
Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták egészségeseekben és aggregációgátlót szedő betegekben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Ezer Erzsébet

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor

Témavezető: Dr. Molnár Tihamér



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

Pécs, 2019

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
1.1 Szubjektív előzmények és indíttatás	1
1.2. Vérlemezkék – Rövid történeti áttekintés	2
1.3. Vérlemezkék	5
1.3.1. Élettani alapok	5
1.3.1.1. Vérlemezkék szerepe a hemosztázisban	9
1.3.1.2. Immunfunkciók.....	14
1.3.1.3. Mikropartikulumok	16
1.3.2. Patofiziológia (Ateroszklerózis)	17
1.4. A vérlemezke és az aggregációgátlás.....	21
1.4.1. Az aggregációgátlás gyógyszerei	21
1.4.2. Az aggregációgátlás effektivitása.....	22
1.4.2.1. Terápiás válaszkészség	23
1.4.2.2. Maradék reaktivitás.....	24
1.4.3. Aggregációgátlás stroke esetén	25
1.5. Vérlemezke laborparaméterei és klinikai relevanciája	28
1.5.1. A mindennapi gyakorlatban használt laborparaméter – trombocitaszám.....	28
1.5.2. Speciális vérlemezke-paraméterek	29
1.5.2.1. Éretlen vérlemezke-alakok klinikai vonatkozásai	29
1.5.2.2. Átlagos vérlemezke-térfogat és klinikai vonatkozásai	33
1.5.3. Vérlemezke-funkció vizsgálata	34
1.5.3.1. Platelet function analyser	35
1.5.3.2. Áramlási citometria.....	37
1.5.3.3. Optikai aggregometria	38
1.5.3.4. Multiplate [®] Analyser	39
1.5.4. Antiszedimentációs technika	44
1.6. A vérlemezke morfológiájának vizsgálata	48
1.6.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	48
1.6.2. Atomerő-mikroszkópia.....	50
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	52
2.1. Trombociták flotációjának vizsgálata	52
2.2. Éretlen trombocitafrakció és átlagos trombocitaterfogat vizsgálata	52
2.3. Trombocitaaggregáció mérése	53
2.4. Trombociták transzmissziós elektronmikroszkópiái vizsgálata	53

2.5. Trombociták atomerő-mikroszkópos vizsgálata	54
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	55
3.1. Beválasztási kritériumok	55
3.2. Kizárási kritériumok mindkét tanulmányban résztvevők esetén	56
3.3. Trombocita flotációjának vizsgálata	56
3.4. Éretlen trombocitafrakció és az átlagos trombocitaterfogat vizsgálata.....	57
3.5. Trombocitaaggregáció mérése	58
3.6. A trombociták transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata.....	58
3.7. Atomerő-mikroszkópia	59
3.8. Statisztikai analízis.....	61
4. EREDMÉNYEK	62
4.1. Vérlemezkek funkcionális és morfológiai eredménye egészségesekben	62
4.1.1. Vérlemezkek funkcionális vizsgálatának eredményei.....	62
4.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálat	65
4.1.3. Atomerő-mikroszkópos felvételek eredménye	66
4.2. Clopidogrelt szedők és a kontroll csoport vizsgálati eredményei	68
4.2.1. Demográfiai és laboratóriumi eredmények	68
4.2.2. Vérlemezke antiszedimentációs ráta	69
4.2.3. Impedancia-aggregometria betegekben és egészségesekben	69
4.2.4. Vérlemezke paraméterek és impedancia aggregometria betegekben	71
4.2.5. Reszponder vs non-reszponder betegek	72
5. DISZKUSSZIÓ	74
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, ÖSSZEGZÉSEK.....	78
6.1. Új megállapítások.....	78
6.2. Összegzés	81
7. A KUTATÁS KORLÁTAI	82
8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	83
9. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	86
10. ÁBRÁK JEGYZÉKE	87
11. IRODALOMJEGYZÉK	89
12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	104
13. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	105
13.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemény.....	105
13.2 Az értekezés alapjául szolgáló, elbírálás alatt álló közlemény	105
13.4 Más témában megjelent közlemények	105

13.5	Könyvfejezet magyar	108
13.6	Könyvfejezet angol	108
13.7	Könyvfejezet német	109
13.8	Magyar folyóiratban megjelent közlemények.....	109
13.9	Kongresszusi előadások/postterek nyomtatásban megjelent összefoglalói...	110

1.BEVEZETÉS

1.1 Szubjektív előzmények és indíttatás

A Pécsi Idegsebészeti Klinika Intenzív Osztályán az általunk kezelt betegek közt a daganatos és subarachnoidealis vérzés mellett nagy arányban fordult és fordul elő súlyos koponyasérülés is. Ez utóbbi betegcsoport epidemiológiai vizsgálata során megállapítható, hogy a hazai betegpopuláció fokozottan terhelt mind légzőszervi, mind keringési, illetve anyagcsere-betegségekkel. Kiemelkedően magas az antikoagulált betegek aránya is, mely nagyban befolyásolja és rontja a kimenetelt. Ezen utóbbi problémával számos esetben találkoztunk mi is, így évek óta a kezelésünk egyik alappillére az alvadási státusz monitorozása és korrekciója volt.

Az utóbbi évek során a javuló sürgősségi ellátás és stroke-diagnosztika, valamint az endovaszkuláris technika fejlődése következtében osztályunkon növekvő számban látunk el a súlyos koponyasérültek mellett iszkémiás stroke-ot szenvedett beteget is. Az antikoagulálás és trombocitaaggregációt gátló kezelés stratégiája módosult az idők folyamán, egyre több betegünk áll a véralvadást befolyásoló kezelés alatt balesete, ill. ictusa idején.

Szerencsés helyzetben voltunk, 2013 óta lehetőségünk van a Multiplate készülékkel bedside trombocitaaggregáció mérésre, így a klinikai képet módunkban volt egzakt adatokkal együtt megítélni. A trombociták viselkedésének, a klinikai sokféleségének tapasztalása vezetett ahhoz az igényhez, hogy e kérdésben mélyebben elmerüljek. Régóta foglalkoztatott továbbá az a gondolat is, hogy a Bogár Lajos professzor által igazolt Leukocyta Antiszedimentációs Ráta (LAR) analógiájaként a trombociták ilyen jellegű viselkedését is tanulmányozzam.

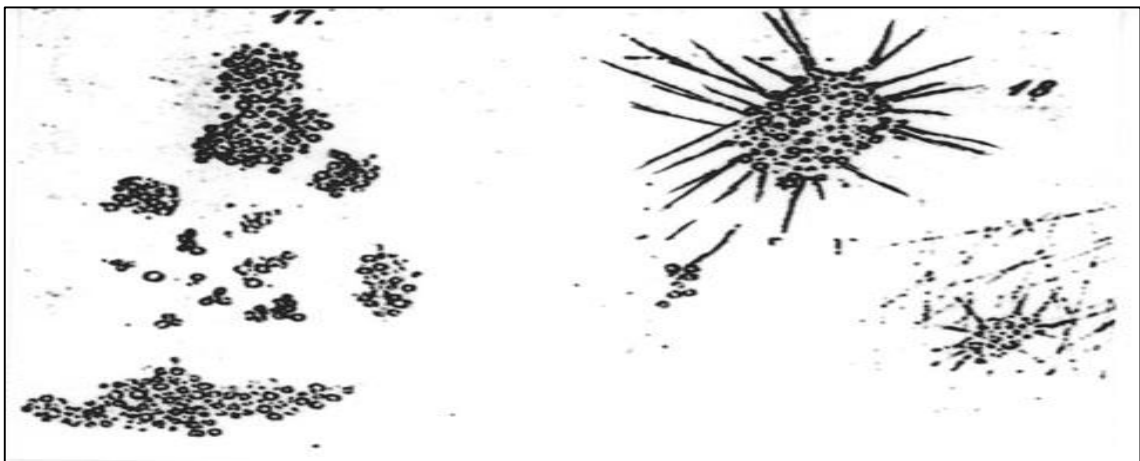
Korábban a PhD tervem a súlyos koponyasérültek adatbázisának (koagulopathia és kimenetel) feldolgozása volt. Mivel ez számos akadály miatt technikailag nem volt lehetséges, ezért egy nem kevésbé izgalmas téma felé fordultam: tudományos érdeklődésem fókuszába a trombociták aggregációban betöltött szerepének mélyebb megértése került.

1.2. Vérlemezkek – Rövid történeti áttekintés

A véralvadáshoz kapcsolódó első megfigyelés a két évezreddel ezelőtt élt görög filozófus Platón nevéhez fűződik. Ő volt az első, aki leírta, hogy amint a vér elhagyja a test hőjét, vérszálakat (fibrin) képez. Platón nézetét a véralvadásról más korabeli és későbbi filozófusok is osztották egészen a 19. századig, amikor is úttörő felfedezések láttak napvilágot a koaguláció vizsgálata terén (1).

1841. George Gulliver először rajzolta le a trombocitákat, az 1830-ban Joseph Jackson Lister által feltalált ikerlencsés mikroszkópban látott kép alapján. 1842. William Addison látótérbe hozta és lerajzolta a trombocita-fibrin trombus (2).

A német születésű Max Schultze (Freiburg, 1825) tudományos vizsgálódásainak célja nem a vér összetevőinek elemzése volt, hanem a hőmérséklet emelésének hatására bekövetkező protoplazma változás leírása. Mindeközben észlelte – saját és más, különböző korosztályú személyeknél – a szabálytalanul képződő, sok kis kerek, színtelen gömbökből álló, különböző méretű „csomókat” (1. ábra). Megállapította, hogy az egyes gömbök különböző méretűek, 6-8x kisebbek (0.001-0.002 mm), mint a vörösvértestek, s felismerésük csak erős lencsével lehetséges. Ezen megfigyelését a saját maga alapította „*Archiv für mikroskopische Anatomie*” című újságban (Bl. I.1965.S.36.) írta le „*Arbeit über die Histologie des Blutes*” címen azzal a megjegyzéssel, hogy ajánlja további elemzésre azoknak, „akik érintettek az emberi vér tanulmányozásában”.

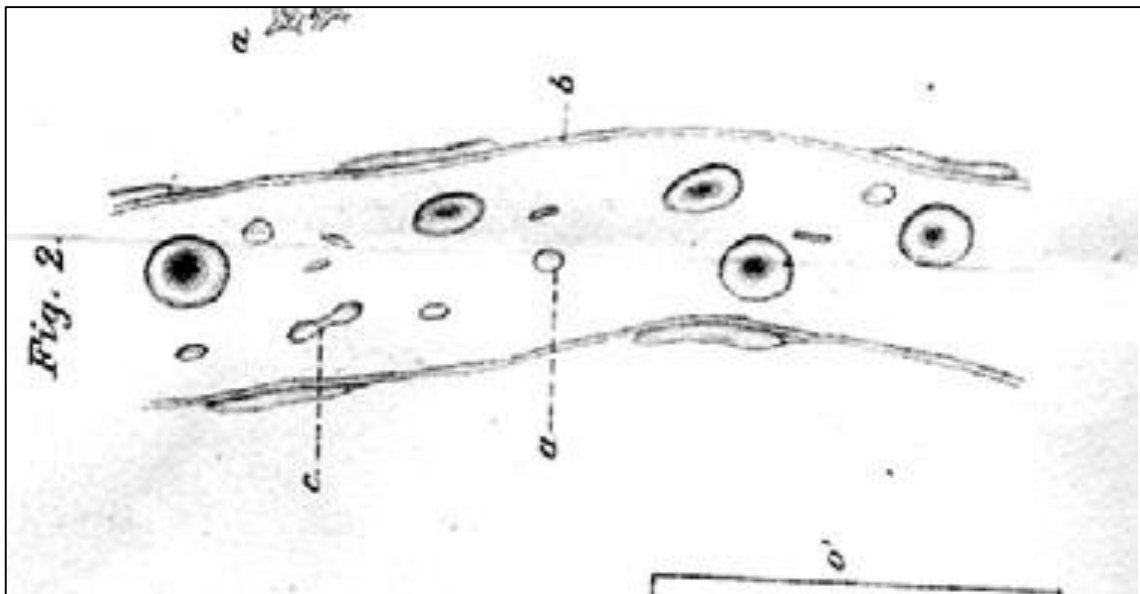


Schultze's figures 17 (left) and 18 (right). Schultze's legends:
Fig. 17. The granular formations which often occur in larger collections in normal human blood.
Fig. 18. The same after the fibrous material of the drop of blood has clotted under the cover slip.
Source: Schultze (1865).

1. ábra: Schultze eredeti ábrája és eredeti angol leírása az általa kis, kerek gömbként jellemzett „harmadik” elemről

A vérben található „harmadik” elemnek, azaz a vérlemezkének az elnevezése (piastrine, lille plates) és funkciójának vizsgálata az olasz származású orvos és tudós Giulio Bizzozero (1846, Varese) nevéhez fűződik. Munkájában tovább folytatta Schultze eredményeinek vizsgálatát és 1882-ben, egy nagy összefoglalóban olasz és német nyelven is leírta a vérlemezke funkcionalitását a véráramban, valamint az összefüggést a vérlemezke adhézió, az aggregáció és az ezt követő fibrin képződése és lerakódása között (3).

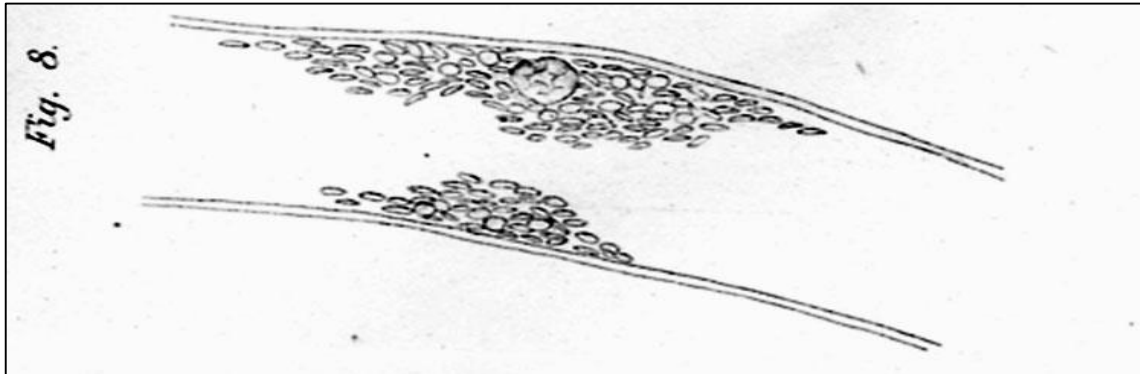
Megállapította, hogy a vörös- és fehérvérsejtek mellett egy harmadik morfológiai elem is kering véredényekben. Formájukat tekintve nagyon vékony lemezkék, korong, ritkán lencse alakúak, párhuzamos felületekkel, s átmérőjük 2-3-szor kisebb, mint a vörösvértesteké (2. ábra).



Bizzozero's figure 2. A small artery in the mesentery of a guinea pig in which the circulation has been stopped. The clarity of the area illustrated is due to the very few red cells present. (A) Surface view of a platelet; (B) the same in profile view; (C) red blood cell (Gundlachimmersion No. VII). Source:

2. ábra: A vér alakos elemeinek (vérlemezke felszíni képe: B) sematikus ábrázolása és eredeti angol jellemzése Bizzozero munkájából

Bizzozero nemcsak a vérlemezkek morfológiáját vizsgálta, hanem leírta azt is, hogy érsérülés esetén a vérárammal a sérülés helyére áramlanak, kezdetben 2-4-6, majd rövid idő múlva több százra emelkedik számuk, majd a trombus eléri azt a nagyságot, amivel kitölti az ér lumenét, megakadályozva a további véráramlást (**3. ábra**).



Bizzozero's figure 8. Two small mural thrombi formed in a small artery in the mesentery of a guinea pig. In the larger thrombus one sees a white cell amongst the platelets (Gundlach No. VII immersion). Source: Bizzozero (1882a).

3. ábra: Érfali trombusképződés sematikus ábrázolása és eredeti angol leírása Bizzozero által

1883-ban Hayem összefüggést talált a vérlemezke és a bőrben kialakuló purpura közt (TTP: trombotikus trombocitopéniás purpura). A 20. századtól rohamos léptekben haladt a vérlemezke véralvadásban és egyéb élettani folyamatokban játszott szerepének tisztázása. 1923-ban Roskam felfedezte, hogy összefüggés van trombociták, a fibrinogén és az alvadási kaskád közt. 1960 körül Hugues és Bounameaux Liégeben arra a következtetésre jutott, hogyha a kötőszövetben lévő kollagén felszabadul, akkor az trombocita aktivációhoz vezet.

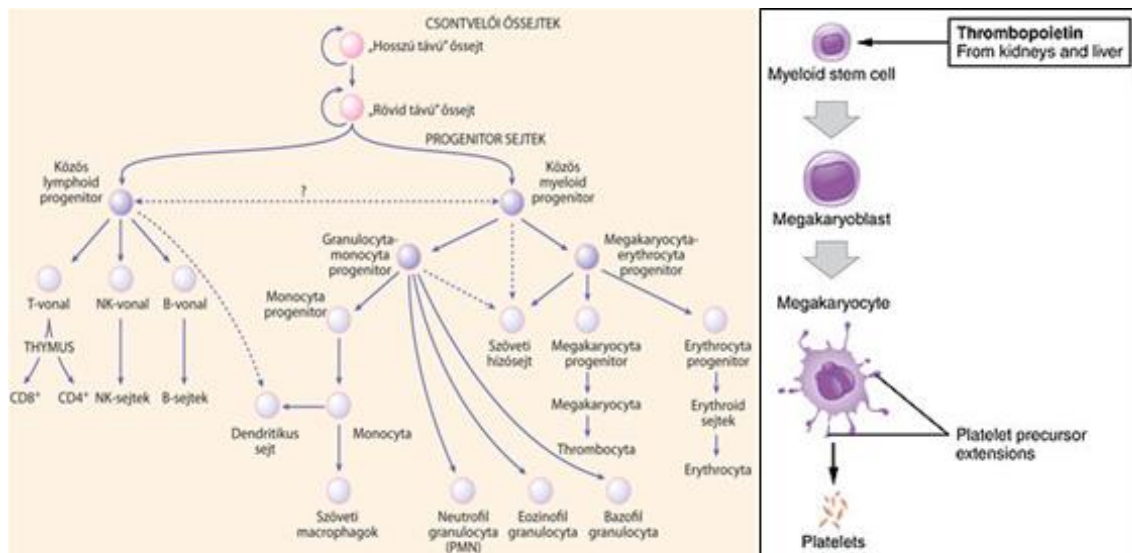
1962-63-ban Born és Cross nevéhez fűződik az optikai aggregometria, melynek elve az, hogy a trombus formáló vérlemezkek optikai denzitása csökkent. 1964-ben Gaarden, Lalane a Nature-ben publikálta, hogy az ADP egy potens induktora a trombocitaaggregációnak. 1967-69-ben Aledorf megállapította, hogy ASA hatásban a vérzési idő megnyúlik. Az 1990-es évektől kezdve a molekuláris biológia fejlődésével az intracellularis szignáltranszdukciós mechanizmusok kutatása indult el, a vérlemezkek gyulladásban betöltött szerepét (trombocita-leukocita interakció) nézték, valamint azt, hogy milyen szerepük van a tumorigenezisben, metasztázisképződésben, valamint a vizsgálták a trombociták hatását a transzplantált szervek rejekciójában (2,5).

1992-ben látott napvilágot a „cell-based model”, mely értelmében a hemosztázis egyensúlyát az aggregáció-antiaggregáció, koaguláció-antikoaguláció, fibrinolízis-antifibrinolízis folyamatok tartják fenn (1).

1.3. Vérlemezkek

1.3.1. Élettani alapok

A vérben keringő trombociták a csontvelőben lévő megakariocitákból keletkeznek, egy összetett folyamat következményeként (4. ábra). A megakariopoesis során a megakariociták differenciálódnak, plazmamembránból és sejtplazmából álló nyúlványokat, állábakat (pszeudopódium) képeznek a csontvelői szinuszoidok üregébe (6). Ezek a nyúlványok a trombopoézis során lefűződnek, és mint trombociták (vérlemezkek) kerülnek a keringésbe (6,7,8). Egy megakariocita 5000-10000 trombocita képzésére képes (9). A megakariopoesis, trombopoézis (kb. 5 nap) számos citokin és növekedési faktor által szabályozott, melyek közül a trombopoetin játssza a kulcsszerepet (8).



Fonyó A, Medicina Könyvkiadó Zrt.(2011), 8. fejezet, V.rész

4. ábra: A vérsjtképződés folyamata. A megakariocita-eritrocita progenitor sejtől indul ki a trombocitaképzés

A keringésbe jutott – a csontvelőben naponta kb. 10^{11} képződik – érett trombocita sejttag nélküli, 2-5 μm átmérőjű, diskoid, bikonvex alakú testecske. Hozzávetőleg 2/3 a vérben kering, 1/3-a a lépben raktározódik. Egy egészséges egyén vérében $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ vérlemezke cirkulál. Élettartamuk 7-10 nap, s ha nem szekvesztrálódnak a vérzés és/vagy gyulladás helyén, életciklusuk végén a máj és a lép makrofágjai kiürítik őket (4,8,9,10,11).

A vérlemezke főbb szerkezeti egységei (5. ábra):

1. Perifériás zóna:

Plazmamembrán: kétrétegű, fehérjéből és lipidekből álló egység. Fő lipide a foszfolipid, mely a membrán domináns szerkezeti eleme, és fontos sajátossága az, hogy a vérlemezke aktiválódása során egy anionos, negatív töltésű foszfolipid, a foszfatidil-szerin kerül a felszínre, mely a VIII és IX valamint a X és V. koagulációs faktorok enzimikus folyamatait több nagyságrenddel képes gyorsítani (10,11). A plazmamembrán szelektíven permeábilis, a kettős rétegű foszfolipid támogató funkciót tölt be a belső rész aktiválásában és a külső terület aggregációban való részvételében.

Glikokalix: A trombociták felszínét egy negatív töltésű, 20-30 nm vastagságú (vastagabb, mint a leukociták és eritrociták felületi rétege) réteg képezi, mely főleg oligo- és poliszaharidokból, valamint fehérjéből, főleg fibrinogénből áll. A vérlemezke felszíne fiziológiás környezetben negatív töltésű marad, így akadályozva azt, hogy kölcsönhatásba kerüljön a szintén negatív töltésű endotéllel (10,11).

2. Membrán szerkezet

A plazmamembrán behatol a vérlemezke belsejébe, ezáltal a felülethez kapcsolódó úgynevezett „*csatorna rendszer*” (SCCS: Surface-Connected Canalicular System) kialakítva biztosítja, hogy azon keresztül a vérlemezkében tárolt hemosztatikus fehérjék a glikokalixra jussanak. Párhuzamosan és szorosan illeszkedve a SCC rendszerhez található az endoplazmás retikulum maradványaként funkcionáló zárt *tubulusrendszer* (DTS: Dense Tubular System), amely elsősorban a Ca^{2+} szekvesztrációban vesz részt a G-proteinhez kapcsolt PAR-1 receptor aktiválásával.

A trombociták membránjában több mint 50 féle receptor található. A hemosztázisban résztvevő receptorok közül kiemelendő a von Willebrand-faktor *adhéziós receptora*, a GP-Ib-V-IX (~40000/trombocita), valamint a kollagén/fibronektin GP-Ia-IIa receptor. Az *aktivációs receptorokhoz* tartozik a már alacsony trombinkoncentrációnál is gyors folyamatként aktív kötést biztosító PAR-1 (proteáz aktivált receptor-1) és a magasabb trombinkoncentrációnál lassú folyamatként működésbe lépő PAR-4. A vérlemezke aktiválásában kiemelkedő szerepe van két purinerg receptornak, az aktiváció kezdeti fázisában a P_2Y_1 receptornak, a későbbi aktivációs szakaszban pedig a gyógyszercélpontként is szolgáló P_2Y_{12} -es receptornak.

Ezekhez a dense granulumból felszabaduló ADP kötődik. Az aktiválásban fontos tényező még az adrenalin (epinephrin), amely az α_2 receptoron keresztül fejt ki hatását a vérlemezék cAMP szintjének csökkentésével, potenciálja emellett az ADP, trombin és a TXA₂ (tromboxánA₂) hatását. A szerotoninreceptoron kötődő szerotonin (5-HT: 5-hidroxitriptanin) feladata a vérlemezke Ca szintjének növelése, aktiválása, ezáltal az aggregáció erősítése. A legfontosabb *aggregációs receptor* a GP-IIb/IIIa, mely csak az aktivációt követően kerül a membrán felszínére és válik működőképpé (affinitása nyugalomban alacsony) azáltal, hogy bivalens ligandja a fibrinogén hídként köti össze a trombocitákat. A GP-IIb/III/a receptorok száma magas, kb. 40-80000/vérlemezke (9,10,11).

3. Struktúr zóna (vérlemezke citoskeleton)

A *mikrotubulusok* körkörös kötegei tartják fent a vérlemezke diszkoid alakját, s ezek párhuzamosak a külső felület síkjával. Hidegben a mikrotubulusok szerkezete megváltozik, következményképp a vérlemezke kerek formát vesz fel, azonban 37 °C -n ismét visszanyeri eredeti diszkoid állapotát. A mikrotubulusok és a membrán közti keskeny sávot aktinból képződött *mikrofilamentumok* vastag hálózata tölti ki, mely kontraktilitásával rögzíti a plazmamembrán glikoproteineket és proteoglikánokat (10). A citoplazma 8-12 nm átmérőjű *intermedier filamentumokat* is tartalmaz, melyek kapcsolódva az aktinnal és a tubulusokkal a vérlemezke alakváltozásának szabályozása mellett befolyásolják a pszeudopódiumok kiterjedését és a granulomok tartalmának szekrécióját.

4. Organellum zóna

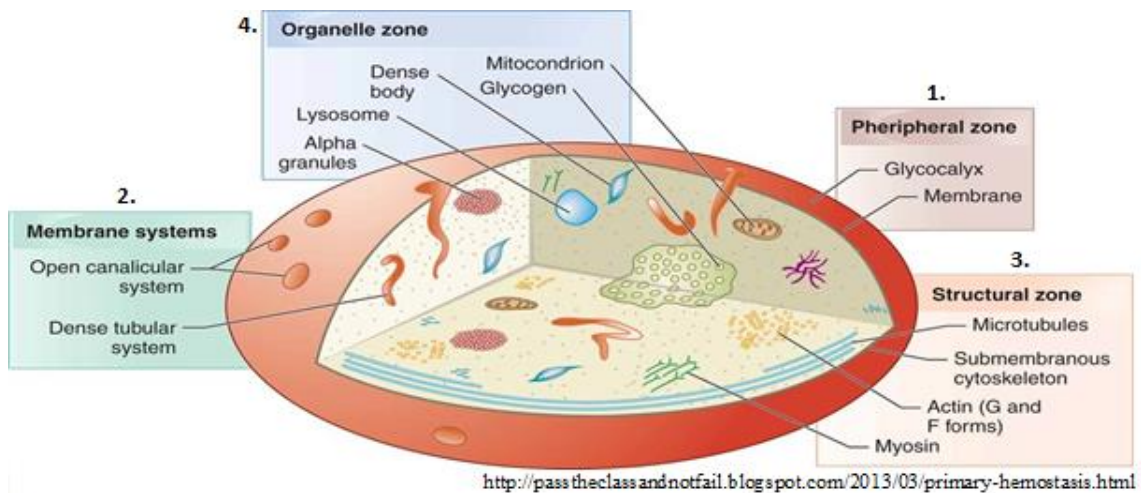
A vérlemezke plazmájában három különböző típusú szekretoros granulum található: α -granulum, dense granulum és lizoszóma.

α -granulum: egy trombocitában kb. 50-80 (volumenének 10%-át adja) α -granulum található, 10x több, mint a dense granulumok száma. Miután a vérlemezke aktiválódik, a α -granulum membránja fuzionál a SCCS-sel és tartalma azon keresztül a mikrokörnyezetbe áramlik, segítve az adhéziót, aggregációt és támogatva plazma koagulációs folyamatait. Tartalmazza egyrészt az adhézióhoz szükséges vWF-t, fibronektint, trombospondint, valamint a plazma koaguláns fibrinogént, V., VIII., XI. faktorokat, valamint a nagy molekulatömegű kininogént. Emellett antikoaguláns (α_2 -makroglobulin), fibrinolitikus (plazminogen) és antifibrinolitikus (α_2 -antiplazmin, PAI-

1) elemek is találhatóak benne, valamint tárolják a prokoaguláns trombocita 4-faktort (10,11,12).

dense granulum: számuk trombocitánként 2-7, a megakariocita differenciálódás folyamán később alakulnak ki, mint az α -granulumok. A dense granulumok különböző hemosztatikusan aktív, nem fehérje jellegű molekulákat tárolnak, melyek a vérlemezke aktiválódása folyamán szekretálódnak. Ezen közé tartozik a szerotonin, mely vazokonstriktor, az endotelsejtet köti össze a vérlemezke-membránnal, a Ca^{2+} és Mg^{2+} , mely az aggregációs alakváltozáshoz fontos, valamint segíti, támogatja a vérlemezke aktivációját és a koagulációt. Az aggregáció folyamatának további erősítését szolgálja a granulumban található ATP és ADP is. Az ADP fontos szerepet tölt be a szomszédos vérlemezkével való aggregációban azáltal, hogy a felszíni P_2Y_1 és a P_2Y_{12} receptorhoz kötődik (10,11).

A harmadik granulomtípus a 300 nm átmérőjű, neutrophilekhez hasonló **lizoszóma**. Arilszulfatázt, β -glucuronidázt, foszfátázt és prozetázt (catepszin) tartalmaz. Valószínű, hogy az *in vivo* aggregáció folyamán megemészti az érfalmátrix komponenseit és a keletkező törmelégeket is (8,10,12).



5. ábra: A vérlemezke főbb szerkezeti egységeinek sematikus ábrázolása

A trombociták régóta ismert, „elsődleges” funkciója a primer hemosztázis (adhézió, aktiváció és aggregáció) fenntartása az érpályán belül. Ezen fő funkció mellett azonban számos egyéb élettani szerepe is van a vérlemezkeknek, mint pl. az immunfunkció és a mikropartikulumképzés.

1.3.1.1. Vérlemezkék szerepe a hemosztázisban

1.3.1.1.1. Fiziológias hemosztázis

A hemosztázis (hemo+osztázis) a vérzés és a vérzés megállítására, csillapítására vonatkozó kifejezés. Összetett szabályozó rendszerét az endotelium, a máj és a csontvelő által termelt alakos elemek, vérplazma aktív alvadási tényezői alkotják. 1992-ben látott napvilágot a „cell-based model” fogalma, mely értelmében dinamikus az egyensúly az aggregációs-antiaaggregációs, koagulációs-antikoagulációs, fibrinolitikus-antifibrinolitikus folyamatok között (1,2). Ezen hemosztatikus folyamatok legfontosabb feladata, hogy 1., érfalsérülés esetén rögzépződéssel „zárja” a megszakadt folytonosságot, ezáltal akadályozva a további vérvesztést, 2., a vért „folyékony” állapotban tartsa, valamint 3., a vaszkuláris integritás helyreállítása után eltávolítsa a képződött alvadékat.

A hemosztázist didaktikusan három fő részre oszthatjuk fel (2,3): primer hemosztázisban (**6. ábra**) a trombociták a kulcsfontosságú elemek, a szekunder hemosztázisban vesznek részt a vérplazmában található alvadási faktorok által biztosított koagulációs folyamatok, míg a terciér az alvadék feloldását, a fibrinolízist jelenti.

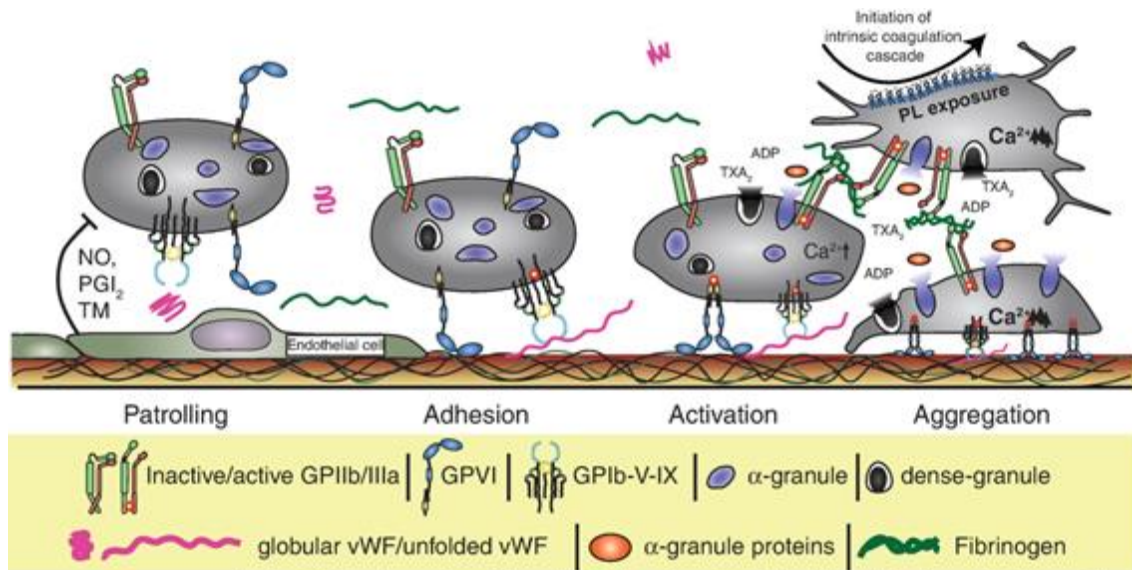
A vérlemezkék normál, élettani körülmények közt inaktív formában keringenek az érpályában, felszínükön azonnali adhézióra, aktivációra képes GP-II/b/IIIa és GP-VI receptorokkal. Sérülés, vérzés esetén a primer hemosztázis során trombocitadugót alakítanak ki, ezzel megakadályozva az intravaszkuláris volumendepléciót, majd a későbbi szekunder hemosztázisban is fontos feladatuk van: biztosítják az alvadék lokalizációját és facilitálják a fibrin kialakulását, valamint hozzájárulnak a vérrög retrakciójához is (3,4,5).

A vérlemezkék véralvadásban gyakorolt működése három részre osztható fel:

1. **Adhézió**nak nevezzük a vérlemezkék kapcsolódását más struktúrákhoz, jelen esetben az endotélhez. A vérplazmában inaktív formában keringő von Willebrand-faktor (VIII. faktor) érfalsérülés esetén a szabaddá váló kollagénhez kapcsolódik. A véráramlás során kialakuló nagy nyíróerők révén aktiválódik és kapcsolódik a trombociták GP Ib-IX-V receptorához, az így kialakult komplex a vérlemezkéket sérült érfalhoz köti (3,5,6,8).
2. Az adhézió során intracelullárisan Ca^{++} emelkedés alakul ki, amely elindítja az **aktivációt**. A tartósan fennálló intracelulláris hiperkalcémia

összetett, energiaigényes folyamatok megindulását facilitálja. Aktiváció magába foglalja a vérlemezkék alakváltozását, a membránszerkezetben kialakuló változásokat, valamint a tárolt és de novo képződő mediátorok szintézisét, véráramba történő emisszióját. Az aktiváció pozitív feedback hurokként értelmezhető folyamat, melyet a véralvadási folyamat során termelődő anyagok receptorokhoz történő kapcsolódása idéz elő, kiemelendő a PAR-1 receptor és trombin kapcsolódás, ADP kapcsolódása az ADP (P₂Y₁, P₂Y₁₂) receptorokhoz, továbbá a TXA₂-TXA₂ receptorinterakció (6). A nyugvó trombociták felszíne sima, aktiváció során apró kis tüskék alakulnak ki, melyek során erős vérlemezke-fibrin-vérlemezke kapcsolat alakul ki. Expresszálódik az aggregációhoz szükséges GP-IIb/IIIa receptor is. Membránszerkezet is megváltozik, a foszfatidil-szerin felszínre kerülésével lokális erős negatív töltés alakul ki a vérlemezkék felszínén, ezzel facilitálva a faktorok, faktorkomplexek (tenáz, protrombináz) működésének hatékonyságát (4,5,6). A szekreteros granulumok degranulációjuk során a bennük tárolt anyagok koncentrációja lokálisan megnő, parakrin módon további vérlemezkéket vonzva a trombus felszínére. Autokrin módon tromboxánszintézis indul meg, ami lokálisan vazokonstriktiót okoz, valamint további trombocitaaktivációt- és aggregációt indukál.

3. **Aggregációnak** nevezzük a trombociták egymáshoz csapódását. A vérlemezkéket a glikoprotein IIb/IIIa receptorokhoz kapcsolódó bivalens fibrinhidak kötik össze. Az aggregációs kapacitást tudjuk mérni *ex vivo*, ezáltal jutunk indirekt következtetésekre a primer hemosztázist illetően.



