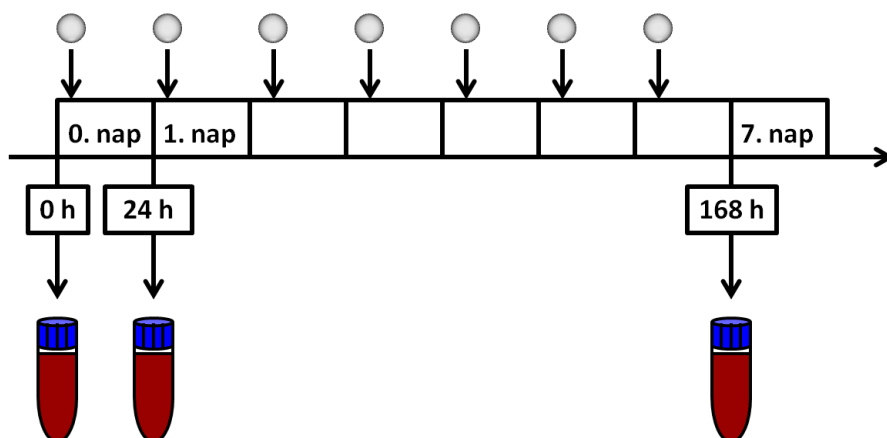
A 121 toborzott önkéntesből 6 jelentkezőt a tanulmány elkezdését megelőző két hétben ill. annak időtartama alatt történő nem-szteroid gyulladáscsökkentő bevétele miatt kizártunk. Három esetben enyhe vérlemezke funkciós rendellenességet diagnosztizáltunk. További három résztvevő nem jelent meg a második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

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

## 2. Az aszpirin kezelés és a mintagyűjtés protokollja

A tanulmányban résztvevő egészséges önkéntesek egy hétig napi egy alkalommal 100 mg enteroszolvens bevonatos aszpirt szedtek (Aspirin Protect, Bayer). Az aszpirin tabletták bevétele 8 és 9 óra között történt. A compliance-t tabletták számlálásával ellenőriztük. Az egyetlen non-compliance lehetőséget felvető esetben az egy hetes aszpirin terápiát

megismételtük és a tabletták ismételt bevételét közvetlenül ellenőriztük. A vérvétel éhgyomorra történt a könyökhajlati vénából 0.109 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) az első aszpirin tabletta bevételét megelőzően, majd azt követően 24 ill. 168 órával (0. napos, 1. napos és 7. napos minták) (3.ábra). PRP-t 120 g-n, 37°C-on, 15 perc centrifugálással nyertünk. Trombocita depletált plazmát (platelet depleted plasma; PDP) két egymást követő centrifugálás segítségével állítottunk elő (1500 g, 25°C, 20 perc). A teljes vér és a PRP trombocita számának meghatározása Sysmex KX-21N (Kobe, Japán) hematológiai automatával történt.



**3. ábra. Az aszpirin adagolás és a vérvételek protokollja**

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

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

követően alumínium hidroxid gélre adszorbeált BSA-konjugátumot adtunk kéthetes időintervallumokban két alkalommal.

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

- 1/ a microplate lemezek felszínének fedése a két nem-konjugált peptid valamelyikével (50  $\mu$ L 2  $\mu$ g/ml peptid 0.1 M pH 9.6 -os nátrium karbonát pufferben, inkubálás +4 °C-on 20 órán át).
- 2/ a szabad felszín blokkolása 100  $\mu$ L hígító pufferrel (0.5 % humán szérum albumint, 0.5 M NaCl-t és 0.05% Tween 20-at tartalmazó 0.01 M pH 7.2-es foszfát puffer, phosphate-buffered saline: PBS) történő 1 órás inkubálással.
- 3/ 50  $\mu$ L antitest tartalmú minta (hígított egér szérum vagy hígítatlan hibridóma felülúszó) bemérése, majd inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten.
- 4/ 50  $\mu$ L HRPO-jelzett kecske anti-egér IgG antitest (Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, USA) bemérése és inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten.
- 5/ 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrát (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) bemérése és inkubálás 0,5 órán át szobahőmérsékleten.
- 6/ 50  $\mu$ L 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 7/ spektrofotometriás mérés 450 nm-en.

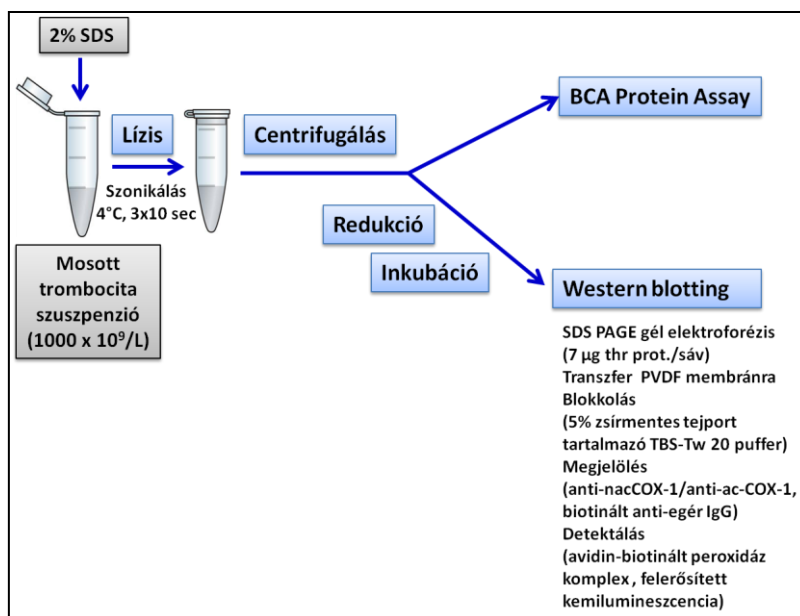
Az immunizált egerekből eltávolított lépsejteket Sp-2/o myeloma sejtekkel fuzionáltattuk [38]. Először azokat az antitesteket termelő hibridómákat szelektáltuk, melyek a nem acetilált peptiddel adtak reakciót, az acetilált peptiddel pedig nem reagáltak. Ezek az antitestek az aszpirinnel nem kezelt egyénektől nyert trombocita lizátumban található COX-1-el reagáltak. A másik szelekciós eljárás során ezzel szemben csak az acetilált peptiddel reagáló antitesteket termelő hibridómákat szelektáltuk; ezek az antitestek csak az aszpirinnel kezelt egyének trombocita lizátumában lévő COX-1-el reagáltak. A szelektált hibridómákat határhígításos módszerrel klónoztuk. Az antitesteket ascites folyadéktól Protein G affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. Így két típusú antitestet állítottunk elő; egyik a nem acetilált COX-1-re specifikus (anti-nacCOX-1), a másik pedig csak az acetilált COX-1-el ad reakciót (anti-acCOX-1).

Minden minta reakciót adott a nyúl anti-COX-1 poliklonális antitesttel (Rb pAb ACOX-1, Abcam, Cambridge, UK) kecske anti-nyúl IgG-HRPO (Jackson ImmunoResearch

Laboratories, Inc. Baltimore Pike, USA) rendszerben. A poliklonális anti-COX-1 antitest nem tett különbséget az acetilált- és a nem acetilált formák között.

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

PRP-ből készített mosott trombocita szuszpenziót ( $1000 \times 10^9/L$ ) [39] nem redukáló nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) minta pufferben szonikálással ( $4^\circ C$ ,  $3 \times 10$  másodperc) lizáltuk. A sejttermelék eltávolítása céljából 5 perc centrifugálást ( $14000 g$ , Eppendorf 5415R centrifuga) követően a felülúszó trombocita lizátum protein tartalmát BCA protein assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg. A következő lépésben a mintákat redukáltuk 5% merkaptotanol hozzáadásával, majd 5 percig forrásban lévő vízben inkubáltuk. A továbbiakban SDS-PAGE-t követően az analízis Western blotting technikával történt. A blottokat az anti-nacCOX-1 és az anti-acCOX-1 monoklonális antitestekkel inkubáltuk. Az immunreakciót biotinált anti-egér IgG-vel majd avidin-biotinált peroxidáz komplexszel hívtuk elő (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA, USA) és az immunreakciót felerősített kemilumineszcens detektálással tettük láthatóvá (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK). A Western blottokat GS800 kvantitatív denzitométerrel (Bio-Rad, Hercules CA) szkenneltük be.

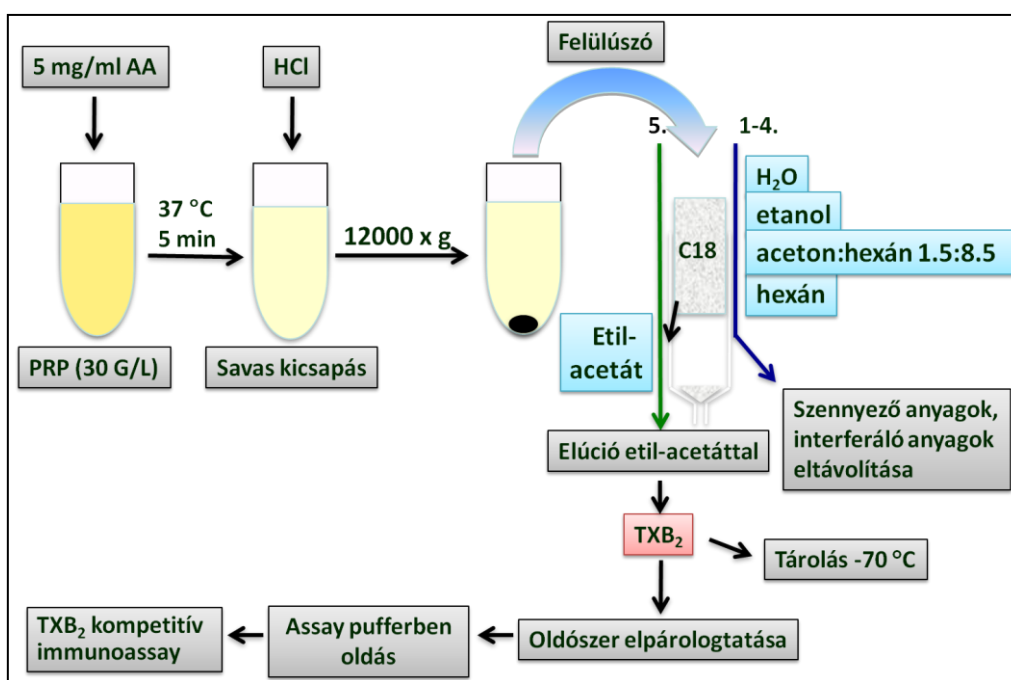


4. ábra. Az ac-COX-1 és a nacCOX-1 trombocita lizátumból Western blottinggal történő kimutatásának sémája.

## 5. Módosított TXB<sub>2</sub> assay a trombociták AA-indukálta TXB<sub>2</sub>-képzésének mérésére

A PRP minták trombocita számát PDP-vel való hígítással  $30 \times 10^9/\text{L}$ -re állítottuk be. A trombocita TXB<sub>2</sub> képződést  $12.5 \mu\text{L}$   $5 \text{ mg/mL}$ -es AA (Helena, Gateshead, UK)  $237.5 \mu\text{L}$  hígított PRP-hez történő hozzáadásával indukáltuk.  $37^\circ\text{C}$ -on történő 5 perces inkubációt követően a reakciót  $12.5 \mu\text{L}$   $2 \text{ M}$  HCl hozzáadásával állítottuk le. A mintát 15 percig  $4^\circ\text{C}$ -on hűtöttük, majd  $12000 \text{ g}$ -n centrifugáltuk ( $4^\circ\text{C}$ , 10 perc).

A módszer beállítása során annak ellenére, hogy az AA az alkalmazott TXB<sub>2</sub> assay antitestével csak kis mértékben adott keresztreakciót ( $0.1 \%$ ), a képződött TXB<sub>2</sub>-höz viszonyítva az AA  $10000\times$ -es moláris túlsúlya miatt interferenciát tapasztaltunk. A felülúszóban található TXB<sub>2</sub>-t az interferáló anyagoktól, mindenekelőtt az AA-tól, Discovery C18 oszlopon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) szekvenciális szilárd fázisú extrakciós módszerrel választottuk el (5. ábra).