6. ábra: A primer hemosztázis élettana. Sérülést, vérzést követően a vérlemezke kapcsolódik az endotélhez (adhézió), majd az aktivációt követően létrejön az aggregáció

1.3.1.1.2. A „vérelégtelenség” kórélettana

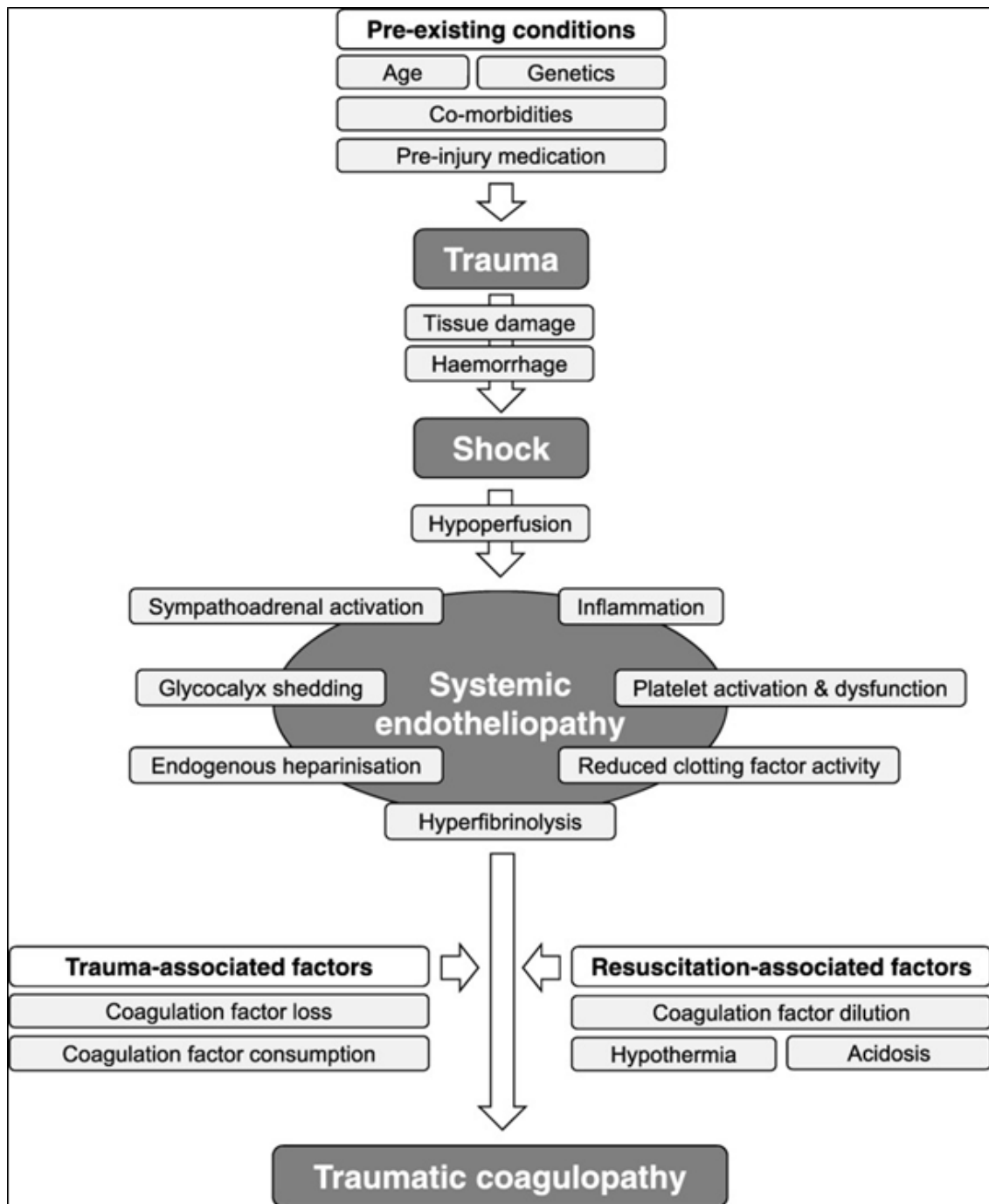
A traumás sérülések – kardiovaszkuláris halálokok mellett – továbbra is vezető halálökként szerepelnek a világstatisztikákban, és a betegek 40%-ában a súlyos kivérzés tehető felelőssé a rossz kimenetelért. A sürgősségi osztályra vérzéssel, véralvadási zavarral érkezők túlélési esélye szignifikánsan rosszabb, mint a megtartott hemosztázissal jelentkező betegek kimenetele. A masszív vérzés talaján kialakult komplex patofiziológiai katasztrófa háttérében a vérzés okozta súlyos oxigénadósság és a következményes „vérelégtelenség” („haemorrhagic blood failure”) kialakulása áll (9).

Egy új, az utóbbi években napvilágot látott megközelítések szerint a vér, mint szervrendszer fogható fel, mely sokkal komplexebb és dinamikusabb, mint bármelyik másik szervrendszerünk. Alapját a mintegy 10^{13} sejt által alkotott, megközelítőleg 4000-7000 m² területet kitevő endotélium és a vele felbonthatatlan egységet képező vér adja, mely jól definiált, szövetspecifikus funkciókkal rendelkezik: a hemosztázis regulációja, a pro- és az antiinflammatoros egyensúly beállítása, az oxidáns-antioxidáns effektusok pufferelése és a vazoreguláció. Ezen felsorolt funkciók összehangolásában számos egyéb szerv (elsősorban a csontvelő, a máj, a vegetatív idegrendszer) is részt vesz, az említett egyensúlyok végső homeosztátikus beállítása a vér-endotél egység szuverén feladata. Az említett egység (az angolszász szakirodalomban: „blood-endothel unit”) specifikus élettani szerepe akkor mérhető fel leginkább, mikor funkciói kiesnek, azaz

manifesztálódik a vér „elégelensége”. A vér-endotél egység diszfunkciójának legfontosabb okozója az oxigénadósság.

Az előrehaladott oxigénadósság talaján kialakult patofiziológiás folyamatok (iszkémia, reperfüziós károsodás, oxidatív stressz, diszregulált gyulladási válasz) a szervek károsodásához, végső soron szervelégtelenségekhez (tudat, légzés, vese, máj, keringés) vezethetnek. A többi szervhez hasonlóan a vér-endotél egysége is sérül: romlik az oxidáns-antioxidáns effektusok pufferelése, diszregulálttá válik a pro- és az antiinflammatoros egyensúly beállítása, sérül a mikrocirkuláció szabályozása, romlik az érfal átteresztőképessége (kapilláris „leak” alakulhat ki), trombocitadiszfunkció jön létre (9). A folyamat progressziójával párhuzamosan kifejlődik a koagulopátia is. Az endotél, valamint a vér celluláris és molekuláris elemei közötti koordinált együttműködés teljes megbombolása véralvadási zavarhoz, valamint a vérzés progressziójához vezet. A súlyos hipoperfüzió és oxigéndeficit talaján kialakult endotelopátiát és a következményes akut traumás koagulopátiát (**7. ábra**) együttesen nevezzük „vérelégtelenségnek”. A vérlemezke-diszfunkciót tovább rontja a hipotermia, valamint a folyamat előrehaladtával kialakult az acidózis (9,10,11).

A súlyosan vérző betegek esetén ezért a legfontosabb feladatunk a vérzésforrás definitív ellátásáig az azonnali vérzéscsillapítás mellett az oxigéndeficit és a hipoperfüzió mielőbbi rendezése (kevés folyadék + korai vazopresszor) illetve a hipotermia elkerülése.



S pahn et al: *Crit Care* 2019; 23: 95

7. ábra: A „vérelégtelenség” („haemorrhagic blood failure”), traumás koagulopátia kialakulásának folyamata. A trauma következtében fellépő vérzés, szövetkárosodás hipoperfúzióhoz vezet, mely következtében kritikus oxigéndeficit alakul ki. Az alacsony szöveti oxigénszint endotheliopátiát okoz, a vaszkuláris permeabilitás fokozódni kezd, trombocitadiszfunkció, hiperfibrinolízis jön létre. A koagulopátia kialakulását befolyásolja az alvadási faktorok vesztese, elhasználódása, a hipotermia és az acidózis.

1.3.1.2. Immunfunkciók

A vérlemezkéknek nem csak a hemosztázisban, hanem az immunitásban is fontos szerepük van. Két évtizeddel ezelőtt fedezték fel, hogy a vérlemezkék felszínén egy nagyon fontos ligand, a CD44L helyezkedik el, melyet a T-sejtek használnak fel a B-limfocita aktivációja során. Morell és munkatársai 2014-ben közölték, hogy a vérlemezkék felszínén többféle, az immunfolyamathoz kapcsolódó receptor és ligand található (**1. táblázat**). Ezt követően még számos, az immunfolyamatokért felelős molekulát sikerült a trombociták felszínén azonosítani. Ilyenek például a humán P-szelektin, a Toll-like receptorok, scavenger receptorok, Siglecs, komplement receptorok, valamint az immunoglobulin receptorok közül az Fc- ϵ a-RI és az Fc-gamma-RIII (23,24,25,26).

A trombociták intracelluláris tartalma kompartmentalizált, különféle szekretoros granulumokban (alfa, dense és a lizoszómák), különféle anyagok tárolódnak. A szekretoros granulumok tartalma egyrészt a megakariociták által szintetizált, csak tárolt anyag, míg vannak de novo szintetizált anyagok is a már meglévő mRNS-ekből, például ilyen az IL-1b (Interleukin-1b). Proteomikai tanulmányok bizonyították, hogy a vérlemezkék kb. 300 féle különböző mediátort tartalmaznak, míg a genomikai analízisek azt igazolták, hogy a trombocitákban 9500 mRNS ismert, melyeken proteinkódoló lókuszok helyezkednek el (23,24,25,26).

Az α -granulumok főleg protein mediátorokat tartalmaznak, melyek igen diverz hatással rendelkeznek, vannak köztük alvadási faktorok (fibrinogén, von Willebrand-faktor, V. faktor), kemokinek (PF4: platelet factor 4, CXCL7) és adhéziós molekulák is (P-szelektin, alfa-IIb-béta3). Funkcionalitás szempontjából elmondható, hogy a trombociták potenciálisan a mediátorok széles repertoárját képesek szekretálni. Ezek között vannak olyan anyagok, melyek letálisak a patogénekre, ide tartoznak a különböző antimikrobiális faktorok, mint például a PF4 és a CCL5, proteázok, elasztázok. A granulumokban lévő molekulák közül az immunitásért felelnek a különböző adhéziós molekulák és sejtfelszíni receptorok, amelyek elősegítik a trombociták interakcióját a különféle sejtekkel (23,24,25,26).

IMMUNITÁS	IMMUNREGULÁCIÓ
C3 + C4 PREKURZOROK	C1 INHIBITOR
KOMPLEMENT FAKTOR D	KOMPLEMENT FAKTOR H
CXCL-7 DERIVÁTUMOK (PBP, TAP-III, TROMBOCIDIN-1,-2, BÉTA TROMBOGLOBULIN)	TIMP-1,-4
IMMUNGLOBULIN G	
MMP-1,-2,-9	
TIMOZIN-BÉTA4	
KATEPSZIN-D,-E	

1. táblázat: Az immunitást és az immunregulációt befolyásoló legfontosabb faktorok (saját táblázat)

Vérlemezkék direkt módon képesek részt venni az immunitásban, azáltal, hogy target molekulájukat elpusztítják („killing funkció”), például baktériumot csomagolnak be, vagy aggregációindukció révén degranulációhoz vezetnek.

Különleges és kiemelendő az, hogy fiziológias körülmények között is képesek a vérlemezkék leukocitákhoz, vagy limfocitákhoz, dendritikus sejtekhez, monocitákhoz, eozinofilokhoz, bazofilokhoz, neutrofilokhoz kötődni. A trombocitákon lévő P-szelektin (CD62P) és a leukocitákon elhelyezkedő PSGL-1(CD162) képes ezen adhézios interakció kialakítására. Továbbá a CD40/CD40L interakció, valamint az alsam-béta2 (Mac-1,CD11b/CD18,CR3) interakciók (mieloid sejtek) esetében szintén fontosnak tűnnek. Keringésben lévő trombocita-leukocita aggregátumok mennyisége megnövekszik szeptikus betegekben, azonban azokban, akiknél többszervi elégtelenség is kialakul, ez a mennyiség alacsonyabb, feltehetően a fokozott perifériás szekvesztráció miatt (23,24,25,26).

A trombociták számos, diverz szerepet töltenek be az immunrendszer különböző folyamataiban (23,24,25,26).

- a nyirokcsomókban mutatják az utat a limfocitáknak az endoteliális venulákhoz, ezáltal hidat képeznek az interakciók kialakításához
- vérlemezkék co-stimuláns szignálokat képesek a dendritikus sejtekhez szállítani
- mieloid sejtek esetén a trombocitakapcsolódás általában proinflammatorikus aktivációhoz vezet a leukocitákban, pl. a monocitákban, eozinofil és neutrofil granulocitákban

- számos neutrofil-trombocita komplex fordul elő akut és krónikus gyulladásos betegségekben, azonban ezen komplexek kialakulásának gátlása antitestblokádnak révén nagymértékben képes csökkenteni az akut gyulladásos állapotok súlyosságát
- szepszisben az endotoxinok által aktivált trombociták neutrofilokhoz kapcsolódva képezik az ún. „neutrophil extracellular trapset” (NETs), melyek extracelluláris, hisztonnal körül ölelt genomialis DNS-ből, és egyéb antimikrobiális peptidekben állnak, és hálót alkotva intravasalisán facilitálják a bakteriális eliminációt
- trombocita-monocita kooperáció révén krónikus gyulladás talaján az ateroszklerotikus plakkok kialakulásában is szerepet játszanak
- a gyulladás rezolúciós fázisát segítik

1.3.1.3. Mikropartikulumok

A mikropartikulumok (MP) – 0,1-1,0 μm nagyságú, sejteredetű vezikuláris strukturák – sejtaktiváció vagy apoptózis útján sejtmembrán-lefűződéssel keletkeznek. Membránjuk lipidekben és fehérjékben gazdag, külső rétege főként foszfatidil-szerint (PS) és foszfatidil-etanolamint (PE) tartalmaz. A sejteredetűkre specifikus felszíni antigéneket/fehérjéket hordoznak, melyek révén azonosíthatók (27,28,29).

Elsőként Wolf írta le 1967-ben őket, mint trombocitaeredetű prokoaguláns részecskéket. A mikropartikulumok nagy része (70-90%) trombocitákból származik, azonban leukocitákból, eritrocitákból, endotelsejtekből és simaizomsejtekből is keletkezhetnek (27,28,30). Keletkezésük folyamán (sejtaktiváció) különböző agonisták kötődnek a sejt felszíni receptorhoz, mely következménye intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése lesz. Trombociták esetén ez a stimuláló ágens a trombin, az ADP és a kollagén (27,28).

A vérlemezke eredetű MP-ok képződésében szerepe van a GPIIb/IIIa komplexnek. Ez a komplex fibrinogénreceptor-funkciót tölt be a trombocita felszínén és fibrinogént kötve aktiválódik, ami fokozott MP képződéshez vezet (27). A GPIb receptor aktivitása révén a trombociták a von Willebrand-faktorhoz tudnak kötődni, így sejtaktiváció esetén a trombocita membránjából MP-ok fűződnek le (31).

A mikropartikulumok funkciója sokféle lehet, a keletkezési helyüktől függően mind fiziológiás, mind pedig patofiziológiás szerepet is betölthetnek. Részt vesznek a sejtek közti kommunikációban, illetve a genetikai információ átvitelében (32). Szerepük

van a gyulladásos folyamatokban, a véralvadási rendszer aktivációjában és bizonyos vaszkuláris funkciókban is.

A trombocita eredetű MP-ok felszíne 50-100-szor nagyobb prokoaguláns aktivitással rendelkezik, mint például a trombocitafelszín (33). A trombocitaeredetű MP-ok felszínén jelen lévő PS-nek fontos szerepe van a véralvadás mechanizmusában. Ca^{2+} jelenlétében a PS-hez kötődnek az alvadási faktorok (IXa., VIII., Va. és IIa.), amelyek tenáz- és protrombináz-komplexek kialakulásához vezetnek, ami végül trombinképződést eredményez (34). A trombocitaeredetű MP-ok felszínén expresszálandó P-szelektin és TF (TF: tissue factor). Az endotélsejt eredetű MP-ok nagyméretű von Willebrand-faktor multimereket expresszálnak, trombocitaaggregációt eredményezve növelhetik az aggregátum stabilitását (35).

1.3.2. Patofiziológia (Ateroszklerózis)

Az ateroszklerózis görög eredetű szó, az „atero” jelentése megfáradt. Marchand nevéhez köthető az ateroszklerózis leírása, aki összefüggést talált az erek zsíros degenerációja és az érfal megmerevedése között (37). Főleg az elasztikus és a muskuláris artériák érintettek (aorta, karotisz, proximális koronáriák, iliofemorális artériák), azok progresszív obliteratív betegségét nevezzük ateroszklerózisnak (magyarul érlemeszesedésnek) (38). A nyugati országokban lévő morbiditás és mortalitás 50%-áért tehető felelőssé. Egyre növekvő különbségek figyelhetők meg a megjelenésben és a kimenetelben a különböző országok, valamint a különböző társadalmi szintek között (39).

Epidemiológiai tanulmányok számos genetikai és környezeti (2. táblázat) rizikófaktort azonosítottak (36):

Genetikai faktorok	Környezeti hatások
LDL/VLDL emelkedett koncentrációja	Magas zsírtartalmú diéta
Csökkent HDL szint	Dohányzás
Magas lipoprotein szint	Alacsony antioxidáns szint
Magasvérnyomás betegség	Mozgásszegény életmód
Homociszteinémia	Kórokozók (pl. Chlamydia pneumoniae)
Diabétesz és elhízás, metabolikus szindróma	
Depresszió	
Nem (férfi > nő)	
Szisztémás gyulladás (emelkedett CRP)	
Pozitív családi anamnézis	

2. táblázat: Az ateroszklerózis kialakulásának genetikai és környezeti rizikófaktora (saját táblázat)

Az ateroszklerózis krónikus gyulladással járó betegség (40,41). Az endoteliális károsodás, sérülés kezdeményező szerepe elengedhetetlen. A turbulens véráramlás endotéliális diszfunkcióhoz vezet, meggátolva a nitrogén monoxid termelését, ami potens vazodilatátor és stimulálja különféle adhéziós molekulák szintézisét. Ennek következménye az, hogy a monociták és a T-sejtek az endotéliumhoz kapcsolódnak és a subendoteliális térbe vándorolnak. A vérben nagy koncentrációban keringő lipidek (LDL: low-density lipoproteins, VLDL: very low-density lipoproteins) az endotéliumhoz kötődnek, majd a subendoteliális térben oxidálódnak. A monociták az endotélium alatti rétegben „elnyelik” az oxidált LDL molekulákat, így habsejteké alakulnak át. Ez felel meg az első stádiumnak, amikor az ér falán egy zsíros csík látszik. Ezen zsíros csíkok már a 11-12 éves gyermekekben is megjelennek (42). A makrofágok proinflammatorikus citokineket termelnek, melyek aktiválják a simaizomsejteket. Excesszív simaizomreplikáció kezdődik meg az extracelulláris mátrixban, ami végül subendoteliális fibrózus plakk kialakulásához vezet, mely lipid magból áll, simaizomsejtek és kötőszövet veszi körül (43).

A különböző érretek szekvenciális folyamat során károsodnak, először az intima, majd a média, végül pedig az adventica válik érintetté. A centrális lipid maggal rendelkező, gyulladással járó sejtekkel, simaizomszövettel, kötőszövettel felépülő plakkok az ér falat megvastagítják, új vasa vasorumok lépnek be a megvastagodott falba, amelyek intramurális hemorrágiát okozhatnak, ezáltal tovább fokozva a kötőszövet-szaporulatot (44).

Kétféle plakktípust különböztethetünk meg: stabil és instabil. A stabil plakkok regrediálnak, statikusak maradnak, vagy lassú növekedési rátával jellemezhetők. A 'low risk' plakkokban a fibrotikus kötőszövet mennyisége dominál, és az esetek nagy részében okklúziót nem okoznak. Ezzel szemben a „high risk” plakkokban nagy zsíros mag található, melyet vékony fibrózus sapka határol, ami az érlumen nem szignifikáns szűkületét (<50%) okozva növeli a ruptúra veszélyét (45). A legfőbb klinikai események az instabil plakkokhoz köthetők. A plakkruptúrát a makrofágok által szekretált enzimek idézik elő. Ha egy plakk megreped, akkor annak tartalma az érpályába jut, lokális trombozishoz vezet. A trombozisz megváltoztathatja a plakkok alakját, lumen okklúzióhoz vezethet, disztálisan embóliát okozhat. Az Amerikai Kardiológiai Társaság Konszenzus Klasszifikációja szerint az ateroszklerózisnak morfológiailag **(3. táblázat)** különböző stádiumai vannak (46).

I. Non-ateroszklerotikus intimaléziók		Trombózis
I./A Intimavastagodás	simaizomsejt szaporulat az intimában, lipidek, makrofágok, habsejtek nélkül	nincs
I./B Intimális xantóma	felületes habsejtgyülem, nekrotikus mag, fibrotikus sapka nélkül	
II. Progresszív ateroszklerotikus léziók		
II./A Patológias intimamegvastagodás	simaizomsejtben gazdag plakk, proteoglikán mátrixszal és fokális extracelulláris lipidakkumulációval	nincs
II./B Fibrotikus sapkás ateróma	korai nekrozis/késői nekrozis	
II./C Vékony sapkás aterofibróma	<65 µm-nél vékonyabb fibrotikus sapkamakrofág- és limfocita-infiltrációval, nagy nekrotikus maggal	
III. Léziók akut trombusképződéssel		
III./A Plakkruptúra	luminális trombus kommunikál a nekrotikus lipidmaggal	okkluzív/non-okkluzív
III./B Plakkerózió	nincs kommunikáció a trombus és a plakk nekrotikus magja között	általában non-okkluzív
III./C Kalcifikált nodulus	kalcifikált nodulus vedlése, alatta fibrokalcifikus plakk legfeljebb minimális nekrozissal	általában non-okkluzív
IV. Léziók gyógyult trombussal		
IV./A Fibrotikus	kollagénben gazdag plakk, szignifikáns luminális sztenózis, általában nagy terület	nincs
IV./B Fibrokalcifikus	involvál, minimális gyulladáshoz sejt, kistokus vagy hiányzó nekrozis	

3. táblázat: Az ateroszklerózis stádiumai az Amerikai Kardiológiai Társaság Konszenzus Klasszifikációja beosztása szerint

Az ateroszklerózis kezdetben aszimptomatikus, tünetek akkor jelentkeznek, ha a léziók a keringést limitálják. Ha a plakk növekedni kezd és az artéria lumene csökken, akkor tranzienis iszkémiás epizódok alakulhatnak ki, mint például stabil (effort) angina,

klaudikáció intermittensz, instabil angina, szívinfarktus, stroke, aneurizma, érdisszekció (45,47).

A trombociták szerepe igen diverz az aterogenezisben. Intakt, nem aktivált endotéliumhoz a vérlemezkék nem kapcsolódnak. Gyulladásos állapotokban azonban – ami az érlemeszesedés kezdeti szakaszában is megfigyelhető – a vérlemezkék stimulálódhatnak, egzakt endotél sérülés nélkül (48). Ennek pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, fontos etiopatológiai tényezők közé tartozik azonban az endotélium antitrombotikus fenntartásáért felelős mechanizmusok károsodása, reaktív oxigéngyökök felszaporodása, valamint a protrombotikus/proinflammatorikus mediátorok keringésben való megjelenése, endotélhez tapadása (49).

Az aktiválódott endotélium a vérlemezkék érfalhoz sodródását okozhatja, még magas nyírófeszültség esetén is. A mechanizmusban kruciális fontossággal bír a P-szelektin, az adhézió kialakításában pedig az integrinek játszanak fontos szerepet. Ismeretes, hogy a P-szelektin hiánya véd az ateroszklerotikus léziók kialakulásával szemben knock-out egerekben (50). A vérlemezkék érfalhoz való hozzácsapzódásáért ezenkívül felelősek még a GPIIb/IIIa receptor mediálta interakciók és a von Willebrand-faktor is. Az aktivált vérlemezkék intracellularis granulumaiban számos olyan anyag található, amely a sejtadhézióért, proliferációért, koagulációért, valamint a gyulladásos citokin termelődésért tehetőek felelőssé. Ezáltal a vérlemezkék képesek akcelerálni azon gyulladásos folyamatokat, melyek az ateroszklerózis súlyosbodásához, a plakkok kialakulásához vezetnek.

A trombocitákban nagy mennyiségben vannak jelen mikroRNS-ek, amelyek a fehérjeexpressziót módosítják azáltal, hogy lebontják a messenger RNS-eket vagy csökkentik azok transzlációját. Bizonyos mikroRNS szint fölött korrelációt mutattak ki speciális agonisták által előidézett vérlemezke-aggregáció kialakulásában, valamint patológis állapotokban. A mikroRNS-ek potenciális biomarkernek tekintendők a vérlemezke-aktivitásban és a vaszkuláris trombózis kialakulásában. Fontos szereppel bírnak a mikroRNS-eket transzportáló molekulák, a trombocita asszociált mikropartikulumok is (51,52).

A vérlemezék hídként funkcionálnak azáltal, hogy mediálják a leukocita-endotél interakciókat az ateroszklerózis korai fázisában, valamint fontos szereppel bírnak a gyulladásos állapotok kialakulásában is. Ennek egy impozáns példája az, hogy a

vérlemezkék szállítanak és tárolnak is magukban RANTES-eket (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) és PF4-et, amelyek a monociták és az endotél falához kötődnek. Evvel a kötődéssel segítik elő a monocita asszociált integrinek aktivációját, facilitálva ezáltal a makrofágok infiltrációját az érfalba (53).

Az aktivált vérlemezkék, valamint az endoteliális sejtek aktívan képesek szekretálni gyulladásozó citokineket, mint például a CD40 ligandot, az IL-1T-t. Ezek az endotélium további stimulációja révén aktiválják az endoteliális NFκB-t, amely a kulcsgének transzkripcióját és translációját triggereli, pl. az MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 – melyek nélkülözhetetlenek a monociták érfalhoz kapcsolódásában és transzmigrációjában (54).

Újabb tanulmányok mutatták ki, hogy a vérlemezkék progenitor toborzásáért is felelősek, ami a vaszkuláris regeneráció szempontjából nagyon fontos. A vérlemezkék jelentős mennyiségben tárolnak stroma derived factor-1-et (SDF-1), amely potens kemokinreceptor a progenitor sejtek számára, így segíti elő a progenitor sejtek adhézióját az endotéliumra, illetve a trombusok felszínére. A progenitor sejtek képesek habsejteké, illetve bizonyos állapotokban endoteliális sejtekké is differenciálódni (55).

1.4. A vérlemezke és az aggregációgátlás

1.4.1. Az aggregációgátlás gyógyszerei

Az akut cerebrális iszkémia, mely megjelenhet tranziens iszkémiás attack, iszkémiás stroke formájában, gyakran szövődik rekurrens vaszkuláris eseményekkel (56). A recidív iszkémiás epizódok megelőzésének terén kulcsfontosságú az adekvát trombocita-aggregációgátló kezelés (57). Az alábbiakban ismertetésre kerül az Food and Drug Administration Authority által elfogadott, különböző kutatások, szakmai irányelvek során vizsgált, szekunder prevencióban alkalmazható gyógyszerek (57,58). A 2014-es AHA/ASA szekunder prevenció irányelve I.A evidencia szinttel javasolja a trombocitaaggregációs gyógyszerek alkalmazását a terápia részeként (59).

Aszpirin (acetilszalicilsav) irreverzibilisen inaktiválja a vérlemezkék ciklooxygenáz enzimét, mely intracelullárisan csökkent prosztaglandin- és tromboxán-szintézishez vezet. A tromboxán A₂ potens trombocita-aktivátor és proaggregátor. Telítődőzisa 300 mg, fenntartó dózis 75-300 mg lehet. Egy meta-regressziós analízisben placebo-kontrollált aszpirinterápiás csoportot vizsgálva, azt találták, hogy a relatív

rizikóredukció (iszkémiás és hemorrágiás) stroke esetén 15% (95% CI:6%-23%) (60). A hatáserősség a dózisdependenciát mutatott 75 mg és 1500 mg között (61,62,63,64,65). Azonban nem elhanyagolható a szintén dózisdependes gyógyszer toxicitás, melyek közül az életet veszélyeztető gasztrointesztinális vérzések emelendők ki. Azon betegek, akik alacsony dózisu aspirint (<325 mg/nap) szednek hosszú időn keresztül, az éves GI vérzés rizikója 0,4%, ami két és félszerese a gyógyszert nem szedő egyénekének (62,63,65,66,67).

Aszpirin-dipiridamol kombinációban alkalmazható. A dipiridamol tromboticaggregációgátló hatásának több mechanizmus áll a háttérében: képes gátolni a vérlemezkék ciklikus-AMP-foszfodiészteráz enzimét, csökkenti a vér alakos elemeinek adozinfevévét, továbbá serkenti az adozin lebomlását, képes potenciózni a prosztaciklin (PGI₂) antiaggregációs hatását a PGI₂ bioszintézis fokozásának révén (68).

Clopidogrel a tienopiridenek csoportjába tartozó molekula, melynek aktív metabolitja (R-130964) szelektíven képes gátolni az ADP sejt felszíni P₂Y₁₂-receptorhoz való kötődését, így blokkolja az ADP-mediálta GPIIb/IIIa komplex kialakulását, ami nélkülözhetetlen az aggregációban (69,70). Akutan a telítődózis 300-600 mg, majd fenntartó kezelés esetén 75-150 mg/nap.

Ticagrelor reverzibilis P₂Y₁₂-receptor antagonist, a clopidogrellel ellentétben, itt nincs szükség intrahepatikus konverzióra, hogy aktív metabolit jöjjön létre. A bevett gyógyszer biohasznosulása megfelelő, hatásidőtartama rövidebb, így naponta kétszer kell bevenni.

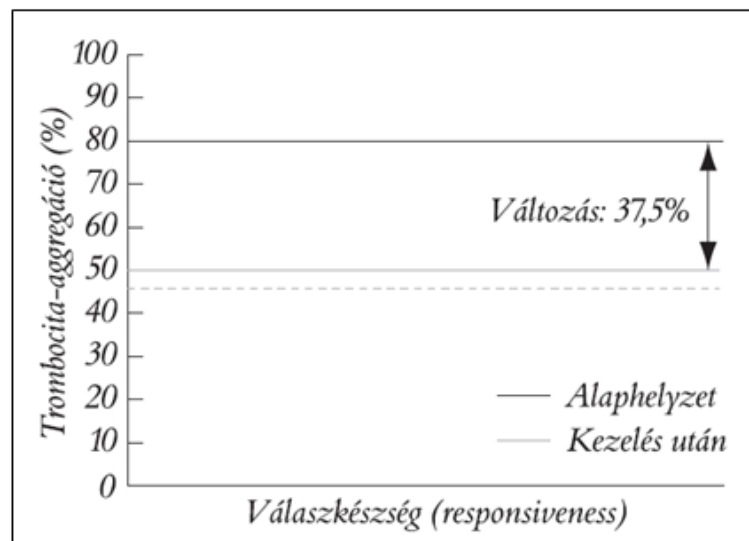
1.4.2. Az aggregációgátlás effektivitása

A nemzetközi szakirodalom áttekintése során gyakran találkozunk az alább ismertett fogalmak szinonimaként való megfeleltetésével, azonban esszenciális a két jelenség elkülönítése (71). Samara és munkacsoportja a témában végzett úttörő munkássága során demonstrálta azt, hogy a megfelelően reagáló, tehát reszponder betegek bizonyos hányadában a jelentős változás ellenére az elvártnál magasabb vérlemezke-reaktivitás maradhat vissza (72). Korábbi tanulmányokból tudjuk azt, hogy a kezelés ellenére fennálló reziduális magas tromboticareaktivitás (HTRPR, high on treatment residual platelet reactivity) erős prediktora a recidív iszkémiás epizódok kialakulásának, s ezt a jelenséget részletesen vizsgálták az akut koronária szindróma vonatkozásában az intervenciós beavatkozásokat követően is (73). Egy magyar

kutatócsoport által végzett metaanalízis eredményei szerint a HTRPR fennállása esetén a várható kardiovaszkuláris mortalitás 3,4-szeresére növekszik a kezelés mellett normál trombocitareaktivitással bíró egyénekéhez képest (74).

1.4.2.1. Terápiás válaszkészség

A válaszkészség (responsiveness) meghatározását végezzük laboratóriumi módszerekkel abban az esetben, hogyha az első trombocitaaggregációt gátló gyógyszer bevétele előtti állapothoz képest a gyógyszer hatására létrejött változást mérjük. Clopidogrel non-reszponzióról beszélünk abban az esetben, hogyha az alaphelyzethez képest létrejött változás kevesebb, mint 10% (8. ábra).

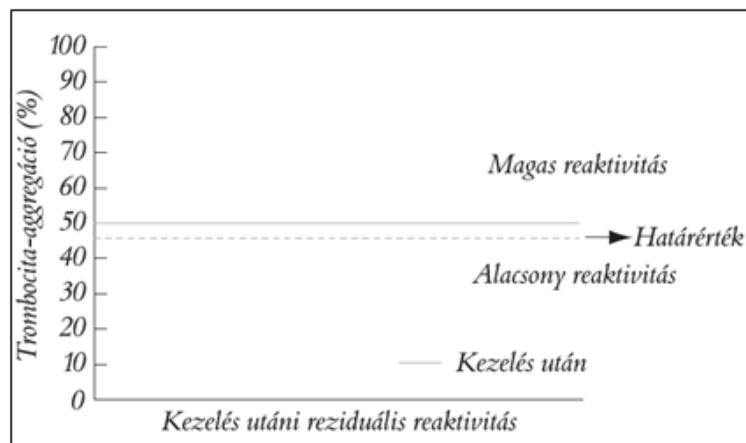


Komócsi, *Cardiologia Hungarica* 2011, 41:03-X

8. ábra: Terápiás válaszkészség vizsgálata trombocitaaggregációs kezelésben

1.4.2.2. Maradék reaktivitás

A gyógyszer rendszeres szedését követően különböző stimulusokkal határozzuk meg a maradék trombocitareaktivitást (post-treatment reactivity). Kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitásról (HRPR) definíció szerint akkor beszélünk, ha a gyógyszeres kezelést követően határozzuk meg a vérlemezkék reaktivitását és egy kívánatos határ fölötti értéket kapunk (**9. ábra**), míg a megfelelő gyógyszerhatást (aggregációgátlást) alacsony reaktivitásként (LRPR: low residual platelet reactivity) határoztuk meg.



Komócsi, *Cardiologia Hungarica* 2011, 41:03-X

9. ábra: Trombocitaaggregációs kezelés utáni reziduális reaktivitás mérése

1.4.3. Aggregációgátlás stroke esetén

Az alábbi táblázatban (**4. táblázat**) összefoglalva kerülnek bemutatásra azon klinikai tanulmányok, melyek azt vizsgálták, hogy az akut iszkémiás stroke kezelése során adott gyógyszerek közül az aszpirin, aszpirin-dipiridamol és a clopidogrel milyen hatással van a betegség lefolyására, kimenetelére.

Aszpirin				
Vizsgálat neve	Résztvevők	Beavatkozás típusa	Utánkövetés ideje	Végeredmény
IST (75)	19435 beteg akut iszkémiás stroke, 48 órán belüli kezdettel	ASA 300 mg/nap vs. nem szedett gyógyszer	6 hó	11-gyel kevesebb halál/recidív iszkémia 14 napon belül 1000 főre vonatkoztatva
CAST (76)	21106 beteg akut iszkémiás stroke, 48 órán belüli kezdettel	ASA 160 mg/nap vs. placebo	4 hét	7-tel kevesebb halál vagy nem fatális stroke 4 héten belül 1000 főre vonatkoztatva
IST+CAST poolozott analízis (77)	40000 beteg, akut iszkémiás stroke, 48 órán belüli kezdettel	ASA 160-300 mg/nap vs. nem szedett gyógyszer	3 hét	9-cel kevesebb stroke vagy kórházi halálozás, 1000 főre vonatkoztatva
ATC-3 metaanalízis (78)	6170 szekunder prevenció, 10 db poszt-stroke/TIA vizsgálatból	ASA különböző dózisokban	nem jelzett	17% (p=0,001) redukció súlyos vaszkuláris érintettség esetén, 36% (p=0,03) RR csökkenés nonfatális MI esetén, 21% (p=0,01) RR csökkenés major koronária eseményeket tekintve, 90%-os (p=0,03) növekedés vérzéses stroke tekintetében, 21% (p=0,05) RR csökkenés definitív iszkémiás stroke-ban, 22% (p=0,001) RR csökkenés lehetséges iszkémiás stroke-ban, 17% (p=0,01) RR csökkenés bármilyen típusú stroke-ban
Aszpirin-dipiridamol				
ESPS-2 (79)	6602 beteg komplett iszkémiás stroke/TIA 3 napon belül	ASA 25 mg/nap, dipiridamol 200 mg/nap, ASA 25 mg/nap+dipiridamol 200 mg/nap, placebo	2 év	Összesített stroke/halálozás csökkenés 13.2%-kal (p=0,016) ASA esetén, 15.4% RR csökkenés (p=0,015) dipiridamol kezelés során, 24,4%-os RR csökkenés (p<0,001) kombinált kezeléskor
ESPRIT (80)	2739 beteg 6 hónapon belüli minor stoke/TIA	ASA 30-325 mg/nap és dipiridamol 200 mg vs. ASA monoterápia	3,5 év	Összesített vaszkuláris halálozást csökkentette a kombinált terápia 8HR 0,8), 95% CI, 0,66-0,98)
ASA-dipiridamol metaanalízis (81)	7795 beteg cerebrális iszkémiával 6 vizsgálat elemzésével	ASA+dipiridamol, ASA monoterápia	nem jelzett	RR=0,82 (95% CI, 0,74-0,91) összetett vaszkuláris halálozás, nemfatális stroke, fatális MI tekintetében

Clopidogrel				
Vizsgálat neve	Résztvevők	Beavatkozás típusa	Utánkövetés ideje	Végeredmény
CAPRIE (82)	19185 vaszkuláris beteg, ebből 6431 akut iszkémiás stroke	clopidogrel 75 mg/nap vs. ASA 325 mg/nap	1,91 év	8,8% (p=0,043) RR csökkenés az összetett stroke, MI, vaszkuláris halálozás tekintetében, 7,3% (p=0,26) RR csökkenés stroke csoportban
MATCH (83)	7599 beteg, friss iszkémiás stoke vagy TIA legalább egy egyéb vaszkuláris faktoral	clopidogrel 75 mg/nap és ASA 75 mg/nap vs. clopidogrel 7 5mg/nap monoterápia	18 hónap	RRR=,4% (p=0,244) az elsődleges végpont tekintetében, ARD 1,26% (p<0,0001) életet veszélyeztető vérzés tekintetében, ARD 0,40% (p=0,029) primer intracranialis vérzés vonatkozásában)
SPS3 (84)	3020 beteg, szimptomatikus lakunáris stroke vagy TIA, 180 napon belül	ASA 325 mg/nap és clopidogrel 75 mg/nap vs. ASA 75-162 mg/nap	3.4 év	HR=0,92 (p=0,48) rekurrens stroke esetén, HR=1,97 (p<0,001) major vérzésekre vonatkozóan, HR 1,52 (p=0,004) az összesített mortalitást illetően
CHARISMA (85)	15603 kardiovaszkuláris beteg, ebből 4320 TIA/iszkémiás stroke	clopidogrel 75 mg/nap és ASA 75-162 mg/nap vs. ASA 75-162 mg/nap	28 hónap	RR=0,93 (p=0,22) a primer összetett kimenetelt illetően az összes beteget figyelembe véve, RR=0,81 (0,62-1,03) a rekurrens stroke/TIA/stroke csoportban
PRoFESS (86)	20332 beteg friss iszkémiás stroke-kal (<90 napon belül)	ASA-ERDP 25+200 mg/nap vs. clopidogrel 75 mg/nap monoterápia	2,5 év	HR=1,01 (95% CI: 0,92-1,11) az ASA ERDP rekurrens stroke, HR=0,99 (95% CI: 0,92-1,07) stoke/MI/vaszkuláris halálozás, HR=1,15 (95% CI: 1,00-1,32) a major vérzéseket illetően, HR=,42 (1,11-1,83) az intracranialis vérzésre vonatkozóan
CHANCE (87)	5170 beteg 24 órán belül kezdődő minor iszkémiás stroke vagy magas rizikójú TIA	clopidogrel (300 mg/nap telítődózis, majd 75 mg/nap) és ASA 75 mg/nap vs. ASA 75 mg/nap, kettős aggregáció gátlás 21 napig	90 nap	HR=0,68 (p<0,001) stroke, HR=0,75(p=0,01) fatális/rokkantságot okoz stroke, HR= 0,87 (p<0,001) iszkémiás stroke, HR=0,94 (p=0,94) súlyos vérzést illetően
POINT (88)	4881 beteg, 12 órával a tünetek kialakulását követően, minor stroke vagy magas rizikójú TIA	600 mg telítődózis majd 75 mg/nap clopidogrel és 50-325 mg/nap ASA vs. ASA 50-325 mg monoterápia	90 nap	HR=0,75 (p=0,02) major iszkémiás epizódok, HR=0,72 (p=0,01) iszkémiás stroke, HR=2,32 (p=0,02) major vérzés, HR=2,45 (p=0,04) non-intracranialis vérzés
SOCRATES (89)	13199 beteg nem súlyos iszkémis stroke vagy magas rizikó csoportba sorolt TIA, 24 órán belüli kezdettel	180 mg telítődózisú, majd 90 mg/nap ticagrelor vs. ASA 300 ms telítődózis, majd100mg/nap	90 nap	HR=0,89 (p=0,07) stroke/MI/halálozás, HR=0,87 (p=0,046) iszkémiás stroke, HR=0,83 (p=0,45) major vérzés

4. táblázat: Aszpirin, Aszpirin-dipiridamol és clopidogrel tanulmányok

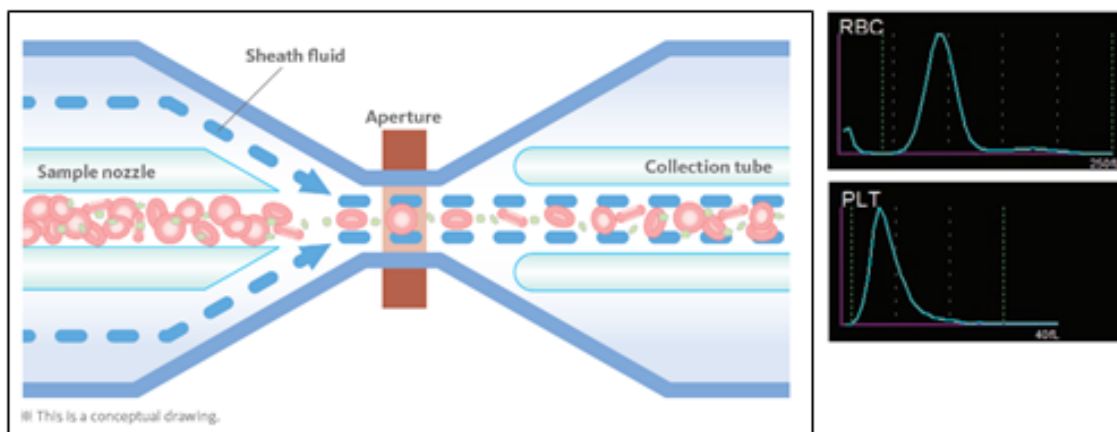
1.5.Vérlemezke laborparaméterei és klinikai relevanciája

A vérlemezkéék *ex vivo* élettani és patológias tulajdonságainak laboratóriumi vizsgálata mindenkor nagy kihívás. A trombocita egy reológiai, morfológiailag érzékeny struktúra, mely fizika-kémiai behatásokra rendkívül sérülékeny. A véralvadás bonyolult mechanizmusában betöltött funkciója áramlás-függő, felülete érzékeny és aktív. Az alábbiakban röviden áttekintjük a trombociták laboratóriumi vizsgálatának módszereit és klinikai alkalmazását. Ezek közül választottuk ki a legmegfelelőbbeket a tanulmányunkban felvetett kérdések megválaszolására.