**5. ábra. A trombociták AA indukálta TXB<sub>2</sub> képződésének mérése.** AA jelenlétében történő aktivációt követően a trombociták által képzett TXB<sub>2</sub>-öt szekvenciális szilárd fázisú extrakciós módszerrel választottuk el a szennyező és az interferáló anyagoktól, majd a TXB<sub>2</sub> koncentráció meghatározására kompetitív immunoassayt alkalmaztunk.

125  $\mu\text{L}$   $\text{TXB}_2$  tartalmú felülúszót C18 oszlopra vittünk, majd szekvenciálisan 2 x 1 mL HPLC-tisztaságú vízzel, 15%-os etanollal, aceton:hexán 1.5:8.5 arányú elegyével és hexánnal mostuk. A  $\text{TXB}_2$ -t 2 mL etil-acetátban eluáltuk. Az eluátumot 200  $\mu\text{L}$ -enként nitrogén alatt szárítottuk majd 500  $\mu\text{L}$ , a reagens kithez biztosított assay pufferben oldottuk. Amennyiben a minták  $\text{TXB}_2$  koncentrációját egy későbbi időpontban határoztuk meg, az eluátumokat  $-70^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

A  $\text{TXB}_2$  koncentrációt kompetitív immunoassay-vel (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) határoztuk meg 96 lyukú kecskében termelt anti-nyúl IgG-vel fedett mikrotiter lemezben:

1/  $\text{TXB}_2$  standard sor elkészítése: 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41.1 és 13.7 pg/mL-es  $\text{TXB}_2$  koncentrációval ( $\text{TXB}_2$  törzsoldat hígítása Assay pufferben);

2/ 100  $\mu\text{L}$  assay puffer pipettázása az NSB és  $B_0$  helyekre;

3/ 100-100  $\mu\text{L}$   $\text{TXB}_2$  standard és minta pipettázása a megfelelő helyekre;

4/ 50  $\mu\text{L}$   $\text{TXB}_2$ -vel konjugált alkalikus foszfatáz enzim oldat (a kitben kék színű) pipettázása a Blank kivételével minden lyukba;

5/ 50  $\mu\text{L}$   $\text{TXB}_2$ -höz kötődő nyúl poliklonális antitest (a kitben sárga színű oldat) pipettázása az NSB és Blank kivételével minden lyukba;

6/ Inkubáció szobahőmérsékleten 2 óráig, 500 rpm-es rázatással;

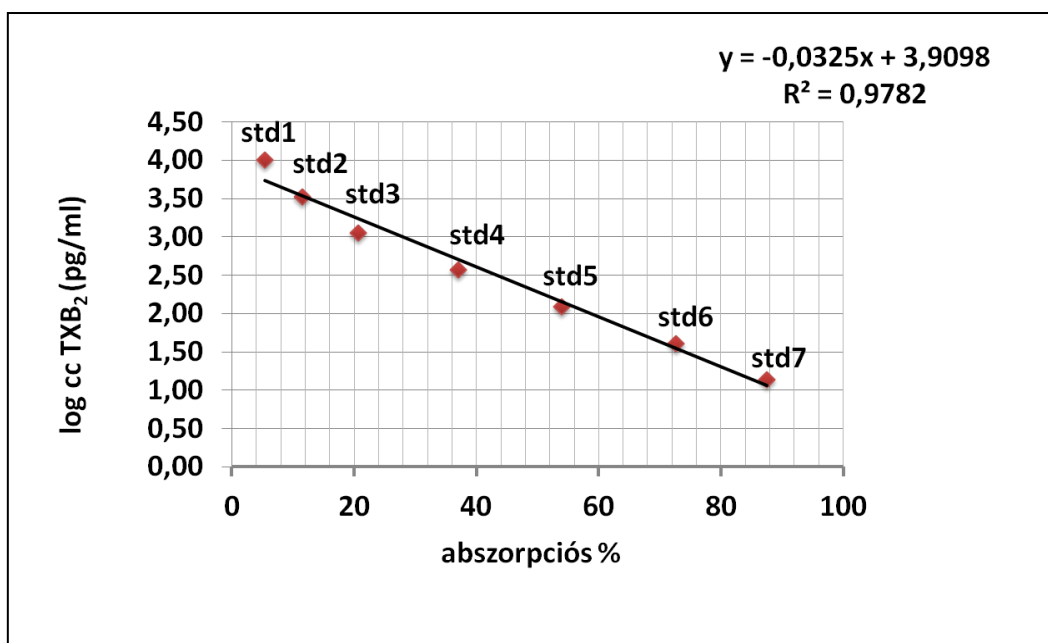
7/ Plate mosása lyukanként 400  $\mu\text{L}$  hígított mosóoldat hozzáadásával 3x;

8/ Az utolsó mosás után 200  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil foszfát szubsztrát hozzáadása minden lyukhoz, majd inkubáció szobahőmérsékleten 45 percig, rázatás nélkül;

9/ Az enzim-szubsztrát reakció leállítása 50  $\mu\text{L}$  stop-oldat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  oldat) hozzáadásával minden lyukhoz;

10/ A képződött sárga szín optikai denzitásának leolvasása microplate-readerrel 405 nm-en.

A kötődést jelző sárga szín intenzitása fordítottan arányos a mintákban ill. standardokban található  $\text{TXB}_2$ -koncentrációkkal. A mintákban található  $\text{TXB}_2$ -koncentrációk meghatározására a mért optikai denzitást használtuk (6. ábra).



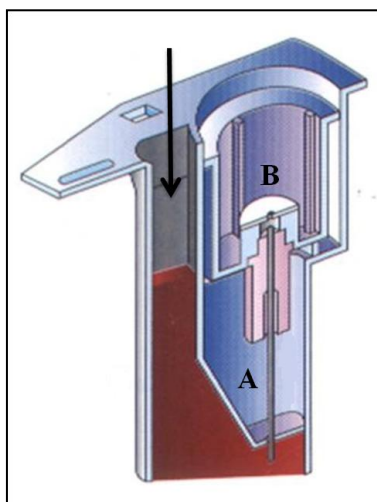
**6. ábra. A TXB<sub>2</sub> koncentráció meghatározása kalibrációs görbe segítségével történt.** A mért optikai denzitásból kiszámolt abszorpciós százalékot logaritmikus skálán a TXB<sub>2</sub> koncentrációnak feleltettük meg.

A trombociták által képzett TXB<sub>2</sub>-t pg TXB<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> trombocita egységben fejeztük ki. Az aszpirinnel nem kezelt egyénektől nyert trombociták AA-indukálta TXB<sub>2</sub> képzési tartományában, 13363 pg/mL-es TXB<sub>2</sub> koncentrációnál, a módszer variációs koefficiense (CV) 6.9%-nak adódott. Az aszpirinnel egy hétig kezelt egyénektől nyert trombociták AA-indukálta TXB<sub>2</sub> képzési tartományában, nagyon alacsony, 888 pg/mL-es TXB<sub>2</sub> koncentrációnál, a CV 11.7% volt. A mintákhoz hozzáadott és a teljes procedúrán végig vitt TXB<sub>2</sub> visszanyerése jól reprodukálhatóan 75% körül volt, magas endogén TXB<sub>2</sub> koncentrációjú minták esetén a hozzáadott TXB<sub>2</sub> visszanyerése 74.1%, alacsony endogén TXB<sub>2</sub> koncentrációjú minták esetén 78.2% volt.

#### **6. A trombocita funkció vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel**

A PFA-100 záródási időt kollagén/epinefrines (CEPI) patronnal mértük. A módszer olyan egyszer használatos patront használ, melynek nyílásába mért citráttal alvadásgátolt vérminta vákuum segítségével egyenletesen áramlik egy kapillárison és rezervoáron át

trombocita agonistákkal (kollagén és epinefrin vagy kollagén és ADP) átitatott szűk nyílással (aperturával) rendelkező membránon lévő apertúrán keresztül (7. ábra). Az áramló aktivált trombociták kitapadnak a membránon található apertura falához majd aggregálódva eltömítik a nyílást. A nyílás eltömődését egy vákuum szenzor érzékeli és ezt az ún. záródási időt méri másodpercben.



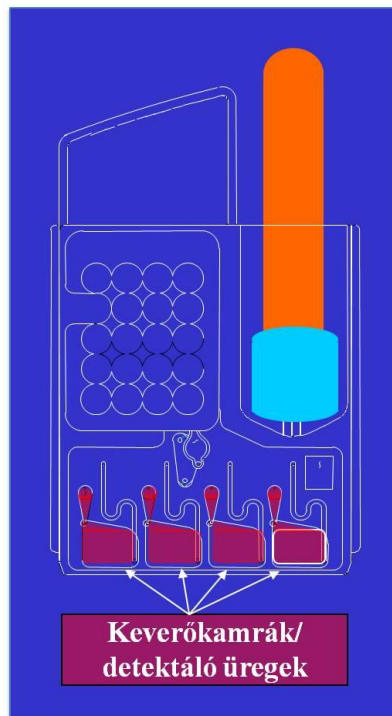
**7. ábra. A PFA-100 záródási idő meghatározásra alkalmazott egyszer használatos patron szerkezete.** A patronba pipettázott citráttal alvadésgátolt vérminta egy kapillárison (A) és rezervoáron keresztül áramlik, majd az aperturával rendelkező membránon (B) áthaladva a membránt átitató trombocita agonisták aktiválják a vérlemezkéket.

A VerifyNow (VN) Aspirin Assay elvégzése a gyártó előírása szerint történt. Ez a betegség mellett is használható (point of care) trombocita funkciós teszt is citráttal alvadésgátolt vérmintát használ (8. ábra).

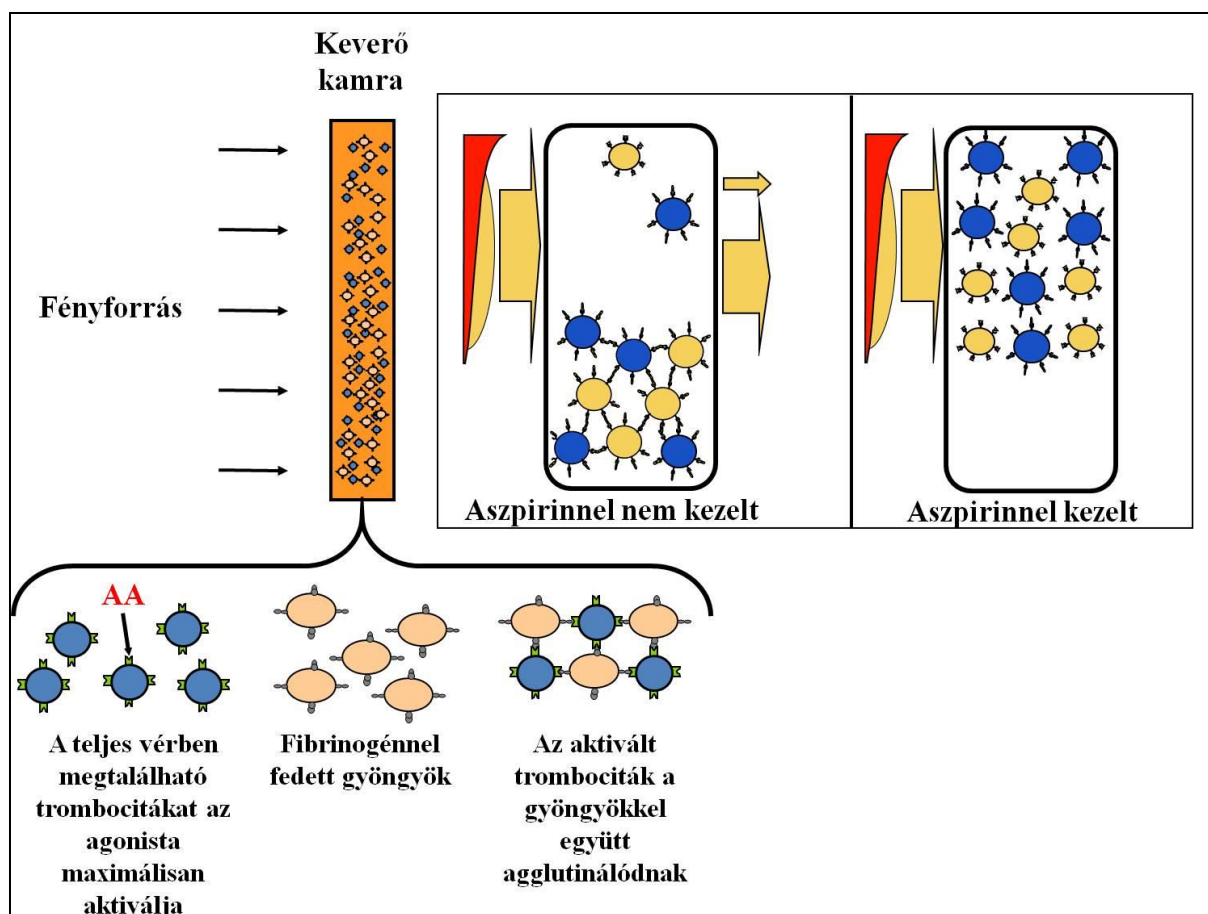


**8. ábra. A VN Aspirin Assay használata.** A meghatározás a készülékbe helyezett egyszer használatos patron segítségével történik, melynek nyílásába helyezzük a citráttal alvadásgátolt vérmintát tartalmazó vérvételi csövet.