1.5.1. A mindennapi gyakorlatban használt laborparaméter – trombocitaszám

A perifériás vérben keringő trombocitaszám meghatározásra több módszer is elterjedt. Kezdetben számláló kamrában határozták meg, azonban napjainkban kizárólag automata hematológiai analizátorokon mérik a teljes vérkép részeként, ami nagyban egyszerűsítette, pontosabbá tette és jelentős időmegtakarítást tesz lehetővé a vérlemezkéék számának meghatározásakor.

A legtöbb hematológiai automata a trombocitaszám mérésére az impedanciás mérési alapelvet használja. A sejtek egy kapillárisban hidrodinamikai fókuszálás után egyesével haladnak át egy apertúrán. Ennek mindkét oldalán elektródák helyezkednek el, melyen egyenáram folyik át. Az áthaladó sejtek ellenállásváltozást hoznak létre, melynek nagysága arányos a sejt méretével. A méretük alapján azonosított sejteket térfogateloszlási görbén ún. hisztogrammon lehet ábrázolni (**10. ábra**). Fiziológias körülmények között a vörösvértest- és a trombocitapopuláció méret alapján egyértelműen elválasztható egymástól.

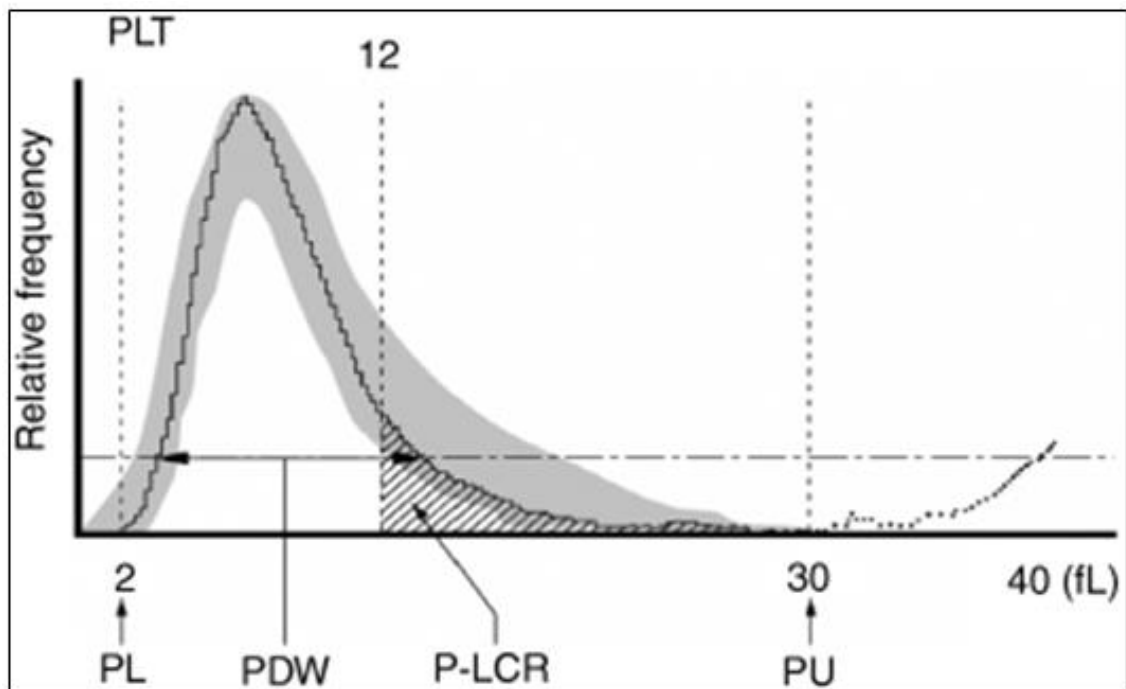


Sysmex educational enhancement and development / august 2016/ /SEED Haematology

10. ábra: Hidrodinamikai fókuszálás és DC (direct current) detektálás: RBC/PLT csatorna

1.5.2. Speciális vérlemezke-paraméterek

Az új generációs hematológiai automaták innovatív vérlemezke-paraméterek mérésének széles körét teszik lehetővé (90). Ezek a következők : plateletcrit, trombotocitokrit (PCT) – a trombotocitafrakció százaléka a teljes vérhez viszonyítva ; mean platelet volume, (MPV) – az átlagos trombotocitaterfogat ; platelet distribution width (PDW) – a trombotocitaterfogat eloszlásgörbe szélessége; platelet larger cell ratio (P-LCR) – a > 12 fL térfogatú trombotociták százaléka (91) (**11. ábra**). Néhány vérképautomata képes az immature platelet fraction (IPF) – éretlen trombotocitafrakció meghatározására is a keringésben (92).



Briggs C, Harrison P, Machin SJ. *Int J Lab Hematol.* 2007 Apr;29(2):77-91.

11. ábra: Típusos trombotocitaeloszlás-görbe egy hematológiai automatán. PL, a trombotocita-méreteloszlás alsó megkülönböztetése; PDW, trombotocita méreteloszlás szélessége; P- LCR, nagyméretű trombotociták aránya; PU, a trombotocita méreteloszlás felső megkülönböztetés

1.5.2.1. Éretlen vérlemezkealakok klinikai vonatkozásai

Az éretlen, fiatal, a csontvelőből a keringésbe újonnan kijutó vérlemezkéket retikulált trombotocitáknak nevezzük (RPs: reticulated platelets), melyek RNS-t tartalmaznak és nagyobb méretűek, mint az érett trombotociták. A vörösvértest vonal retikulocitáinak feleltethető meg. Reaktívabbak, mint az érett trombotociták, számuk a trombotopoézist tükrözi. A trombotociták RNS-tartalma a megakariocita aktivitással korrelál.

Az éretlen trombotocitaszám-meghatározás segítséget nyújthat a trombotocitopénia okainak elkülönítésére. Jól használható nem-invazív teszt a trombotocitopéniás betegek

vizsgálatára különböző klinikai állapotokban. Csontvelő-elégtelenségben számuk alacsony, míg a trombociták perifériás pusztulása vagy konzumpciója során a fokozott csontvelő-tevékenység eredményeként számuk magas. Az éretlen trombocitaszám meghatározására kezdetben az áramlási citometria terjedt el. Azonban az analitikai standardizálás hiánya miatt a különböző laboratóriumokban mért eredmények nehezen összehasonlíthatóak. Jelenleg két olyan nagy teljesítményű hematológiai automata van piaci forgalomban, amely az éretlen trombociták és az éretlen trombocitafrakció mérését teljesen automatikusan méri : a Sysmex (XE- és XN-sorozat) és az Abbott (CELL-DYN Sapphire) (5. táblázat).

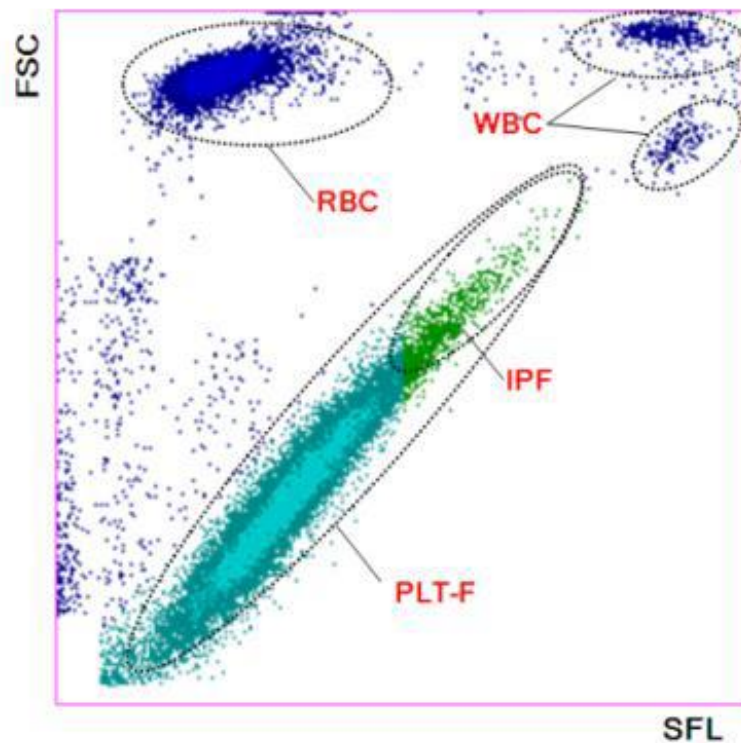
	Áramlási citometria	Sysmex IPF
Mintaelőkészítés	Változó: nincs, fixáció, trombocitaizolálás	Nincs
Fluoreszcens festék	Thiazole orange, acridin orange	Polimetine (XE-sorozat) : oxazin (XN-sorozat)
Inkubációs idő	Változó 15 perc–2,5 óra	Nincs adat
Pontosság normál trombocitaszám esetén, CV%	Nincs adat	7%–11%
Pontosság alacsony trombocita számesetén, CV%	Nincs adat	9%–36%
Referenciatartomány, %	Nagyon változó 1%–15%	1,1–6,6
Referenciatartomány, 10⁹/l	Átlag 3,2	2–17

Hoffmann, J. (2014). *Chemistry and Laboratory Medicine*, 2014. 52(8), 1107-1117. nyomán
5. táblázat: Az éretlen trombocita mérésére használt áramlási citometria és a Sysmex sorozat néhány jellemzőjének összehasonlítása

A Sysmex XN-sorozat hematológiai analizátorainak bevezetésével az éretlen trombociták meghatározása a fluoreszcens trombocitamérés része lett, mely az RNS festésre oxazin alapú festéket használ. Az IPF az átmenő fényszórás (sejtméret) és az oldalirányú fluoreszcens (RNS-tartalom) eloszlásdiagramjáról származik. Az érett trombociták kék pontokként, míg az éretlen trombociták zöld pontokként jelennek meg az eloszlásdiagramon, ez utóbbiak alkotják az IPF paramétert. A számítógép algoritmusai különíti el az oldalirányú fényszórás és a fluoreszcenciaintenzitás alapján az érett és az éretlen trombocitákat.

A Sysmex-XN 9000 integrált hematológiai automata rendszeren (Sysmex Co, Japán, 2017) a trombocitaszám (PLT-F) és az éretlen trombocitafrakció (IPF) meghatározás a készülék fluoreszcens trombocitacsatornáján történik. Ezen a csatornán a trombociták speciális intracelluláris fluoreszcens festése megy végbe, egy CELLPACK

DFL reagenssel való előkezelés után, mely a sejtmembrán átjárhatóságát teszi lehetővé. A mérés áramlási citometriával az átmenő fény (FSC-forward scatter), az oldalra szórt fény (side scatter) és az oldalra szórt fluoreszcens (SFL – side fluorescent light) detektálásával történik. A trombocitaszám mellett az éretlen trombocitafrakció is meghatározható, a magas fluoreszcencia intenzitást mutató trombociták „kikapuzásával” (Az FSC/SFL plot-on az IPF területre eső, magas fluoreszcencia intenzitást mutató trombociták) (12. ábra).



12. ábra: Fluoreszcens trombocitamérés Sysmex XN hematológiai automatán. RBC: vörösvértest, WBC: fehérvérsejt, PLT-F: fluoreszcens trombocita, IPF: éretlen trombocitafrakció, FSC: átmenő fényszórás, SF: oldalirányú fluoreszcens fényszórás.

Az IPF-et hagyományosan %-os formában adják meg a teljes trombocitaszámhoz viszonyítva. Az abszolút IPF (IPF#) szám, az éretlen trombociták koncentrációja ($10^9/l$), jobban tükrözi a trombociták valós idejű termelődését (93). Ezt néhány irodalmi adat bizonyítja újszülöttkori infekciók (94) és krónikus májbetegség (95) esetén. Úgy tűnik, hogy az abszolút IPF# számot a trombocita-transzfúzió nem befolyásolja, míg az IPF% csökken, valószínűleg a kihígulás miatt (96). Érdekes módon az éretlen trombociták és P-LCR között szoros pozitív korrelációt írtak le, az aplasztikus anémia kivételével (97).

Az éretlen vérlemezke-frakciót az utóbbi években igen széles körben vizsgálták vaszkuláris betegségek patomechanizmusában, a legtöbb cikk az akut koronária

szindrómával összefüggésben született. A korábban megjelent tanulmányokat két fő csoportra oszthatók. Voltak olyan vizsgálatok, amelyek az éretlen trombociták aggregációt gátló gyógyszerekre adott válaszát vizsgálták, illetve a biomarker-kutatások folyamán azt nézték, hogy az éretlen vérlemezke-frakció és a betegek kimenetele között milyen korrelációt lehet kimutatni.

Számos vizsgálat során szignifikáns interindividuális variabilitás volt megfigyelhető az aszpirinre illetve clopidogrelre adott farmakodinámiás válaszban, míg ez elhanyagolható volt a prasugrellel vagy ticagrelorral kezelt csoportokban. A retikulált, éretlen vérlemezkéket protrombotikus, hiperreaktív egyedekként tartjuk számon, így a magas IPF arány összefüggésbe volt hozható a fokozott gyógyszeres válasszal (98). A keringésben cirkuláló nagyobb retikulált vérlemezke-arány prasugrelre adott csökkent válasszal volt összefüggésbe hozható, akut miokardiális infarktuson áteset betegekben (99). Stratz és munkacsoportja az egyszerűen alkalmazható, és relatíve olcsó vérlemezke-reaktivitást detektáló módszerként az IPF meghatározását facilitálja, automata sejtszámláló alkalmazásával (100).

Karpatkin 1969-ben kimondta, hogy a keringésbe újonnan jutó vérlemezkék sokkal fontosabb szereppel bírnak a trombózis kialakulásában öreg társaikkal szemben (101). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a retikulált vérlemezke-szám előre jelzi a farmakológiai hiporeszponzivitást aszpirin és clopidogrel esetén koronáriabetegségben (102,103). Széles spektrumú, nagy betegszámot tartalmazó vizsgálatok stabil koszorúér-betegségben szenvedők esetén kimutatta, hogy éretlen trombocitafrakció aránya előrejelezheti a halál, rekurrens angina, miokardiális infarktus kialakulását. Ibrahim és kutatócsoportja meghatározott egy cut off értéket az éretlen vérlemezkék számának vonatkozásában ($7,632/\text{mm}^3$), amikor a klinikai események valószínűsége nagyobb eséllyel alakul ki (104). A jól megtervezett, homogén betegpopuláció eredményeit összegző ExcelsiorLOAD tanulmány (Extent of Clopidogrel-Induced Platelet Inhibition during Elective Stent Implantation Clinical Event Rate-Advanced Loading Strategies) demonstrálta azt, hogy az éretlen vérlemezke-frakció értéke a legerősebb independens prediktora a vérlemezke hiporeszponzivitásnak a tienopiridinekre adott válaszban (600 mg clopidogrel telítés v. 30 ill. 60 mg ticagrelor telítődózis alkalmazása esetén) (105).

1.5.2.2. Átlagos vérlemezke-térfogat és klinikai vonatkozásai

A fenti paraméterek közül a legnagyobb irodalma az MPV-nek van. Kimutatták, hogy fontos szerepet játszhat bizonyos betegségek kifejlődésében, progressziójában és szövődményeinek kialakulásában azáltal, hogy a nagy vérlemezkek több protrombotikus anyagot választanak ki és gyorsabban aggregálódnak.

Az emelkedett MPV egyértelműen összefüggésbe hozható a miokardiális infarktus (MI) rizikójával, és a mortalitás, valamint koronária-angioplasztika után a resztenózis független prediktorának bizonyult MI után (106). A vénás tromboembólia kialakulásánál is az emelkedett MPV független rizikófaktornak bizonyult (107). Krónikus májbetegyeknél a hepatocelluláris karcinóma előrejelzésére jobb prediktornak bizonyult, mint az AFP (108). Metasztatikus kolorektális karcinómában szenvedő betegek esetén a betegség progressziója szignifikánsan csökkent az alacsony MPV értékű betegekénél (109).

Számos tanulmány igazolja azt is, hogy az MPV nem csak a kardiovaszkuláris események, hanem az iszkémiás stroke előfordulását, kimenetelét is befolyásolja. Gul és munkatársai többek közt az vizsgálta, hogy milyen összefüggés van az MPV, az akut iszkémiás stroke (AIS) és nonvalvularis pitvarfibrilláció (NVAf: nonvalvular atrial fibrillation) közt. Tanulmányukban kimutatták, hogy az MPV-szint szignifikánsan magasabb volt akut iszkémiás stroke-ban és NVAf-ben szenvedő betegekben, mint azokban, akiknek nem volt NVAf-juk. Ebből arra a megállapításra jutottak, hogy a vérlemezke reakcióképességét jelző MPV feltételezhetően az AIS kockázati tényezőjeként tekinthető NVAf-ben szenvedő betegekben (110). Megvizsgálva, hogy az átlagos vérlemezke-térfogat szerepet játszik-e az akut agyi infarktusban szenvedő betegek kimenetelének előrejelzésében, Wan és munkatársai azt találták, hogy az MPV független rizikófaktor, és érzékeny mutató a betegek prognózisának megítélésében (111). Felmerül az kérdés is, hogy az MPV az akut iszkémiás stroke-ban ok vagy következmény? Ayas munkacsoportja megnézték az MPV értékének változását 24 órával, valamint egy hét után olyan akut stroke-ban szenvedő betegekénél, ahol az ictus előtti érték rendelkezésre állt. Azt találták, hogy az eseményt követő egy héttel mért MPV-érték szignifikánsan magasabb volt, mint előtte (112).

Az MPV nagyságát számos genetikai tényező befolyásolja. Az irodalomból ismert az a tény is, hogy egyes gyógyszerek, mint pl. a rocovastatin, amlodipin, és a nebivolol

csökkentik az MPV-t, mérsékelve ezáltal a stroke-rizikót és javítva annak kimenetelét. Hasonló összefüggést keresett Haungsaithong és munkacsoportja is a trombocita-aggregációgátló gyógyszerek és az MPV nagysága közt. Azt találták, hogy ezen gyógyszercsoport mindegyike csökkenti az MPV-t, de leginkább a clopidogrelnek van a legjobb hatása az MPV-re és ezáltal a kimenetelre (113). Az akut iszkémiás stroke kezelése a trombolízis vagy a mechanikus trombektómia. Mindkét kezelés független rizikófaktora az emelkedett MPV-érték (114,115).

Összefoglalásképp megállapíthatjuk, hogy az eddigi tanulmányok összefüggést találtak a vérlemezke átlagos térfogatának emelkedett értéke, a trombóziskialakulás és a rossz prognózis közt. Továbbra is kérdés azonban, hogy a megnövekedett vérlemezke-méret vajon oka-e vagy sem a trombózis következményének? Az MPV nagyságának változását számos tényező befolyásolja, többek közt a nem, életkor, az etnikai hovatartozás, így kérdés az is, hogy mennyire lehet figyelembe venni az értékét az egyes betegségek prognosztikájában (116). Többek közt ezen kérdésekre is választ ad Vasudeva közleménye, melyben arra utal, hogy a vérlemezkéket és MPV-t érintő további komplex genetikai vizsgálatok segítséget adhatnak neurovaszkuláris betegségek kezelési stratégiáinak kidolgozásában (117). Ezek alapján az MPV ígéretes prognosztikai markernek ígérkezik bizonyos betegcsoportokban.

1.5.3. Vérlemezke-funkció vizsgálata

Súlyos vérzéses szövődményhez vezethetnek nemcsak a különböző okokból fellépő trombocitopéniák, hanem a trombociták hibás működése is. A trombocitafunkciót különböző mérési eljárásokkal vizsgálhatjuk. Ennek jelentősége az örökletes és szerzett (aggregációt gátló szerek) trombocitafunkciós rendellenességek kimutatásában van. Az eljárás minden klinikai szakterületén rendkívüli fontossággal bír, hiszen az eredmény birtokában az egyes beavatkozások elvégzése vagy halasztása döntő jelentőségű lehet. Laboratóriumi trombocitareaktivitás mérésére szolgáló tesztek közül ma már széles paletta áll rendelkezésünkre, melyek közül mindegyiknek megvannak a maga korlátai. A trombocitaműködés vizsgálatára régen a vérzési idő mérése volt használatos, de ezt kiszorította a gyakorlatból nem megfelelő érzékenysége miatt a trombocitafunkció-analizátor (PFA-100: Platelet Function Analyser). Ezen kívül napjainkban igen elterjedt az aggregometria – citrátos vagy teljes vérből történik a mérés – mely többféle hozzáadott agonistával (ADP, adrenalin, kollagén, risztocetin) ad információt a trombocitaaggregációról. Áramlási citometriával a trombociták felszíni glikoproteinjeit

fluoreszcens CD markerekkel jelölve, meghatározható az aktivált állapotban lévő vérlemezkék száma.

A Point of Care Testing (POCT), vagy betegágy melletti labordiagnosztika definíció szerint magában foglal minden olyan laboratóriumi vizsgálatot, melyet a hagyományos központi laboratóriumokon kívül végeznek: akár fekvőbeteg intézményekben közvetlenül a betegágy mellett, vagy a háziorvosi ellátásban a rendelőben, illetve a beteg által kivitelezve otthonában.

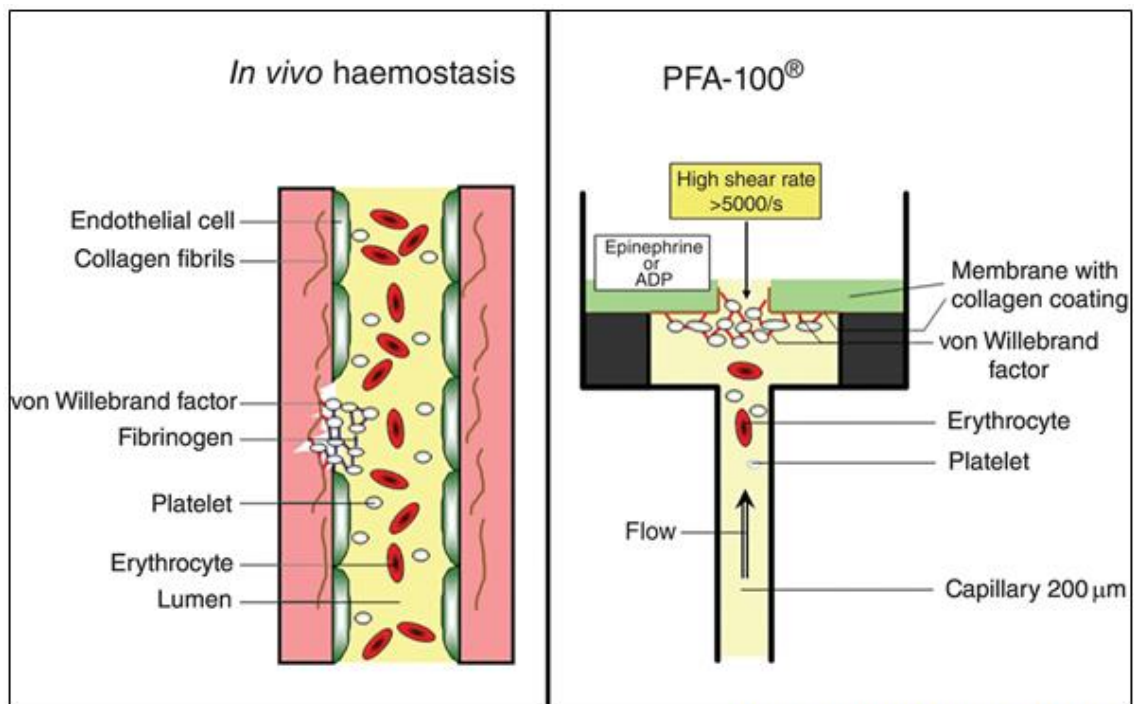
A POCT diagnosztika elterjedésében a laborvizsgálatokkal szembeni gyorsabb eredmények – rövidebb „turn-around-time” (TAT) – ezzel a betegápolási napok lerövidülése, könnyen kezelhetőség, minimális minta-előkészítési igény, és a sürgősségi ellátásban való alkalmazhatósága játszottak fő szerepet. Legismertebb formája a betegágy melletti vércukormérés, de POC tesztek alkalmazhatók ezen felül kardiológiai marker (troponin) vizsgálatára, klinikai kémiai tesztek (vérgázok, ionok, laktát, vesefunkció, kooximetria) elvégzésére, néhány hormon (vizelet-hCG, intraoperatív PTH) szintjének mérésére, toxikológiai vizsgálatokra és a hemosztázis és hematológiai tesztek kivitelezésére. Hemosztázis vizsgálatára POCT segítségével a PI-INR és az aPTI meghatározása lehetséges. A protrombin idő meghatározására az ú.n. CoaguCheck^R készülék alkalmazható, mely a vércukormérőhöz hasonlóan kevés vérből, 1 perc alatt pontos, központi laborban mért értékekkel korreláló eredményt ad. A Hemochron ITC nevű készülék az aPTI mérésére alkalmas, de megbízhatósága elmarad az előbb ismertetett PI méréshez képest. Az ATC (Activated Clotting Time) a nem frakcionált heparin (UFH) antikoaguláns hatásának monitorozására alkalmas teszt. Legelterjedtebb az intervenciós kardiológiában és a szívsebészetben, főleg "extracorporeal membrane oxygenation" (ECMO) alkalmazása során. A műszer az aktivált alvadási időt méri, amely az aPTI analógja. Normál értéke 90-120s, és 400-480s között tekinthető kardiopulmonáris bypass (CPB) folyamán biztonságosnak.

Point of Care tesztek egy új, teljes vérből végezhető aggregometrián alapuló módszere a Multiplate impedancia-aggregometria (MEA) (1118,119).

1.5.3.1. Platelet function analyser (PFA-100)

A PFA-100 az elsők között alkalmazott olyan POC készülék, amely a veleszületett és szerzett trombocitafunkció károsodásának kimutatására alkalmas a trombociták adhéziójának és aggregációjának in vitro meghatározásával. A módszer alapja az egyszer használatos patron, melynek egyik nyílásába kerül a vizsgálatához használt, Na₃-citráttal

alvadásgátolt teljes vér, ami vákuum segítségével, egyenletes áramlással egy membránnal lezárt rezervoárba kerül. Ez a membrán kétféle lehet, attól függően, hogy milyen trombocitaaktiváló anyagokkal van átítatva. Egyik típusú membrán adrenalin és kollagén, másik ADP és kollagén alapú. A rezervoáron egy nyílás található, amin a vér egyenletesen áramlik át – szimulálva a kis kapillárisok *in vivo* hemodinamikáját – és az aktivált trombociták ezen nyílás falához kitapadva fokozatosan elzárják azt. A készülék ezt az ún. záródási időt (closure time) méri, amikor a kitapadt trombocitadugó teljesen elzárja az utat az áramló vér előtt (**13. ábra**). A PFA-100 érzékeny számos veleszületett trombocitafunkciós betegségre, mint a von Willebrand betegség (vWD) vagy a Glanzmann trombasténia, valamint alkalmas ezen betegségek terápiás monitorozására is. Alkalmazható a trombocta-aggregációgátló szerek, mint a clopidogrel, vagy az aspirin, és a tromboltikus terápia során előidézett trombocita-funkciózavar detektálására (120,121).

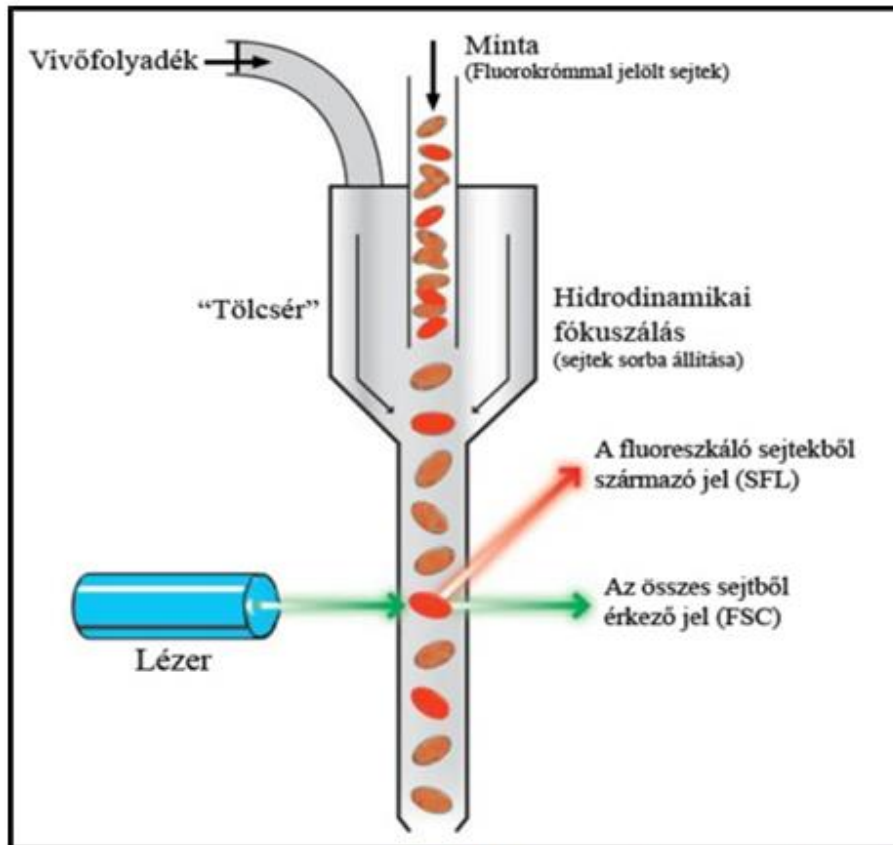


<https://slideplayer.com/slide/4494135/>

13. ábra: Platelet function Analyser (PFA-100TM) készülék működési elve. A készülék fő eleme az egyszer használatos patron, melynek egyik nyílásába kerül a Na₃-citráttal alvadásgátolt teljes vér. Vákuum hatására a minta egyenletes áramlással egy kis rezervoárba kerül, melyen van egy nyílás. A nitrocellulóz membrán vérlemezke-aktiváló (kollagén és adrenalin, illetve kollagén és ADP) anyagokkal van átítatva, így a vér kontaktusba kerül vele, s ez által a trombociták aktiválódnak, majd nagy sebességgel áramlanak tovább, miközben kitapadnak a nyíláshoz és fokozatosan eltömítik azt. A készülék ezt a záródási időt méri.

1.5.3.2. Áramlási citometria (Flow cytometria)

Az áramlási citometria egy olyan vizsgálóeljárás, amely nagyszámú különálló sejtek gyors, fényelnyelési, fényszórási és fluoreszcenciai tulajdonságait képes detektálni. Lehetővé válik felhasználásával kevert sejtpopulációban az egyes sejttípusok külön mérése, analizálása és szeparálása funkcionális állapot vagy fenotípus szerint. Vérplazmában vagy sejttenyésztő médiumban szabadon úszó sejteket képes pl. méretük szerint felismerni, megszámlálni és – ha szükséges – kigyűjteni az oldatból további vizsgálatok számára. Információt ad a relatív sejtméretről, a sejtek relatív granuláltságáról, belső komplexitásáról és fluoreszcencia intenzitásukról. A folyadékrendszer biztosítja a sejtek áramlását és a sejteket a gerjesztés helyére fókuszálja. A keresztülhaladó sejteket a készülékben lézersugár világítja meg, és az optikai jeleket a készülék detektálja, dolgozza fel (14. ábra).



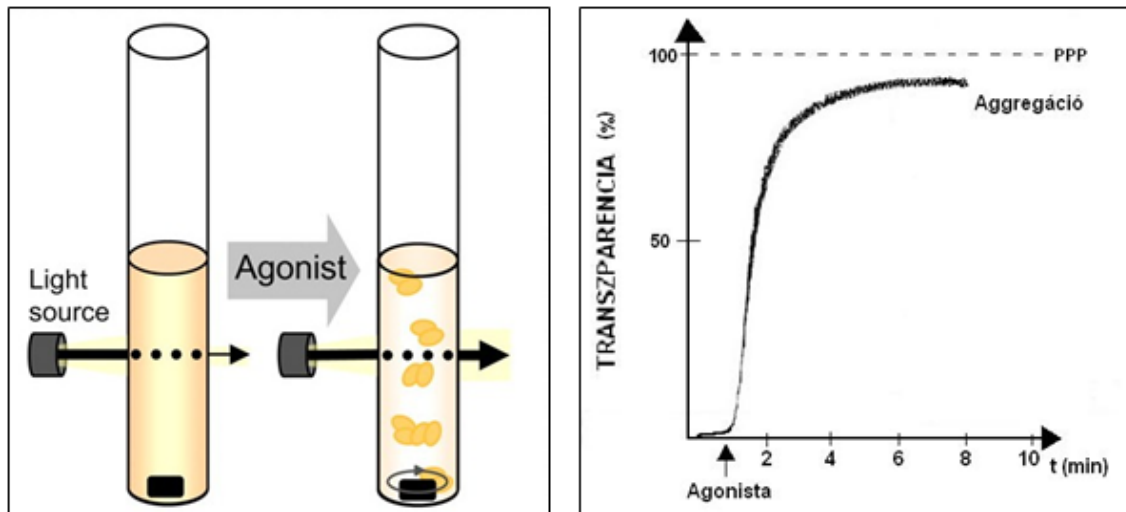
<https://mb.ft.hu/assets/sejtanalitika/aramlasicitometria.pdf>

14. ábra: Az áramlási citométer működési elve: az áramlási fej közepén a „tölcsérben” a minta (fluorokrómmal jelölt sejtek) áramlik, amit a köpenyfolyadék (sheath fluid) koncentrikus áramlása biztosít. Ez a hidrodinamikai fókuszálás, ennek célja a sejtek sorba rendezése azért, hogy egyesével tudjanak áthaladni a lézerfényforrás előtt. A piros nyíl az ábrán a fluoreszkáló sejtekből származó jel (SFL), a zöld nyíl a sejtek átmenő fényszórását jelöli. A műszer mindkét adatot detektálja és a sejteket ez alapján különíti el

Alkalmazási területei tág határok között mozognak, felhasználható immunhiányos állapotok, malignus hematológiai kórképek diagnosztikájában és differenciál diagnosztikájában, autoimmun betegségek nyomonkövetésében, HLA-haplotípus vizsgálatában, fertőző betegségek diagnosztikájában, pre- és poszttranszlációs állapotok nyomonkövetésében. Felhasználható DNS-, RNS-tartalom mérésére és kvantitatív mérésekre, mint pl. a vizsgált markert expresszáló sejtek mennyiségének, ill. sejtfelszínen expresszálódó antigének meghatározására. A trombocita aktivációja és analízise ez utóbbi alkalmazáson belül mérhető. A trombociták membránján lévő glikoproteinek mennyisége tájékoztat a vérlemezke-aktiváció szintjéről, meghatározható az aktivált trombociták száma, a GP IIb/IIIa molekula mennyisége is. Áramlási citometriás vizsgálat szükséges a különböző glikoproteinek hiányával járó ritka betegségek diagnózisának megerősítéséhez (122,123).

1.5.3.3. Optikai aggregometria

Az optikai aggregometria az 1960-as években került felfedezésre, és azóta is gold standardnak számít a trombocitafunkciók tesztelésében. Annak ellenére, hogy használata széles körben elterjedt, kevésbé standardizált és számos változata létezik a laboratóriumi gyakorlatban. Az aggregométer a tromboctaaggregáció meghatározására szolgáló eszköz, alapjait tekintve tulajdonképpen egy fotométer, amivel egy oldat fényáteresztőképességét tudjuk mérni. A méréshez Na₃-citráttal alvadásgátolt vér centrifugálása után nyert vérlemezkedús plazma (PRP) és vérlemezke-szegény plazma (PPP) szükséges. Először a fényáteresztő képességet, a transzparenciát kell beállítani a műszeren, mégpedig úgy, hogy a PPP oldat transzparenciája lesz a 100%, míg a PRP transzparenciája 0%. Ezután a PRP oldathoz trombocta agonista adásával – ADP, adrenalin, kollagén, risztocetin – megindul az aggregáció, amivel párhuzamosan nő a transzparencia, a PPP oldat 100%-os értékéhez közeledve **(15. ábra, bal oldal)**. A folyamat egy idő – transzparenciagörbével ábrázolható, ahol a legmagasabb mért transzparencia a maximális aggregációnak felel meg **(15. ábra, jobb oldal)** (124).



Jackson S.P.: Blood June 15, 2007; 109 (12)

15. ábra: Az aggregómeterben elhelyezett minta (PRP) átvilágítása agonista adása előtt és után (balra), és egy egészséges egyén idő - aggregációsgörbéje (jobbra).

1.5.3.4. Multiplate® Analyser

A trombocitafunkció mérésének számos lehetősége közül a beteggy mellett is használható kompakt, gyors mérésre alkalmas, az 1980-as években Cardinal és Flower által kifejlesztett (125) Multiplate® Analyser (Roche) (16. ábra) terjedt el leginkább a mindennapi gyakorlatban. Nevének összetétele a 'multiple platelet function analyzer' szavakból adódik.

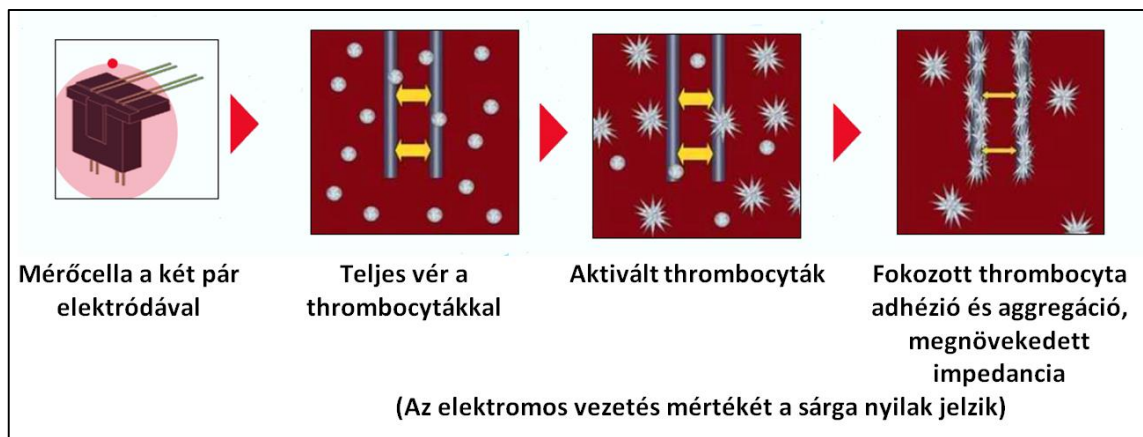


16. ábra: Multiplate® Analyser készülék

A műszer a trombocitafunkció közvetlenül teljes vérben végzett, szenzitív vizsgálatára alkalmas. A vizsgálat előkészítést nem igénylő, csupán 300 µl, hirudinnal (direkt trombin inhibitor) alvadásgátolt teljes vérmintából történik. A kis mennyiség teszi

lehetővé széles körű elterjedését a klinikai gyakorlatban (gyermekgyógyászat) illetve kutatási alkalmazásokban (állatkísérletek) egyaránt.

A mérés alapelve az, hogy a nyugalmi állapotban lévő trombociták nem trombozódnak. Aktiválódást követően azonban aggregálódnak (*in vivo*: endotélhez, *in vitro*: elektróda felszínre), majd kitapadnak a tesztcellákban (küvetékben) lévő két ezüstborítású, magas vezetőképességgel rendelkező 3,2 mm hosszú rézrúd elektróda felszínéhez, megváltoztatva ezáltal azok ellenállását (**17. ábra**).

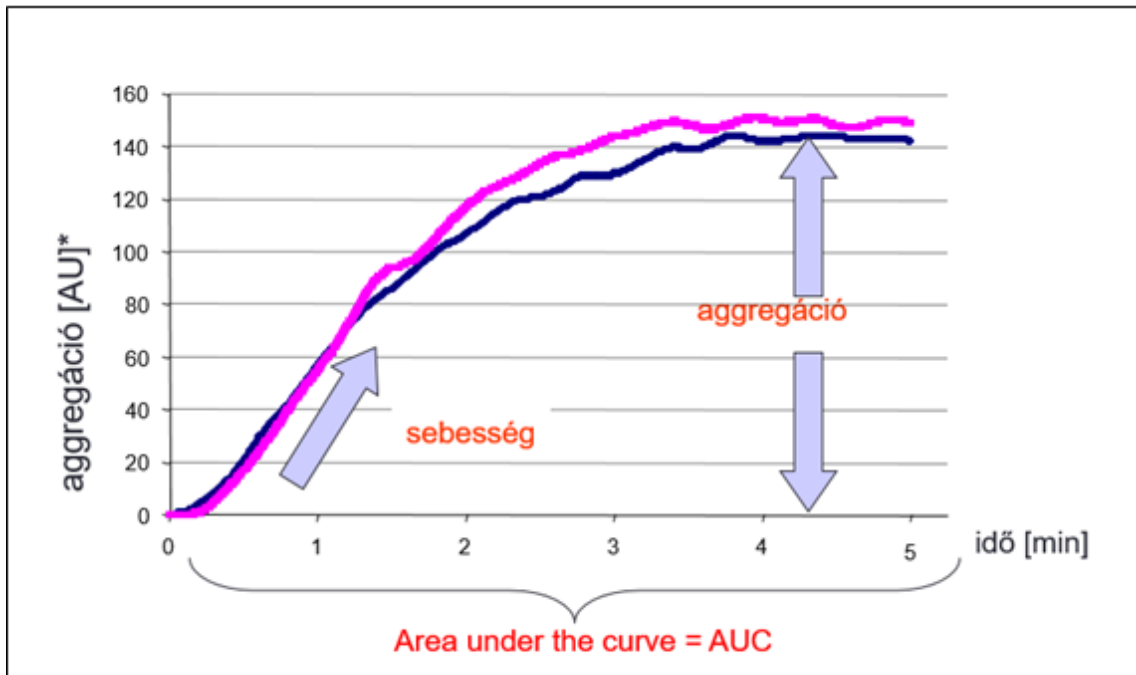


17. ábra: A trombocitaaggregáció és kitapadás hatása a szenzor elektródák közti impedanciára

Az aggregáció mérésekhez a mérőcellákban lévő 300 μ l hirudinos teljes vérmintát 1:2 arányban 0,9% NaCl oldattal kell hígítani. Ezután 37 °C fokon 3 perc inkubációt követően a következő lépés a teszt agonista hozzáadása. Az impedanciaváltozás eredménye 6 perc elteltével jelenik meg a műszer képernyőjén (**18. ábra**). A készülék 5 csatornán, egyidejűleg 5 cellában végzi a méréseket, egy a rendszerhez integrált Windows XP alapú szoftver segítségével. Az ellenállásváltozás mérése paralel történik a két elektródon, így biztosítva a mérések közötti kongruenciát. A szenzor elektródákkal detektált impedancianövekedést a komputerprogram automatikusan átalakítja önkényesen választott aggregáció egységekké (AU: arbitrary aggregation units,), ami a kijelző képernyőjén számszerűen és az idő függvényében grafikusán ábrázolva jelenik meg (AU*min). Körülbelül 8 AU felel meg 1 ohm ellenállásnak. A műszer mennyiségileg az aggregáció mértékét az AU*min görbe alatti terület nagyságával (AUC: Area Under the Curve,) automatikusan határozza meg. A csatornákon kijelzett AUC eredmény az egy cellában végzett két mérés számtani középértéke. További két fontos paraméter kerül még kiszámításra: az aggregáció (az impedancia növekedése a vizsgálat ideje alatt) és a sebesség (az aggregációs görbe maximális meredeksége) (**19. ábra**).

	<p>Multiplate® Analyzer impedancia aggregométer (Roche)</p>
	<p>Küvetta behelyezése a mérőhelyre</p>
	<p>Érzékelő kábelek csatlakoztatása</p>
	<p>300 µl 0,9%-os NaCl + 300 µl hirudinos teljesvér betöltése</p>
	<p>3 perc inkubálás</p>
	<p>Agonista hozzáadása ADP-teszt ASPI-teszt TRAP-teszt COLL-teszt</p>
	<p>Mérési idő 6 perc EREDMÉNY</p>

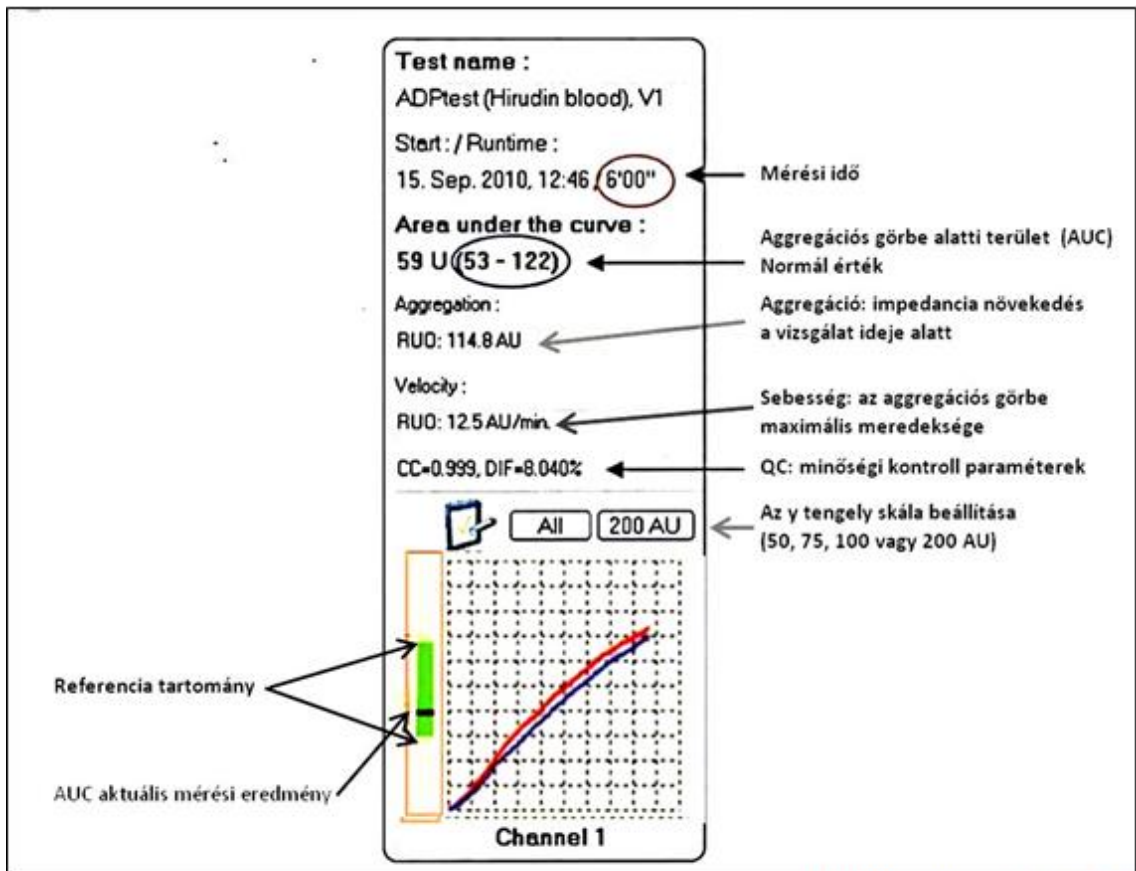
18. ábra: A tromboctaaggregáció mérési folyamata



Multiplate Compendium, 2007

19. ábra: A trombocitafunkció mérés jellemző paraméterei

A csatornakijelzőn megjelenített adatok a következők: betegazonosító, a teszt típusa, a vizsgálat ideje, időtartama és az aggregációs paraméterek (20. ábra).

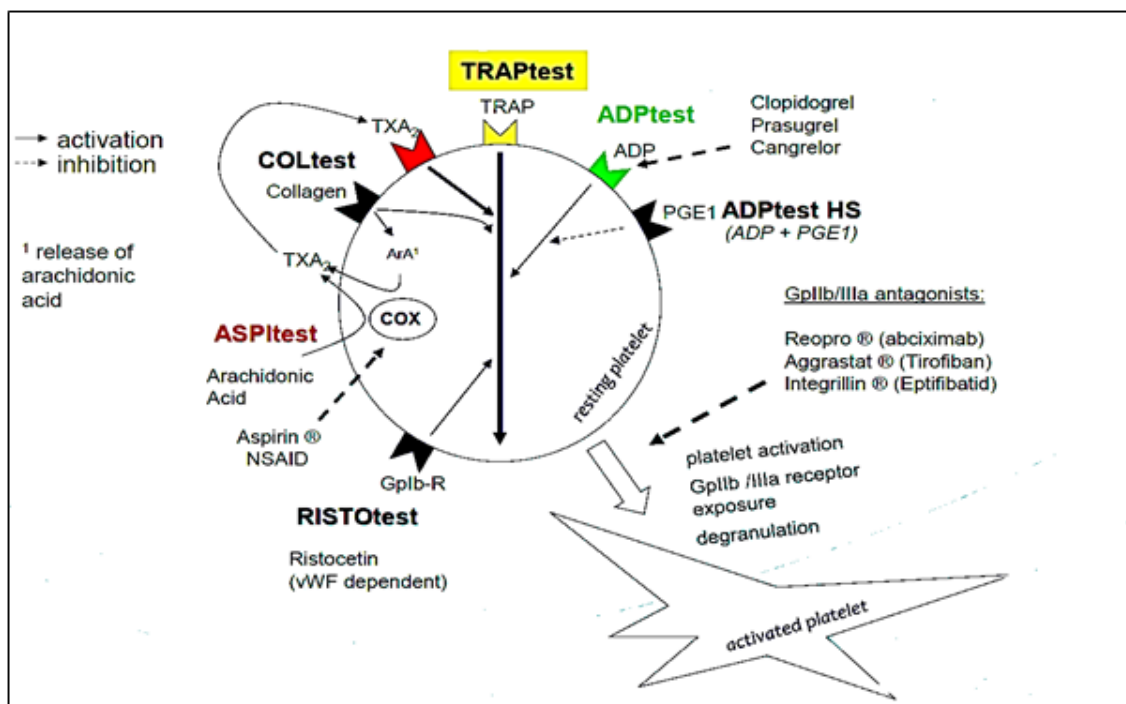


Multiplate Compendium, 2007

20. ábra: A csatornakijelzőn megjelenített számszerű és grafikus adatok

A trombocitafunkciók széles körű megítélésére a Multiplate® különféle tesztek elvégzésére képes. Ezek hatásmechanizmusának sematikus ábrázolása az **21. ábrán** látható.

- *ASPI-teszt*: arachidonsavstimuláció – COX enzim szubsztrátja – TXA₂ képződés, mely egy potens trombocita aktivációt elindító anyag (aszpirinhatás vizsgálata) ArA 0,5 mmol
- *COL-teszt*: kollagén aktiválja a kollagénreceptort, amely endogén arachidonsav-felszabadulást eredményes, az így képződött TXA₂ aktiválja a trombocitákat
- *TRAP-teszt*: TRAP-6 stimulálja a trombociták felszínén lévő trombin receptort, a trombin potens trombocita aktivátor. (GPIIb/IIIa rec. antagonisták hatásának vizsgálata)
- *ADP-teszt*: az ADP a P2Y₁₂-receptor gátló hatásának meghatározására szolgál (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor) – ADP 6,5 μmol
- *ADP-teszt HS* (high sensitive): ADP + endogén PGE1 inhibitor teszi lehetővé, hogy a clopidogrelhatást még pontosabban meghatározzuk.



Multiplate Compendium, 2007

21. ábra: Az alkalmazott trombocita-antagonisták hatásmechanizmusa

A Multiplate[®] használatának legfontosabb prediktív értéke a személyre szabott trombocita-aggregációgátló gyógyszerek kiválasztásában, a gyógyszerdózisok megállapításában van. Ismert, hogy a betegek 20%-a inadekvát módon reagál a clopidogrel kezelésre. A gyógyszeres kezelés ellenére fennálló, magas reziduális trombocitareaktivitás (HRPR) 5-10-szeresére növeli a recidív iszkémiás epizódok kialakulásának esélyét (125,126,127). A legjobb prediktív értékkel rendelkezik a vérzéses rizikó meghatározásában is: kettős trombocita-aggregációgátló kezelésben részesülő betegek fokozott intra- és posztoperatív vérzéses rizikónak, transzfúziós igénynek vannak kitéve, továbbá clopidogrel high-responder betegek esetén 2,6-szer magasabb vérzéses rizikóval kell számolni (128,129). Trombocitopatiák kimutatására is alkalmas (szemben az optikai aggregometriával), úgy, mint Glanzmann-trombasténia, Bernard-Soulier-trombasténia, von Willebrand betegség, heparin indukálta trombocitopénia (130,131). A Multiplate[®] készülékkel következetes eredményeket kapunk jól standardizált módszer, a kis mennyiségű vérigény miatt jól reprodukálható (132,133). A nemzetközi irodalomban 446 PubMed(Medline), 76 Cochrane cikkben hivatkoznak rá, továbbá klinikai szakmai ajánlások, valamint konszenzusjavaslatok alapjául is szolgál.

1.5.4. Antiszedimentációs technika

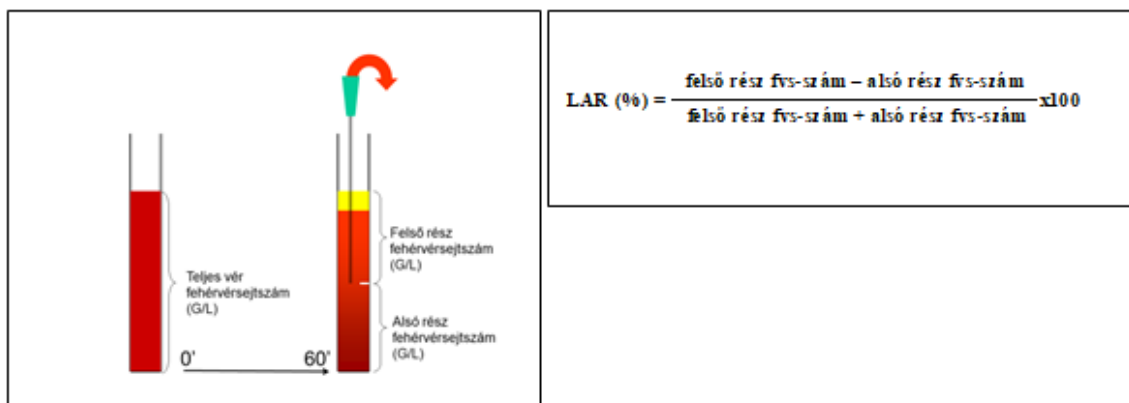
A különböző akut és krónikus gyulladással járó folyamatokról a vérszűnyedés (ESZR: eritrocita szedimentációs ráta, más elnevezéssel We: Westergren), mint nem specifikus, egyszerű és érzékeny vizsgálat, információt adhat. Ismert, hogy értéke nem utal a betegség milyenségére, a gyulladás pontos okára sem. A múlt század első felében már megállapították az akut fázis reakció és az ESZR közti összefüggést és azt is, hogy mindezt a nagy molekulásúlyú akut fázis fehérjék, főleg a fibrinogén, gyorsítják. Ismertek azok a mechanizmusok, kölcsönhatások, fizikai-kémia folyamatok is, melyek mindezt befolyásolják (134).

A fehérvérsejtek (fvs) mozgásának dinamikája kevésbé volt a vizsgálat tárgya. A szűnyedéses csőben történő felfelé mozgásáról Cutts és munkatársai 1970-ben azt állapították meg, hogy az egyenesen arányosságban van a vörösvértest-szűnyedéssel. Annak mértékét, befolyásoló tényezőit viszont nem vizsgálták (135). Bogár és munkatársainak az 1990-es évek közepén az volt a hipotézisük, hogy a leukociták aszcendáló mozgását nem csak a vörösvértest-aggregátumok, hanem egyéb tényezők is befolyásolják, úgy, mint a sejtaktivációt követő fajsúly - és tapadékonyságváltozás. Azt feltételezték, ha mérik a véroszlop felső felében lévő fehérvérsejtek számát, akkor az jelzi

az akut fázis reakcióra utaló kórélettani változást, s ezzel egy egyszerűen kivitelezhető, specifikus teszthez jutottak (136).

Ennek mérésére a következő technikát dolgozták ki: A Westergren-csőbe levett vérminta egyórás ülepitése után a véroszlop magasságának fele feletti részt eltávolították, majd mindkét frakcióból meghatározták a fvs-koncentrációt. Azt feltételezték, hogy a fvs-ek kezdetben homogén eloszlást adnak, így a szedimentáció előtti értéket 100%-nak véve kiszámítható, hogy egy óra elteltével a leukociták hány %-a halad a csőben felfelé, illetve lefelé. A szerzők a jelenséget leukocita antiszedimentációs rátának (LAR) nevezték el, mivel a fehérvérsejtek a vörösvértestek szedimentációjával ellentétes mozgását tükrözi. A LAR százalékos értékét megkapjuk, ha a felső és alsó rész fehérvérsejtszámkülönbségét osztjuk a két érték összegével és szorozzuk százzal (22. ábra).

A LAR eredmény pozitív előjelű, ha a felső részben lévő fvs koncentráció az egy órás vérsüllyedés után magasabb, mint a kiindulási vérminta fvs száma. A negatív szám pedig arra utal, hogy a felső véroszlop leukocitaszáma kisebb az alsóénál, vagyis a leukociták fajsúlya jelentősen nagyobb, mint a plazmáé.



22. ábra: A leukocita antiszedimentáció kivitelezése és a leukocita antiszedimentációs ráta kiszámítása (LAR)

A szerzők első eredményeik után arra a következtetésre jutottak, hogy a fvs-ek az akut fázis reakció során sokkal gyorsabban aktiválódnak, mint az akut fázis fehérjék (PCT, CRP) termelődése, így a LAR a gyulladásos folyamatok korai és érzékeny tesztje lehet (136).

A LAR felhasználásának lehetőségeit tovább vizsgálva megnézték, hogy 33 beteg nyelőcsőműtétét követően a korai posztoperatív szakban a prokalcitonin (PCT) és a LAR előre jelzi-e a fenyegető légzési elégtelenséget. Eredményeik azt mutatták, hogy a LAR

és a PCT elkülönítette egymástól a harmadik napon a normoxiás és hipoxiás betegcsoportokat, jelezve ezzel a fenyegető légzési elégtelenséget (137).

A LAR további gyakorlati alkalmazását kutatva ugyanezen munkacsoport arra kereste a választ, hogy vajon bacterémia esetén kialakuló láz befolyásolja-e a fehérvérsejtek antiszedimentációs tulajdonságát. Vizsgálatukba intenzív osztályon fekvő 39 beteget vontak be, akiknél a kezelés során először jelentkezett láz. Hemokultúra levétele mellett LAR-vizsgálat is történt. Azt találták, hogy a LAR szignifikánsan magasabb értéket adott pozitív hemokultúra esetén a negatív eredményhez képest. Következtetésként arra jutottak, hogy a lázzal kapcsolatos terápiás döntéseket segítheti a LAR meghatározása (138).

Az agyi történések és az azt követően fellépő nem specifikus gyulladási folyamatok közti összefüggés ismert. A tüdőgyulladás és a húgyúti infekció alakul ki leggyakrabban az akut ischaemiás stroke szövődményeként, jellemzően a 4-5. poszt-stroke napon, melyet rosszabb klinikai kimenetel kísér. A LAR gyulladással járó folyamatokban adott változását alapul véve Molnár és munkatársai azt nézték, hogy a CRP és a bed side tesztként végezhető LAR előre jelzi-e az iszkémiás stroke korai szakaszában az infekciót és a kimenetelt. Azoknál a betegeknél találtak magasabb fertőzési arányt, akiknél 24 óránál elmaradt a LAR emelkedés, viszont 72 óra elteltével a baseline értékhez képest emelkedett CRP volt. A hiányzó LAR emelkedés az immunválasz diszfunkciójára utal és a CRP-nél korábban jelzi a poszt-stroke infekció kialakulását. Megállapították, hogy a CRP és a LAR segíthetnek a fertőzések rizikójának becslésében (139).

Politrauma esetén és égésbetegséghez társulóan szintén kialakul a szisztémás gyulladással járó válaszreakció, mely során leukocitaaktiváció történik. Meghatározva ezen betegek CRP- és LAR-értékeit Rozanovic és munkacsoportja azt találta, hogy az elhalálozott szeptikus betegeknél a CRP és a LAR az első két napon szignifikánsan magasabb volt, mint a túlélőkben és a kontroll csoportban, azonban szepszis előtt egy nappal jelentős csökkenést mutatott. Megállapították, hogy a LAR- és a CRP-szintek csökkenése figyelmeztető jele lehet a szeptikus szövődmények kialakulásának (140).

A vörösvértest-süllyedés (ESzR) és a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) mechanizmusa illetve a klinikai gyakorlatban betöltött szerepe alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a trombociták hogyan viselkednek a süllyedéses csőben? Található-e

valamilyen összefüggés az így kapott eredmények és az egyes betegségek közt? Erre a kérdésre irodalmi adat nem állt rendelkezésre, így arra gondoltunk, hogy a LAR-hoz hasonlóan megvizsgáljuk a vérlemezke-mozgást.

1.6. A vérelemeske morfológiájának vizsgálata

1.6.1. Transzmissziós Elektronmikroszkópia (TEM)

A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM: transmission electron microscopy) a vizsgálni kívánt minta speciális sajátosságainak nagyított, képszerű megjelenítésére és vizsgálatára alkalmas eszköz. Az első TEM-et 1931ben E. Ruska és M. Knoll német mérnökök szerkesztették.

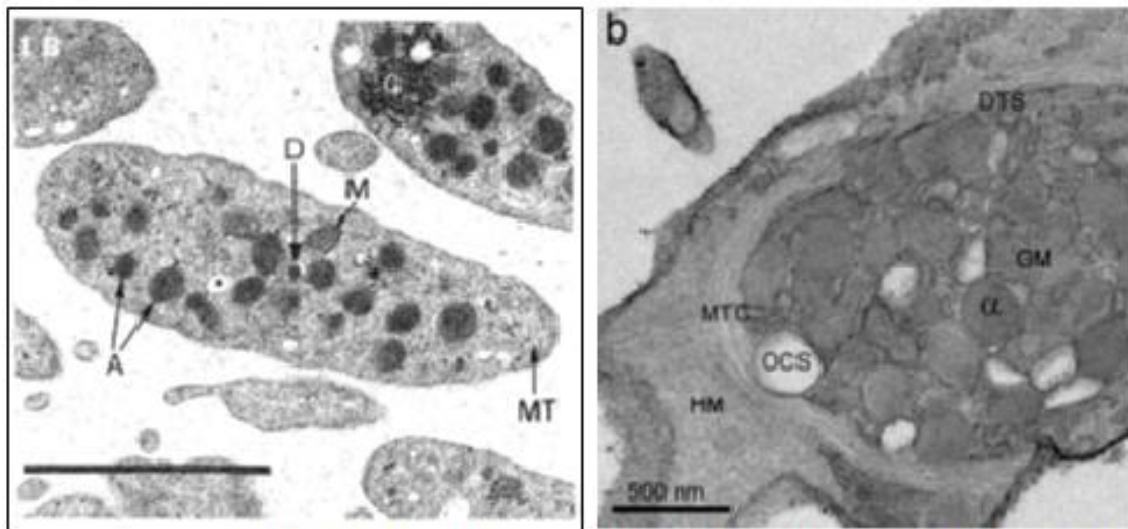
A képképzéshez fotonok helyett elektronokat használ, amelyek keresztülhaladnak a mintán, innen a transzmissziós elnevezés. Mivel az elektronok hullámhossza három nagyságrenddel kisebb, mint a látható fényé, a TEM felbontása <1 nm.

TEM lényegében atomi felbontású, azaz az úgynevezett pontfeloldás $0,14-0,4$ nm. A TEM a vékony minta egyik oldalán elhelyezkedő megvilágító rendszerből és a minta másik oldalán elhelyezkedő képképző-, vetítőrendszerből áll. Az elektronsugár a vizsgált mintán áthatolva, annak egyes részein különbözőképpen szóródik, majd így jön létre a kontraszt (23. ábra). Az elektronsugár fluoreszcens képernyőn vagy a számítógép képernyőjén kerül megjelenítésre. Ezen tulajdonságai alapján számos kutatási területen kapott egyre nagyobb teret.



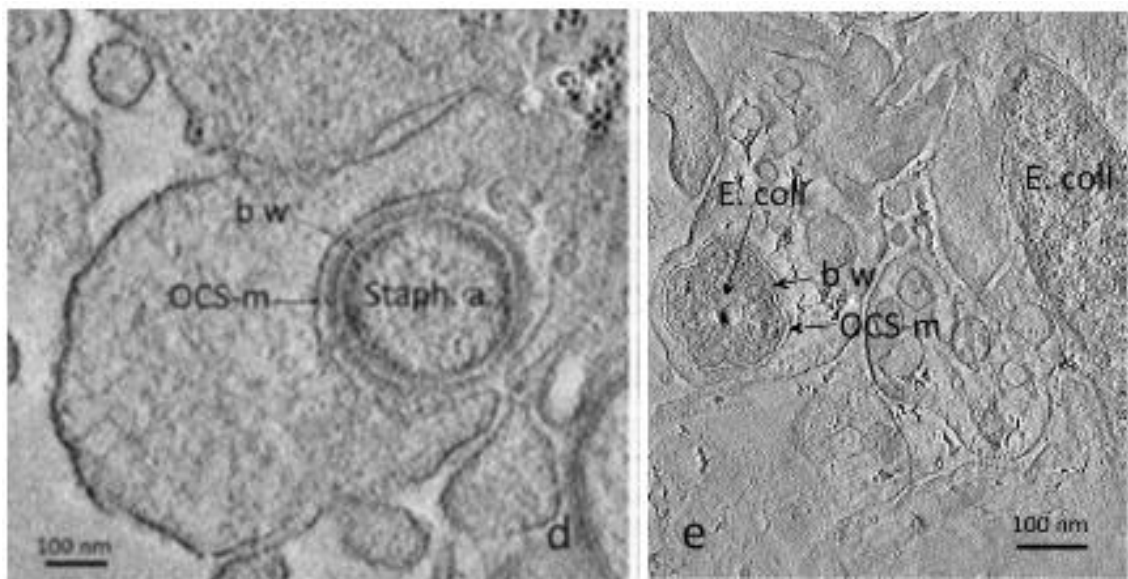
23. ábra: A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) szerkezetének sematikus ábrázolása

A vérlemezkék főbb infrastruktúrájának morfológiai vizsgálata az 1970-es években kezdődött. Először az egészséges vérlemezkék szerkezetét térképezték fel elektronmikroszkóppal (140), majd a trombocitákhoz asszociált rendellenesség esetén is történtek vizsgálatok. A technika fejlődése, a minták egyre pontosabb előkészítése lehetővé tette, hogy a legfinomabb szerkezeti egységek (24. ábra) (mikrotubulus, mikrofilamentumok, a felülethez kapcsolt csatornarendszer) is láthatóvá válhassanak (142,143), a trombociták működés közbeni (25. ábra) morfológiai változásának megjelenítése mellett (144).



Scanning Electron Microscopy (1985) <http://dx.doi.org/10.5772/60673>

24. ábra: Trombocita elektronmikroszkópos képe 24./1B ábra: α -granulum (A), dense-granulum (D), mitokondrium (M), mikrotubulus (MT). 24/b ábra mikrotubulus (MTC), open canalicular system (OCS), dense tubular system (DTS), α -granulum (α), Hyalomere (HM), granulome (GM)



J Cardiol and Cardiovasc Sciences. 2019;3(1):4-10

25. ábra: Trombocita transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele. d ábra: Staphylococcus aureus az OCS-ben (open canalicular system), e ábra: az E.coli teljes bekebelezése az OCS-ben. OCS-m = OCS membrán, bw = baktérium fala

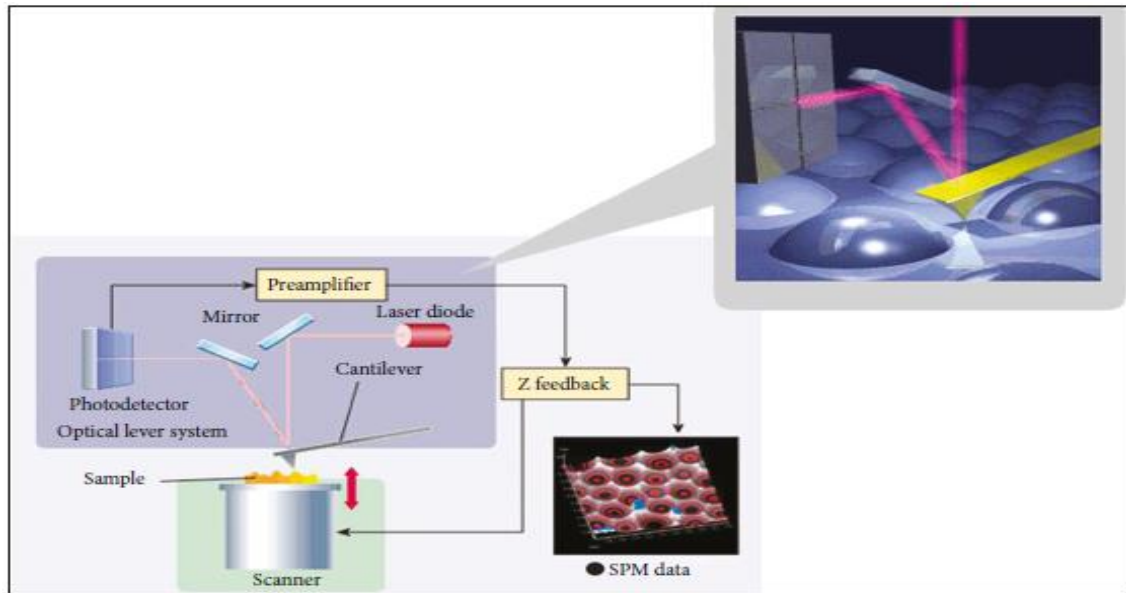
1.6.2. Atomerő-mikroszkópia (AFM, atomic force microscopy)

Az atomerő mikroszkópia (AFM, atomic force microscopy) a pásztázó, tűszondás mikroszkópiák közé tartozik. A pásztázó mikroszkópos módszerek megjelenése és elterjedése a nyolcvanas években történt. 1981-ben Heinrich Rohrer és Gerd Binnig kifejlesztette a pásztázó alagútefektus-mikroszkópot, mely munkájukért 1986-ban fizikai Nobel díjat kaptak. Pásztázó alagútefektus-mikroszkópiánál egy igen hegyes tű nagyon közel halad el egy elektromosan vezető felszínhez. Az alagútefektus következtében a tű és a felszín között áram folyik, melynek erőssége a tű és a felszín közti távolság függvényében változik. A módszer így alkalmas a tű és a felszín közti igen kis távolságok nagyon pontos meghatározására (145). A pásztázó mikroszkópos módszerek előnye a diffrakciólimitált módszerekkel szemben az, hogy a legkisebb feloldható távolságot nem korlátozza a fény hullámtermészete. A pásztázó mikroszkópok működési elve kicsit eltérő lehet, de minden esetben egy szonda pásztázza a vizsgált minta felszínét, mely topológiai képet eredményez. A tű precíz mozgatását a felszín felett piezoelektromos átalakítók végzik. A felbontást a tű alakja és a tű hegyének mérete határozza meg.

Binnig 1985-ben találta fel a pásztázó atomerő mikroszkópiát, mely a minta és a szonda között fellépő atomi kölcsönhatások mérésén alapul. A pásztázó alagútefektus-mikroszkópiával szemben az AFM előnye, hogy elektromosan nem vezető minta topológiai képe is felvehető, így biológiai minták, például fehérjék leképezésére is alkalmas. Az AFM-szonda a rugólapka, mely egy rugalmas lemezből és annak a végén található igen hegyes tűből áll. A mérés elve a következő: nagyon hegyes, néhány atomnyi görbületi sugarú tű és a felszín között vonzó vagy taszító atomi kölcsönhatások ébrednek. Ennek következtében a rugólapka elhajlik és sajátfrekvenciája is megváltozik. A rugólapka pozíciójában bekövetkező apró változásokat a lapka felszínére vetített majd onnan visszavert lézersugár segítségével követjük, melyet egy pozícióérzékelő, kvadráns fotodióda detektál.