A teszt alkalmazása során a vérben lévő trombociták AA agonista hatására aktiválódnak. A képződött  $\text{TXA}_2$  biokémiai jelátvivő útvonalat indít el mely végső soron a trombocita membránban lévő GPIIb/IIIa komplexszet fibrinogén kötő receptorra alakítja. Az aktivált trombociták az egyszer használatos patronok keverőkamrájában található fibrinogénnel fedett gyöngyökhöz kötődnek és agglutinálják azokat (9. ábra). Az agglutináció fokozott fény áteresztést (transzmissziót) eredményez. Amennyiben az aszpirin gátolja a  $\text{TXA}_2$  képződést nem alakul ki trombocita aktiváció és a fény transzmisszió sem növekszik (10. ábra). Az eredményeket Aspirin Reaction Unit-ban (ARU) fejezzük ki. A gyártói előírás szerint az 550 ARU cut-off érték alatti eredmények megfelelő aszpirin hatást mutatnak.



**9. ábra.** A VN Aspirin Assay egyszer használatos patron szerkezete. A citráttal alvadásgátolt vérmintában megtalálható trombociták a tesztpatron keverőkamráiban AA agonista hatására aktiválódnak, fibrinogénnel fedett gyöngyökhöz kötődnek és agglutinálják azokat.

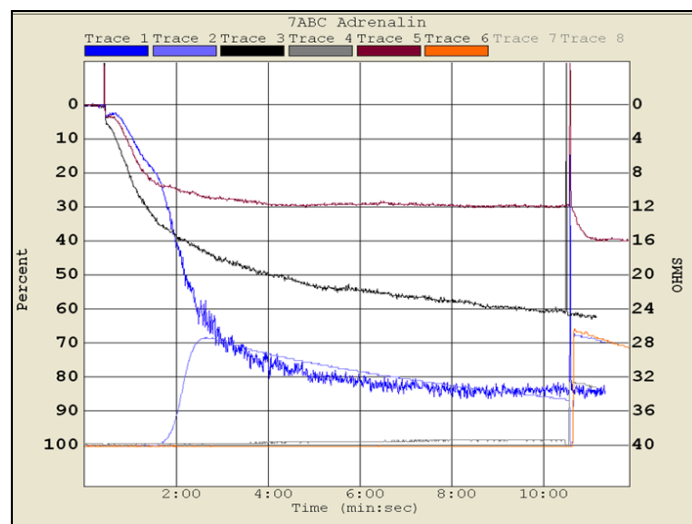


**10. ábra. A VN Aspirin Assay alapelve.** AA agonista hatására az aktiválódott trombociták a készülékbe helyezett egyszer használatos patron keverőkamrájában fibrinogénnel fedett gyöngyökkel agglutinálódnak és a minta fényáteresztése fokozódik. Az aszpirin gátolja a trombocita aktivációt, ennek következtében az agglutináció akadályozott, így a minta fényáteresztése csak kismértékű.

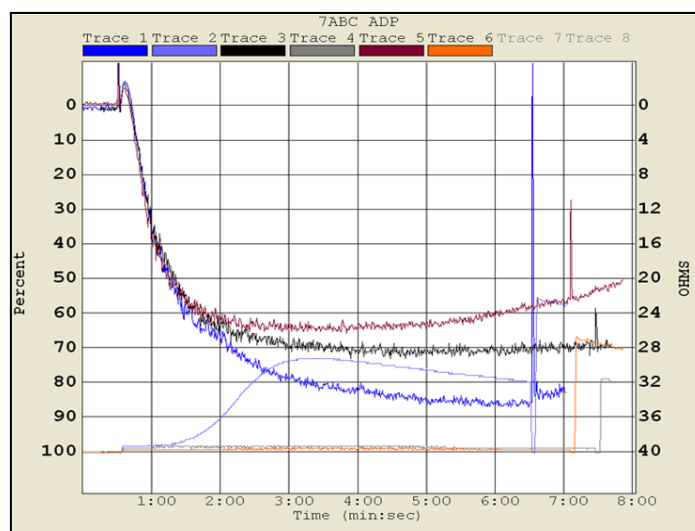
A trombocita aggregációt és szekréciót Chrono-log 700 lumiaggregométeren (Chrono-Log, Havertown, PA, USA) vizsgáltuk PDP-vel  $260 \times 10^9/L$  trombocita számra beállított PRP-ben. A meghatározáshoz esetenként  $450 \mu L$  PRP-t, trombocita mentes referencia mintaként  $450 \mu L$  PDP-t,  $50 \mu L$  luciferin-luciferáz (LL) reagenst (Biothema AB, Handen, Svédország) ill.  $50 \mu L$  agonista oldatot használtunk. Utóbbi esetben kivételt jelentett a kollagén, amit  $5 \mu L$ -ben adtunk a rendszerhez. Az agonisták végkoncentrációja a következő volt:  $500 \mu g/mL$  ( $1.53 \text{ mmol/L}$ ) AA (Helena, Gateshead, UK),  $10 \mu mol/L$  ADP, (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA),  $10 \mu g/mL$  ( $54.6 \mu mol/L$ ) adrenalin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország),  $1 \mu g/mL$  fibrilláris Horm kollagén (Nycomed, Zurich, Svájc). Az aggregációs

és szekréciós görbékét ADP agonistával végzett aktiváció során 6 percig (6B ábra), AA jelenlétében 8 percig (6C ábra), adrenalin és kollagén jelenlétében 10 percig (6A és 6D ábrák) rögzítettük. Az eredményeket a maximális transzmisszió változás százalékában fejeztük ki. Az aktivált trombociták ATP szekrécióját - az aggregációval párhuzamosan - biolumineszcens módszerrel, luciferin-luciferáz reagens (Biothema AB, Handen, Svédország) segítségével detektáltuk. A maximális ATP szekréciót  $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$  trombocita egységben fejeztük ki. Az agonista indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció kimutatásának lépései lumiaggregométeren az alábbiak voltak:

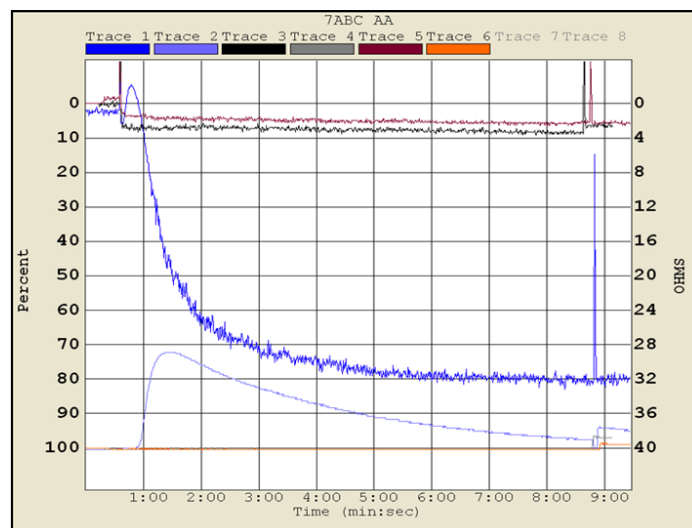
- 1/ a küvettaház referens helyére 450  $\mu\text{L}$ , a vizsgálandó PRP-nek megfelelő PDP-t helyeztünk;
- 2/ az előtermosztált, mágneses keverővel ellátott küvettákba 450  $\mu\text{L}$  PRP-t mértünk, és 3 perc előmelegítés után a küvettát a PRP-vel jelzett lyukba helyeztük;
- 3/ a PRP-hez 50  $\mu\text{L}$  LL-reagenst adtunk és a készüléket nulláztuk;
- 4/ ezután a trombociták aktivációját agonista hozzáadásával indukáltuk, a küvettákba 50-50  $\mu\text{L}$  AA-t/ ADP-t/adrenalin, ill 5  $\mu\text{L}$  Horm kollagén szuszpenziót mértünk és követtük az aggregációs ill. ATP szekréciós görbék lefutását;
- 5/ a meghatározás végén a mintákhoz 2  $\mu\text{L}$  1 mmol/L ATP standard-ot adtunk, s ehhez viszonyítottuk az aktiváció során a trombociták által szekretált ATP mennyiségét.



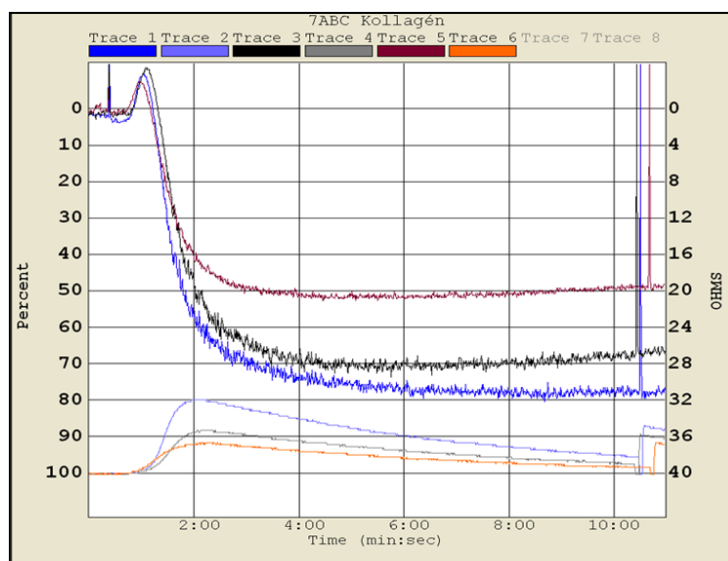
**11A ábra. Jellegzetes adrenalin indukálta trombocita aggregációs és szekréciós görbék az aszpirin kezelés előtt, ill. 1 és 7 napos aszpirin kezelés után levett mintákban. Aggregáció 0., 1., 7. nap: kék-fekete-bordó. Szekréció: 0., 1., 7. nap: világoskék-szürke-narancssárga.**



**11B ábra. Jellegzetes ADP indukálta trombocita aggregációs és szekréciós görbék az aszpirin kezelés előtt, ill. 1 és 7 napos aszpirin kezelés után levett mintákban. Aggregáció 0., 1., 7. nap: kék-fekete-bordó. Szekréció: 0., 1., 7. nap: világoskék-szürke-narancssárga.**



**11C ábra. Jellegzetes AA indukálta trombocita aggregációs és szekréción gőrbék az aszpirin kezelés előtt, ill. 1 és 7 napos aszpirin kezelés után levett mintákban. Aggregáció 0., 1., 7. nap: kék-fekete-bordó. Szekréción: 0., 1., 7. nap: világoskék-szőrzke-narancssárga.**



**11D ábra. Jellegzetes kollagén indukálta trombocita aggregációs és szekréción gőrbék az aszpirin kezelés előtt, ill. 1 és 7 napos aszpirin kezelés után levett mintákban. Aggregáció 0., 1., 7. nap: kék-fekete-bordó. Szekréción: 0., 1., 7. nap: világoskék-szőrzke-narancssárga.**