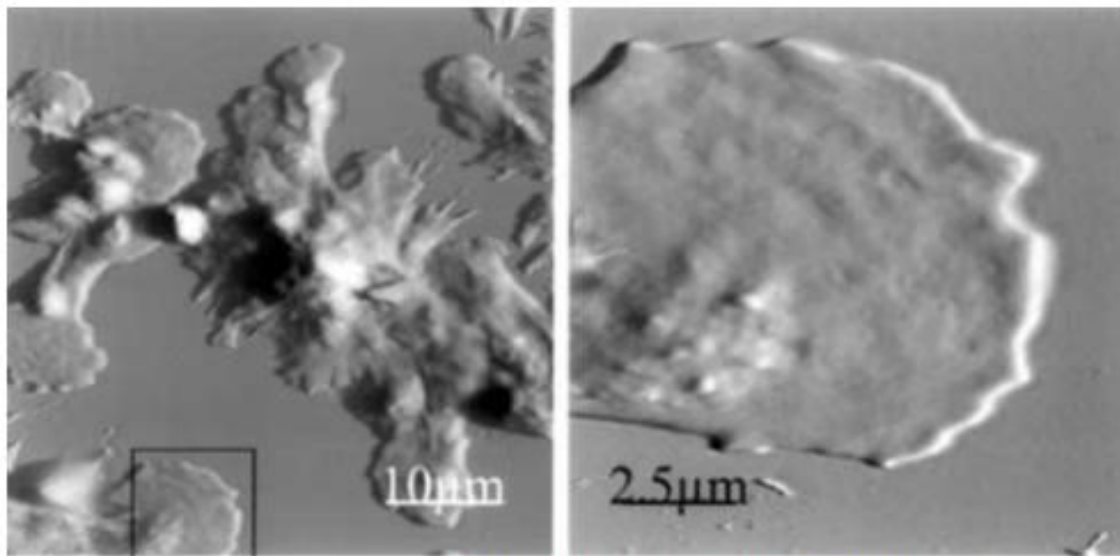
A topográfiai képalkotás során a rugólapka X-Y irányú elmozdulását piezoelektromos kristállyal vezéreljük, így pásztázva végig a mintát. A képalkotás több módon is megvalósítható. A rugólapkát a sajátfrekvenciájához közeli frekvencián rezgésbe kell hozni. A felszínhez közeledve a tű hegye és a minta atomjai között fellépő vonzó atomi kölcsönhatások következtében a rugólapka sajátfrekvenciája lecsökken. A piezo által keltett kényszerrezgés frekvenciája viszont nem változik, így a rezgés amplitúdójának csökkenése tapasztalható, aminek mértéke a felszíntől való távolsággal

arányos (**26. ábra**). A minta topográfiai képe így akár század nanométernyi pontossággal rekonstruálható (145,146).



26. ábra: Atomerő-mikroszkóp sematikus működési elve

Az AFM a közelmúltban rendkívül hatékonynak bizonyult az élő sejtek vizsgálatában. Páratlan előnye a kiváló térbeli hatás demonstrálása. Alacsony szkennelési erőnél a felületi domborzat válik láthatóvá, míg nagyobb erőknél a helyi rugalmasság jelentősen hozzájárul ahhoz, hogy a belső struktúrák, mint például a citoskeleton is láthatóvá váljon. Ezen tulajdonsága tette lehetővé a különböző sejtek, beleértve az érrendszer elemeinek (vérlemezkék (**27. ábra**), endoteliális sejtek) biomechanikai mérését (147).



Marchant, *Current Protein and Peptide Science* (2002)

27. ábra: Vérlemezke morfológiája fiziológias körülmények között. AFM-felvétel az elterült vérlemezkéről (10 x 10 mm) 0,52 nN nyomaték alatt

2. CÉLKITŰZÉSEK

Hipotézisünk az volt, hogy a leukocitákhoz hasonlóan a vérlemezkék is szeparálódnak valamilyen fiziko-kémiai tulajdonságuk alapján, illetve aktivációjukkal arányosan. Mivel a teljes vér egyórás ülepitése után két vérfrakciót (alsó és felső) választottunk szét, mind a teljes vérben, mind pedig a vérfrakciókban külön-külön megmértük a laborparamétereket (tct-szám, MPV, IPF stb), a vérlemezkék aggregációját (Multiplate aggregometria), illetve a morfológiai (TEM, AFM) jellemzőiket. Két tanulmányt terveztünk: egészséges egyéneknél (*Vérlemezkék funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken (Vizsgálat I.)*) illetve iszkémiás stroke miatt clopidogrelt szedő betegeknél (*Vérlemezkék funkcionális és morfológiai eltéréseinek vizsgálata clopidogrelt szedők esetében (Vizsgálat II.)*) a következő kérdésekre kerestünk választ:

2.1. Trombociták flotációjának vizsgálata

Célunk az volt, hogy megnézzük, mi történik a vérlemezkékkel 1 órás ülepités során. A LAR mintájára képeztük a trombocita antiszedimentációs rátát (TAR).

2.1.1. TAR vizsgálata egészséges kontrol csoportban.

2.1.2. TAR vizsgálata clopidogrelt szedő betegek esetében.

2.1.3. A TAR értékek összehasonlítása a két csoport között.

2.2. Éretlen trombocitafrakció (IPF) és átlagos trombocitaterfogat (MPV) vizsgálata

Vizsgálni kívántuk, hogy a trombocitaszám mellett az éretlen trombocitafrakció (IPF), az átlagos trombocitaterfogat (MPV), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR), valamint a magas fluoreszcencia intenzitást mutató éretlen trombocitafrakció (H-IPF) mutat-e különbséget az ülepités után nyert alsó és felső vérfrakciójában.

2.2.1. IPF, MPV, P-LCR és H-IPF értékeinek laboratóriumi kimutatása a kontroll csoportban.

2.2.2. IPF, MPV, P-LCR és H-IPF vizsgálata clopidogrelt szedő betegek esetében.

- 2.2.3 Kérdésünk az, hogy van-e különbség a szedimentálódott és felfelé szálló TCT-ák fenti értékeiben.

2.3. Trombocitaaggregáció (TAG) mérése

Arra kerestük a választ, hogy a teljes vér aggregációja, valamint a szeparáció során kettéválasztott az alsó és felső részben mért aggregáció (AUC, aggregáció, velocity) mutat-e különbséget. Az irodalmi adatok alapján ismert tény, hogy az emelkedett IPF rizikófaktora a súlyos kardiovaszkularis események kialakulásának, így célunk volt azt is megnézni, hogy a clopidogrel hatása és az értetlen vérlemezke eredmények közt van-e összefüggés.

- 2.3.1. Teljes vér vs. alsó és felső frakció TAG vizsgálata kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegek esetében.
- 2.3.2. Alsó vs. felső frakció TAG vizsgálata kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegek esetében.

A clopidogrel szedő betegeket a teljes vér TAG alapján reszponder és non-reszponder alcsoportokra osztottuk.

- 2.3.3. Kíváncsiak voltunk, hogy az IPF mutat-e különbséget a reszponder és non-reszponder alcsoportok között.

2.4. Trombociták transzmissziós elektronmikroszkópai vizsgálata

A képképző vizsgálatokkal azt szeretnénk tudni, hogy van-e különbség a szeparálódó trombocitaszubpopulációk morfológiájában.

- 2.4.1. Össze kívántuk hasonlítani, hogy van-e eltérés az alsó és a felső frakcióban lévő vérlemezkék area, periméter, konvex area, konvex periméter tulajdonságaiban.
- 2.4.2. Vizsgálni kívántuk, hogy a két frakcióban látható sötét (alfa-granulumok) és világos (dense-granulumok) granulumok számában van-e eltérés.

2.5. Trombociták atomerő-mikroszkópos vizsgálata

Ezzel a különleges képalkotó vizsgálatokkal arra szeretnénk volna választ kapni, hogy van-e különbség a szeparálódó trombociták atomerő mikroszkópos morfológiájában.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálati protokollt a Pécsi Tudományegyetem Klinika Központ Regionális és Intézményi Kutatás-Etikai Bizottsága jóváhagyta és engedélyezte a klinikai tanulmányt. (2017.06.10, ügyiratszám: 6735). A betegek és az egészségesek alapos tájékoztatást követően a beleegyező nyilatkozat aláírásával adták hozzájárulásukat a vizsgálathoz. Tanulmányunkat két időintervallumban végeztük.

Vérlemezkék funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken (Vizsgálat I.)

A periódus első szakaszába 21 egészséges egyén került vérévételre a trombocita flotációjának, az éretlen trombocitafrakció és az átlagos trombocitaterfogat meghatározására, valamint a vérlemezke-aggregometriai vizsgálatára. Az elektronmikroszkópos és az atomerő-mikroszkópos felvételekhez szükséges vérévételre 6-6 egészséges személyt vontunk be.

Vérlemezkék funkcionális és morfológiai eltéréseinek vizsgálata clopidogrelt szedők esetében (Vizsgálat II.)

A második szakaszba 46 clopidogrelt szedő beteg és 15 egészséges kontroll személy került bevonásra.

3.1. Beválasztási kritériumok

Vizsgálat I:

- tanulmányba önként jelentkező, egészséges egyének kerültek vérévételre

Vizsgálat II:

- A betegcsoportba olyan krónikus cerebrovaszkuláris kórképpel kezelt felnőttek kerültek beválogatásra, akik már legalább 3 hónapja iszkémiás stroke miatt, prevenció céljából napi 75 mg clopidogrelterápiában részesültek. A vizsgálathoz a betegek kiválasztása a PTE Neurológiai Klinika Stroke Ambulanciáján kontroll vizsgálatra megjelent személyekből történt, akik időpontegyeztetést követően jelentkeztek vérévétel céljából a PTE Idegsebészeti Klinika Intenzívosztályán.
- Kontroll csoportba egészséges, önként jelentkező személyeket vontunk be.

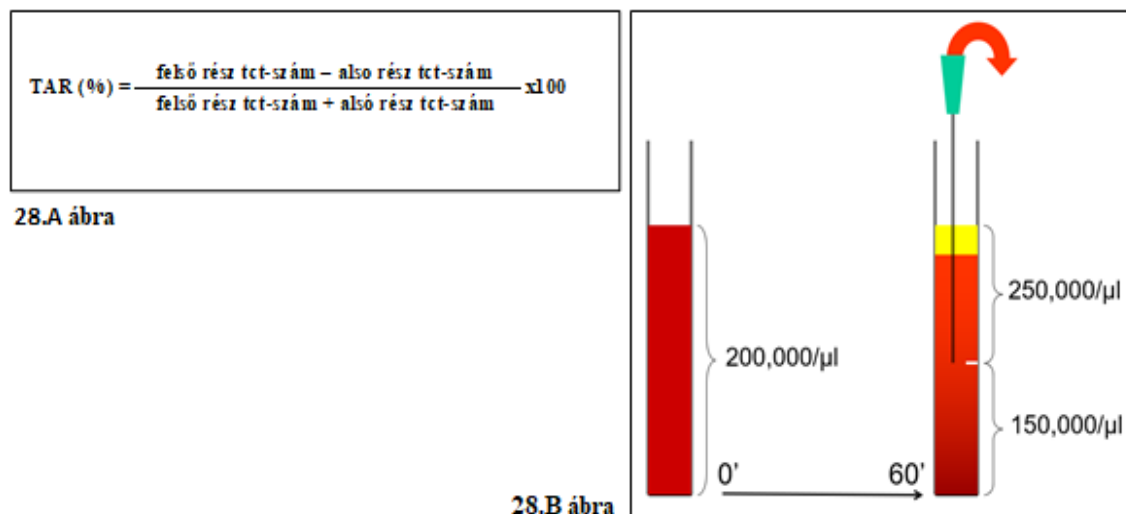
3.2. Kizárási kritériumok mindkét tanulmányban résztvevők esetén:

- akut vaszkuláris esemény
- trombocitopénia (tct<50 G/L – a Multiplate-tel való mérés alsó határa)
- veleszületett trombocitafunkciós zavar
- veleszületett véralvadási zavar
- anémia
- hemorreológiai paramétereket befolyásoló gyógyszer szedése (OAC, NOAC, NSAID, diuretikumok, antiglikémiás gyógyszer)

3.3. Trombocita flotációjának (TAR: trombocita antiszedimentációs ráta) vizsgálata

A tanulmányba bevont személyektől 2x3 ml vért vettünk az EDTA-s Vacutainer csőbe (REF: 368856, 5,4 md EDTA). A mintavétel a kontroll és a beteganyag esetében a könyökhajlati vénából, rövid leszorítás után 21 G-s tűvel, zárt vérvételi rendszerrel történt. Az egyik csőből vérszámológó automatával (Sysmex XN 9000) a PTE Központi Laboratóriumában a teljes vérkép meghatározása történt. A másik EDTA-s csőben lévő vért 1 óra hosszan ülepítettük, majd a csőben lévő véroszlop magasságának felső ½ részét átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe (TF: trombocita felső). Az eredeti cső alsó felében maradt ½ részből (TA: trombocita alsó) és a felső frakcióból (TF: trombocita felső) vérkép mérésével meghatározzuk a trombociták számát, majd „trombocita felső” (TF) – „trombocita alsó” (TA)/ TF+TA egyenlet szerinti értéket (a LAR analógiájára: $[100 \cdot (TF - TA) / (TF + TA)]$). kiszámoltuk és százalékban adtuk meg. Az ebből képzett hányadost **Trombocita Antiszedimentációs Rátának (TAR)** neveztük el. A TAR az eredeti trombocitaszám százalékában adja meg azoknak a trombocitáknak a számát, amelyek az

egyórás szedimentáció során felfelé átlépték a csőben lévő vérminta felezővonalát (28. ábra).



28. ábra: Az 28.A ábrán a trombocita antiszedimentációs ráta képlete ($\text{TAR} = \text{TCT}(\text{F}-\text{A}) / \text{TCT}(\text{F}+\text{A}) \times 100$) látható. A 28.B sematikus ábrán a trombociták szeparálását mutatjuk a Westergren csőben való egyórás ülepedés után.

3.4. Éretlen trombocitafrakció (IPF: Immature Platelet Fraction) és az átlagos trombocitaterfogat (MPV: Mean Platelet Volume) vizsgálata

Az éretlen trombocitafrakció mérése a Sysmex XN 9000 integrált hematológiai automata analizátorral történt (Sysmex Co, Japan, 2017) az előző fejezetben leírt vérvételi és szeparációs módszerrel nyert alsó – és felső vérmintából.

A trombocitaszám (PLT-F) és az éretlen trombocitafrakció (IPF) meghatározás a készülék fluoreszcens trombocita csatornáján történt. Ezen a csatornán a trombociták speciális intracelluláris fluoreszcens festése történik, egy CELLPACK DFL reagenssel való előkezelés után, mely a sejtmembrán átjárhatóságát teszi lehetővé. A mérés áramlási citometriával az átmenő fény (FSC: forward scatter), az oldalra szórt fény (side scatter) és az oldalra szórt fluoreszcens (SFL: side fluorescent light) detektálásával történik. A trombocitaszám mellett az éretlen trombocitafrakció is meghatározható, a magas fluoreszcencia intenzitást mutató trombociták “kapuzásával” (az FSC/SFL plot-on az IPF területre eső, magas fluoreszcenciaintenzitást mutató trombociták). A trombocitaszám és az éretlen trombocitafrakció (IPF) mellett, az átlagos trombocitaterfogat (MPV), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR), a trombocita-görbeeloszlás szélessége (PDW), a trombocitokrit (PCT) valamint a magas fluoreszcenciaintenzitást mutató éretlen trombocitafrakció (H-IPF: High-Immature Platelet Fraction) – származtatott paraméterek – is rögzítésre került.

3.5. Trombocitaaggregáció mérése

A tanulmányban résztvevőktől 2x3 ml vénás vér vettünk egy Hirudin Blood Tube for Multiplate analysis Vacutainer csőbe (REF: 06608311). Ezt követően az egyik hirudinos csőből elvégeztük a teljes vér trombocitaaggregációs vizsgálatot (TAG-teljes) a PTE Idegsebészeti Klinikán található készülékkel (Multiplate® Analyzer, Roche). A másik cső hirudinos vért ülepítettük 1 óra hosszan, majd a csőben lévő vér felső ½ részét (a véroszlop felső felét) átpipettázzuk egy üres hirudinos csőbe. Az így kapott két mintából (alsó- és felső rész) megmértük a trombocitaaggregációt (TAG-alsó és TAG-felső). Az így kapott eredményekből az **AUC**-t (area under the curve – görbe alatti terület), az **aggregációt** (az impedancia növekedése) és a **velocity**-t (aggregációs görbe maximális meredeksége) használtuk fel kutatásunkhoz. Az értékek jelölése a következőként történt: AUC-teljes, AUC-alsó, AUC-felső, aggregáció-teljes, aggregáció-alsó, aggregáció-felső, velocity-teljes, velocity-alsó, velocity-felső.

3.6. A trombociták transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata

A trombocitadús plazma nyerése céljából 6 egészséges személytől történt vérvétel EDTA-s csőbe, az előző részekben ismertetett módszerrel. Egy órás ülepítés után a felső részt átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe, majd az alsó és a felső részt 5 percig 200 g-n centrifugáltuk. Ezt követően mindkét cső felülúszóját egy új natív csőbe tettünk, s ezt 1200 g-n 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítás után a két csőben alul maradt a trombocitadús plazma, melyet azonnal az elektronmikroszkópos laborba vittük további feldolgozás céljából.

A trombociták fixálása 2,5%-os glutáraldehiddel történt 4 °C-on, „overnight”. Eppendorf csőben történt centrifugálás után az üledék postfixálása következett 1%-os osmium-tetroxiddal 4 °C-on 60 percig. A fixált szediment 3%-os agarba került, majd 1 mm³ blokk kivágása és 3x10 percig 0,1M-os foszfát pufferben való mosása következett. Az etil-alkoholos dehidráció és mosás után propilén-oxidba helyeztük és beágyasztuk Durcupan gyantába (Sigma, Budapest, Hungary). A félvékony metszeteket toluidinekkel megfestettük és fénymikroszkóppal megvizsgáltuk. Az ultravékony rétegeket rácsokra helyeztük és ólom-citrát és uranil-acetát („contrasted”) és a JEOL JEM 1200EX transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) megvizsgáltuk. A digitális fényképek az iTEM szoftver (Olympus, Japan) segítségével készültek. Az elektronmikroszkópos felvételekkel a következő vizsgálatok készültek:

- 1., TEM kép az alsó - és felső részben lévő trombocitákról
- 2., iTEM program segítségével (interpolált poligon) megmértük a felső - és alsó részben lévő 21-21 vérlemezke (50000x nagyítás) területét, kerületét, konvex területét és konvex kerületét.
- 3., Meghatároztuk az alsó - és felső részben lévő 70-70 közel azonos nagyságú ($2\ \mu\text{m}$) vérlemezékében (50000x nagyítás) látható sötét (alfa-granulumok) és világos (dense-granulumok) granulumok számát.

3.7. Atomerő-mikroszkópia (AFM, atomic force microscopy)

Minta és előkészítése

A vizsgálatokhoz a vért egészséges egyének antekubitális vénájából volt levéve, K-EDTA-t tartalmazó csőbe (N=6). Egyórás, szobahőn történő ülepetést követően a vér felső felét azonnal egy másik K-EDTA-t tartalmazó csőbe pipettáztuk és mindkét felet $150\ \text{g-n}$, 8 percig centrifugáltuk szobahőn, 2-es leállási sebességgel. A trombociták aktiválódásának minimalizálása miatt $0,1\ \text{mL}$ felső trombocitadús plazma réteget pipettáztunk $10\ \text{m}$ HBS pufferbe (HEPES buffered physiological saline), amely $0,001\ \text{M}$ EDTA-t és $0,1\ \%$ glukózt is tartalmazott, minkét fél centrifugálása után. Az óvatos felforgatással a mosott trombocitákat a cső aljára centrifugáltuk (szobahő, $2000\ \text{g}$, 5 perc). A mosópuffer leöntése és a cső faláról való óvatos leitatása után tiszta mosópufferben szuszpendáltuk a trombocitákat, úgy hogy a trombocitaszám $100\ \text{G/L}$ legyen.

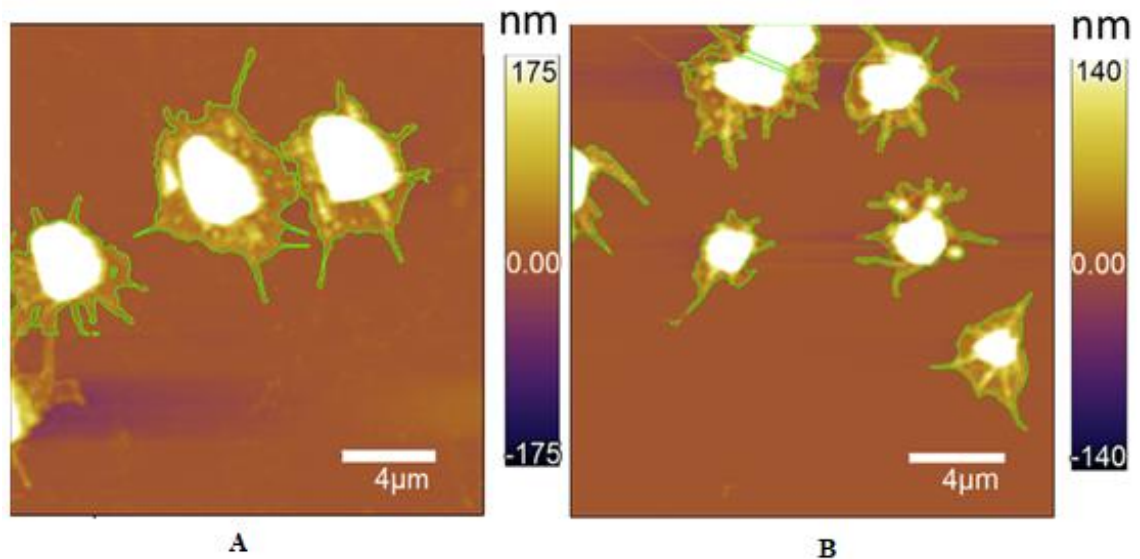
A szuszpenziókból frissen hasított csillámpala korongra ($d=12\ \text{mm}$) $0,025\ \text{mL-t}$ cseppentettünk, nedves kamrában 20 percig hagytuk ülepedni, majd $0,025\ \text{mL}$ 2%-os glutáraldehid oldatot adtunk hozzá, körkörös döntögetéssel kevertük és 30 percig hagytuk fixálódni. Végül a felszínt Milli-Q vízzel mostuk és áramló N_2 gázzal szárítottuk.

AFM-fotók

A csillámpala felszínre ülepedett, fixált és szárított trombocitákat Cypher ES atomerő-mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA), tapogató módban (AC) pásztáztuk, AR16 programmal. A pásztázáshoz szilikon-nitrid rugólapkát használtunk, amelynek a rugóállandója $\sim 42\ \text{N/m}$ és a rezonanciafrekvenciája $\sim 300\ \text{kHz}$ (OTESPA-R3, Bruker, Billerica, MA). A szabad amplitúdót $1\ \text{V-ra}$ állítottuk, $0,5\text{-}0,7\ \text{V-ra}$ a pásztázási amplitúdót, az erősítést 7-10 - szeresre.

AFM-adatok analízise

A pásztázás során alkotott képet az AFM AR16 programjával analizáltuk (Igor Pro 6.34 A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR). A pásztázott terület 20x20 μm -es volt, amelyen a programmal megfelelő élesen körbe határoltuk a trombociták területét (**29. ábra**).



29. ábra: A trombociták kijelölése képanalízisre AFM-mel készült magasságképen. Statisztikai analízisre csak a teljes trombocitákat használtuk. Az ábra A része felső, a B része az alsó fázisból származó trombocitákat mutatja

A trombociták analízise 18 paramétert eredményezett, amelyek közül felszínen rögzített, diszkoid alakú celluláris elemeket feltételezve a következők lehetnek hasznosak: magasság maximum (Z max), a középpontban (Z Center), átlagmagasság (Z Average); terület (Area), térfogat (Volume), kerület (Perimeter), hossz (Length) és szélesség (Width).

3.8. Statisztikai analízis

Az adatokat SPSS software package (Version 19.0, SPSS Inc, Chicago, USA) segítségével analizáltuk. A diszkrét változókat Chi-négyzet próbával elemeztük. A folyamatos változókat normalitásvizsgálatnak vetettük alá Smirnov-Kolmogorov teszttel. A normal eloszlást mutató értékeket két-mintás Student-t próbával hasonlítottuk össze. A nem normál eloszlást mutató paramétereket Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze, míg a többváltozós korrelációra Spearman-korrelációt használtunk (Spearman-korrelációs koefficiens, r). A kategorikus változókat, mint abszolút szám és (százalék) ábrázoltuk. A kvantitatív adatokat pedig, mint medián és interkvartilis tartomány (25th – 75th percentilis) vagy átlag±szórás (SD) ábrázoltuk. A p -érték $<0,05$ tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

Az alábbiakban a két külön tanulmány eredményeit foglaljuk össze (**Tanulmány I.: Vérlemezkék morfológiai és funkcionális vizsgálata egészségesekben** és **Tanulmány II.: Clopidogrel szedő és egészséges kontroll csoport vizsgálata**) A két tanulmányban szereplő egészséges kontroll csoport nem azonos.

4.1.Vérlemezkék funkcionális és morfológiai eredménye egészségesekben

4.1.1. Vérlemezkék funkcionális vizsgálatának eredményei

A vizsgálati periódusunk első felében összesen 21 nem dohányzó, egészséges személyt (életkor: $36\pm$ év, nő/férfi: 12/9) vontunk be kontroll csoportként. A módszertani fejezetben ismertetett módon levett vérminta egyórás szedimentációt követően a felső frakcióban szignifikánsan több trombocitát találtunk, mint az ülepedett alsó frakcióban ($p<0,001$).

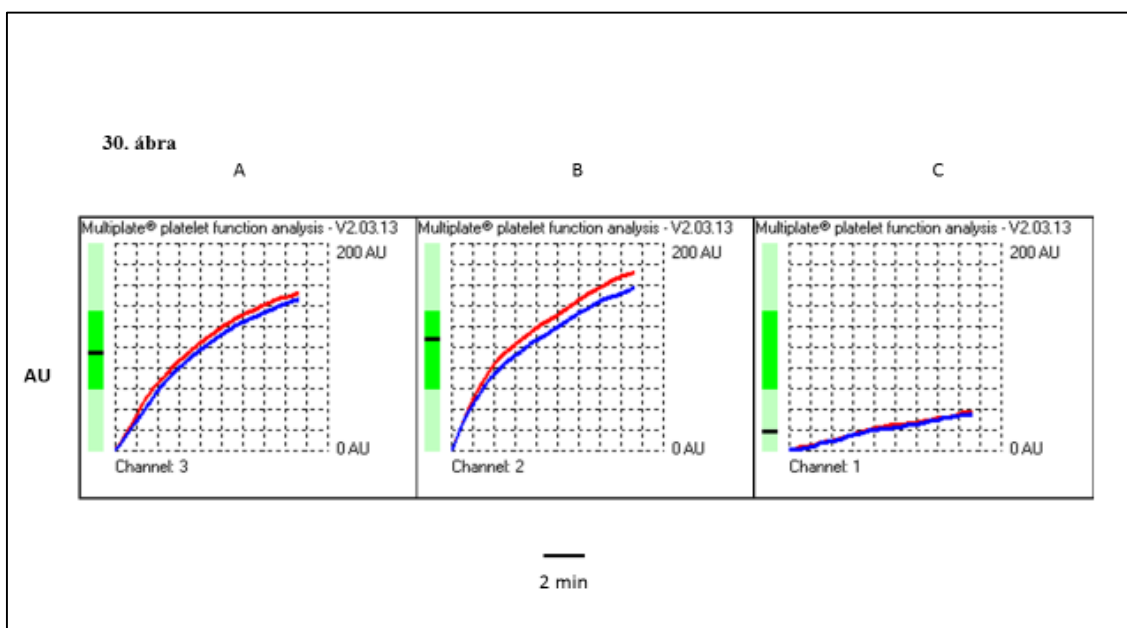
Az egészségesekben a vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR) átlaga $50,8\pm$ SD: 18,7 % volt.

Az átlagos vérlemezketérfogat (MPV), az abszolút értékű éretlen trombocitafrakció (IPF), valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva ($p<0,001$, $p=0,001$, $p=0,005$) (**6. táblázat**).

	teljes vér	felső rész	alsó rész	p^*
trombocitaszám (G/l)	239 ± 76	285 ± 132	85 ± 33	0,003
MPV (fl)	$10,4\pm 1,2$	$10,3\pm 0,6$	$1,2\pm 0,6$	0,644
IPF (abs)	$8,8\pm 4,4$	$7,6\pm 5,3$	$3.5\pm 2,2$	0,003
H-IPF (%)	$1,5\pm 1,0$	$1,4\pm 0,8$	$1,3\pm 0,9$	0,021
LCR	$27,5\pm 4,0$	$26,9\pm 5,1$	$26,9\pm 4,9$	1,000

MPV= mean platelet volume, IPF= immature platelet fraction, H-IPF= high-fluorescent IPF, LCR= large cell ratio. Az adatokat, mint átlag \pm SD ábrázoltuk. p^* a felső vs alsó rész között.
6. táblázat: Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke paraméterek

A vérlemezke-aggregometria során a Multiplate analízátor által készített reprezentatív görbéket mutatjuk az **30. ábrán** (A: teljes vér, egy órás szedimentáció után szeparált, B: felső illetve C: alsó vérfrakció AUC görbéje).



30. ábra: A vérlemezke-aggregometria során nyert görbék egy egészséges egyénben. Teljes vér (A), a felső frakció (B) és az alsó frakció (C) Multiplate analízátor által készített görbéje

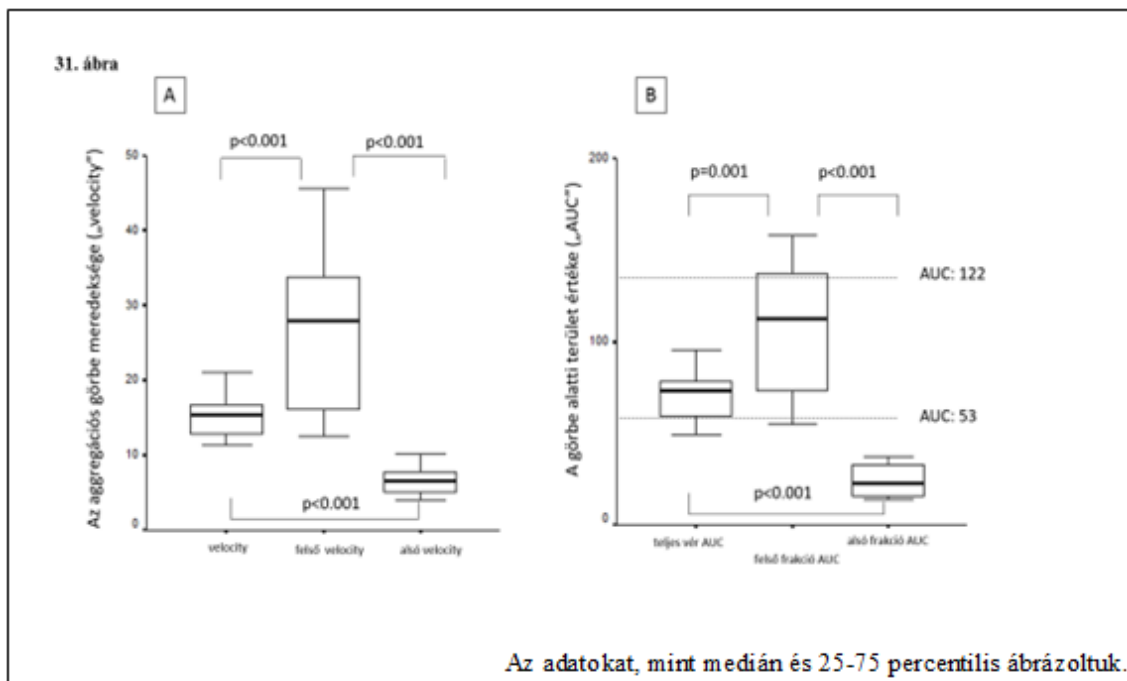
Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk az alsó (átlag AUC: $69,9 \pm 13,1$ vs $26,1 \pm 9,6$) és a felső frakció ($69,9 \pm 13,1$ vs $103,3 \pm 35,8$) görbe alatti terület (AUC) értékei között a vér egyórás szedimentációját követően (**7. táblázat**).

Impedancia-aggregometria				
	teljes vér	felső rész	alsó rész	p*
AUC	$69,9 \pm 13,1$	$103,3 \pm 35,8$	$26,1 \pm 9,6$	<0,001
aggregáció	$130,9 \pm 23,7$	$174,3 \pm 53,0$	$52,2 \pm 16,2$	<0,001
velocity	$15,5 \pm 3,8$	$26,5 \pm 10,9$	$6,5 \pm 1,7$	<0,001

Az adatokat, mint átlag \pm SD ábrázoltuk. p* a felső vs alsó rész között. AUC= area under the curve

7. táblázat: Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke-aggregabilitási adatok

A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek szignifikáns különbséget mutattak mind a teljes vér vs felső illetve alsó, mind pedig a felső vs alsó vér frakciók összehasonlításakor (valamennyi, $p < 0,001$) (31. ábra A). Az AUC értékek a felső és az alsó frakcióban szignifikánsan eltértek egymástól ($p < 0,001$). Kiemelendő, hogy a felső frakcióban mért AUC értékek az egészséges kontrollok 38%-ban ($n=8$) túllépték a normál tartomány felső határát (AUC: 53-122), mely arra enged következtetni, hogy a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében (31. ábra B). Annak ellenére, hogy az egészséges kontroll csoport nem részesült antitrombotikus kezelésben, az AUC értékek az alsó frakcióban az effektív antithrombotikus kezelés során várt tartományban voltak (AUC: 0-53) Ez arra enged bennünket következtetni, hogy a szedimentálódott trombociták *ex vivo* nem aktiválhatók ADP hozzáadásával, olyan, „mintha clopidogrelhatásban lennének” (31. ábra).



31. ábra: A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek a teljes vérben, valamint az 1 óras szedimentáció után szeparált felső illetve alsó frakcióban (A). A görbe alatti terület (AUC) a teljes vérben, valamint az 1 óras szedimentáció után szeparált felső illetve alsó frakcióban (B)

Fontos továbbá, hogy a TAR szignifikáns negatív korrelációt mutatott az AUC, az aggregáció, valamint a görbe meredekségét jelző „velocity” értékekkel az alsó frakcióban ($r = -0,661$, $p < 0,05$, $r = -0,700$, $p = 0,01$, $r = -0,636$, $p < 0,05$). Hasonlóan az előbbihez, a résztvevők kora is negatív korrelációt eredményezett az alsó frakció AUC, aggregációs és a velocity adataival ($r = -0,553$, $p < 0,05$, $r = -0,553$, $p < 0,05$, $r = -0,535$, $p < 0,05$ respectively). Mindazonáltal a vizsgálati csoportunkban nem találtunk korrelációt az életkor és a vérlemezke-antiszedimentációs ráta értékei között.

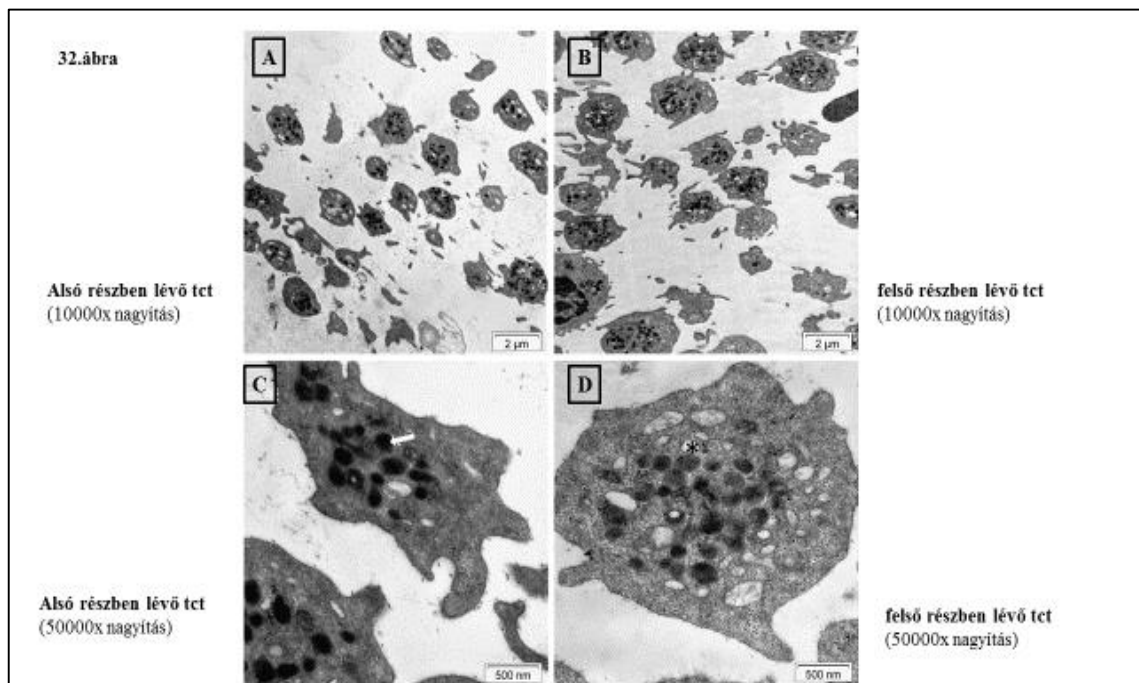
4.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálat

Az egészséges egyének véréből nyert, alsó és felső frakcióból származó trombocitákat transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, morfológiai információk nyérésének céljából. Kis nagyítás során különbséget tapasztaltunk a különböző vérfrakciók mind morfológiai megjelenésében, mind pedig számukban. A trombociták területe és kerülete szignifikánsan nagyobb volt a felső frakcióból származó trombociták esetében az alsó frakcióban mért értékekkel összehasonlítva ($p < 0,001$). Méréseinket a korábban részletezett iTEM program segítségével végeztük (8. táblázat) Nagyobb nagyítás során határoztuk meg a trombocitákban lévő alfa és dense granulumok számát. A felső frakcióban elhelyezkedő trombocitákban 1,6-szor több alfa granulumot találtunk az alsóhoz képest (32. ábra).

	alsó rész	felső rész	<i>p</i>
vérlemezke-terület (nm²)	$2,26 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^5$	$3,69 \times 10^6 \pm 9,3 \times 10^5$	<0,001
vérlemezke-kerület (nm)	$7,21 \times 10^3 \pm 1,55 \times 10^3$	$9,17 \times 10^3 \pm 1,42 \times 10^3$	<0,001

Az adatokat, mint átlag \pm SD ábrázoltuk.

8. táblázat: Transzmissziós elektronmikroszkóppal nyert adatok egészségesekben

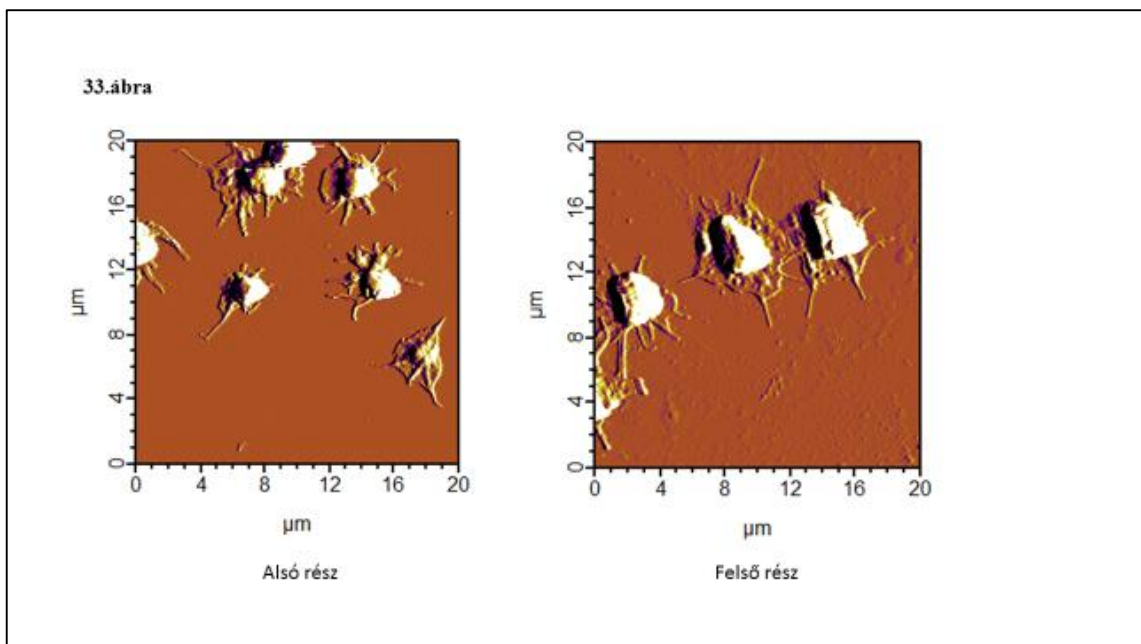


32. ábra: Az alsó (A és C) és felső frakció (B és D) trombocitáinak elektronmikroszkópos felvételei. A kis nagyítású képek az alsó (A) és felső (B) frakcióban lévő vérlemezkek számát és méretét mutatja. A C és D jelzés alatt nagy nagyításban megjelenített vérlemezke látható. A nyíl a C jelzésű felvételen egy α -granulátumra mutat, míg a D-ben lévő csillag egy sűrű granulátumot jelöl. A skálaértékek A és B tartományban 2 μ m, C és D 500 nm.

4.1.3. Atomerő-mikroszkópos felvételek eredménye

Az egészséges egyének véreből nyert, alsó és felső frakcióból származó trombociták morfológiáját atomerő-mikroszkóppal is vizsgáltuk, mivel az AFM-vizsgálathoz az előkészítés a trombocitákat sokkal kevésbé befolyásolja, mint az EM-vizsgálatokhoz szükséges előkészítés. Rutin szerint az alap hematológiai paramétereket K₂-EDTA-s vérből határoztuk meg, ezért a morfológiai vizsgálatokhoz is ilyen vért használtunk.

Az AFM-mel a felszínhez kötődő trombocitákat vizsgáljuk, azonban EDTA-s vérből csak mosott trombociták rögzültek a mica felszínen, 20 perces ülepités és 30 perc glutáraldehides fixálás után. Azonban ezek is elmozdultak a pásztázás során, így dehidrált trombocitákkal dolgoztunk továbbiakban. A magasság, az amplitúdó, a fázis és a Z szenzor képek egyaránt azt mutatták, hogy mindkét fázis trombocitái rögzülés közben gömb alakot vehettek fel, kiterültek a felszínen, majd különböző mértékben összehúzódtak (**33. ábra**).

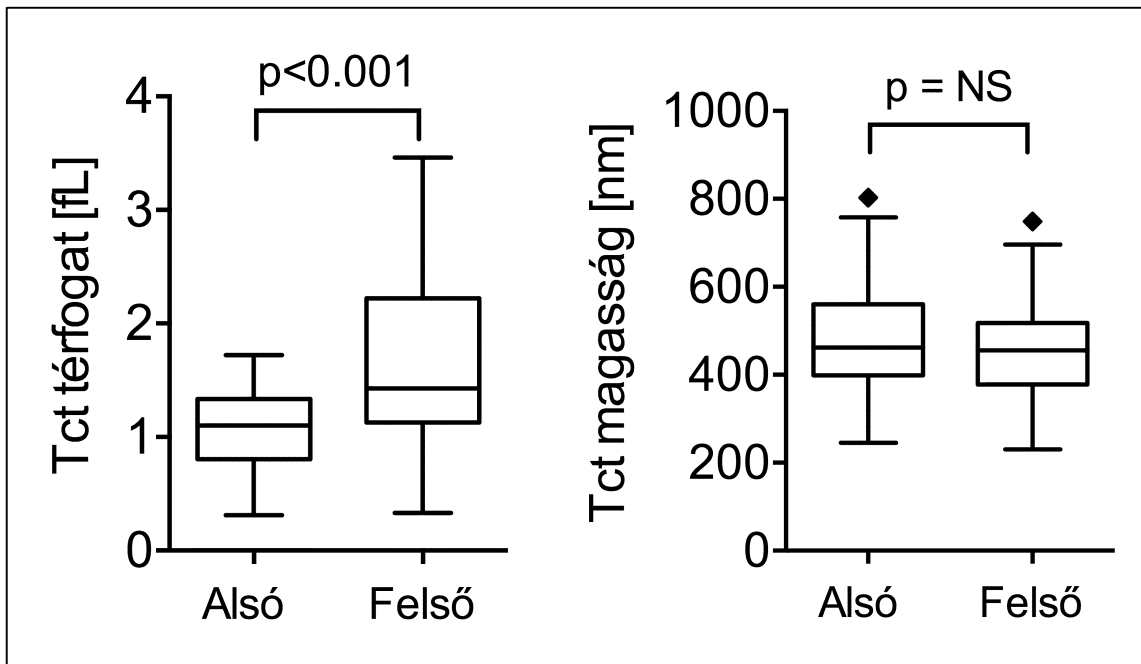


33. ábra: Trombociták AFM-képe a sedimentált vérből

Az összehúzódás mértékére jellemzően látszik a kiterült membrán és annak összehúzódásakor a felszínen kapaszkodó állabak. A képen jól látszik, hogy az alsó fázis trombocitái kiterjedésükben és összehúzódtott formájukban is kisebbek.

Az AFM programja a felszínen rögzített trombociták magasságáról és kiterjedéséről szolgáltat képanalízisre alkalmas adatokat. A analízishez a fixált és szárított trombocitaminták magasságképén kijelöltük az egyedi trombocitákat és a programmal

elvégeztettük azok analizését. Az alsó és felső fázisban lévő trombociták összehasonlításra a térfogatot és a középpontban mért magasságot mutatja az **34. ábra**. Az összehasonlító statisztikai analízis szerint (páratlan t-teszt) a felső fázis trombocitáinak térfogata nagyobb volt, mint az alsó fázisé ([fL] átlag±SE: 1,7±0,12 és 1,1±0,06÷ p <0,001). A középmagasságok nem különböztek szignifikánsan ([nm] átlag±SE: 456±20 és 484±0,20). A maximum minimum értékeit adjuk itt meg a magasság maximum- ([μm] 351-885), terület- ([μm²] 8-25), kerület- ([μm] 12-25), hossz- ([μm] 3-7) és szélesség adatokra ([μm] 3-5), mert nem különböztek ezek sem.



34. ábra: Trombociták AFM paramétereinek box és whiskers Tukey-szerinti grafikus ábrázolása. Az adatok négy negyedes eloszlásának középső két negyedét mutatja doboz (IQR, interkvartilis tartomány), benne a keresztvonal az adatok mediánját jelzi. A felső és alsó szórásvonalak az $IQR \pm 1,5 \times IQR$ értékeket, az egyedi jelek az ezen kívüli értékeket mutatják.

4.2. Clopidogrelt szedők és a kontroll csoport vizsgálati eredményei

4.2.1. Demográfiai és laboratóriumi eredmények

Prospektív vizsgálatunkban első lépéseként összesen 46, stroke szekunder prevenció miatt gyógyszeres antitrombotikus kezelésben részesülő beteg adatait (átlagéletkor: 66±8, férfi: 31) hasonlítottuk össze 15 egészséges egyén adataival (átlagéletkor: 40±13 év, férfi: 6). A csoportok demográfiai jellemzőit, kiindulási laborértékeit táblázatban összegeztük (9. táblázat). Az eritrocita-szedimentációs ráta (ESR) szignifikánsan magasabb volt a betegpopulációban ($p < 0,001$), a CRP tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Sem a teljes trombocitaszámban, sem pedig az MPV-értékben nem észleltünk szignifikáns különbséget annak ellenére, hogy a kontroll csoport tagjai jelentősen fiatalabbak voltak ($p < 0,001$). Hasonlóan nem találtunk különbséget a BMI, a hematokrit és a leukocitaszám értékében sem. A clopidogrel csoportban a dohányosok száma több, mint négyszerese a kontrollhoz képest. (9. táblázat).

	Kontroll (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	<i>p</i>
Életkor	40±13	66±8	<0,001
Nem (férfi/nő)	6/14	31/15	0,06
BMI	25±3	27±4	0,119
Dohányzás (%)	2 (18)	9 (19)	0,586
CRP (mg/l)	1,70 (0,8-3,1)	1,75 (0,7-3,5)	0,237
ESR (mm/óra)	2 (1-4)	10 (6-18)	<0,001
Hematocrit (%)	42,8±0,9	43,6±0,7	0,416
Leukocita (G/l)	6,3±1.2	8,3±1.7	0,251
Vérlemezke (G/l)	282±75	239 ± 65	0,098
MPV (fl)	10,2±1.6	10,7±0.9	0,528

BMI= body mass index, CRP= C-reaktív protein, ESR= eritrocita szedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume. Az adatokat mint átlag±SD illetve abszolút érték (%), kivéve CRP és ESR, melyeket medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk

9. táblázat: A kontroll csoport és a clopidogrelt szedő egyének demográfiai és laboratóriumi adatai

4.2.2. Vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR)

A trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoport, valamint a beteg populáció értékei között, azonban a betegcsoportban magasabb TAR-tendencia volt megfigyelhető (**10. táblázat**). Mindkét csoportban meghatározásra került az MPV. Ezt összehasonlítottuk a különböző alcsoportokban (teljes vér, alsó frakció, felső frakció). Az MPV értékben (**10. táblázat**) nem találtunk szignifikáns különbséget sem a beteg populációt összehasonlítva az egészségesekkel, sem pedig a csoportokon belül (teljes vér vs. felső frakció, teljes vér vs. alsó frakció, felső vs. alsó frakció).

	Kontroll (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	p
Felső tct szám (G/L)	316 (218-478)	345 (301-428)	0,68
Alsó tct szám (G/l)	88 (51-124)	71 (54-86)	0,43
TAR (%)	58,5 (45,0-67,5)	67,7 (61,7-72,9)	0,15
MPV (fl) felső	10,7 (10,0-10,8)	10,8 (10,2-11,6)	0,30
MPV (fl) alsó	10,0 (9,8-10,6)	10,5 (9,8-11,2)	0,47
LCR felső (%)	28,9 (24,5-30,6)	33,0 (26,8-38,9)	0,14
LCR alsó (%)	25,5 (22,7-28,7)	30,5 (24,2-36,2)	0,14

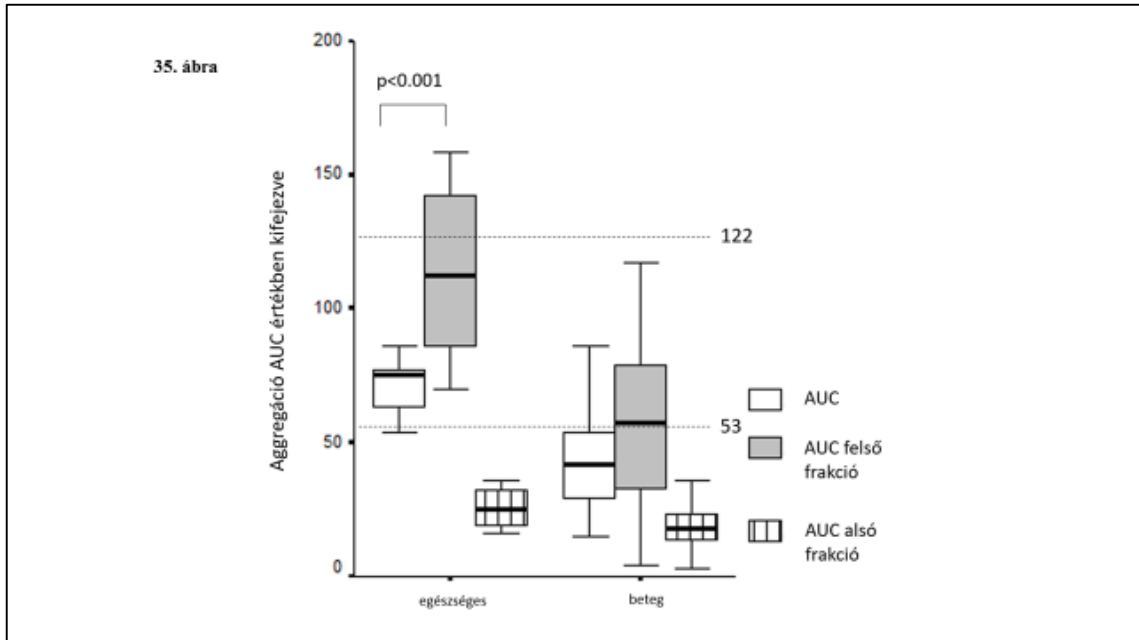
Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. tct=trombocita, TAR=trombocita antiszedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume, LCR= large cell ratio

10. táblázat: Vérlemezke adatok egészségesekben és clopidogrel szedőkben

4.2.3. Impedancia-aggregometria betegekben és egészségesekben

Az aggregometriai vizsgálat során (Multiplate[®] Analyzer) szignifikáns különbséget tapasztaltunk a betegek alsó és a felső frakcióiban mért AUC-értékek között a vér egyórás ülepitését követően (teljes vér vs. alsó frakció: median 41,5, IQR: 29,0-5,0 vs median 18,0, IQR: 14,0-23,0; teljes vér vs. felső frakció: 41,5, 29,0-54,0 vs 57,5, 33,0-79,0; p<0,001) (**35. ábra**). Szembetűnő, hogy a mért AUC-értékek a felső frakcióban a clopidogrelt szedő betegek 59%-ában (n=27) meghaladták a terápiás tartomány felső határát (AUC: 0-53). Kérdés volt, hogy a clopidogrelkezelésre nem reagáló (teljes vér Multiplate alapján non-reszponderek, n=12) betegek és a felső frakcióban mért 53 feletti AUC értékkel rendelkező betegek átfedést mutatnak-e. A 12 non-reszponderből 11-nek a felső frakcióban is 53 feletti AUC-értéket mértünk, így a két csoport közötti közötti koincidencia szignifikáns volt (p=0,001).

Hasonlóképp, a teljes vérből mért AUC-értékek a kontroll csoportban szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC-értékekhez képest (teljes vér: medián 73,5, IQR: 59,5-78,5 vs. felső frakció: 112,5, 73,0-137; teljes vér: 73,5, 59,5-78,5 vs. alsó frakció: 23,0, 16,0-35,0, $p=0,005$) (35. ábra).



35. ábra: A Multiplate-tel mért aggregáció (AUC=area under the curve) a teljes vérben és a felső és alsó frakcióban, az egészséges és clopidogrel szedő csoportokban

A teljes vér AUC-értékek és a felső frakcióban mért AUC-értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a gyógyszer nem szedő egészségesekben a clopidogrel szedő betegekkel összehasonlítva ($p<0,001$) (11. táblázat). A felső frakcióban mért AUC-értékek az egészséges populáció 40%-ában ($n=6$) magasabb volt a normál tartomány felső értékénél (AUC: 53-122) (35. ábra). Mindeközben, az alsó frakcióban mért AUC-értékek szignifikáns különbséget nem mutattak az egészséges és a betegcsoport között (egészséges vs. beteg: 23,0, 16,0-35,0 vs 18,0, 14,0-23,0). Ezek az értékek a hatásos antitrombotikus terápia tartományban voltak (AUC: 0-53), még az egészségesekben is (35. ábra). Az aggregáció (AU) és a velocity is szignifikáns eltérést ($<0,001$) mutatott a csoportok közt a teljes vérben és a felső frakcióban egyaránt. Az alsó rész aggregációja és a velocity közt ilyen összefüggés nem volt kimutatható (11. táblázat).

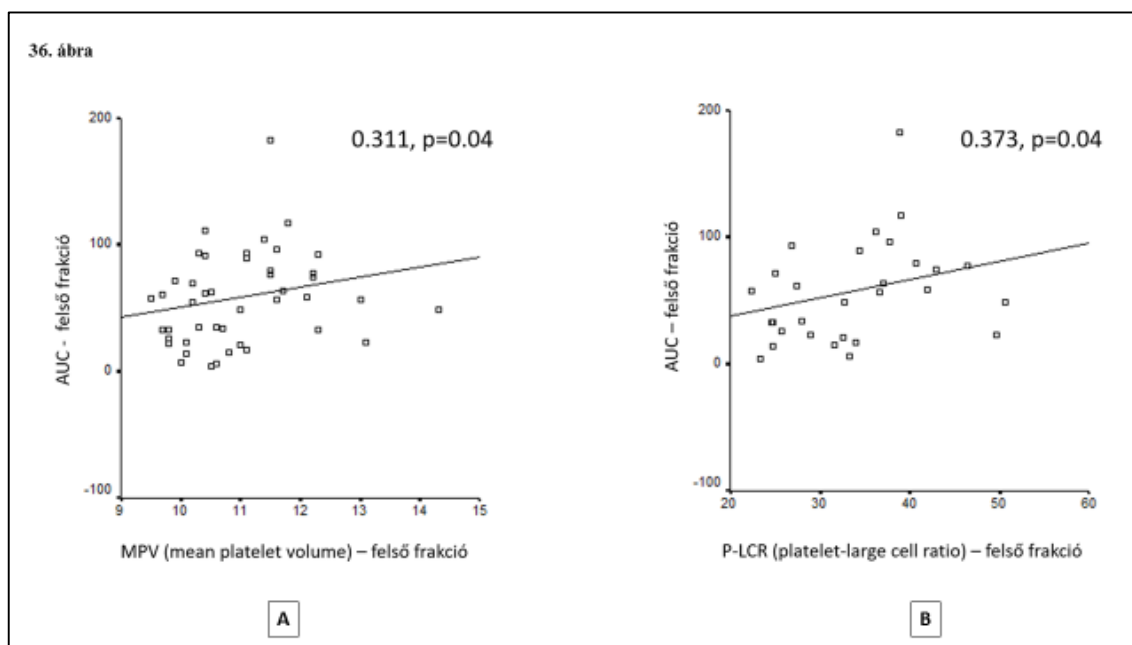
	Kontroll (n=15)	Clopidogrel szedők (n=46)	p
AUC	73,5 (59,5-78,5)	41,5 (29,0-54,0)	<0,001
AUC felső	112,5 (73,0-137)	57,5 (33,0-79,0)	0,003
AUC alsó	23,0 (16,0-35,0)	18,0 (14,0-23,0)	0,26
Aggregáció, AU	135 (105-146)	76,3 (59,3-107,3)	<0,001
Aggregáció felső AU	164 (131-203)	100,1 (48,8-138)	<0,001
Aggregáció alsó AU	39,8 (34,1-60,4)	37,4 (30,8-45,8)	0,200
Velocity	15,1 (12,2-16,6)	9,4 (7,4-11,4)	<0,001
Velocity felső	27,5 (17,5-33,6)	12,3 (6,5-21,1)	<0,001
Velocity alsó	5,3 (5,0-7,0)	5,1 (4,3-6,5)	0,254

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. AUC= area under the curve, AU= aggregation unit

11. táblázat: Impedancia aggregometriai adatok egészségesekben és clopidogrelt szedőkben

4.2.4. Vérlemezke paraméterek és impedancia aggregometria betegekben

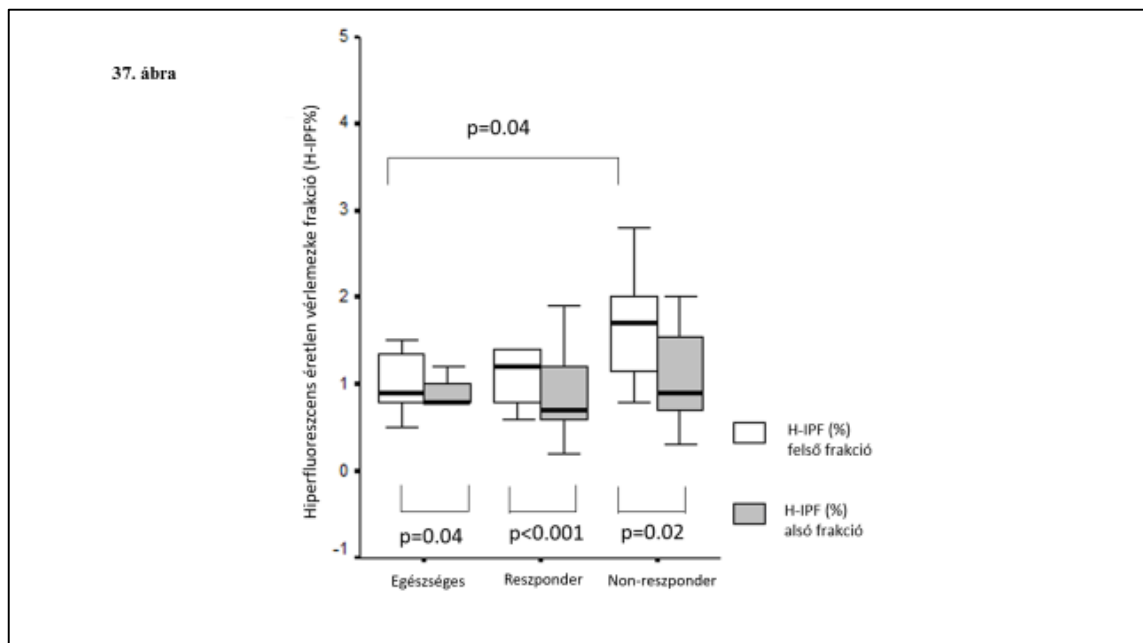
A vérlemezke-aggregációt gátló gyógyszert (75 mg clopidogrelt) szedő betegekben, mind a felső frakcióban mért MPV ($r=0,311$, $p=0,04$) (**36.A ábra**), mind pedig a felső frakcióból meghatározott PLCR (%) érték ($r=0,373$, $p=0,04$) pozitívan korrelált a felső frakcióban mért AUC-értékekkel (**36.B ábra**).



36. ábra: A felső frakció AUC-eredményének összefüggése a felső rész MPV (A) illetve PLCR% (B) értékével

4.2.5. Reszponder vs non-reszponder betegek

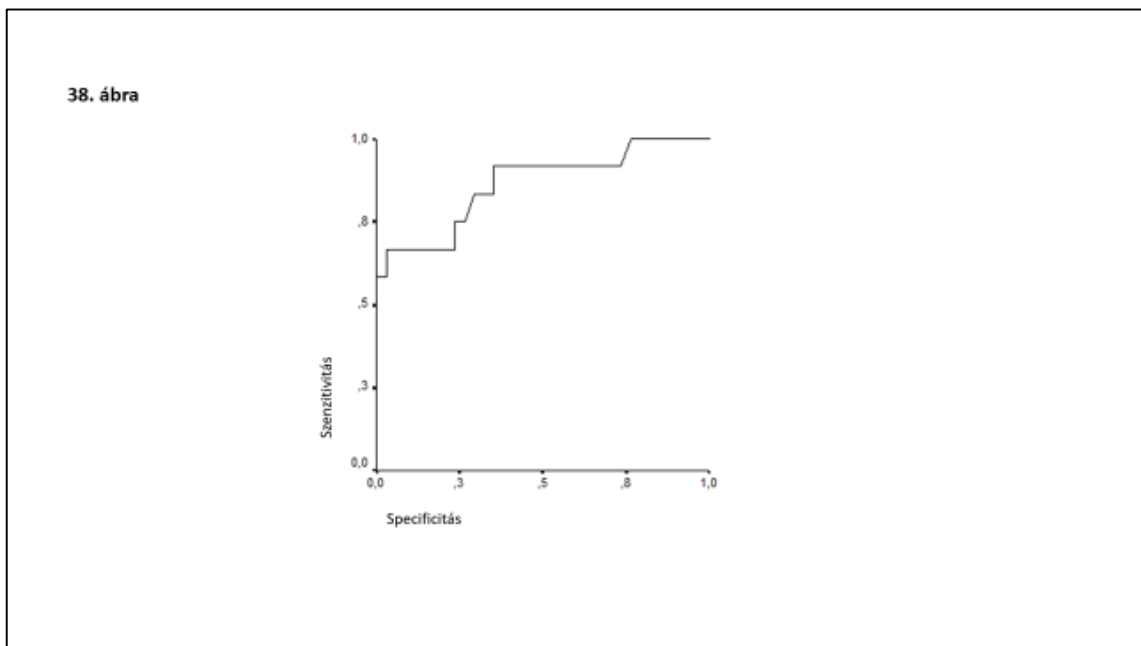
A 75 mg clopidogrelt szedő betegeket a Multiplate® analizátor segítségével reszponder ($AUC < 53$, $n=34$) és non-reszponder ($53 \leq AUC$, $n=12$) alcsoportokra osztottuk. Ezt követően összevetettük a H-IPF (%) értékét az alsó és a felső frakcióban a hirudinnal antikagulált teljes vér egyórás szedimentációját, majd szeparációját követően az egészséges csoport és a clopidogrel szedő reszponder és non-reszponder alcsoportokban. A felső frakcióban a H-IPF aránya szignifikánsan magasabb a non-reszponder alcsoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva (median: 1,7, 25-75 percentilis: 1,15-2,0 vs 0,9, 0,8-1,35, $p=0,04$). A non-reszponder és a reszponder alcsoport értékeinek összevetésekor a különbség nem szignifikáns, azonban a trend hasonló, mint a fentiekben. A felső és az alsó frakció összehasonlításakor, a H-IPF (%) minden egyes alcsoportban magasabbnak bizonyult a felső frakcióban (egészséges csoport: 0,9, 0,8-1,35 vs 0,8, 0,8-1,0, $p=0,04$; reszponderek: 1,2, 0,8-1,4 vs 0,7, 0,6-1,2, $p < 0,001$; non-reszponderek: 1,7, 1,15-2,0 – 0,9, 0,7-1,55, $p=0,02$) (37. ábra).



37. ábra: H-IPF (%) az alsó és a felső frakciókban egészséges kontroll csoportban és a clopidogrel reszponder és non-reszponder alcsoportokban

TAR-értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a non-reszponder csoportban a reszponderekhez viszonyítva (median: 71,9, 25-75 percentilis: 63,6-74,3 vs. 67,2, 60,3 –71,0, $p=0,20$). A TAR pozitív korrelációt mutat a teljes frakcióból meghatározott MPV-értékekkel a teljes betegcsoportban (Spearman korreláció: $r=0,300$, $p=0,04$) és a reszponder alcsoportban ($0,364$, $p=0,04$), azonban ez a korreláció nem volt kimutatható a non-reszponder csoport tagjai között. Az életkor, a TAR, az ESR és a CRP,

valamint a felső frakcióban mért H-IPF, LCR, MPV, AUC értékek bevonásával bináris logisztikus regressziót végeztünk a clopidogrel kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke aggregáció (HRPR, „non-reszponder” státusz) független prediktorának keresése céljából. Ez alapján egyedül a felső rész AUC-értéke tekinthető a kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás független rizikófaktorának (OR: 1,06, 95%CI: 1,007-1,120, $p=0,027$). ROC analízis során meghatároztuk, hogy a felső frakcióban mért $AUC>62$ érték 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással képes előre jelezni a „non-reszponder” status fennállását (Area: 0,863, 95% CI: 0,728-0,998, $p<0,001$) (38. ábra).



38. ábra: A felső frakcióban mért AUC-érték ROC görbéje a non-reszponder status előrejelzésére (ROC analízis)

5. DISZKUSSZIÓ

A leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) analógiájára írtuk le a trombociták mozgását egy órás gravitációs szedimentáció során, clopidogrel kezelés alatt álló poszt-stroke betegekben, valamint egészséges önkéntesekben. Új fogalomként került bevezetésre a trombocita antiszedimentációs ráta (TAR, angol nyelven platelet antisedimentation rate, PAR rövidítéssel lett publikálva). Trombocita antiszedimentációs ráta számítására egy képletet hoztunk létre, mely a vérlemezkék azon hányadát fejezi ki %-ban, melyek a vérszlop középvonalát keresztezik a teljes vér egyórás szedimentációja során.

A szeparációt követően az **egészséges önkéntesekből** származó vérlemezkék a felső frakcióban ADP jelenlétében az egyének 38%-ában fokozott aggregabilitást mutattak. Ez korrelál a korábbi irodalommal, miszerint az éretlen vérlemezkék reaktivitása fokozott az érett alakokhoz képest, mely protrombotikus tényező (148). Morfológiailag a felső frakcióban elhelyezkedő vérlemezkék területe, kerülete nagyobb volt és a vélhetően fiatalabb trombociták több α -granulumot tartalmaztak az EM-képeken (149). Korábbi tanulmányok már felhívták a figyelmet, hogy a nagyobb és hiperdenzitást mutató vérlemezkék funkcionálisan, az aggregabilitás szempontjából fontosabbak lehetnek, mint a kisebb, kevesebb dense granulumot tartalmazó trombociták (150). Az aszcendáló trombociták összefüggést mutattak a vérlemezkék korával (IPF, H-IPF %), és a trombociták térfogatával, méretével (MPV, LCR). Érdekes azonban az, hogy a TAR-érték nem korrelált az MPV, IPF, H-IPF értékekkel. Szignifikáns negatív korrelációt sikerült azonosítanunk a TAR és az AUC, velocity, aggregáció-értékek között az alsó frakcióban. Feltételezésünk szerint, a TAR az érett/éretlen vérlemezke szubpopulációk arányának indirekt indikátora lehet.

Az egészséges vérlemezkék individuális diverzitására hívja fel az a megfigyelés a figyelmet, hogy a felső frakcióban lévő trombociták *ex vivo* ADP hozzáadását követően hiperaggregabilitást mutattak, míg az ülepedő vérlemezkék teljesen aggregáció gátlásban voltak, minden farmakológiai intervenció nélkül. Feltehetőleg ennek a jelenségnek a háttérében az áll, hogy az ülepedő (öregebb) vérlemezkék már korábban kibocsátották magukból a trombo-inflammatorikus mediátorokat az alfa granulumokból, emiatt elvesztették az ADP-dependens aktivációs képességüket *ex vivo*. Azonban ennek tisztázására további vizsgálatokat szükséges elvégezni. Meghatároztuk az endogén ADP-

szintet mindkét vérfrakciókban, azonban ebben szignifikáns különbséget nem találtunk (nem ábrázoltuk).

Csillámpala lemezre rögzített trombociták morfológiai AFM-képe EDTA-val antikoagulált vérből történt. A fixált és dehidrált trombociták képe a trombociták részleges aktivációját mutatta filopódiák és különböző mértékben lamellopódiák megjelenésével. A citoskeletáris rendszer a celluláris elemekkel viszonylag magas, centrális, félgömb alakot képez. Ezzel a vizsgálattal térfogatukban különböznek egymástól a vér alsó és felső frakcióiból izolált trombociták egyórás szedimentáció után. A félgömbszerű rész terjedelme kisebb, amit térfogatoméréssel kvantitáltunk, de más morfológiai jellemzőik hasonlóak. AFM lehetővé teszi a szedimentálódott trombociták morfológiai jellemzését, az aktiválódás részleteinek további vizsgálatát. Szedimentációval szeparált trombociták AFM-vizsgálatára nem találtunk közleményt. Nem szeparált vérből AFM-mel a trombociták térfogatára vonatkozóan egy közleményt találtunk, melyben hasonló a trombociták térfogata (151).

A clopidogrel vs egészséges kontroll tanulmányunkban is megvizsgáltuk a TAR-értéket befolyásoló tényezőket. Pozitív korreláció volt kimutatható a CRP szérumkoncentrációja, valamint a vérlemezke-szám vonatkozásában a felső frakcióban. Ez arra utal, hogy a felfelé mozgó, flotáló vérlemezkek szerepet játszhatnak a gyulladással járó folyamatokban, azok meghatározó tényezői lehetnek (152,153). Nem csak experimentális, hanem egyre több klinikai evidencia mutat összefüggést CRP-érték és a vérlemezke-aktiváció között (152,153). A non-responder alcsoportban a CRP koncentráció pozitív összefüggést mutatott a H-IPF aránnyal a felső frakcióban, mely arra utalhat, hogy a fokozott szisztémás gyulladással járó válasz összefüggésben lehet az éretlen vérlemezke-képződéssel (153,154). Ez hasonlóságot mutat a mi megfigyelésünkkel is, miszerint a legnagyobb H-IPF arány a non-responder csoport felső frakciójában volt megfigyelhető (155,156). A szeparációt követően elvégzett trombocitafunkciós vizsgálatban a vérlemezkek hiperreaktivitást mutattak a clopidogrelt szedő betegek 59%-ában. Összefoglalva ezeket az eredményeket, úgy véljük, hogy a krónikus gyulladással járó állapot összefüggésben lehet a megnövekedett vérlemezke turnover-rel, melyre az éretlen vérlemezke frakció méretének növekedése utal. Ezen igen aktív vérlemezkek tehetők felelőssé az *ex vivo* fokozott vérlemezke-aktiváció kialakulásáért. Korábban alkalmazott vérlemezke-szeparáción alapuló módszerek szintén mutattak különbséget a vérlemezkek aggregációs tulajdonságaiban, így valószínűsíthető az, hogy a nagyobb (éretlenebb)

trombociták funkcionálisan fontosabbak a kisebb társaiknál (157). A TAR, így a felfelé szálló vérlemezkék aránya a legnagyobb a clopidogrelt szedő non-reszponder betegekben volt. A különbség a reszponder betegekhez képest nem volt szignifikáns, míg az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva igen. A non-reszponder vs reszponder összehasonlításban az esetszám növelését tervezzük. A non-reszponder csoport felső frakciójában észlelt gyakori $AUC > 53$ a későbbiekben segíthet a reziduális magas trombocitareaktivitással (HRPR) bíró egyének rizikóbecslésében, egyúttal a személyre szabott terápia megválasztásában (dózisemelés vagy hatóanyagváltás).

Megemlítendő továbbá az is, hogy a felfelé mozgó trombociták vélhetően fiatalabbak és hiperreaktivitásuk összefüggésben állhat azzal, hogy több tromboinflammatorikus molekulát tartalmaznak, míg az ülepedő vérlemezkék, vélhetően „öregebbek”, ADP hozzáadásával sem aktiválhatóak. A megfigyelt szeparációs folyamat mozgatórugói egyelőre nem ismertek. További vizsgálatok tisztázhatják azt, hogy mely individuális vérlemezke-jellemzők tehetők felelőssé a jelenségért. Mint jövőbeli perspektíva, tisztázásra vár a trombociták és egyéb gyulladással összefüggésben lévő molekulák interakciója. Tervezzük a trombocitaeredetű és más alakos elemekhez illetve endotélhez köthető mikropartikulumok áramlási citometriás vizsgálatát is (158,159).

Fontos megemlíteni, hogy a kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás mechanizmusa egy nagyon összetett folyamat eredménye. A vérlemezkék multiplex szerepkörrel bírnak, nem csak a hemosztázis, gyulladásozó folyamatok szabályozói, hanem hozzájárulhatnak az érfalban zajló patológiás folyamatok kialakulásában is (ateroszklerózis, trombózis), továbbá fontos szerepük van az érvédő folyamatok fenntartásában (160). Vizsgálatunk eredeti célja az volt, hogy a reziduális magas trombocitareaktivitással (HRPR) rendelkező betegek felismerését a TAR és az impedancia aggregometria kombinált használatával pontosítsuk.

Vizsgálatunk pilota tanulmány volt, azonban a kis esetszám miatt további mérések szükségesek. A nem vérlemezke eredetű módosító tényezők feltárása szintén szükséges. Jelen vizsgálatunk egy későbbi tanulmány „proof of concept” alapja lehet.

Végezetül elmondhatjuk, hogy vizsgálatunk során lényeges különbségeket sikerült feltárnunk a trombociták karakterisztikájában (pl. méret, granulomok fajtája, száma, aggregabilitás) az általunk kifejlesztett új szedimentációs technikával. A vizsgálat klinikai jelentőségét az adja, hogy a módszer nagyobb esetszámon való validálása után a

kardio- és cerebrovaszkuláris, betegségekben szenvedők a Multiplate-nél szélesebb körű és olcsóbb vizsgálatát biztosíthatja (155,161). Reményeink szerint, a vérlemezke antiszedimentáció vizsgálatával személyre szabott és új megközelítéssel tárhatjuk fel a clopidogrelszedő betegek magas reziduális vérlemezke-reaktivitásának hátterében álló tényezőket (162). További célunk a TAR és a származtatott vérlemezke paraméterek akut ischaemiás stroke-ban való vizsgálata, valamint a klinikai kimenetellel való kapcsolatuk feltárása a jövőben (155,162-164).

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, ÖSSZEGZÉSEK

6.1. Új megállapítások

Trombociták flotációjának vizsgálata

1. Egy eddig még nem használt új módszer – trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) – került bevezetésre a vérlemezke tulajdonságainak vizsgálatára. A vizsgálatok során megállapítást nyert, hogy a szeparációs technikával kettéválasztott vérlemezkék számos tulajdonságukban (lásd az eredmények fejezetet) különböznek egymástól.
2. A TAR a clopidogrelt szedő betegekben, bár nem szignifikánsan, de magasabb, mint az egészséges kontrollban (medián: 67,7 vs 58,5%), viszont az életkori átlaguk szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva (66 vs 40 év, $p < 0,001$). További vizsgálatokat indokol annak eldöntése, hogy a biológiai öregedés vagy más tényezők (trombociták öregedése, szisztémás gyulladással vagy vaszkuláris betegség) áll-e a jelenség hátterében?

A trombociták morfológiai vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal és atomerő-mikroszkóppal

1. Elektronmikroszkópos vizsgálat először történt antiszedimentációval szeparált trombocitákon. Sikerült kimutatni, hogy a felső frakcióban 1,6x több az α -granulum, illetve ezen vérlemezkék kerülete, területe is szignifikánsan nagyobb, mint az alsó részben találhatóé.
2. Az irodalomban eddig nem jelent meg közlemény szeparált trombociták AFM vizsgálatáról. Megállapítottuk, hogy a felső fázisban a trombociták térfogata szignifikánsan nagyobb.