## 7. Statisztikai analízis

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

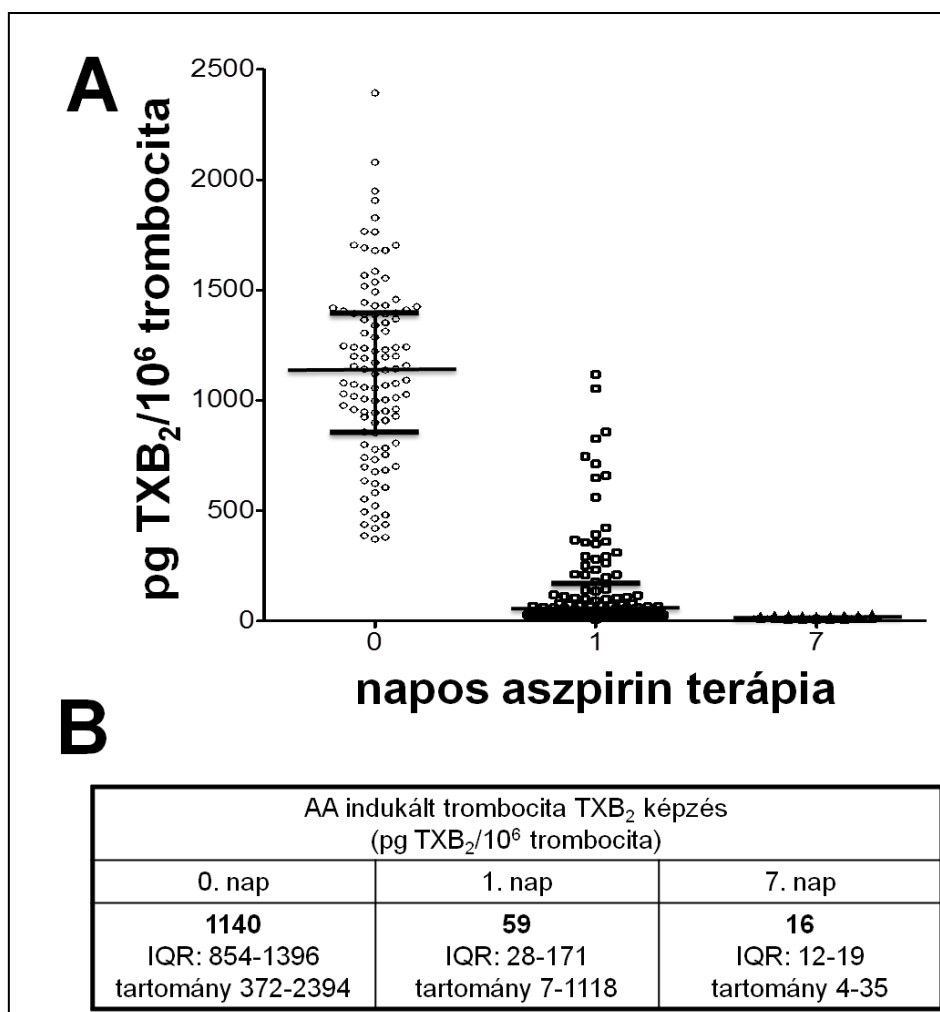
## EREDMÉNYEK

### 1. A vizsgált populáció jellemzői

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

### 2. Az aszpirin terápia hatása az AA-indukált trombocita TXB<sub>2</sub>-képzésre

Az első aszpirin tabletta bevitelét megelőzően (0. nap) AA hatására a trombociták jelentős mennyiségű TXB<sub>2</sub>-öt szintetizáltak, jóllehet, a TXB<sub>2</sub> képző kapacitás széles tartományban szórt. Annak ellenére, hogy a 0. és az 1. mintavételi napokon mért TXB<sub>2</sub> értékek között az eltérés statisztikailag magasan szignifikáns volt ( $p < 0.0001$ ), a jelentkezők 10%-ánál egyetlen enteroszolvens bevonatos aszpirin tabletta bevétele után 24 órával a TXB<sub>2</sub> képzés nem csökkent a 0. napon mért tartomány alsó határa alá. Továbbá, az 1. napon mért TXB<sub>2</sub> értékek 65%-a a 7. napon kapott értékek maximuma felett helyezkedett el, tehát ezekben az esetekben egyetlen aszpirin tabletta bevétele nem volt elegendő a maximális trombocita gátló hatás eléréséhez. Az egy hetes aszpirin kezelés kivétel nélkül hatékonyan lecsökkentette a TXB<sub>2</sub> képzést egy szűk tartományba, tehát elmondhatjuk, hogy a hét napos aszpirin terápia minden résztvevő esetében hatékony volt és részleges "aszpirin rezisztenciát" sem lehetett detektálni. A 7. napon kapott TXB<sub>2</sub> értékek mediánja a 0. napos értékek mediánjának csak 1.4%-a volt. A 7. napon kapott értékek nem mutattak korrelációt a 0. napon mért TXB<sub>2</sub> képzés mértékével ( $r = -0.061$ ,  $p = 0.528$ ), tehát a kezelést megelőző trombocita reaktivitás mértékétől függetlenül az aszpirin egyöntetűen egy nagyon alacsony szintre csökkentette a trombociták TXB<sub>2</sub> képző kapacitását (12A és 12B ábrák).

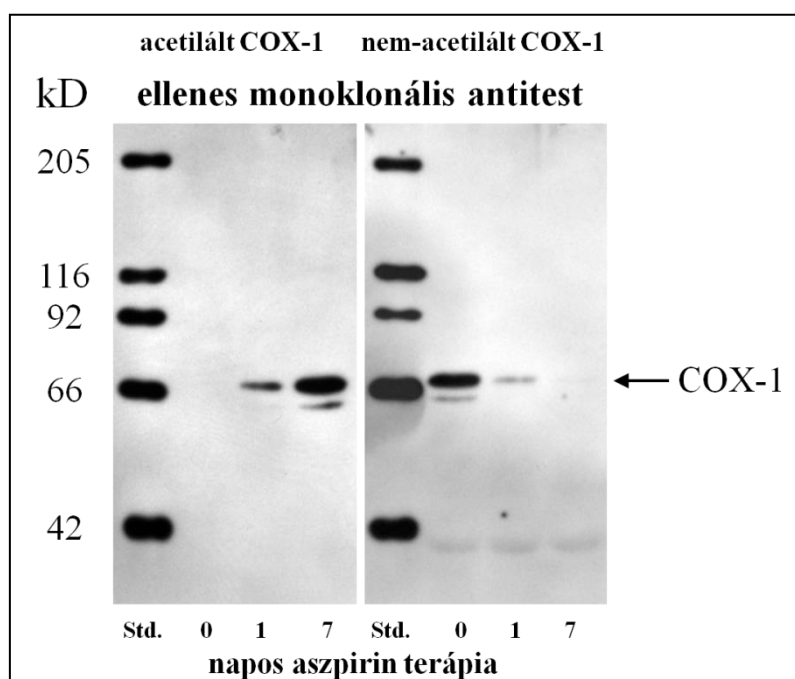


**12. ábra. Az aszpirin kezelés hatása a trombociták AA által indukált TXB<sub>2</sub> képzésére.** Az ábra felső részén (A) az aszpirin kezelés során meghatározott 0. napos (○), 1. napos (□) és 7. napos (Δ) egyéni értékeket ábrázoltuk. A hosszú vízszintes vonalak a mediánokat, a rövid vízszintes vonalak az interkvartilis tartomány (IQR) alsó és felső határait jelzik. A 7. napon mért minden esetben nagyon alacsony egyéni TXB<sub>2</sub> képzés következtében az egyes értékek nehezen különböztethetők meg egymástól és a vízszintes vonalak nehezen észrevehetők. A pontosabb értelmezhetőség kedvéért az ábra alsó részén (B) numerikusan is feltüntettük a medián értékeket, az IQR-t és a teljes tartományt.

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

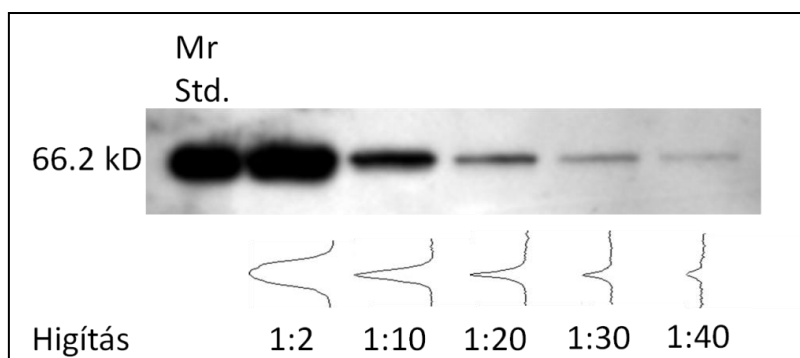
Az aszpirin hatását a COX-1 acetilációs státus direkt kimutatásával is igazoltuk. A COX-1 acetiláció mértékének meghatározása az acCOX-1 vagy nacCOX-1-re specifikus monoklonális antitestekkel történt. A 13. ábrán egy ezt demonstráló reprezentatív kísérletet

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



**13. ábra. A trombocita COX-1 acetiláció kimutatása Western blottinggal.** A COX-1-nek megfelelő sáv alatt látható alacsony intenzitású sáv, mely mindkét antitesttel reakciót mutat, nagy valószínűséggel a COX-1 transzkripciós variánsának megfelelő 37 aminosavval rövidebb 2-es izoforma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/18104968>).

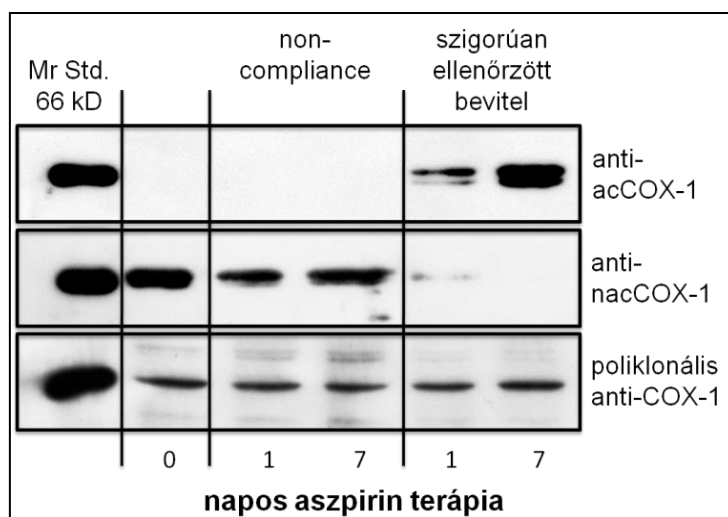
Az általunk használt Western blot technika érzékenységét aszpirinnel nem kezelt egészséges önkéntesektől nyert trombocita lizátum hígítási sorával ellenőriztük (14. ábra). A nacCOX-1 fehérje 40x-es hígítás esetén is kimutatható volt, tehát az assay alkalmas a nacCOX-1 mennyiség 2.5%-ának a detektálására. Az ábrán látható, hogy a reakció denzitometriásan is jól értékelhető. Tekintettel arra, hogy a 7. mintavételi napon a nacCOX-1 ellenes antitestekkel nem volt reakció, ennek az alkalmazására nem volt szükség.



**14. ábra. A nac-COX-1 kimutatás érzékenysége Western blottinggal.** A 2x-es hígítás esetében 7  $\mu$ g trombocita fehérjét vittünk fel a géltre.

Következésképpen, az AA-indukálta TXB<sub>2</sub>-képző kapacitást elemző eredményeinkkel összhangban, ezzel a módszerrel sem tudtunk kimutatni egyetlen esetben sem valódi aszpirin rezisztenciát. Az 1. mintavételi napon az anti-nacCOX-1 és anti-acCOX-1-el adott reakciók mértéke mintánként változott, az aszpirin hatása azonban minden mintában kimutatható volt.

A 108 önkéntessel ellentétben egyetlen önkéntesnél a 7. mintavételi napon az anti-nacCOX-1-gyel intenzív reakciót kaptunk, és nem kaptunk reakciót anti-acCOX-1-gyel (15. ábra). Ennek megfelelően a 7. napon mért AA indukálta TXB<sub>2</sub>-képződés a kiindulási (0. napos) tartományban maradt. Felmerült a non-compliance lehetősége, ezért az önkéntes egy második gyógyszer adagolási periódusban is részt vett, mely időszakban a tabletták bevitelét ellenőriztük. Az ismételt eredmények a 7. napon teljes COX-1 acetilációt mutattak és a vérlemezkek TXB<sub>2</sub>-képző kapacitása a többi önkéntes eredményének megfelelő tartományba csökkent.