Az éretlen trombocitafrakció (IPF), a nagyméretű trombocitaarány (P-LCR) és az átlagos trombocitaterfogat (MPV) vizsgálata

1. Megállapítottuk, hogy a szeparációt követően nyert felső frakcióban a H-IPF %-os aránya legmagasabb a non-responder alcsoportban, mely különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult (median: 1,7 vs 0,9%, $p = 0,04$).

2. A felső és az alsó frakció összehasonlításakor a H-IPF (%) minden egyes alcsoport esetén a felső frakcióban bizonyult magasabbnak, tehát a nagyon éretlen trombociták a szedimentáció során felfelé mozognak ($p=0,04$, $p<0,001$, $p=0,02$).

3. A TAR pozitív korrelációt mutatott a teljes vérből meghatározott MPV értékekkel a teljes betegcsoportban ($r=0,300$, $p=0,04$) és a reszponder alcsoportban ($0,364$, $p=0,04$). Ez a korreláció azonban nem volt kimutatható a non-reszponder csoport tagjai között.

4. A második periódusban vizsgált egészséges csoportban az átlagos vérlemezke-térfogat (MPV), az abszolút értékű éretlen trombocitafrakció (IPF), valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva.

Trombocitaaggregáció (TAG) mérése a két vizsgálati periódusban

I. Egészséges csoport vizsgálati eredményeinek megállapítása:

1. Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk az alsó és a felső frakció görbe alatti területértékei (AUC) között.

2. A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek szignifikáns különbséget mutattak mind a teljes vér vs felső illetve alsó, mind pedig a felső vs alsó vérfrakciók összehasonlításakor.

3. Kiemelendő, hogy a felső frakcióban mért AUC-értékek az egészséges kontrollok 38%-ában túllépték a normál aggregációs tartomány (53-122) felső határát, mely arra enged következtetni, hogy a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében.

4. Az alsó frakcióban mért AUC-értékek olyan tartományban voltak, „mintha effektív aggregációgátlás állna fenn”. Ez arra enged bennünket következtetni, hogy a szedimentálódott trombociták nem aktiválhatók *ex vivo* ADP hozzáadásával.

5. A TAR az alsó frakcióban szignifikáns negatív korrelációt mutatott az AUC, az aggregáció nagysága (AU), valamint a görbe meredekségét jelző „velocity” értékekkel.

II. Clopidogrelt szedő és egészséges kontroll vizsgálati eredményének megállapítása:

1. Az aggregometriai vizsgálat során a teljes vérből mért AUC-értékek szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC-értékekhez képest.
2. A clopidogrelt szedő betegek felső frakciójában mért AUC-értékek 59%-ban meghaladták a terápiás tartomány felső határát. A felső frakcióban mért 53 feletti AUC-értékkel rendelkező esetek és a clopidogrel kezelésre nem reagálók (non-reszponder betegek) közötti koincidencia szignifikáns volt ($p=0,001$).
3. Az egészséges populáció 40%-ban a felső frakcióban mért AUC-érték magasabb volt a normál aggregációs tartomány felső értékénél (AUC: 53-122), melyből arra következtethetünk, hogy a felfelé vándorló vérlemezkék *ex vivo* hiperaggregabilitást mutatnak ADP jelenlétében. Az alsó frakcióban mért AUC-értékek azonban nem mutattak szignifikáns különbséget az egészséges és a betegcsoport között.
4. Mind a teljes vérben, mind a felső frakcióban, a függőleges tengelyen ábrázolt aggregációs egység (aggregation unit, AU) és a görbe meredekségét jelző „velocity” szignifikánsan alacsonyabb volt a clopidogrel szedőkben, mint egészséges kontrollokban (valamennyi, $p<0,001$). Ezzel szemben az alsó frakcióban mért AU és „velocity” értékek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ez utóbbi eredményeink azt sugallják, hogy a szedimentálódó (vagy flotációt nem mutató) vérlemezkék az aggregációban nem vesznek részt.
5. Clopidogrelt szedő betegek esetén a felső frakcióban mért MPV és PLCR (%) pozitív korrelációt mutatott a felső frakcióban mért AUC értékkel.
6. A felső rész AUC-értéke tekinthető a kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás (HRPR) független rizikófaktorának. A felső frakcióban mért 62 fölötti AUC érték 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással képes előre jelezni a „non-reszponder” status fennállását.

6.2. Összegzés

1. Megállapíthatjuk, hogy a teljes vér egyóras szedimentációjával kettéválasztott vérfrakciók vérlemezkei számos tulajdonságukban (lásd az eredmények fejezetet) különböznek egymástól.
2. Az általunk először leírt új módszer – trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) – az életkorral és bizonyos patológiás változásokkal állhat összefüggésben.
3. A TAR-érték diagnosztikus szerepe a kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás (HRPR) további vizsgálatot igényel nagyobb betegszám bevonásával.
4. A teljes vér egyóras szedimentációjával elválasztott felső frakció Multiplate aggregometriával mért AUC-értéke független prediktora a HRPR állapotnak.
5. A teljes vér egyóras szedimentációjával elválasztott felső frakció H-IPF (%) értéke szintén alkalmas lehet a HRPR elkülönítésében.
6. A HRPR a legéretlenebb vérlemezke-alakok számával, flotációjával és fokozott aggregációs tulajdonságaival állhat összefüggésben, ezt morfológiai (EM és AFM) eredmények is alátámasztani látszanak.
7. A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken a felső frakcióban lévő trombociták területe, kerülete nagyobb volt, mint az alsó rész trombocitáké, valamint több α -granulum volt kimutatható bennük.
8. Az AFM tovább pontosítja a szedimentálódott vérlemezkek morfológiai analizisét

7. A KUTATÁS KORLÁTAI

- (i). Betegek gyógyszerbevételi szokásai eltérhetnek.
- (ii). Betegek társbetegségei, dohányzás, alkohol és kávézási szokásai eltérőek voltak.
- (iii). Betegek gyógyszermetabolizmusát nem vizsgáltuk, így abban individuális különbségek lehetnek.
- (iv). Egyéb gyógyszerek befolyásoló hatását nem néztük.
- (v). Az egészséges kontroll csoport fiatalabb volt.
- (vi). A mintaméret viszonylag alacsony.

8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACT	=	activated clotting time
ADP	=	adenozin-difoszfát
AFM	=	atomic force microscop
AIS	=	akut iszkémiás stroke
ASA	=	acetilszalicilsav
AU	=	aggregation unit
AUC	=	area under the curve
CAD	=	coronary artery disease
cAMP	=	ciklikus adenosin-monophosphat
CPB	=	cardiopulmonaris bypass
CRP	=	C-reaktív protein
DTS	=	dense tubular system
ECMO	=	extracorporeal membrane oxygenation
ESR	=	erythrocyta szedimentációs ráta
GP	=	glycoprotein
HDL	=	High-density lipoprotein
H-IPF	=	high-fluorescent immature platelet fraction
HT	=	hydroxytryptanin
HTRPR	=	high on treatment residual platelet reactivity
IL	=	interleukin
IPF	=	immature platelet fraction
LAR	=	leukocita antiszedimentációs ráta
LCR	=	large cell ratio

LDL	=	Low-density lipoproteins
LRPR	=	low residual platelet reactivity
MAR	=	monocita antiszedimentációs ráta
MI	=	myocardialis infarctus
MP	=	mikropartikulumok
MPV	=	mean platelet volume
mRNS	=	messenger ribonukleinsav
NAR	=	neutrofil antiszedimentációs ráta
NETs	=	neutrophil extracellular trapset
NOAC	=	novel oral anticoagulants
NSAID	=	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
NVAF	=	nonvalvular atrial fibrillation
OAC	=	oral anticouagulatio
PAR-1	=	protease activated receptor-1
PCT	=	plateletcrit
PDW	=	platelet distribution width
PE	=	foszfatidil-etanolamin
PF4	=	platelet factor 4
POCT	=	point of care testing
PPP	=	platelet poor plasma
PRP	=	platelet rich plasma
PS	=	foszfatidil-szerin
RP	=	reticulated platelet
RPR	=	residual platelet reactivity

SCCS	=	Surface-Connected Canalicular System
SCCS	=	surface-connected canalicular system
SDF-1	=	stroma derived factor 1
TA	=	trombocita alsó
TAG	=	trombocitaaggregáció gátlás
TAR	=	trombocita antiszedimentációs ráta
TAT	=	turn-around-time
TEM	=	transzmissziós elektronmikroszkópia
TF	=	trombocita felső
TTP	=	trombotikus trombocitopéniás purpura
TXA2	=	thromboxane A2
VLDL	=	very low-density lipoproteins
vWF	=	von Willebrandt faktor
We	=	Westergreen

9. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

- 1. táblázat:** Az immunitást és az immunregulációt befolyásoló legfontosabb faktorok
- 2. táblázat:** Az ateroszklerózis kialakulásának genetikai és környezeti rizikófaktora
- 3. táblázat:** Az ateroszklerózis stádiumai az Amerikai Kardiológiai Társaság Konszenzus Klasszifikációja beosztása szerint
- 4. táblázat:** Aszpirin, Aszpirin-dipiridamol és clopidogrel tanulmányok
- 5. táblázat :** Az éretlen trombocita mérésére használt áramlási citometria és a Sysmex sorozat néhány jellemzőjének összehasonlítása
- 6. táblázat:** Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke-paraméterek
- 7. táblázat:** Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke-aggregabilitási adatok
- 8. táblázat:** Transzmissziós elektronmikroszkóppal nyert adatok egészségesekben
- 9. táblázat:** A kontroll csoport és a clopidogrelt szedő egyének demográfiai és laboratóriumi adatai
- 10. táblázat:** Vérlemezke-adatok egészségesekben és clopidogrel szedőkben
- 11. táblázat:** Impedancia-aggregometriai adatok egészségesekben és clopidogrelt szedőkben

10. ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. **ábra:** Schultze eredeti ábrája és eredeti angol leírása az általa kis, kerek gömbként jellemzett „harmadik” elemről
2. **ábra:** A vér alakos elemeinek (vérlemezke felszíni képe: B) sematikus ábrázolása és eredeti angol jellemzése Bizzozero munkájából
3. **ábra:** Érfali trombusképződés sematikus ábrázolása és eredeti angol leírása Bizzozero által
4. **ábra:** A vérsejtképződés folyamata. A megakariocita-eritrocita progenitor sejtől indul ki a trombocitaképzés.
5. **ábra:** A vérlemezke főbb szerkezeti egységeinek sematikus ábrázolása
6. **ábra:** A primer hemosztázis élettana
7. **ábra:** A „vérelégtelenség” („haemorrhagic blood failure”), traumás koagulopátia kialakulásának folyamata
8. **ábra:** Terápiás válaszkészség vizsgálata trombocitaaggregációs kezelésben
9. **ábra:** Trombocitaaggregációs kezelés utáni reziduális reaktivitás mérése
10. **ábra:** Hidrodinamikai fókuszálás és DC (direct current) detektálás
11. **ábra:** Típusos trombocita eloszlásigörbe egy hematológiai automatán
12. **ábra:** Fluoreszcens trombocita mérés Sysmex XN hematológiai automatán
13. **ábra:** Platelet function Analyser (PFA-100™) készülék működési elve
14. **ábra:** Az áramlási citometria működési elve
15. **ábra:** Az aggregométerben elhelyezett minta (PRP) átvilágítása agonista adása előtt és után (balra), és egy egészséges egyén idő - transzparencia görbéje (jobbra)
16. **ábra:** Multiplate® Analyzer készülék
17. **ábra:** A trombocitaaggregáció és kitapadás hatása a szenzor elektródák közti impedanciára
18. **ábra:** A trombocitaaggregáció mérési folyamata
19. **ábra:** A trombocitafunkció mérés jellemző paraméterei
20. **ábra:** A csatornakijelzőn megjelenített számszerű és grafikus adatok

- 21. ábra:** Az alkalmazott trombocitaagonista aktívatórok hatásmechanizmusa
- 22. ábra:** A leukocita antiszedimentáció kivitelezése és a leukocita antiszedimentációs ráta kiszámítása (LAR)
- 23. ábra:** A Transzmissziós Elektronmikroszkóp (TEM) szerkezetének sematikus ábrázolás
- 24. ábra:** Trombocita elektronmikroszkópos képe
- 26. ábra:** Atomerő-mikroszkóp sematikus működési elve
- 27. ábra:** Vérlemezke morfológiája fiziológiás körülmények között
- 28. ábra:** Az 1.A ábrán a trombocita antiszedimentációs ráta képlete ($TAR = TCT(F-A)/TCT(F+A) \times 100$) látható. A 1.B sematikus ábrán a trombociták szeparálását mutatjuk
- 29. ábra:** A trombociták kijelölése képanalízisre
- 30. ábra:** A vérlemezke-aggregometria során nyert görbék egy egészséges egyénben
- 31. ábra:** A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek
- 32. ábra:** Az alsó (A és C) és felső frakció (B és D) trombocitáinak elektronmikroszkópos felvételei
- 33. ábra:** Trombociták AFM-képe a szedimentált vérből
- 34. ábra:** Trombociták AFM-paramétereinek box és whiskers Tukey-szerinti grafikus ábrázolása
- 35. ábra:** A Multiplate-tel mért aggregáció (AUC) a teljes vérben és a felső és alsó frakcióban, az egészséges és clopidogrelszedő csoportokban
- 36. ábra:** A felső frakció AUC-eredményének összefüggése a felső rész MPV(A) illetve PLCR% (B) értékével
- 37. ábra:** H-IPF (%) az alsó és a felső frakciókban egészséges kontroll csoportban és a clopidogrel reszponder és non-reszponder alcsoportokban.
- 38. ábra:** A felső frakcióban mért AUC-érték ROC-görbéje a non-reszponder status előrejelzésére (ROC analízis)

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev* 2013; 93: 327–358.
2. Alan D.M.: Platelets (Third Edition). (2013). Coller B.S.: A Brief History of Ideas About Platelets in Health and Disease (Voreword) 20-46.
3. Bizzozero, J. Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 1882a;90, 261–332.
4. Brewer DB, Schultze M (1865) Bizzozero G,(1882) and the discovery of the platelet *British Journal of Haematology*, 133,251-258.
5. Gaetano G, Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 2001; 86:349-356.
6. Fonyó A.: Az orvosi élettan tankönyve (2011), Medicina Könyvkiadó Zrt., 27.fejezet
7. Sunita RP, John H, Hartwig JH et al. Italiano Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005;115:3348–3354.
8. Yun SH, Eun-Hye Sim EH, Ri-Young Goh RY. et al. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Research International* Volume 2016; Article ID 9060143, 5 pages.
9. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Scientific World Journal* Volume 2014; Article ID 781857, 16 pages.
10. Fritsma G.A. Platelet Structure and Function *Clin Lab Sci* 2015;28:125.
11. Babik B. Csak öltés és töltés, vagy több? A perioperatív véralvadás klinikai élettana I. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2015; 45:24-37.
12. LiangYao LiJ, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance *J Exp Med* 2017; Vol. 214 No. 8 2193–2204.
13. Mann KG., Krishaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol* 199; 29, 213-26.

14. Hoffmann M, Mondoe DM, 3rs: A cell-based model of hemostasis. *Thromb Hemost* 2001; 85, 958-65.
15. Guzzerra NA, Miller BE. Principles of hemostasis in children: model and maturation, *Paediatr Anaesth* 2011, 21, 3-9.
16. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl)*, 2011; 89, 109-21.
17. Clemetson KJ. Platelets and primary hemostasis. *Thromb Res* 2012; 129, 220-4.
18. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol* 2013; 35, 254-61.
19. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res* 2012; 129, 250-6.
20. White NJ, Ward KR, Pati S. et al. Hemorrhagic blood failure: oxygen debt, coagulopathy and endothelial damage. *J Trauma Acute Care Surg* 2017; June; 82(6):S41-49.
21. Oshiro A, Yanagida Y, Gando S, et al. Hemostasis during the early stages of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. *Critical Care* 2014; 18, R61
22. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V. et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Crit Care* 2019; 23: 98.
23. Holinstat M, Tourdot BE. Coronary heart disease risk factors take a disproportional toll on women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2015; 35:750–751.
24. Koupenova M, Mick E, Mikhalev E. et al. Sex differences in platelet toll-like receptors and their association with cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2015; 35:1030–1037.
25. Ouseph MM, Huang Y, Banerjee M. et al. Autophagy is induced upon platelet activation and is essential for hemostasis and thrombosis. *Blood* 2015; 126:1224–1233.
26. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance, *J Exp Med* 2017; Jul 1
27. Marja J. VanWijk, E. VanBavel, A. et al. Nieuwland. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 2003; 59: 277–287.

28. Batool S, Abbasian N, Burton JO et al. Microparticles and their Roles in Inflammation: A review. *The Open Immunology Journal* 2013; 6, 1-14.
29. Burnier L, Fontana P, Kwak BR. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009; 101: 439–451.
30. Mause SF, Weber C. Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circ Res* 2010;107:1047-1057.
31. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *British Journal of Haematology* 2007; 137: 36-48.
32. Nieuwland R, Sturk A. Why do cells release vesicles? *Thrombosis Research* 2010; 125: S49-S51.
33. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;97:425–434.
34. Dan L. Longo. *Harrison's Hematology and Oncology*. Medical 2010. Section II. Chapter 3. Barbara A. Konkle. Bleeding and Thrombosis pg. 22-31
35. Piccin A, Murphy WG, Smith O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews* 2007; 21, 157–171.
36. A J Lusis et al, Atherosclerosis. *Nature* 2000;407: 233-241.
37. Virmani R, Burke AP, Farb A, Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Col Cardiol* 2006; 47:C13-C18
38. Silva Marques J, Pinto FJ et al. The vulnerable plaque: Current concepts and future perspectives on coronary morphology, composition and wall stress imaging. *Rev Port Cardiol* 2014; 33: 101-110.
39. Beaglehole R, Magnus P et al. The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for the epidemiologists? *Int J Epidemiol* 2002; 31: 1117-1122.
40. Collins R, Armitage J, Parish S et al. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 2005-2016.

41. Pedrigi RM, de Silva R, Bovens SM et al. Thin-cap fibroatheroma rupture is associated with fine interplay of sand wall stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 2224-2231.
42. Libby P. Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 2002; 420: 868-874.
43. Ridker PM, Danielson D, Fonseca FA et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial, *Lancet* 2009; 373: 1175-1182.
44. Scott G, Diane B, Luther C et al. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III.) *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
45. Rodrigues-Granillo GA, Agostoni P, Garcia-Garcia HM et al. MEta-analysis of the studies assessing temporal changes in coronary plaque volume using intravascular ultrasound, *Am J Cardiol* 2007; 99: 5-10.
46. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes, *N Engl J Med* 2004; 350: 1495-1504.
47. Aziz M, Yadav KS et al. Pathogenesis of Atherosclerosis, *Med Clin Rev* 2016; 2:3.
48. Badimon, Padro, Vilahur et al. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemias heart disease, *European Heart Journal, Acute Cardiovascular Care* 2012; 1: 60-64.
49. Huo Ym Schober A Forlow SB et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E, *Nat Med* 2003; 9: 61-67.
50. Massberg S, Brand K, Gruner S et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation, *J Exp Med* 2002 196: 887-96.
51. Landry P, Plante I, Quellet DL et al. Existence of a micro-RNA pathway in anucleate platelets, *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:96-66.
52. Bruchova H, Merkerova M and Prchal JT. Abberand expressions of microRNA in polycythaemia vera, *Haematologica* 2008; 93: 1009-16.

53. Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameter, *Thromb Haemost* 2003; 90: 1112-20.
54. Gawaz M BK, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cell mediated through an interleukine-1 dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2000; 148: 75-85.
55. Gawaz M, Stellos K, Langer HF et al. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells, *J Thromb and Haemost* 2008; 6: 235-42.
56. Amarenco P, Lavallée PC, Labreuche J. et al. TIAregistry.org Investigators. One-year risk of stroke after transient ischemic attack or minor stroke. *N Engl J Med* 2016;374:1533–1542.
57. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR. et al. American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Council on Peripheral Vascular Disease. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2014;45:2160–2236.
58. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T. et al. American Heart Association Stroke Council. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49:e46–e110. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack, *Stroke* 2014;45:2160-2236.
59. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack, *Stroke* 2014;45:2160-2236.
60. Johnson ES, Lanes SF, Wentworth CE. et al. A meta-regression analysis of the dose-response effect of aspirin on stroke. *Arch Intern Med* 1999;159:1248–1253.
61. Antithrombotic Trialists Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients *BMJ* 2002;324:71–86.
62. Farrell B, Godwin J, Richards S. et al. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:1044–105

63. The Dutch TIA Trial Study Group. A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *N Engl J Med* 1991;325:1261–1266.
64. The Canadian Cooperative Study Group. A randomized trial of aspirin and sulfipyrazone in threatened stroke. *N Engl J Med* 1978;299:53–59.
65. The SALT Collaborative Group. Swedish Aspirin Low-dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events. *Lancet* 1991;338:1345–1349.
66. Weisman SM, Graham DY. Evaluation of the benefits and risks of lowdose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. *Arch Intern Med* 2002;162:2197–2202.
67. CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329–1339.
68. The ESPS Group. The European Stroke Prevention Study: principal endpoints. *Lancet* 1987;2:1351–1354.
69. Harker LA, Kadatz RA. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb Res Suppl* 1983;4:39–46.
70. Gachet C, Stierlé A, Cazenave JP. et al. The thienopyridine PCR 4099 selectively inhibits ADP-induced platelet aggregation and fibrinogen binding without modifying the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex in rat and in man. *Biochem Pharmacol* 1990;40:229–238.
71. Komocsi, Aradi et al. Konzensusajánlás trombocitaagregációgátlás méréséről kononária stent implantáció átesett betegek esetén, *Cardiologia Hungarica* 2011; 41:O3-X.
72. Samara WM, Bliden KP, Tantry US. The difference between clopidogrel responsiveness and posttreatment platelet reactivity. *Thromb Res* 2005; 115:89-94.
73. Aradi D, Storey RF, Komocsi A et al. Expert position pper on role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2014; 2;35:209-15

74. Aradi D, Komocsi A, Vorobcsuk A et al. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2010; 160:543-51.
75. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 1997;349:1569–1581.
76. Chen ZM. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 1997;349:1641–1649.
77. Chen ZM, Sandercock P, Pan HC et al. Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke: a combined analysis of 40 000 randomized patients from the Chinese acute stroke trial and the international stroke trial. On behalf of the CAST and IST collaborative groups. *Stroke* 2000;31:1240–1249.
78. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324:71–86.
79. Second European Stroke Prevention Study. ESPS-2 Working Group. *J Neurol.* 1992;239:299–301
80. Halkes PH, van Gijn J, Kappelle LJ et al. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. *Lancet.* 2007 Jan 27;369(9558):274.
81. D G Hackam, J D Spence et al. Antiplatelet Therapy in Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack, an overview of major trials and meta analyses. *Stroke* 2019;50:773-778.
82. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329–1339.
83. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM. et al. MATCH Investigators. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:331–337.
84. Benavente OR, Hart RG, McClure LA. et al. Effects of clopidogrel added to aspirin in patients with recent lacunar stroke. *N Engl J Med* 2012;367:817–825.

85. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W. et al. CHARISMA Investigators. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006;354:1706–1717.
86. Sacco RL, Diener HC, Yusuf S. et al. PROfESS Study Group. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1238– 1251.
87. Wang Y, Wang Y, Zhao X. et al. CHANCE Investigators. Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* 2013;369:11–19.
88. Johnston SC, Easton JD, Farrant M. et al. Clinical Research Collaboration, Neurological Emergencies Treatment Trials Network, and the POINT Investigators. Clopidogrel and aspirin in acute ischemic stroke and high-risk TIA. *N Engl J Med* 2018;379:215– 225.
89. Wong KSL, Amarenco P, Albers GW. et al. SOCRATES Steering Committee and Investigators. Efficacy and safety of ticagrelor in relation to aspirin use within the week before randomization in the SOCRATES trial. *Stroke* 2018;49:1678–1685.
90. Briggs, P. Harrison, S.J. Machin, Continuing developments with the automated platelet count, *Int. J. Lab. Hematol* 2007; 29: 77–91.
91. Kaito K, Otsubo H, Usui N. et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia, *Br J Haematol* 2005;128: 698–702.
92. Hoffmann J, Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility, *Clin Chem Lab* 2014; 52:1107–1117.
93. Barsam SJ, Psaila B, Forestier M. et al. Platelet production and platelet destruction: assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117:5723–32.
94. Cremer M, Weimann A, Schmalisch G. et al. Immature platelet values indicate impaired megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2010;103:1016–21.
95. Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A. et al. Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol* 2010;32:299–306.

96. Bat T, Leitman SF, Calvo KR. et al. Measurement of the absolute immature platelet number reflects marrow production and is not impacted by platelet transfusion. *Transfusion* 2013;53:1201–4.
97. Koh KR, Yamane T, Ohta K. et al. Pathophysiological significance of simultaneous measurement of reticulated platelets, large platelets and serum thrombopoietin in non-neoplastic thrombocytopenic disorders. *Eur J Haematol* 1999;63:295–301.
98. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C. et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2015;36:3202–3210.
99. Perl L, Lerman-Shivek H, Rechavia E. et al. Response to prasugrel and levels of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:513–517
100. Stratz C, Bömicke T, Younas I, et al. Comparison of immature platelet count to established predictors of platelet reactivity during thienopyridine therapy. *J Am Coll Cardiol* 2016;68:286–93.
101. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. *J Clin Invest* 1969;48:1083–7.
102. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost* 2007;5:490–6.
103. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:743–9.
104. Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B. et al. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2122–9.
105. Hochholzer W, Amann M, Titov A, et al. Randomized comparison of different thienopyridine loading strategies in patients undergoing elective coronary intervention: the Excelsior-LOAD trial. *J Am Coll Cardiol Intv* 2016;9:219–27.

106. Chu SG, Becker RC, Berger PB et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk : systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010;8 :148-56.
107. Braekkan SK, Mathiesen EB, Njolstad I, et al. Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromso Study, Tromso, Norway. *J thromb Haemost* 2010;8:57-162.
108. Kurt M, Onal IK, Sayilir AZ et al. The role of mean platelet volume in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2012;50:1580-2.
109. Tuncel T, Ozgun A, Emirzeoglu L et al. Mean platelet volume as a prognostic marker in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-combined chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:6421-3.
110. Gul SS, Gozke E. Mean Platelet Volume in Patients with Acute Ischemic Stroke with Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Clin Lab*. 2018;31:64.
111. Wan JL, Ma ZW. The Value of Mean Platelet Volume for Prognosis of Patients with Acute Cerebral Infarction. *Clin Lab*. 2017;63:1801-1807.
112. Ayas ZÖ , Can U. Alteration of mean platelet volume in the pathogenesis of acute ischemic stroke: cause or consequence? *Ideggyógy Sz*. 2018;71:49-56.
113. Haungsaitong R, Udommongkol C, Nidhinandana S. et al. The Changes in Mean Platelet Volume after Using of Antiplatelet Drugs in Acute Ischemic Stroke: A Randomized Controlled Trial. *Med Assoc Thai* 2015; 98: 852-7.
114. Peng F, Zheng W, Fengli Li F. et al. Elevated mean platelet volume is associated with poor outcome after mechanical thrombectomy. *NeuroIntervent Surg* 2017;0:1–5.
115. Staszewski J, Pogoda A, Data K. et al. The mean platelet volume on admission predicts unfavorable stroke outcomes in patients treated with IV thrombolysis. *Clinical Interventions in Aging* 2019;14 493–503.
116. Noris P, Melazzini F, Balduini C.L. New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? *Platelets* 2016; 27:607-612.

117. Vasudeva K, Munshi A. Genetics of platelet traits in ischaemic stroke: focus on mean platelet volume and platelet count. *Int J Neurosci.* 2019;129:511-522.
118. Az Orvosi laboratóriumi vizsgálatok Szakmai Kollégiuma és az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Szakmai Kollégium. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve A betegágy melletti (Point-of-Care, POC) laboratóriumi diagnosztika fekvőbeteg intézmények sürgős és intenzív terápiás betegellátásában való alkalmazására.
119. John A.St, Price Ch.P. Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biolchem Rev* 2014; 35:155-167.
120. Kundu S.K. Heilmann E.J, Sio R. et al. Description of an in vitro platelet function analyser – PFA-100®-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:106–112.
121. Reny J, Moerloose P, Dauzat M. et al. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 6:444-50.
122. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000;46:1221–1229.
123. Alan D.M.: Platelets (Third Edition) 2013; Berny-Lang M.A, Frelinger A.L, Barnard M.R.: Flow Cytometry (29.Chapter) 581-603.
124. Harrison P, Mackie I, Mumford A. et al. Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function. British Committee for Standards in Haematology Augustus, 2011.
125. Sibbing D, Mayer K, Bernlochner I. et al. Platelet Function Testing Guided Use of Prasugrel in Patients With High on-Clopidogrel Treatment Platelet Reactivity Reduces the Risk of Early Stent Thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2012;59
126. Siller-Matula JM, Francesconi M, Dechant C. et al. Personalized antiplatelet treatment after percutaneous coronary intervention: The MADONNA study. *Int J Cardiol.* 2013;167:2018–23.
127. Maor E, Kain D, Zager Y: Invasive and Interventional Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2013;61.

128. Weber CF, Görlinger K, Meininger D. et al. Point-of-care testing: A prospective, randomized clinical trial of efficacy in coagulopathic cardiac surgery patients. *Anesthesiology* 2012;117:531–47.
129. Ranucci M, Baryshnikova E, Soro G. et al. Multiple electrode whole-blood aggregometry and bleeding in cardiac surgery patients receiving thienopyridines. *Ann Thorac Surg* 2011;91:123–9.
130. Nummi V, Lassila R, Joutsu-Korhonen L. et al. Comprehensive re-evaluation of historical von Willebrand disease diagnosis in association with whole blood platelet aggregation and function. *Int J Lab Hematol* 2018;1–8.
131. Awidi A, Maqablah A, Dweik M. et al. Comparison of platelet aggregation using light transmission and multiple electrode aggregometry in Glanzmann thrombasthenia. *Platelets* 2009;20(5):297–301.
132. Sibbing D, Braun S, Morath T. et al. Platelet Reactivity After Clopidogrel Treatment Assessed With Point-of-Care Analysis and Early Drug-Eluting Stent Thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:849–56.
133. Siller-Matula JM, Gouya G, Wolzt M. et al. Cross validation of the multiple electrode aggregometry: A prospective trial in healthy volunteers. *Thromb Haemost.* 2009;102:397–403.
134. Fabry T.I. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood* 1987;70:1572-1576.
135. Cutts JH. Cell separation. *Methods in Hematology*, Academic Press 1970; New York 39-69.
136. Bogár L, Horváth JA, Tekeres M. *Orv Hetil.* 1997; 138:861-5.
137. Bogar L, Molnar Zs, Tarsoly P. et al. Serum procalcitonin level and leukocyte antisedimentation rate as early predictors of respiratory dysfunction after oesophageal tumour resection, *Critical Care* 2006; Vol 10 No 4,
138. Bogar L, Molnar Z, Kenyeres P. et al. Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. *J Clin Pathol* 2006;59;523-525.

139. Molnar T, Papp V, Banati M. et al. Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 44 (2010) 183–192
140. Rozanovic M, Csontos C, Bogár L. et al. Can leukocyte antisedimentation rate (LAR) predict septic complications and critical care survival early in polytrauma and burn victims? *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64:875-885.
141. Mattson J.C. Use of scanning electron microscopy to study structural-functional relationships in normal and diseased platelets. *Scanning Electron Microscopy* 1985; 351-391.
142. Neumüller A, Meisslitzer-Ruppitsch C, Ellinger A et al. Monitoring of Platelet Activation in Platelet Concentrates Using Transmission Electron Microscopy *Transfus Med Hemother* 2013;40:101–107
143. Neumüller J, Ellinger A, Wagner T. Transmission Electron Microscopy of Platelets FROM Apheresis and Buffy-Coat-Derived Platelet Concentrates <http://dx.doi.org/10.5772/60673>
144. Neumüller J, Wagner T. Electron Tomography Contributing to Ultrastructural Research in Vascular Biology and Transfusion Medicine. *J Cardiol and Cardiovasc Sciences* 2019;3:4-10.
145. Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy – from birth to adolescence. Research Division, Zurich Research Laboratory, 8803 Rüschlikon, Switzerland, Nobel lecture, December 8, 1986
146. Feller T. A fibrinháló képződésének és lízisének morfológiai és nanomechanikai vizsgálata atomierő-mikroszkópiával (Doktori Tézisek), Semmelweis Egyetem Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskolája, 2019
147. Marchant RE, Kang I, PS. Sit PS. et al. Molecular Views and Measurements of Hemostatic Processes Using Atomic Force Microscopy *Current Protein and Peptide Science* 2002; 3:249-274.
148. Martin JF, Plumb J, Kilbey RS, Kishk YT. Changes in volume and density of platelets in myocardial infarction. *BMJ* 1983;287:456-9.

149. Corash L, Costa JL, Shafer B, Donlon JA, Murphy D. Heterogeneity of human blood platelet subpopulations: III. Density-dependent differences in subcellular constituents. *Blood* 1984;64:185-193.
150. Polanowska-Grabowska R, Raha S, Gear ARL. Adhesion efficiency, platelet density and size. *Br J Haemato.* 1992;82):715-720.
151. Woolley R, Prendergast U, Jose B. et al. A rapid, topographical platelet activation assay. *Analyst* 2013;138:4512-8.
152. Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, et al. Platelet \times CRP Multiplier Value as an Indicator of Poor Prognosis in Patients With Resectable Pancreatic Cancer *Pancreas* 2017;46:35-41.
153. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 2015;114:449–58.
154. Liverani E, Kilpatrick LE, Tsygankov AY. The Role of P2Y₁₂ Receptor and Activated Platelets During Inflammation. *Curr Drug Targets* 2014;15:720–728.
155. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2015;36:3202–10.
156. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, et al. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis* 2012;33:137–42.
157. Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, et al. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol* 1982;50:509-19.
158. Becatti M, Fiorillo C, Gori AM, et al. Platelet and leukocyte ROS production and lipoperoxidation are associated with high platelet reactivity in Non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients on dual antiplatelet treatment. *Atherosclerosis* 2013;231:392-400.
159. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood* 2017;130:2171-2179.

160. Reinhart WH. Platelets in vascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;53:71-9.
161. Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:1107-17.
162. Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M et al. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2019 May 28. doi: 10.3233/CH-190580
163. Lev EI. Immature Platelets: Clinical Relevance and Research Perspectives. *Circulation*. 2016;134:987-988.
164. Csecsei P, Pusch G, Ezer E, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T.: Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27:951-956.

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Először is hálás köszönetem **Prof. Dr. Tekerés Miklósnak**, akinek biztatására és a háttérből való irányításának köszönhetően folytattam és befejeztem a PhD munkám. Hálával tartozom **Bogár Lajos** és **Koller Ákos Professzor Uraknak** is, akik szintén folyamatosan támogattak és tanácsokkal elláttak. Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Molnár Tihamérnak** a sok-sok hasznos, értékes tanácsát, szakmai támogatását, a klinikai adatok elemzésében és kiértékelésében nyújtott segítségét, valamint töretlen bizalmát irányomba. Hálával tartozom **Büki András Professzor Úrnak** is, aki a kutatáshoz szükséges anyagi feltételeket biztosította számomra.

Köszönöm **Dr. Schrick Dianának**, aki nagyon sokat segített a vérvételek szervezésében, a dolgozat megírásához szüksége irodalomkutatásban, fordításban. Hasonló hálával tartozom **Dr. Szekeres Gábornak**, aki a dolgozat végső formájának szerkesztését vállalta.

Köszönettel tartozom a **Pécsi Idegsebészeti Klinika nővéreinek, ápolóinak**, akik egyrészt vállalták, hogy a kontroll csoport alanyai legyenek, másrészt sokat segítettek a betegektől történt vérvételben. Itt fejezem ki hálám a többi „véradónak” is (**betegeknek, és a többi egészséges kontroll személynek**), akik így segítettek, hogy a kutatómunkám befejeződhessen.

Köszönöm **Dr. Tőkés-Füzesi Margitnak**, aki a laboratóriumi analízissel járult hozzá az eredményekhez. Hasonlóan sokat segített és köszönet jár **Prof. Dr. Seress Lászlónak** és **Dr. Ábrahám Hajnalkának**, akik az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében és értékelésében nyújtottak segítséget. Az atomerő mikroszkópos felvételek elkészítésében és értékelésében nyújtott segítséget **Dr. Hársfalvi Jolán** és **Prof. Dr. Kellermayer Miklós**, akik munkájáért, fáradozásaikért sok-sok hálával tartozom.

Szeretnék köszönetet mondani mindazon kollégáimnak - többek közt **Dr. Szenohradzki Katalinnak, Dr. Vámos Zoltánnak, Dr. Hudvágner Sándornak** - , akik a háttérben a sok buzdítást és a lelki támogatást adták.

Szeretném megköszönni szüleimnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy orvos lehessek. Hálával tartozom családomnak, **férjemnek**, gyermekeimnek, **Dávidnak** és **Laurának**, akik a háttérrel biztosították számomra.

13. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

13.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. Clin Hemorheol Microcirc. 2019 May 28. doi: 10.3233/CH-190580

IF: 1,642

Cit: 1

Csecsei P, Pusch G, **Ezer E**, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T.: Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 27(4):951-956. (2018)

IF: 2,881

Cit: 3

13.2 Az értekezés alapjául szolgáló, elbírálás alatt álló közlemény

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M², Ábraham Á, Koller Á, Kellermayer M, Hársfalvi J, Bogár L, Molnár T. Gravity sedimentation reveals functionally and morphologically different platelets in healthy subjects

13.3 Más témában megjelent közlemények

Büki A, Barzó P, Demeter B, Kanizsai P, **Ezer E**, Tóth P, Horváth P, Varga C.: [Guidelines for the treatment of traumatic brain injury - 2017]. Ideggyógy Sz.;70(7-8):223-245. (2017)

IF: 0,252

Cit: 3

Toth P, Szarka N, Farkas E, **Ezer E**, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A. Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 311(5):H1118-H1131 (2016)

IF: 3,351

Cit: 24

Toth A, Kovacs N, Perlaki G, Orsi G, Aradi M, Komaromy H, **Ezer E**, Bukovics P, Farkas O, Janszky J, Doczi T, Buki A, Schwarcz A. Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? J Neurotrauma. 1;30(1):2-10 (2013)

IF: 3,968

Cit: 67

Czeiter E, Mondello S, Kovacs N, Sandor J, Gabrielli A, Schmid K, Tortella F, Wang KK, Hayes RL, Barzo P, **Ezer E**, Doczi T, Buki A. Brain injury biomarkers may improve the predictive power of the IMPACT outcome calculator. J Neurotrauma. 10;29(9):1770-8 (2012).