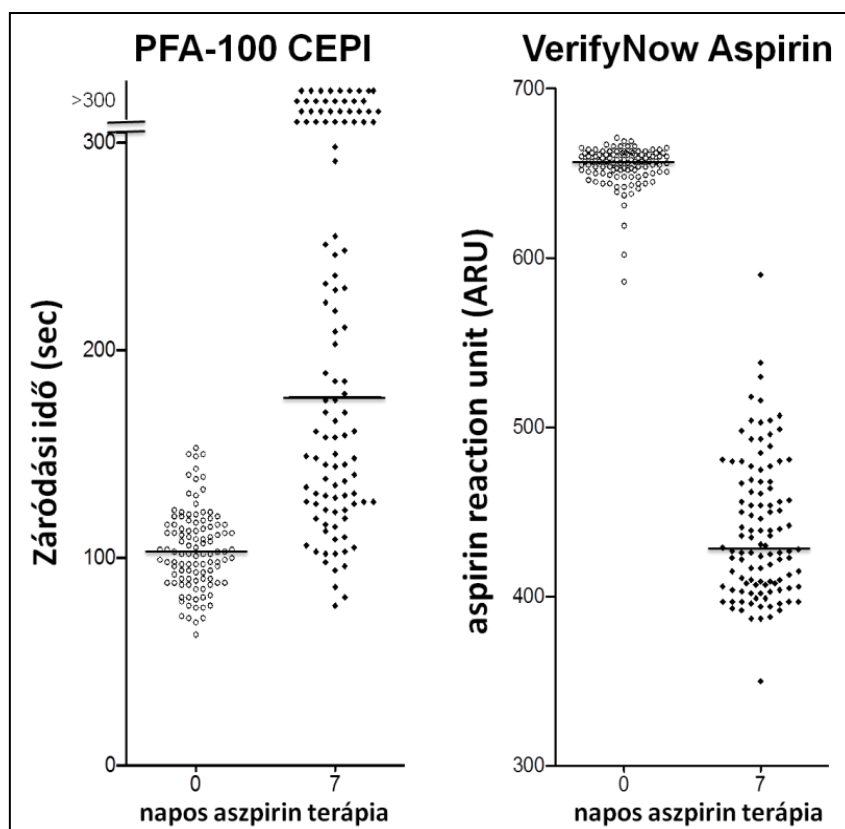
**15. ábra.** A non-compliance időszakát és a szigorúan ellenőrzött ismételt gyógyszer-szedési periódust bemutató Western blottok. A non-compliance időszak alatt az anti-acCOX-1-el nem volt kimutatható reakció trombocita lizátumban, ezzel ellentétben a második, szigorúan ellenőrzött gyógyszer-szedési periódusban intenzív reakciót kaptunk. Minden minta reakciót adott egy poliklonális COX-1 ellenes antitesttel, mely nem tett különbséget az acetilált és a nem acetilált formák közt.

#### 4. Az aszpirin hatás vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel

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

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

Bár a 0. és 7. napon mért PFA-100 CEPI záródási idők közt statisztikailag szignifikáns eltérés volt ( $p < 0.0001$ ), a két tartomány jelentős átfedést mutatott és a záródási idők 38.9%-a az egy hetes aszpirin szedést követően is a 0. napnak megfelelő kiindulási tartományban maradt (16. ábra, 1. táblázat).



**16. ábra. PFA-100 záródási idő és VerifyNow Aspirin Assay alkalmazása az aszpirin hatás vizsgálatára.** A citráttal alvadásgátolt vérmintákat az egészséges önkéntesektől az első aszpirin tabletta bevétele előtt (0. nap) és az egy hetes aszpirin terápiát követően (7. nap) nyertük. A PFA-100 záródási időt kollagén/adrenalin patronnal határoztuk meg. A vízszintes vonalak a mediánokat jelzik.

Amennyiben a végső értékeket nem a kezelést megelőző saját egyéni értékekhez hasonlítjuk, hanem az aszpirinnel nem kezelt populáció számára megállapított referencia intervallumhoz, az esetek jelentős részében, tévesen, aszpirin rezisztenciát diagnosztizálunk.

| Laboratóriumi módszer<br>(egység)                            | 0. nap medián<br>(IQR; teljes<br>tartomány) | 7. nap medián<br>(IQR; teljes<br>tartomány) | A 7. napos értékek<br>átfedése a 0. napos<br>tartománnyal |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| PFA-100 CEPI záródási idő<br>(sec)                           | 103<br>(90-116; 63-153)                     | 177<br>(128->300; 77->300)                  | 38.9 %                                                    |
| VerifyNow Aspirin Assay<br>(ARU)                             | 657<br>(651-662; 586-671)                   | 428<br>(407-467; 350-590)                   | 0.9%                                                      |
| AA-indukált trombocita<br>aggregáció ( $\Delta T\%$ )        | 80<br>(75-87; 50-99)                        | 5<br>(4-6; 0-13)                            | 0 %                                                       |
| ADP-indukált trombocita<br>aggregáció ( $\Delta T\%$ )       | 78<br>(72-85; 39-99)                        | 66<br>(60-72; 16-91)                        | 99.1 %                                                    |
| Adrenalin-indukált trombocita<br>aggregáció ( $\Delta T\%$ ) | 80<br>(52-87; 2-98)                         | 21<br>(15-29; 3-73)                         | 100 %                                                     |
| Kollagén-indukált trombocita<br>aggregáció ( $\Delta T\%$ )  | 79<br>(72-85; 46-99)                        | 9<br>(3-21; 0-52)                           | 4.6 %                                                     |

**1. táblázat. A különböző trombocita funkciós tesztekkel kapott eredmények az aszpirin kezelést megelőzően és egy hetes aszpirin kezelést követően.** A 0. és 7. napon mért PFA-100 CEPI záródási idők átfedését a 0. napos tartomány felső határa alatt lévő 7. napos értékek százalékos aránya adja meg. A trombocita aggregációs tesztek és a VerifyNow Aspirin Assay átfedés tartományát a 0. napos tartomány alsó határa felett lévő 7. napos értékek százalékos aránya adja meg.

A PFA-100 CEPI záródási idő meghatározással ellentétben, egyetlen kieső érték „outlier” kivételével (590 ARU), nem volt átfedés a VN Aspirin Assay-val a 0. és 7. napon mért értékek között. A kieső értéket is figyelembe véve az átfedés százalékos aránya mindössze 0.9% volt (16. ábra, 1. táblázat).

A PFA-100 záródási idő meghatározása esetében a kiindulási értékek szignifikánsan korreláltak a 7. napos értékekkel, tehát az aszpirin kezelés előtt is fokozott reaktivitású trombocitákkal rendelkező egyének aszpirin kezelést követően is relatíve magas trombocita reaktivitást mutattak (2. táblázat). A VN Aspirin Assay esetében hasonló összefüggés nem volt, azaz az aszpirin kezelés előtt mért trombocita reaktivitás, az AA indukálta TXB<sub>2</sub> képződéshez hasonlóan, nem befolyásolta az aszpirin hatékonyságát.

| Laboratóriumi módszer                             | Korrelációs koefficiens (r) | Szignifikancia |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| AA-indukált trombocita<br>TXA <sub>2</sub> képzés | -0.061                      | p=0.528        |
| PFA-100 CEPI záródási idő                         | 0.577                       | p<0.0001       |
| VerifyNow Aspirin Assay                           | 0.039                       | p=0.686        |
| AA-indukált trombocita<br>aggregáció              | 0.019                       | p=0.844        |
| ADP-indukált trombocita<br>aggregáció             | 0.561                       | p<0.0001       |
| Adrenalin-indukált<br>trombocita aggregáció       | 0.483                       | p<0.0001       |
| Kollagén-indukált trombocita<br>aggregáció        | 0.259                       | p<0.007        |

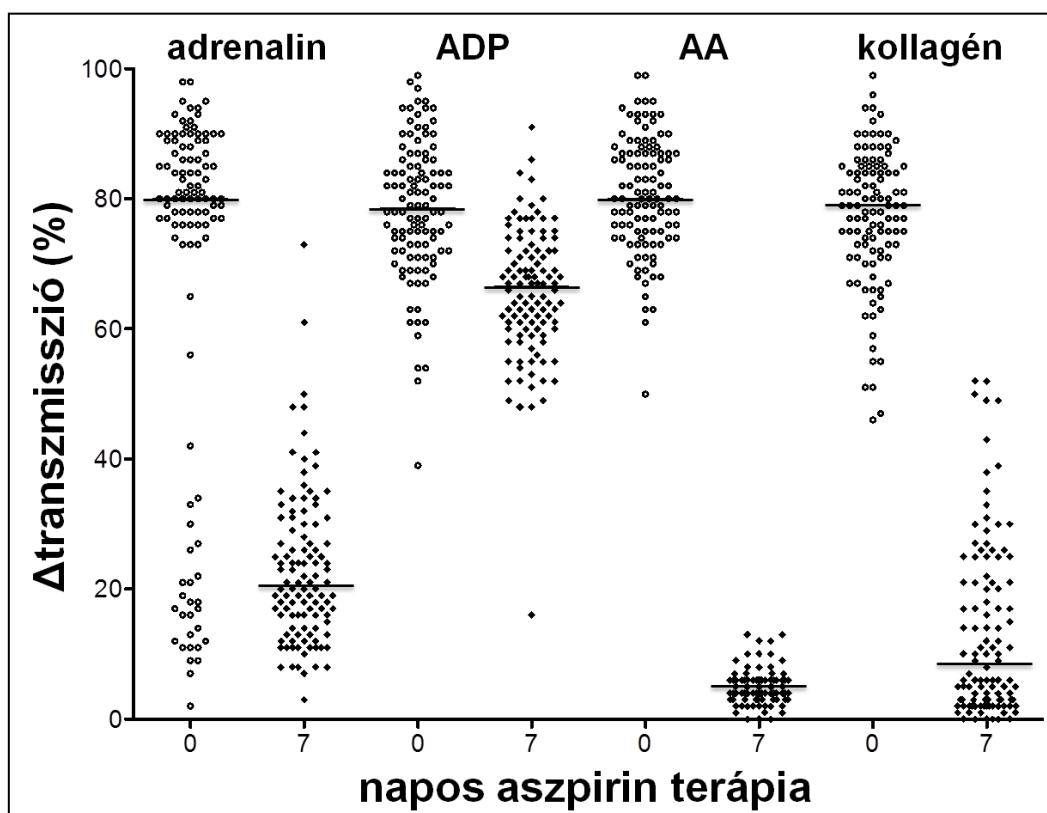
**2. táblázat. Az egy hetes aszpirin kezelést megelőzően és azt követően kapott eredmények korrelációja.**

#### **4.2. A trombocita aggregációs- és szekréción vizsgálatok eredményeinek értékelése**

A 0. mintavételi napon adrenalin agonista hatására bekövetkezett trombocita aggregáció mértéke, az esetek 30%-ában igen alacsony volt, és a 7. mintavételi napon mért értéktartományba esett (17. ábra). Hasonlóképpen, a vizsgált populáció 26%-ánál a 0. napon mért adrenalin-indukált ATP szekréción mértéke mérési határ alatt volt (3. táblázat). Az adrenalinra gyenge választ adók jelentős száma miatt ez az agonista nem alkalmas az aszpirin hatás megítélésére.

Az ADP jelenlétében végzett trombocita aggregációs vizsgálatok esetében, a statisztikailag szignifikáns változás ellenére, a 0. és 7. napos eredmények között jelentős volt az átfedés (13. ábra, 1. táblázat). Az egyetlen, ADP agonistára gyengébb választ adó, 39%-os transzmisszió növekedést mutató, outlier érték kizárása után is, a 7. napon kapott eredmények 94,4%-a átfedést mutatott a kiindulási értéktartománnyal. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az ugyanannál az egyénnél meghatározott kiindulási (kezelést megelőző) érték hiányában, az ADP aggregáció sok esetben álpozitív "aszpirin rezisztenciát" mutat. A 0.

napos ADP indukálta ATP szekréciós értékek széles tartományban szórtak (3. táblázat), ez a paraméter sem használható az aspirin hatás ellenőrzésére.



**17. ábra. Az aspirin hatása a különböző agonisták által kiváltott trombocita aggregációra.** PRP-ben adrenalin, ADP-vel, AA-al és kollagénnel aktiváltuk a trombocitákat. A vérmintákat az egészséges önkéntesektől az első aspirin tabletta bevitelét megelőzően (0. nap) és az követően egy héttel (7. nap) vettük. Az eredményeket a maximális fénytranszmisszió változásban ( $\Delta$ transzmisszió %) fejeztük ki. A vízszintes vonalak a mediánokat jelzik.

| Agonista  | $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ trombocita      |                                             | A 7. napos értékek<br>átfedése a 0. napos<br>tartománnyal |
|-----------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|           | 0. nap medián<br>(IQR; teljes<br>tartomány) | 7. nap medián<br>(IQR; teljes<br>tartomány) |                                                           |
| AA        | 1.1<br>(0.9-1.4; 0.4-2.6)                   | 0<br>(0; 0)                                 | 0 %                                                       |
| ADP       | 1.0<br>(0.7-1.2; 0-2.2)                     | 0<br>(0; 0-0.8)                             | 100 %                                                     |
| Adrenalin | 1.2<br>(0.2-1.5; 0-2.8)                     | 0<br>(0; 0)                                 | 100 %                                                     |
| Kollagén  | 1.0<br>(0.8-1.3; 0.3-2.2)                   | 0.2<br>(0.1-0.3; 0-1.9)                     | 25 %                                                      |

**3. táblázat. Az aszpirin hatása a különböző agonisták által indukált trombocita ATP szekrécióra.** Az egészséges önkéntesektől az első aszpirin tabletta bevitelét megelőzően (0. nap) és azt követően egy héttel (7. nap) vett mintákban végeztük el a vizsgálatokat.

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

Az AA-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció esetében a 0. és 7. napos értéktartományok közt nem volt átfedés, azaz ez a teszt kiválóan alkalmas az aszpirin hatás detektálására (17. ábra, 3. táblázat).

Az egy hetes aszpirin kezelést követően mért adrenalin-, ADP- és kollagén-indukált trombocita aggregációs válasz mértéke szignifikánsan korrelált a kiindulási értékekkel (2. táblázat). AA agonista esetében ilyen összefüggés nem volt, hasonlóan az AA-indukált TXB<sub>2</sub>-képző kapacitás meghatározása során kapott eredményeinkhez.

## MEGBESZÉLÉS

A trombocita COX-1 aszpirin által történő acetilációját nagy biztonsággal kimutató két referencia módszert fejlesztettünk ki. A COX-1 acetilációjának mérésére egy indirekt módszert már korábban leírtak [30, 40]. Ez esetben a trombocita lizátum 180.000 g felülúszójában a COX-1 az aszpirin hatására bekövetkezett inaktivációjának mértékét a [<sup>3</sup>H-acetil]-aszpirin, egy 85 kDa-os fehérjéhez (feltehetően COX-1-hez) való kötődésének csökkenésével mérték. A módszer amellettt hogy meglehetősen nehézkes, nem lett validálva és nem is terjedt el a laboratóriumi gyakorlatban. Az általunk kifejlesztett acCOX-1-re illetve nacCOX-1-re specifikus monoklonális antitesteket alkalmazó módszerek a COX-1 acetiláltsági státusát mutatják ki trombocita lizátumban. Az aszpirin által acetilált Ser529 reziduum a COX-1 belsejében fedett állapotban van, így az antitestek szekvenciális epitópjukkal csak a molekula szekundér és terciér struktúráját denaturáló anionos detergens kezelés (SDS) alkalmazását követően reagáltak. Ezért az antitestek és a COX-1 Ser529-et magában foglaló epitópok interakciójának kimutatására Western blottingot (SDS-PAGE és immunoblot) alkalmaztunk. Az antitestek specificitását a megfelelő acetilált, illetve nem acetilált peptidekkel való reagálás mellett az aszpirinnel nem kezelt önkéntesektől nyert trombocitákban az anti-acCOX-1-el adott reakció hiánya és az aszpirinnel egy hétig kezelt önkéntesektől nyert trombocitákban az anti-nacCOX-1-el adott reakció hiánya is igazolta. Tudomásunk szerint ez az első COX-1 Ser529 acetilációt közvetlenül kimutató módszer, mely alkalmas a kémiai (valódi) aszpirin rezisztencia vagy annak a hiányának a megállapítására.

A TXB<sub>2</sub>-képzés jellemzésére kifejlesztett módosított TXB<sub>2</sub> assay megtervezésénél célunk volt a trombociták által képzett TXA<sub>2</sub> mennyiségének meghatározása függetlenül a más sejtek által in-vivo vagy in-vitro körülmények között képzett TXA<sub>2</sub>-tól, kikerülve a receptor-mediált trombocita aktivációt, melyet az AA-TXA<sub>2</sub> átalakulástól eltérő tényezők befolyásolnak. Módszerünk egy meghatározott trombocita számra beállított hígított PRP-ben vizsgálja a TXB<sub>2</sub> képződést, ami lehetővé teszi az egy trombocita által képzett TXB<sub>2</sub> meghatározását, azaz függetleníti a TXB<sub>2</sub> képződést, ill. annak gátlását az egyénileg eltérő trombocita számtól is. A TXB<sub>2</sub> képződés jellemzésére, ill. az aszpirin hatás detektálására korábban leírták a véralvadás során képződött TXB<sub>2</sub> mérését szérumban, és a 11-dehidro-TXB<sub>2</sub> meghatározást vizeletben [33, 41, 42]. Bár mindkét említett módszer értékes információval szolgál az aszpirin hatásával kapcsolatban, az előbbi a véralvadási folyamat alatt történő trombin generációtól függ, az utóbbit pedig a trombocitáktól független forrásból

képződő  $\text{TXA}_2$  és a vesefunkció is befolyásolhatja. Emellett a vérben lévő egyéb esetleg COX-2-öt tartalmazó sejtek (fehérvérsejtek) által képzett  $\text{TXB}_2$  is befolyásolhatja az eredményeket. Az általunk kifejlesztett módszer a trombociták  $\text{TXA}_2$ -képző kapacitását határozza meg, az aszpirin hatására kapott eredmények indirekt módon mérik a COX-1 acetilációját.

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

Az általunk kifejlesztett referencia módszerekkel egybehangzóan igazoltuk, hogy 108 önkéntes által alkotott egészséges populációban nem volt "aszpirin rezisztens" egyén. Megállapításunk ellentmond számos korábbi, inadekvát laboratóriumi módszerek alkalmazásával elvégzett tanulmány eredményeinek, melyek alapján az aszpirin rezisztencia gyakorisága 5-66%-ig terjed [31-33]. Az általunk vizsgált egészséges önkéntesek esetében az AA-indukálta trombocita  $\text{TXB}_2$ -képzés mértéke egységesen egy nagyon alacsony értéktartományba csökkent. Ennek megfelelően minden egyénnél egy hetes kis-dózisú aszpirin kezelést követően a trombocita COX-1 teljes acetilációját észleltük. Ez azt is jelenti, hogy a COX-1-et kódoló gén gyakori genetikai polimorfizmusai [43-48] nem játszanak szerepet az aszpirinre adott válasz kialakulásában. Hasonlóképpen a kezelést megelőző, kiindulási  $\text{TXB}_2$ -képzési kapacitás („platelet reactivity”) sem befolyásolja a COX-1 aszpirin hatására bekövetkező acetilációjának és a  $\text{TXA}_2$ -generációjának gátlását. A tanulmányt más gyógyszer hatásától mentes egészséges önkéntes csoporton végeztük és az eredmények arra engednek következtetni, hogy egészségesek esetében az aszpirin általi COX-1 acetiláció hiányával jellemzett "aszpirin rezisztencia" nem létezik, vagy ha igen, az ritkaságnak számít. Eredményeinkkel megegyezően, aszpirin hatására 47 egészséges önkéntesnél a szérumban mért  $\text{TXB}_2$ -szint is egységesen lecsökkent [33].

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

Az aszpirin trombocita funkcióra kifejtett hatásának detektálására a klinikai gyakorlatban számos laboratóriumi módszert alkalmaznak [49-51]. Tanulmányunkban a

trombocita COX-1 acetilációt (inaktivációt) megbízhatóan kimutató tesztek azonosítása céljából összehasonlítottuk az e célra leggyakrabban alkalmazott rutin laboratóriumi módszerekkel és a két referencia módszerrel kapott eredményeket.

Aszpirinnel kezelt és nem kezelt betegcsoportban a PFA-100 CEPI záródási idők közti jelentős átfedést már korábban is megfigyelték [52, 53]. Tanulmányunkban a PFA-100 záródási időt kollagén/ADP patronnal is meghatároztuk, a kapott kiindulási és az egy hetes aszpirin kezelést követő értékek azonban teljes mértékben átfedtek, s így ezeket az eredményeket nem vettük be a tanulmányunkba. A COX-1-től független útvonalak, melyeket az aszpirin hatás nem befolyásol, fontos szerepet töltenek be a trombocita dugó képződésében a patron membránjának aperturáján, ezért a záródási idő csak az esetek egy részében tükrözi az aszpirin hatását. Érdekes módon az aszpirin kezelést követően mért záródási idők magas szignifikanciával korreláltak a kiindulási záródási időkkal (2. táblázat). Ez arra enged következtetni, hogy a fokozott kiindulási trombocita reaktivitás jelentősen befolyásolja az eredményeket, ami elfedheti az aszpirin hatást. A PFA-100 záródási időt a von Willebrand faktor koncentrációja, a hematokrit érték és a trombocita szám is befolyásolja [51, 54-56]. Az alkalmazott egy hetes aszpirin kezelés nem változtatta meg a trombocita számot és feltételezzük, hogy a másik két változó sem változott jelentősen.

A VN Aspirin Assay sokkal pontosabban jelezte az aszpirin hatás kialakulását, mint a PFA-100 záródási idő. A kiindulási értékek a gyártó által meghatározott 550 ARU határérték felett, továbbá egyetlen kivétellel (586 ARU), 600 ARU felett helyezkedtek el (16. ábra). Az egy hetes aszpirin kezelést követően az AA-ra adott válasz egyetlen kivétellel (590 ARU) 550 ARU alá csökkent. Tehát, az egészséges önkéntesek 99%-ában a VN Aspirin Assay megbízhatóan mutatta a COX-1 acetiláció státusát. Nem volt összefüggés a kiindulási (0. napos) és 7. napos értékek közt, tehát a kezelést megelőző trombocita reaktivitás mértéke nem befolyásolta a VN Aspirin Assay-vel mért aszpirin hatást.

Amint azt feltételeztük, a hatását COX-1 függő útvonalon keresztül kifejtő AA agonista indukálta trombocita aggregáció és szekréció nagy biztonsággal különítette el a kizárólag acCOX-1- et, ill. nacCOX-1-et tartalmazó mintákat (17. ábra). A 0. és 7. napos AA-indukált trombocita aggregációs és szekréciós eredmények közt nem volt átfedés. A VN Aspirin Assay-hez hasonlóan, a kiindulási trombocita aggregabilitás nem befolyásolta az aszpirin hatás kialakulását (2. táblázat).

A résztvevők kb. negyedénél az adrenalinra adott kiindulási trombocita aggregációs és szekréciós válasz alacsony volt [57, 58], így ez az agonista aligha alkalmazható az aszpirin hatás kimutatására (17. ábra, 3. táblázat). ADP aggregáció esetében a 7. napos mediánérték

kiseb volt a 0. naposnál, az eredmények jelentős átfedése miatt azonban, individuális kezelés előtti saját értékek hiányában, kizárt az aszpirin hatás e tesztel történő megbízható detektálása. Még akkor is, ha ismernénk a kezelés előtti értéket az aszpirin hatására bekövetkezett, kisfokú transzmisszió csökkenés bizonytalanná teszi annak megítélését, hogy a COX-1 aktivitás teljes mértékben gátolt-e. Az eredmények között nem szerepel ugyan, de végeztünk kísérleteket különböző ADP koncentráció mellett is. Az ADP koncentráció változtatása 2.5-20  $\mu\text{M}$  közti tartományban nem javította az aszpirin hatás kimutatásának a hatékonyságát. Kis dózisú kollagén agonista (1  $\mu\text{g/mL}$ ) alkalmazása az ADP-hez képest jobb elkülönítő erővel bírt. A kiindulási- és 7. napos értéktartományok átfedése azonban, kisebb mértékben mint ADP vagy adrenalin esetében, ez esetben is észlelhető volt.

Az ADP- és kollagén-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció COX-1 független mechanizmusokat is involvál, melyeket nem befolyásol az aszpirin. Ezekben az esetekben, hasonlóan a PFA-100 CEPI záródási idő meghatározáshoz, a kiindulási értékek szignifikánsan befolyásolták a 7. napos eredményeket, az agonistákra magas reaktivitást mutató nem acetilált trombociták a COX-1 acetilációja után is magas reaktivitást mutattak (2. táblázat).

Tekintettel arra, hogy a szérumban TXB<sub>2</sub> meghatározás és a vizeletben 11-dehidro-TXB<sub>2</sub> mennyiségének a mérése [42] nem tekinthető a rutin laboratóriumi diagnosztikában általánosan használt eljárásnak, ezeket a módszereket nem vettük be az összehasonlító vizsgálatokba. Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy a véralvadás során képződött trombin által aktiválódott trombocitákban a TXA<sub>2</sub> generáció, melyet a szérumban megjelenő TXB<sub>2</sub> tükröz, jól jelzi az aszpirin hatását. Ugyanakkor az aszpirinnel nem kezelt egyének esetében a módszerrel kapott eredmények függnék a trombin generáció mértékétől, ami egyénekenként változik, s amit pl. az antikoaguláns terápia befolyásolhat. A szérumban lévő TXB<sub>2</sub>-höz a vér egyéb alakos elemei is hozzájárulhatnak, pl. a COX-2-öt tartalmazó leukociták, melyek TXB<sub>2</sub> generációját a preventív dózisban alkalmazott aszpirin nem gátolja. A leukociták hozzájárulását a szérumban TXB<sub>2</sub> szintjéhez jelenleg vizsgálják intézetünkben.

Az értekezésben részletezett vizsgálatok egészséges önkénteseken bizonyították az aszpirin rezisztencia hiányát. A preventív aszpirin terápiában részesülő betegeknél elvileg más szempontok is felmerülhetnek. Az aszpirin gyengébb gátló hatása a trombocita TXA<sub>2</sub> képzésre bizonyos patológias állapotokban, mint a gyulladásos betegségek [59-61], összefügghet a kis dózisú acetilszalicilsav által nem gátolt COX-2 expresszióval bár ennek a mechanizmusnak a jelentősége vitatott [62]. Előzetes kardiovaszkuláris betegeken végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy e betegcsoporton az eredmények hasonlóak az egészséges

önkéntesek esetében leírt eredményekhez [63]. Véleményünk szerint, a COX-1 acetilációra kifejtett aszpirin hatás hiányának az elsődleges oka a non-compliance, így az aszpirin hatás ellenőrzésének fő indikációja valószínűleg a non-compliance laboratóriumi detektálása. Tanulmányunkban igazoltuk, hogy az új referencia módszerek és az ezeknek megfelelő specifikus módszerek alkalmasak a non-compliance detektálására is. További indikációs terület az aszpirinnel esetleg párhuzamosan szedett nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek interferáló hatásának a kiszűrése. Utóbbiak megakadályozzák az aszpirin hozzáférését a COX-1 aktív site üregben elhelyezkedő Ser529-hez [64-66].

Összefoglalva, a valódi aszpirin rezisztencia, ha létezik extrémén ritka a populációban. Az aszpirin hatás detektálásának fő indikációja a non-compliance és az interferáló gyógyszerek hatásának a kizárása. Az aszpirin hatás megbízható detektálására a kifejlesztett referencia módszerek mellett az AA-indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció mértékének meghatározása, a VN Aspirin Assay és nagy valószínűséggel a szérumban TXB<sub>2</sub> meghatározás is [41] alkalmasak. A PFA-100 CEPI záródási idő mérése és az AA-tól eltérő agonisták által indukált trombocita aggregáció és ATP szekréció meghatározása nem megbízhatóak erre a célra. Ezeket a teszteket a COX-1-től független aktivációs mechanizmusok jelentősen befolyásolják, így nem javasolhatók az aszpirin hatás kimutatására. Ugyanakkor hasznosak lehetnek az acetilált COX-1 mellett (vagy attól függetlenül) is magas reaktivitású trombociták kimutatására [67, 68], ennek bizonyítására azonban további széleskörű klinikai vizsgálatok szükségesek.

A közölt eredményeket a Thrombosis Research nemzetközi szakfolyóirat külön szerkesztőségi közleményben méltatta [69].

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Michelson, A.D., *How platelets work: platelet function and dysfunction*. J Thromb Thrombolysis, 2003. **16**(1-2): 7-12.
2. Healy, A.M., M.D. Pickard, A.D. Pradhan, Y. Wang, Z. Chen, K. Croce, M. Sakuma, C. Shi, A.C. Zago, J. Garasic, A.I. Damokosh, T.L. Dowie, L. Poisson, J. Lillie, P. Libby, P.M. Ridker, and D.I. Simon, *Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events*. Circulation, 2006. **113**(19): 2278-84.
3. Patrono, C., B. Collier, G.A. FitzGerald, J. Hirsh, and G. Roth, *Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. Chest, 2004. **126**(3 Suppl): 234S-264S.
4. Moncada, S. and J.R. Vane, *Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls*. N Engl J Med, 1979. **300**(20): 1142-7.
5. Kobayashi, T., Y. Tahara, M. Matsumoto, M. Iguchi, H. Sano, T. Murayama, H. Arai, H. Oida, T. Yurugi-Kobayashi, J.K. Yamashita, H. Katagiri, M. Majima, M. Yokode, T. Kita, and S. Narumiya, *Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): 784-94.
6. Hamberg, M., J. Svensson, and B. Samuelsson, *Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): 2994-8.
7. FitzGerald, G.A., *Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists*. Am J Cardiol, 1991. **68**(7): 11B-15B.
8. Kulmacz, R.J., W.A. van der Donk, and A.L. Tsai, *Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(5): 377-404.
9. Smith, W.L. and I. Song, *The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: 115-28.
10. Rouzer, C.A. and L.J. Marnett, *Structural and functional differences between cyclooxygenases: fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): 34-44.
11. Grosser, T., S. Fries, and G.A. FitzGerald, *Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): 4-15.
12. Gibson, P.C., *Aspirin in the treatment of vascular diseases*. Lancet, 1949. **2**(6591): 1172-4.
13. Craven, L.L., *Acetylsalicylic acid, possible preventive of coronary thrombosis*. Ann West Med Surg, 1950. **4**(2): 95.
14. Craven, L.L., *Prevention of coronary and cerebral thrombosis*. Miss Valley Med J, 1956. **78**(5): 213-5.
15. Eikelboom, J.W., J. Hirsh, F.A. Spencer, T.P. Baglin, and J.I. Weitz, *Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): e89S-119S.
16. Patrono, C., L.A. Garcia Rodriguez, R. Landolfi, and C. Baigent, *Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(22): 2373-83.

17. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*, 2002. **324**(7329): 71-86.
18. Baigent, C., L. Blackwell, R. Collins, J. Emberson, J. Godwin, R. Peto, J. Buring, C. Hennekens, P. Kearney, T. Meade, C. Patrono, M.C. Roncaglioni, and A. Zanchetti, *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. *Lancet*, 2009. **373**(9678): 1849-60.
19. Vandvik, P.O., A.M. Lincoff, J.M. Gore, D.D. Gutterman, F.A. Sonnenberg, P. Alonso-Coello, E.A. Akl, M.G. Lansberg, G.H. Guyatt, and F.A. Spencer, *Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest*, 2012. **141**(2 Suppl): e637S-68S.
20. Garcia Rodriguez, L.A., S. Hernandez-Diaz, and F.J. de Abajo, *Association between aspirin and upper gastrointestinal complications: systematic review of epidemiologic studies*. *Br J Clin Pharmacol*, 2001. **52**(5): 563-71.
21. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(3): 387-437.
22. Lindemann, S., N.D. Tolley, D.A. Dixon, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and A.S. Weyrich, *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(3): 485-90.
23. Caccese, D., D. Pratico, A. Ghiselli, S. Natoli, P. Pignatelli, V. Sanguigni, L. Iuliano, and F. Violi, *Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(3): 485-90.
24. Toth, L., L. Muszbek, and I. Komaromi, *Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM calculations*. *J Mol Graph Model*, 2013. **40**: 99-109.
25. Blobaum, A.L. and L.J. Marnett, *Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition*. *J Med Chem*, 2007. **50**(7): 1425-41.
26. Pedersen, A.K. and G.A. FitzGerald, *Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(19): 1206-11.
27. Bode-Boger, S.M., R.H. Boger, M. Schubert, and J.C. Frolich, *Effects of very low dose and enteric-coated acetylsalicylic acid on prostacyclin and thromboxane formation and on bleeding time in healthy subjects*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1998. **54**(9-10): 707-14.
28. Patrignani, P., P. Filabozzi, and C. Patrono, *Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects*. *J Clin Invest*, 1982. **69**(6): 1366-72.
29. Patrono, C., G. Ciabattini, P. Patrignani, F. Pugliese, P. Filabozzi, F. Catella, G. Davi, and L. Forni, *Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition*. *Circulation*, 1985. **72**(6): 1177-84.
30. Roth, G.J. and P.W. Majerus, *The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(3): 624-32.
31. Akay, O.M., Z. Canturk, E. Akin, C. Bal, and Z. Gulbas, *Aspirin-resistance frequency: a prospective study in 280 healthy Turkish volunteers*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2009. **15**(1): 98-102.

32. Frelinger, A.L., Y. Li, M.D. Linden, I. Tarnow, M.R. Barnard, M.L. Fox, and A.D. Michelson, *Aspirin 'resistance': role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(12): 2035-44.
33. Santilli, F., B. Rocca, R. De Cristofaro, S. Lattanzio, L. Pietrangelo, A. Habib, C. Pettinella, A. Recchiuti, E. Ferrante, G. Ciabattoni, G. Davi, and C. Patrono, *Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin "resistance"*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(8): 667-77.
34. Arazi, H.C., D.G. Doigny, R.S. Torcivia, H. Grancelli, S.V. Waldman, C. Nojek, M.C. Fornari, and J.J. Badimon, *Impaired anti-platelet effect of aspirin, inflammation and platelet turnover in cardiac surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010. **10**(6): 863-7.
35. Grove, E.L., A.M. Hvas, and S.D. Kristensen, *Immature platelets in patients with acute coronary syndromes*. Thromb Haemost, 2009. **101**(1): 151-6.
36. Henry, P., A. Vermillet, B. Boval, C. Guyetand, T. Petroni, J.G. Dillinger, G. Sideris, C.B. Sollier, and L. Drouet, *24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease*. Thromb Haemost, 2011. **105**(2): 336-44.
37. Rocca, B., F. Santilli, D. Pitocco, L. Mucci, G. Petrucci, E. Vitacolonna, S. Lattanzio, D. Mattoscio, F. Zaccardi, R. Liani, N. Vazzana, A. Del Ponte, E. Ferrante, F. Martini, C. Cardillo, R. Morosetti, M. Mirabella, G. Ghirlanda, G. Davi, and C. Patrono, *The recovery of platelet cyclooxygenase activity explains interindividual variability in responsiveness to low-dose aspirin in patients with and without diabetes*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(7): 1220-30.
38. Stahl, C., T. Staehelin, V. Miggiano, J. Schmidt, and P. Haring, *High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis*. J Immunol Methods, 1980. **32**(3): 297-304.
39. Hevessy, Z., G. Haramura, Z. Boda, M. Udvardy, and L. Muszbek, *Promotion of the crosslinking of fibrin and alpha 2-antiplasmin by platelets*. Thromb Haemost, 1996. **75**(1): 161-7.
40. Burch, J.W., N. Stanford, and P.W. Majerus, *Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin*. J Clin Invest, 1978. **61**(2): 314-9.
41. Patrono, C., G. Ciabattoni, E. Pinca, F. Pugliese, G. Castrucci, A. De Salvo, M.A. Satta, and B.A. Peskar, *Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects*. Thromb Res, 1980. **17**(3-4): 317-27.
42. Ciabattoni, G., J. Maclouf, F. Catella, G.A. FitzGerald, and C. Patrono, *Radioimmunoassay of 11-dehydrothromboxane B2 in human plasma and urine*. Biochim Biophys Acta, 1987. **918**(3): 293-7.
43. Halushka, M.K., L.P. Walker, and P.V. Halushka, *Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(1): 122-30.
44. Fan, L., J. Cao, L. Liu, X. Li, G. Hu, Y. Hu, and B. Zhu, *Frequency, risk factors, prognosis, and genetic polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene for aspirin resistance in elderly Chinese patients with cardiovascular disease*. Gerontology, 2013. **59**(2): 122-31.
45. Feher, G., A. Feher, G. Pusch, G. Lupkovics, L. Szapary, and E. Papp, *The genetics of antiplatelet drug resistance*. Clin Genet, 2009. **75**(1): 1-18.
46. Clappers, N., M.G. van Oijen, S. Sundaresan, M.A. Brouwer, R.H. Te Morsche, W. Keuper, W.H. Peters, J.P. Drenth, and F.W. Verheugt, *The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetyl salicylic acid*. Thromb Haemost, 2008. **100**(1): 70-5.

47. Goodman, T., A. Ferro, and P. Sharma, *Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **66**(2): 222-32.
48. Maree, A.O., R.J. Curtin, A. Chubb, C. Dolan, D. Cox, J. O'Brien, P. Crean, D.C. Shields, and D.J. Fitzgerald, *Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): 2340-5.
49. Grinstein, J. and C.P. Cannon, *Aspirin resistance: current status and role of tailored therapy*. Clin Cardiol, 2012. **35**(11): 673-81.
50. Kasmeridis, C., S. Apostolakis, and G.Y. Lip, *Aspirin and aspirin resistance in coronary artery disease*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): 242-50.
51. Linden, M.D., H. Tran, R. Woods, and A. Tonkin, *High platelet reactivity and antiplatelet therapy resistance*. Semin Thromb Hemost, 2012. **38**(2): 200-12.
52. Renda, G., M. Zurro, G. Malatesta, B. Ruggieri, and R. De Caterina, *Inconsistency of different methods for assessing ex vivo platelet function: relevance for the detection of aspirin resistance*. Haematologica, 2010. **95**(12): 2095-101.
53. Andersen, J.B., B. Koch, T.H. Nielsen, D. Sorensen, M. Hansen, O. Nybroe, C. Christophersen, J. Sorensen, S. Molin, and M. Givskov, *Surface motility in Pseudomonas sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi Rhizoctonia solani and Pythium ultimum*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 1): 37-46.
54. Kunicki, T.J., S.A. Williams, D.R. Salomon, P. Harrison, P. Crisler, P. Nakagawa, T.S. Mondala, S.R. Head, and D.J. Nugent, *Genetics of platelet reactivity in normal, healthy individuals*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): 2116-22.
55. Eugster, M. and W.H. Reinhart, *The influence of the haematocrit on primary haemostasis in vitro*. Thromb Haemost, 2005. **94**(6): 1213-8.
56. Favalaro, E.J., *The utility of the PFA-100 in the identification of von Willebrand disease: a concise review*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(5): 537-45.
57. Weiss, H.J. and B. Lages, *The response of platelets to epinephrine in storage pool deficiency--evidence pertaining to the role of adenosine diphosphate in mediating primary and secondary aggregation*. Blood, 1988. **72**(5): 1717-25.
58. McCabe White M, J.L., *Platelet Protocols*1999, New York: Academic Press.
59. Weber, A.A., K.C. Zimmermann, J. Meyer-Kirchrath, and K. Schror, *Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance*. Lancet, 1999. **353**(9156): 900.
60. Halushka, M.K. and P.V. Halushka, *Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A2?* Circulation, 2002. **105**(14): 1620-2.
61. Rocca, B., P. Secchiero, G. Ciabattini, F.O. Ranelletti, L. Catani, L. Guidotti, E. Melloni, N. Maggiano, G. Zauli, and C. Patrono, *Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): 7634-9.
62. Riondino, S., E. Trifiro, L. Principessa, S. Mascioletti, L. Di Renzo, C. Gaudio, L.M. Biasucci, F. Crea, and F.M. Pulcinelli, *Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A2 production*. Thromb Res, 2008. **122**(3): 359-65.
63. Muszbek, L., Kovács, E.G., Homorodi, N., Katona, E., Bereczky Z., Balogh L., Peterfy, H., Kiss, R.G., Édes I., Muszbek L., *Lack of aspirin resistance in patients with coronary artery disease*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. **11**(Supplement).
64. Fitzgerald, R. and M. Pirmohamed, *Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(2): 213-25.

65. Ho, P.M., J.A. Spertus, F.A. Masoudi, K.J. Reid, E.D. Peterson, D.J. Magid, H.M. Krumholz, and J.S. Rumsfeld, *Impact of medication therapy discontinuation on mortality after myocardial infarction*. Arch Intern Med, 2006. **166**(17): 1842-7.
66. Schwartz, K.A., D.E. Schwartz, K. Barber, M. Reeves, and A.C. De Franco, *Non-compliance is the predominant cause of aspirin resistance in chronic coronary arterial disease patients*. J Transl Med, 2008. **6**: 46.
67. Sweeny, J.M., D.A. Gorog, and V. Fuster, *Antiplatelet drug 'resistance'. Part 1: mechanisms and clinical measurements*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(4): 273-82.
68. Snoep, J.D., M.M. Hovens, J.C. Eikenboom, J.G. van der Bom, and M.V. Huisman, *Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(15): 1593-9.
69. Ofosu, F.A. *Appropriate Assessment of the Functional Consequences of Platelet Cyclooxygenase-1 Inhibition by Aspirin in vivo*. Thromb Res, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.11.025>.

# AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

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

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6.266

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

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

Debrecen, 2013.12.03



## **TÁRGYSZAVAK**

aszpirin

aszpirin rezisztencia

ciklooxygenáz

referencia módszer

trombocita

trombocita aggregáció

trombocita szekréció

tromboxán

## **KEYWORDS**

aspirin

aspirin resistance

cyclooxygenase

platelet

platelet aggregation

platelet secretion

reference method

thromboxane

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom Prof. Muszbek László akadémikusnak, témavezetőmnek, aki a Klinikai Kutató Központ igazgatójaként a kutatásaimhoz szükséges feltételeket megteremtve munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, értékes szakmai tanácsokkal látott el, pozitív hozzáállásával mindvégig biztatott és támogatott, felkeltette bennem az új ismeretek megszerzése iránti vágyat és kutatói gondolkodásmódra nevelt.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bereczky Zsuzsannának, aki hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokkal, észrevételekkel látott el, ötleteivel és szervezőmunkájával hozzásegített az akadályok leküzdéséhez.

A klinikus kollaborációs partnereinknek Prof. Édes Istvánnak és Prof. Kiss Róbert Gábornak, dr. Balogh Lászlónak és dr. Homoródi Nórának szakmai segítségnyújtásukért, nélkülözhetetlen, áldozatkész munkájukért vagyok hálás.

Köszönettel tartozom dr. Katona Évának és Csapó Juditnak a ciklooxigenáz-1 ellenes monoklonális antitesteket alkalmazó referencia módszer kifejlesztéséért és pótolhatatlan, precíz munkájukért.

Haramura Gizellának, Molnár Évának és Tóth Eszternek a trombociták tromboxán képző kapacitását meghatározó új referencia módszer fejlesztése során és nem utolsósorban a laboratóriumi technikák elsajátításában nyújtott segítségükért mondok köszönetet.

Kiemelném a Laboratóriumi Medicina Intézet vérvételi-, hemosztázis- és hematológiai labor dolgozóinak szívélyes és készséges segítségét. Ezúton köszönöm nekik.

Nem utolsósorban a Kardiológiai Intézet, a Klinikai Kutató Központ, és a Laboratóriumi Medicina Intézet lelkes dolgozóinak köszönöm meg, hogy az ismételt vérvételektől vissza nem riadva önzetlen önkéntes segítségüket nyújtották a tanulmányban való részvételükkel!

Végezetül külön köszönet illeti meg a kutatás ideje alatt mellettem kitartó családtagjaimat és barátaimat!

A tanulmány a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal Jedlik Ányos program és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 pályázat támogatásával valósult meg.

## FÜGGELÉK

### NEMZETKÖZI- ÉS HAZAI KONFERENCIÁKON TARTOTT ELŐADÁSOK, BEMUTATOTT POSZTEREK

**Kovács EG**, Bereczky Zs, Homoródi N, Katona É, Balogh L, Kiss RG, Shemirani AH, Haramura G, Péterfy H, Szőke G, Csapó J, Édes I, Muszbek L. Aspirin rezisztencia vizsgálata kardiovaszkuláris betegekben; valóban létezik-e a laboratóriumban?

Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság Kongresszusa, Alsópáhok, 2012.10.4-6.

**Kovács EG**, Bereczky Z, Balogh L, Homoródi N, Haramura G, Tóth E, Édes I, Muszbek L.

Development of reference methods for the evaluation of platelet response to aspirin. The lack of aspirin resistance among healthy volunteers.

21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Berlin, 15-19 May 2011

Bagoly Zs, Kerényi A, **Kovács EG**, Muszbek L, Kappelmayer J: A hemosztázis funkcionális vizsgálata, thrombocytá POCT.

Semmelweis Egyetem Intenzív Terápiás, Aneszteziológiai és Sürgősségi Továbbképző Orvoscongresszus (SIASTOK), Budapest, 2011.03.31–2011.04.02.

**Kovács EG**. Aspirin resistance: myth or reality? Final conclusions.

5th Winter Course on Clinical Research, Bad Kleinkirchheim, Austria, 2011.01.10-12.

**Kovács EG**, Bereczky Zs, Balogh L, Homoródi N, Haramura G, Tóth E, Édes I, Muszbek L. Aspirin rezisztencia kimutatására használt módszerek összehasonlítása egészséges önkénteseken.

„Öt év a klinikai kutatásban” című tudományos ülés, Debrecen, 2010.11.29.

**Kovács EG**, Bereczky Zs, Balogh L, Homoródi N, Haramura G, Tóth E, Édes I, Muszbek L  
Aspirin rezisztencia kimutatására használt módszerek összehasonlítása egészséges  
önkénteseken.

A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagygyűlése, Pécs, 2010.08.26-28.

Katona É, Csapó J, **Kovács EG**, Muszbek L. Acetilált és nem acetilált ciklooxygenáz-1  
azonosítása trombocitákban új monoclonális antitestek segítségével.

A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagygyűlése, Pécs, 2010.08.26-28.

Muszbek L, Bereczky Z, **Kovács EG**, Katona E, Balogh L, Homoródi N, Édes I. Aspirin  
resistance: myth or reality?

21st International Congress of Thrombosis, Milan, Italy, 2010.07.06-09

Katona E, Csapó J, **Kovács EG**, Muszbek L. Differentiation of acetylated and non-acetylated  
platelet cyclooxygenase-1 by newly generated monoclonal antibodies.

21st International Congress of Thrombosis, Milan, Italy, 2010.07.06-09

**Kovács EG**, Bereczky Z, Balogh L, Homoródi N, Haramura G, Tóth E, Édes I, Muszbek L.  
Detection of aspirin resistance among healthy volunteers; comparison of different methods.

21st International Congress of Thrombosis, Milan, Italy, 2010.07.06-09

**Kovács EG**. Comparison of different methods used for the detection of aspirin resistance  
among healthy volunteers.

4th Winter Course on Clinical Research, Tauplitz, Austria, 2010.01.10-12.

**Kovács EG**, Haramura G. Reference method for the detection of aspirin resistance.

4th Winter Course on Clinical Research, Tauplitz, Austria, 2010.01.10-12.

**Kovács EG.** Aspirin rezisztencia és kimutatására használt módszerek összehasonlítása egészséges önkénteseken. Laki Kálmán Doktori Iskola (LAKIDI) Doktorandusz hallgatóinak 2009. évi konferenciája, Debrecen, 2009.12.12

**Kovács EG,** Balogh L, Bereczky Zs, Homoródi N, Haramura G, Muszbek L: Aspirin rezisztencia kimutatására használt laboratóriumi módszerek összehasonlítása egészséges önkénteseken. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság Laki Kálmán Emlékülése, Abádszalók, 2009.09.26

Muszbek L, **Kovács EG,** Bereczky Z. Aspirin resistance and its laboratory diagnostics. 1st Congress of the Romanian Association of Medical Laboratories with International Participation, Tg. Mures, Romania, 24-27 June. 2009.

**Kovács EG.** Comparison of methods used for the detection of Aspirin resistance on healthy volunteers. 3rd Winter Course on Clinical Research, Palfau, Austria, 2009.01.22-24.