IF: 4,295

Cit: 87

Auer T, Schwarcz A, **Ezer E**, Czeiter E, Aradi M, Hudvágner S, Janszky J, Büki A, Dóczi T.: [Diffusion tensor and functional MR imaging of severe traumatic craniocerebral injury at low magnetic field]. Ideggyogy Sz. 30;60(11-12):480-8 (2007).

Cit: 0

Kasó G, Horváth Z, Kövér F, **Ezer E**, Dóczi T. Application of vertebroplasty, neuronavigation and kyphoplasty in the treatment of multiplex osteoporotic vertebral fractures--case report]. Ideggyogy Sz. 20;59(7-8):282-7 (2006).

Cit: 1

Ertl T, Sulyok E, **Ezer E**, Sárkány I, Thurzó V, Csaba IF.: The influence of metoclopramide on the composition of human breast milk. Acta Paediatr Hung. 31(4):415-22 (1991).

Cit: 24

Hanley DF, et al. MISTIE III Investigators. Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial. Lancet.; 393(10175):1021-1032 (2019).

Cit: 35

van Essen TA, den Boogert HF, Cnossen MC, de Ruiter GCW, Haitzma I, Polinder S, Steyerberg EW, Menon D, Maas AIR, Lingsma HF, Peul WC; CENTER-TBI Investigators and Participants.: Correction to: Variation in neurosurgical management of traumatic brain injury: a survey in 68 centers participating in the CENTER-TBI study. *Acta Neurochir (Wien)*. 161(3):451-455 (2019).

Cit: 2

Vande Vyvere T, Wilms G, Claes L, Martin Leon F, Nieboer D, Verheyden J, van den Hauwe L, Pullens P, Maas AIR, Parizel PM; Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI) Investigators and Participants: Central versus Local Radiological Reading of Acute Computed Tomography Characteristics in Multi-Center Traumatic Brain Injury Research. *J Neurotrauma*. 1;36(7):1080-1092 (2019).

Cit: 0

van Veen E, van der Jagt M, Cnossen MC, Maas AIR, de Beaufort ID, Menon DK, Citerio G, Stocchetti N, Rietdijk WJR, van Dijck JTJM, Kompanje EJO; CENTER-TBI investigators and participants. Brain death and postmortem organ donation: report of a questionnaire from the CENTER-TBI study. *Crit Care*. 16;22(1):306 (2018) (cit:1).

Cit: 1

.....
Összesített IF: 16,389

Összesített Cit: 248

13.4 Könyvfejezet magyar:

Ezer Erzsébet: Intracranialis nyomásmérés, liquordrenázs. In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 175-179.

Ezer Erzsébet: Intracranialis katasztrófák intenzív terápiája In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 317-332.

Ezer Erzsébet: Nyaki gerincsérültek intenzív terápiája In.: Bogár Lajos, Molnár Zsolt: Az intenzív terápia gyakorlata. Medicina, Budapest (2013), 326-331.

Ezer Erzsébet: Az intracranialis nyomás (ICP) mérése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanesthézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 51-54.

Ezer Erzsébet: Sztereotaktikus beavatkozások érzéstelenítése In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanesthézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 157-165.

Ezer Erzsébet: Craniocerebrális sérülést szenvedett betegek anesztéziája In.: Fülesdi Béla, Tassonyi Edömér, Molnár Csilla: Neuroanesthézia és neurointenzív ellátás. Medicina, Budapest (2014), 51-54

Ezer Erzsébet, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Súlyos koponyasérültek primer ellátása In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Emberi életfolyamatok idegi szabályozása – a neurontól a viselkedésig. Interdiszciplináris tananyag az idegrendszer felépítése, működése és klinikuma témáiban orvostanhallgatók, egészség- és élettudományi képzésben résztvevők számára Magyarországon. 2299 p Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1900-1919.

13.5 Könyvfejezet angol:

Endre Czeiter, Zsuzsanna Ursprung, Noemi Kovacs, **Erzsebet. Ezer**, Ferenc Kover, Janos Sandor, Tamas Doczi and Andras Buki: Outcome Prediction with Marshall CT-classification and Rotterdam Score in Severe Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 978-88-7587-385-1 2007; 353-356.

Büki András, Czeiter Endre, Dán Livia, **Ezer Erzsébet** Haematomas in anticoagulated patients. In: **EANS Training Course Book: Second EANS Course In Spinal Surgery**, Opatija, Croatia, November 6 - 8, 2008. pp. 178-182. Opatija: 2009.

Ezer Erzsébet, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primary treatment of severe neurotrauma In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Neural regulation of human life processes – from the neuron to the behaviour. Interdisciplinary teaching material concerning the structure, function and clinical aspects of the nervous system for students of medicine, health and life sciences in Hungary. 2266 p. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 1876-1895.

13.6 Könyvfejezet német:

Ezer Erzsébet, Cséplő Péter, Vámos Zoltán: Primäre Versorgung nach schweren Schädeltraumata In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (szerk.) Neurologische Regulierung humaner Lebensprozesse – vom Neuron zum Verhalten. Interdisziplinärer Lernstoff zum Thema Aufbau, Funktion und Klinik des Nervensystems für Studierende der Medizin, Gesundheits- und Biowissenschaften in Ungarn. 2453 p. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, 2016. pp. 2032-2053.

13.7 Magyar folyóiratban megjelent közlemények:

Ertl, T., Sulyok, E., Hartmann, G., **Ezer, E.**, Sárkány, I., Thurzó, V.: Az anyatej prolaktin és dopamin szintjének változása metoclopramide kezelés hatására. Magyar Nőorv. L. 55: 360-363, 1992.

Decsi, T, Volker Veil, Szász, M., **Ezer, E.**, Méhes, K.: Az anyatej és három különböző tápszer összehasonlító vizsgálata érett újszülöttek táplálásában. Orv. Hetil., 133. 2087-2091. 1992.

Ezer, E., Soponyai, J., Láng, Á.: Fentanyl alkalmazása a szülészeti peridurál anaesthesiában. Magyar Nőorv. L. 57. 133-138. 1994.

Ezer Erzsébet, Büki András: Az akut koponyatrauma intenzív osztályos kezelése Aneszteziológia és intenzív terápia 37(4)2007, 193-200

Ezer E., Vámos Z.: Az agyi keringés szabályozása (az agyi autoreguláció élettani és klinikai aspektusai). Aneszteziológia és intenzív terápia 42.(3) 2012, 162-166.

13.8 Kongresszusi előadások/poszterek nyomtatásban megjelent összefoglalói

Szellár Dóra, Czeiter Endre, Péterfalvi Ágnes, Sándor János, Mezősi Emese, Kövér Ferenc, Kosztolányi Péter, Angyal Miklós, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Dóczi Tamás, Büki András The Pécs Traumatic Brain Injury Databank Clin Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2005;58(5-6):212.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, Büki András, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. Clin Neurosci/Ideggy Szle 2005;58(5-6):210-1.

Czeiter Endre, Szellár Dóra, **Ezer Erzsébet**, Meszaros István, Kövér Ferenc, Auer Tibor, Schwarcz Attila, Dóczi, Tamás, Büki, András; Analysis of the Pecs severe traumatic brain injury database: the effect of guideline implementation on outcome Journal of Neurotrauma. 2006 May;23(5):758.

Pál József, Kellényi Lóránd, Kövesdi Erzsébet, Lückl János, **Ezer Erzsébet**, Gallyas Ferenc, **Büki András**, Dóczi Tamás: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. Journal of Neurotrauma. 2006 May;23(5):752

Czeiter Endre; Kovács Noémi; Ursprung Zsuzsanna; **Ezer Erzsébet**; Kövér Ferenc; Sándor János; Dóczi Tamás; Büki András: Prediction of outcome in severe traumatic brain injury based on computed tomographic examinations Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2007;60(S1):14.

Hudak Istvan, Botz Lajos, **Ezer Erzsébet**, Doczi Tamas.:A novel strategy in the treatment of high grain brain AVMs: combined transarterial and transvenous embolisation by means of a polyurethane based new embolizing agent. WFITN Congress , Beijing, 2007 szept.

Zsuzsanna Ursprung, Endre Czeiter, Janos Sandor, Noemi Kovacs, **Erzsébet Ezer**, Tamas Doczi, Andras Buki :Outcome Prediction in Severe Traumatic Brain Injury: Does Conventional CT Matter? Journal of Neurotrauma. 2008 Jul;25(7):913.

Czeiter Endre, Sándor János, Kovács Noémi, **Ezer Erzsébet**, Dóczi Tamás, Büki András. : The „Pécs severe traumatic brain injury database”: treatment and outcome estimation in case of severe head injury in Hungary Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience 2008;61(9-10):330.

Kovács Noémi, Ursprung Zsuzsanna, Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Demeter Béla, Szabó József, Sándor János, Dóczi Tamás, Büki András. :Outcome prediction in severe traumatic brain injury: does conventional CT matter? *Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience* 2008;61(9-10):334.

Molnár Tihamér, Pálincás Dániel, Pisztrai Levente, Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Büki András. Effect of different fluid resuscitation on brain tissue oxygen depth in patients with severe traumatic brain injury *Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience* 2008;61(9-10):337.

Erzsébet Ezer, Csaba Loibl, Katalin. Szenohradszki, István Hudák, Tamas Dóczi: Hemodynamic aspects of the endovascular treatment of cerebral arterio-venous malformations and their perioperative care (preliminary study) *European Journal of Anaesthesiology*, Volume 25, Supplement 44, 2008

Czeiter Endre, **Ezer Erzsébet**, Sándor János, Kovács Noémi, Geider Attila, Szabó József, Demeter Béla, Dóczi Tamás, Büki András Coagulopathy in severe head injury: a deadly combination? *Journal of Neurotrauma* 26:(8) p. A99. (2009)

E. Ezer, S. Mondello, S. Robicsek, A. Gabrielli, G. Brophy, Linda Papa, J. Tapas, C. Robertson, E. Czeiter, A. Buki, R.L.Hayes, K.K.W.Wang: Brain Tissue oxygenation and putative biomarkers in severe traumatic brain injury *Intensive Care Medicine*, Volume 36, Supplement 2, September 2010

S. Mondelo, A. Buki, R. Bullock, C.Robertson, P.Barzo, E.Czeiter, **E.Ezer**, J.Streeters, K.Schmidt, F.Tortella, K.Wang, R.Hayes: Elevated Serum Biomarkers Associated with Increased Intracranial Pressure after Severe Traumatic Brain Injury *International Conference on Intracranial Pressure and Brain Monitoring*, September 12-16, 2010, Tübingen/Germany

András Büki, Endre Czeiter, Noémi Kovács, Krisztina Amrein, **Erzsébet Ezer**, János Sándor, Tamás Dóczi: Geriatric Traumatic Brain Injury with special focus on Eastern Europe *Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience* 2013;66(3-4):130

Ezer E, Csabai L, Cseplo P., Kanizsai P., Szenohradszki K, Vamos Z: Effect of Intravenous administration of NSAIDs on platelet aggregation after herniated disc surgery *International Neurotrauma Society (INTS 2014)*, Budapest, március 19-23., 2014.*Journal of Neurotrauma*, in press

Erzsebet Ezer, Noémi Kovács, Endre Czeiter, Krisztina Amrein, Andras Büki: A fallen elderly patient with coagulopathy – a new dominant type of severe traumatic brain injury? (Analysis of the „Pécs severe head injury database”.) International Neurotrauma Society (INTS 2016), Cape Town, 1-4 February 2016. Journal of Neurotrauma,

A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel

Erzsebet Ezer^a, Diana Schrick^a, Margit Tókécs-Füzesi^b, Laszlo Szapary^c, Lajos Bogar^a and Tihamer Molnar^{a,*}

^a*Department of Anesthesiology and Intensive Care, Medical School, University of Pecs, Pecs Hungary*

^b*Department of Laboratory Medicine, University of Pecs, Medical School, Pecs, Hungary*

^c*Department of Neurology, University of Pecs, Medical School, Pecs, Hungary*

Abstract.

BACKGROUND: Elevated mean platelet volume (MPV) and immature platelet fraction (IPF) are predictive for vascular risk. Both can be associated with residual platelet reactivity. We aimed to explore associations among platelet characteristics and responder status in stroke patients on clopidogrel.

METHODS: Blood samples from 46 patients and 15 healthy subjects were analyzed for platelet count, MPV, IPF, large cell ratio (LCR) and high-fluorescent immature platelet fraction (H-IPF). As a novelty, not only whole blood, but upper and lower half blood samples after 1-hour gravity sedimentation were analyzed. Platelet aggregometry was used for the whole blood and separated samples to explore area under the curve (AUC) in patients and controls.

RESULTS: The AUC of the whole blood showed significant differences compared to the upper and lower samples separated after 1-hour sedimentation in patients and controls ($p < 0.001$ and $p = 0.005$ respectively). Remarkably, AUC measured in the upper samples in 59% of patients on clopidogrel were exceeding the therapeutic range suggesting that ascending platelets exert aggregation in the presence of ADP. This observation was associated with increased MPV and LCR in the upper samples (both $p = 0.04$). Patients on clopidogrel were characterized as responders and non-responders and the percentage of H-IPF was significantly higher among non-responders compared to controls in the upper samples ($p = 0.04$).

CONCLUSIONS: The modified platelet function test may help to stratify patients with high residual platelet reactivity.

Keywords: Immature platelet, clopidogrel, aggregometry, ischemic stroke

1. Introduction

Platelets play a pivotal role in the development of atherothrombotic events [1]. Platelet populations are heterogeneous in terms of age, size, reactivity, and susceptibility to anti-platelet therapy [2]. Immature platelets are presumed to be pro-thrombotic and hyperactive compared to mature platelets [3]. A high platelet turnover rate can produce a higher proportion of immature platelet fraction (IPF) leading to a residual platelet reactivity (RPR) in coronary artery disease (CAD) and stroke patients despite of antiplatelet drugs. An increased IPF was recently found to be associated with an attenuated response to clopidogrel [4].

By the analogy of erythrocyte sedimentation rate (ESR), leukocyte antisedimentation rate (LAR) was developed and used as a simple clinical laboratory test [5]. Indeed, LAR reflects the flotation of leukocytes in response to gravity, which is proportional to the number of activated leukocytes in the

*Corresponding author: Tihamer Molnar, Department of Anesthesiology and Intensive Care, University of Pecs, Ifjusag u 13, Pecs, 7624 Hungary, Tel.: +36 72 536 440; Fax: +36 72 536 441, E-mail: tihamermolnar@yahoo.com.

Westergren tube. Its clinical utility in early recognition of infection was proven in several conditions, such as in sepsis, major surgery and post-stroke infection [6–8]. The rheological behavior of other blood cell components such as platelets would also be of great clinical interest, therefore the modified version of LAR, called platelet antisedimentation rate (PAR) was developed in our department. In this context, we examined the motion of platelets during one hour gravity sedimentation similarly to ESR or LAR.

The aim of the present study was to explore the motion of platelets in the Westergren tube during 1-hour gravity sedimentation in patients suffering from past ischemic stroke, who had been on antiplatelet therapy and in normal controls. Besides, we also compared platelet function test in the whole blood and the separated upper and lower fraction of samples following 1-hour gravity sedimentation between healthy volunteers and patients.

2. Material and methods

2.1. Subjects

The study protocol was approved by the University of Pécs Clinical Centre Regional and Institutional Research Ethics Committee (Ref. number: 6735, Clinical Trial No: NTC03679858). Written informed consent was obtained from each patient and healthy volunteers.

A total of 46 patients (age: 66 ± 8 , male: 31) on antiplatelet therapy (75 mg clopidogrel once daily) due to secondary stroke prevention and 15 healthy subjects (age: 39 ± 13 , male: 6) not taking any medications were prospectively recruited into this study. The selected patients were on regular medical check up at the Outpatient Clinic of the Department of Neurology. Fasting venous blood samples were taken via a 21G peripheral venous cannula from each patient and healthy subject. Patients were instructed to take their daily clopidogrel at least 2 hours prior to blood sampling. Exclusion criteria were acute infection and acute vascular events, such as acute ischemic stroke, transient ischemic attack, acute myocardial infarction, acute coronary syndrome, thrombocytopenia (platelet count $<150\text{G/l}$), congenital platelet abnormalities, congenital disorder of haemostasis (eg. haemophilia), anaemia and patients on medical therapy influencing blood coagulation (eg. oral anticoagulants, novel oral anticoagulants, non-steroid antiinflammatory drugs). The comorbidities, medications and smoking status were also recorded. Besides, the baseline ESR, C-reactive protein (CRP), and whole blood count were measured.

2.2. Blood sampling

Venopuncture was performed from the cubital vein after short time strangulation of the arm with 21G BD vacutainer needle. The total blood count and the platelet antisedimentation rate (PAR, see below) were measured of 2×3 ml blood samples taken into two vacutainers with EDTA (REF: 368856, 5.4md EDTA). Also, blood for platelet aggregometry was taken into 2×3 ml hirudin containing tube for Multiplate[®] Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

2.3. Platelet antisedimentation rate (PAR)

Modified whole blood gravity sedimentation technique was developed for studying platelet sedimentation properties. After one hour gravity sedimentation the upper and lower half fraction of each venous blood column were separately removed from the EDTA sedimentation tube and transferred to another EDTA tube for further analysis. An automatic cell counter system (Sysmex XN 9000, Sysmex Co, Japan, 2017) was applied to count the upward floating (ascending) and sinking (non-ascending)

platelets in the separated samples. The platelet anti-sedimentation rate (PAR) indicates the proportion of platelets crossing the midline of a blood column in an upward direction during one hour gravity sedimentation expressed in percentage and calculated with the following equation:

$$\text{PAR}(\%) = \frac{\text{upper platelet count} - \text{lower platelet count}}{\text{upper platelet count} + \text{lower platelet count}} \times 100$$

2.4. Impedance platelet aggregometry

Platelet function test from the whole blood was performed from a hirudin containing tube with a Multiplate[®] Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Another hirudin containing tube was used for sedimentation, similarly to whole blood sedimentation in the EDTA-tube. After one hour gravity sedimentation, the blood column was divided into upper and lower samples (Fig. 1). Platelet aggregometry was universally performed 60 minutes after blood sampling using adenosine diphosphate (ADP; 6.5 μM) as agonist. Aggregometry was simultaneously performed from the whole blood, as well as from the upper and the lower blood samples. Aggregation level was expressed as the area under the curve (AUC) (9, 10). AUC was calculated by a Multiplate[®] Analyzer using the product of aggregation unit (AU) x time (minutes) [12]. After ADP stimulation, the normal aggregation range was expected as AUC: 53–122 according to the manufacturer [9, 10]. Based on the whole blood AUC, patients on clopidogrel were categorized as responders with AUC <53 and non-responders with AUC \geq 53.

2.5. Total blood cell count and IPF measurements

The total blood cell count was measured on Sysmex XN 9000 integrated automated hematology analyzer (Sysmex Co, Japan, 2017) at the Department of Laboratory Medicine. The platelet number by fluorescent measurement (PLT-F) and the immature platelet fraction (IPF) were measured using the fluorescent platelet channel of the analyzer. In this channel, platelets are specifically stained intracel-

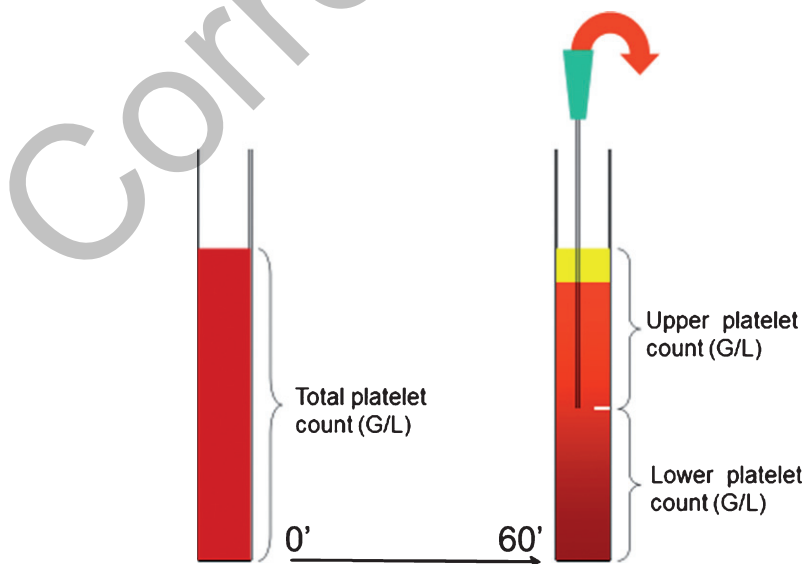


Fig. 1. Schematic drawing of platelet antisedimentation measurement.

lularly with fluorescent dye and measured on the principle of flow cytometry, analyzing the forward scattered light (FSC), side scattered light (SSC) and side fluorescent light (SFL). The platelets are counted and additionally, the plots in the area with high fluorescence intensities are separated as the immature platelet fraction. The mean platelet volume (MPV), platelet large cell ratio (P-LCR), high fluorescent immature platelet fraction (H-IPF) and absolute PLT-F count were recorded.

2.6. Statistical analysis

Data were evaluated using SPSS software package (Version 19.0, SPSS Inc, Chicago, USA). Categorical data were summarized by means of absolute and relative frequencies (counts and percentages). Quantitative data were presented as median and 25th–75th percentiles, as well as mean \pm SD. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to check for normality. Chi-square test for categorical data and Student-t test for continuous data were used for analysis of demographic and clinical factors. Non-parametric Mann-Whitney U test was used for not normally distributed parameters. Correlation analysis was performed calculating Spearman's correlation coefficient (r). A p -value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

A total of 46 patients (age: 66 ± 8 , male: 31) on antiplatelet therapy (75 mg clopidogrel daily) due to secondary stroke prevention and 15 healthy subjects (age: 40 ± 13 , male: 6) were prospectively examined. Demography of patients and healthy controls and baseline laboratory data are summarized in (Table 1). The ESR was significantly higher in the patient group compared to healthy individuals ($p < 0.001$). Neither in total platelet count, nor in MPV were observed significant differences, however the control group was significantly younger ($p < 0.001$) (Table 1).

Table 1
Demography and baseline laboratory data

	Control Group ($n = 15$)	Clopidogrel Group ($n = 46$)	p -value
Age	40 ± 13	66 ± 8	<0.001
Gender (M/F)	6/9	31/15	0.06
BMI	25 ± 3	27 ± 4	0.119
Smoking (%)	2 (13)	9 (19)	0.586
CRP (mg/l)	NA	1.75 (0.7–3.5)	NA
ESR (mm/hour)	2 (1–4)	10 (6–18)	<0.001
Hematocrit (%)	42.8 ± 0.9	43.6 ± 0.7	0.416
Leukocyte (G/l)	6.3 ± 1.2	8.3 ± 1.7	0.251
PLT (G/l)	282 ± 75	239 ± 65	0.098
MPV (fl)	10.2 ± 1.6	10.7 ± 0.9	0.528

M, male; F, female; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume. Data are presented as absolute value (percentage), mean \pm SD or median (25th–75th percentiles), independent sample test and Mann-Whitney U test were used.

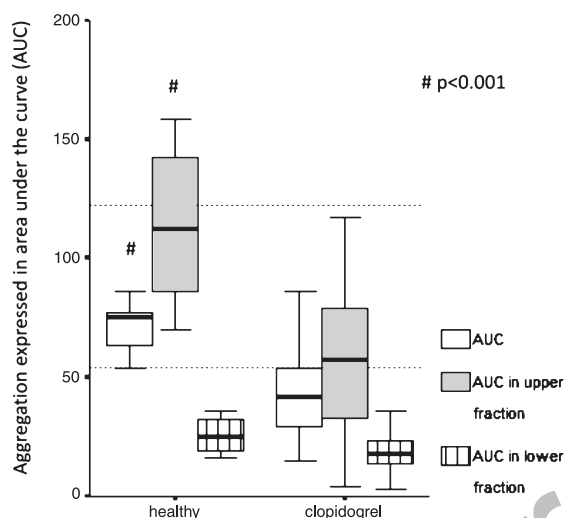


Fig. 2. Platelet function test in healthy subjects and patients taking clopidogrel. Comparison of aggregation expressed as area under the curve (AUC) measured in the whole blood and upper/lower fractions separated after 1 hour gravity sedimentation by Multiplate aggregometry in healthy vs. post-stroke patients taking 75 mg clopidogrel. The two horizontal dotted lines indicate the normal range of AUC as a response to ADP stimulation. Healthy intragroup differences: AUC vs. AUC in upper vs. AUC in lower fraction, $p=0.005$ respectively. Clopidogrel intragroup differences: AUC vs. AUC in upper vs. AUC in lower fraction, $p<0.001$ respectively. Data are shown as median and 25th–75th percentiles (# indicate intergroup differences $p<0.001$ respectively).

3.1. Platelet aggregometry

The AUC of the whole blood, measured by Multiplate aggregometry, showed significant differences compared to the upper and the lower samples AUCs after 1 hour gravity sedimentation (whole blood vs upper: 41.5, 29.0–54.0 vs 57.5, 33.0–79.0; whole blood vs lower: 41.5, 29.0–54.0 vs 18.0, 14.0–23.0, $p<0.001$ respectively) (Fig. 2). Remarkably, AUC measured in the upper samples in 59% of patients on clopidogrel ($n=27$) were exceeding the effective therapeutic range (AUC: 0–53), therefore suggesting that ascending platelets exert aggregation in the presence of ADP. The coincidence of AUC > 53 measured in the upper samples ($n=11$) and the non-responder status ($n=12$) was significant ($p=0.001$).

Similarly, the AUC of the whole blood showed significant differences compared to both AUCs measured by Multiplate aggregometry in the upper and lower samples separated after 1 hour gravity sedimentation (whole blood: 73.5, 59.5–78.5 vs upper: 112.5, 73.0–137; whole blood: 73.5, 59.5–78.5 vs lower: 23.0, 16.0–35.0, $p=0.005$ respectively) (Fig. 2).

Not surprisingly, the whole blood AUC and the AUC measured in the upper samples were significantly higher in normal controls without any medication influencing platelet function compared to patients on clopidogrel therapy ($p<0.001$ respectively) (Table 2). Remarkably, AUC measured in the upper samples in 40% of healthy controls ($n=6$) were exceeding the top of the normal range (AUC: 53–122) suggesting that ascending platelets show *ex vivo* hyperaggregability in the presence of ADP (Fig. 2). Although, AUC measured in the lower samples showed no significant difference (healthy vs patients: 23.0, 16.0–35.0 vs 18.0, 14.0–23.0), these values were in the effective antiplatelet therapeutic range (AUC: 0–53) even in the healthy group suggesting that sedimentated platelets can not be activated by ADP *ex vivo* (Fig. 2).

Table 2
Platelet and aggregability data of post-stroke patients and healthy controls

	Control group (n = 15)	Clopidogrel group (n = 46)	p-value
PLT count upper (G/L)	316 (218–478)	345 (301–428)	0.68
PLT count lower (G/L)	88 (51–124)	71 (54–86)	0.43
PAR (%)	58.5 (45.0–67.5)	67.7 (61.7–72.9)	0.15
MPV (fl) upper	10.7 (10.0–10.8)	10.8 (10.2–11.6)	0.30
MPV (fl) lower	10.0 (9.8–10.6)	10.5 (9.8–11.2)	0.47
PLCR upper (%)	28.9 (24.5–30.6)	33.0 (26.8–38.9)	0.14
PLCR lower (%)	25.5 (22.7–28.7)	30.5 (24.2–36.2)	0.14
AUC	73.5 (59.5–78.5)	41.5 (29.0–54.0)	<0.001
AUC upper	112.5 (73.0–137)	57.5 (33.0–79.0)	0.003
AUC lower	23.0 (16.0–35.0)	18.0 (14.0–23.0)	0.26

PLT count upper, platelet count in the upper sample; PLT count lower, platelet count in the lower sample; PAR, platelet antisedimentation rate; AUC, area under the curve; MPV, mean platelet volume; PLCR, platelet large cell ratio. Data are presented as mean \pm SD as well as median (25th–75th percentiles), Mann-Whitney *U* test was used.

Table 3
Platelet and aggregability data of healthy controls and post-stroke patients grouped on their responder status

	Control group (n = 15)	Responder (n = 34)	Non-responder (n = 12)	p-value
PLT count upper (G/L)	316 (218–478)	343 (284–408)	372 (302–478)	0.39
PLT count lower (G/L)	88 (51–124)	73 (53–86)	65 (54–90)	0.95
PAR (%)	58.5 (45.0–67.5)	67.1 (57.6–71.0)	71.8 (62.6–74.3)	0.16
MPV (fl) upper	10.7 (10.0–10.8)	10.05 (9.7–10.8)	10.32 (10.1–10.8)	0.83
MPV (fl) lower	10.0 (9.8–10.6)	10.45 (9.75–11.22)	10.40 (9.8–11.1)	0.95
PLCR upper (%)	28.9 (24.5–30.6)	32.65 (25.02–37.92)	36.95 (27.4–38.9)	0.37
PLCR lower (%)	25.5 (22.7–28.7)	30.2 (23.5–37.7)	32.25 (26.5–36.8)	0.51
H-IPF upper (%)	0.9 (0.8–1.35)	1.2 (0.8–1.4)	1.7 (1.15–2.0)	0.04*
H-IPF lower (%)	0.8 (0.8–1.0)	0.7 (0.6–1.2)	0.9 (0.7–1.5)	0.54
AUC	73.5 (59.5–78.5)	36.5 (27.0–42.2)	66.0 (59–74.5)	<0.001
AUC upper	112.5 (73.0–137)	49 (23.0–63.0)	93 (65.5–107.5)	<0.001
AUC lower	23.0 (16.0–35.0)	17 (13.0–21.0)	21.5 (17.0–30.5)	0.03

3.2. Characteristics of platelet separation

Mean platelet volume (MPV) was determined and compared in the whole blood and the upper and lower samples in each group. MPV showed no significant differences neither in patients vs healthy intergroup comparison nor in intragroup comparisons (whole blood vs upper, whole blood vs lower, upper vs lower samples). However, MPV in the upper fraction correlated positively with AUC measured in the upper samples of patients on clopidogrel ($r = 0.311$, $p = 0.04$) (Fig. 3A). Similarly, platelet large cell ratio (PLCR) measured in the upper fraction correlated positively with AUC measured in the upper samples of patients on clopidogrel ($r = 0.373$, $p = 0.04$) (Fig. 3B). We also compared the percentage of high fluorescent immature platelet fraction (H-IPF) measured in the upper and lower samples

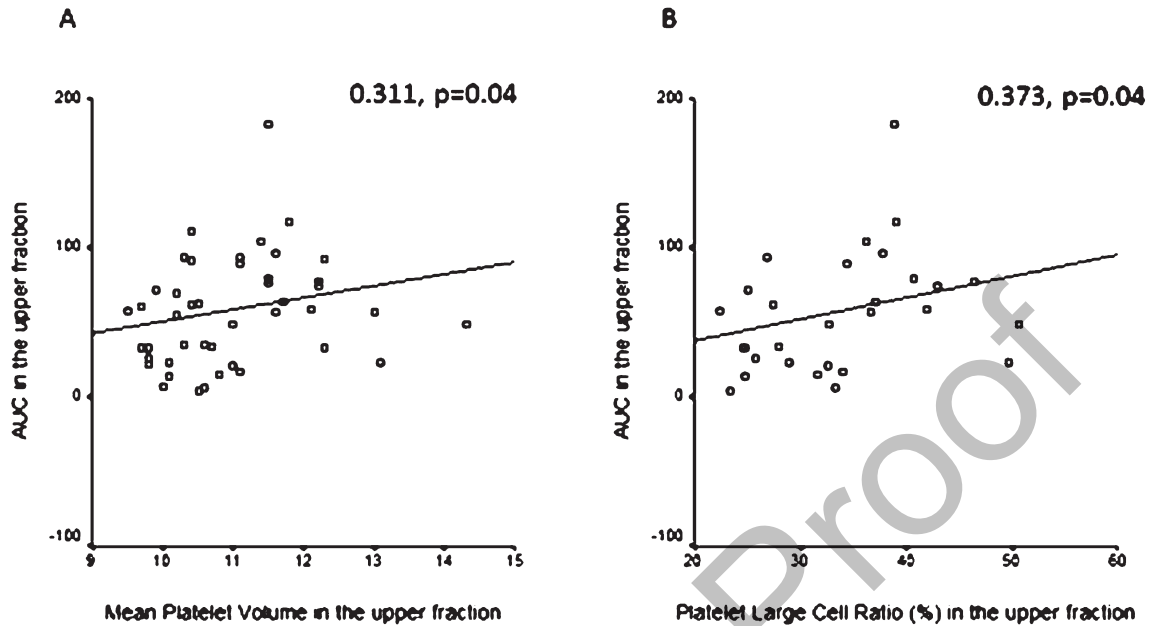


Fig. 3. A Correlation between mean platelet volume (MPV) and aggregation expressed as area under the curve (AUC) measured in the upper samples. Positive correlation in the upper samples between mean platelet volume (MPV) and area under the curve (AUC) determined by Multiplate aggregometry in patients on antiplatelet therapy. Spearman correlation. B Correlation between platelet large cell ratio (PLCR) and aggregation expressed as area under the curve (AUC) measured in the upper samples. Positive correlation in the upper samples between platelet large cell ratio (PLCR) and area under the curve (AUC) determined by Multiplate aggregometry in patients on antiplatelet therapy. Spearman correlation.

separated after 1 hour gravity sedimentation respectively in healthy subjects vs subgrouped patients on clopidogrel selected as responders ($n = 34$) vs non-responders ($n = 12$) by Multiplate aggregometry. The percentage of H-IPF was significantly higher in the non-responder patient subgroup compared to healthy subjects in the upper samples (1.7, 1.15–2.0 vs 0.9, 0.8–1.35, $p = 0.04$). While the difference between non-responders and responders was not significant, the trend was similar (Fig. 4). The upper vs. lower sample comparison of H-IPF (%) was also done in each group and it showed significantly higher H-IPF (%) in the upper samples in all groups (healthy: 0.9, 0.8–1.35 vs 0.8, 0.8–1.0, $p = 0.04$; responders: 1.2, 0.8–1.4 vs 0.7, 0.6–1.2, $p < 0.001$; non-responders: 1.7, 1.15–2.0 – 0.9, 0.7–1.55, $p = 0.02$) (Fig. 4).

3.3. Platelet antisedimentation rate

PAR showed no significant difference between the normal control and the patient groups, although a higher PAR was observed as a trend in patients (Table 2). Similarly, PAR showed a tendency to be higher in non-responders compared to responders (71.9, 63.6–74.3 vs. 67.2, 60.3–71.0, $p = 0.20$), which was statistically insignificant. PAR was correlated positively with total platelet MPV in patients ($r = 0.300$, $p = 0.04$) and in responders (0.364, $p = 0.04$), but this correlation disappeared in non-responders.

3.4. ESR and C-reactive protein

In patients on clopidogrel the ESR correlated positively with the total platelet count and the platelet count in the upper sample ($r = 0.381$, $p = 0.009$ and 0.390 , $p = 0.008$ respectively). These correlations

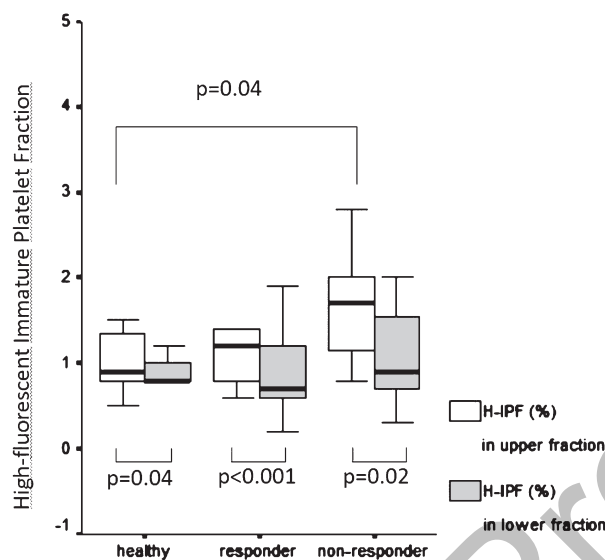


Fig. 4. High fluorescent immature platelet fraction measured in the upper and lower samples in healthy subjects compared to responder and non-responder patients. Comparison of high fluorescent immature platelet fraction (%) measured in the upper and lower fraction separated after 1 hour gravity sedimentation respectively in healthy subjects vs patients selected as clopidogrel responders and non-responders respectively by Multiplate aggregometry. Data are presented as median and 25th–75th percentiles, Mann-Whitney U test.

remained in the responder and non-responder subgroups as well. The serum concentration of CRP also correlated positively with the platelet count in the upper sample and the ESR ($r = 0.482$, $p = 0.001$ and 0.298 , $p = 0.04$ respectively) in patients on antiplatelet therapy. Although the positive correlation between the CRP and the platelet count in the upper sample remained in the responder group, these correlations disappeared in the non-responder subgroup. Furthermore, the serum concentration of CRP also showed a significant positive correlation with the upper sample H-IPF (%) (0.860 , $p = 0.006$) in the non-responder subgroup.

3.5. Independent prediction of non-responder status

Based on binary logistic regression, including age, PAR, H-IPF, LCR, MPV, AUC in the upper sample, ESR and CRP as confounders, only AUC measured in the upper samples was found to be an independent predictor of high residual platelet reactivity (OR: 1.06, 95%CI: 1.007–1.120, $p = 0.027$). ROC analysis showed that AUC in the upper sample ≥ 62 indicated the non-responder status with a sensitivity of 84% and specificity of 71% (Area: 0.863, 95% CI: 0.728–0.998, $p < 0.001$) (Fig. 5).

4. Discussion

By the analogy of leukocyte antisedimentation rate (LAR), as a novelty we described the movement of platelets in patients on clopidogrel therapy and normal controls during one hour gravity sedimentation. PAR, reflecting the percentage of platelets crossing the midline of the blood column upwards during one hour gravity sedimentation, was the highest in non-responders compared to responders and normal

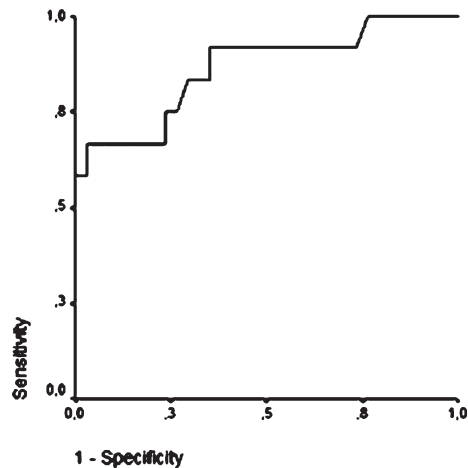


Fig. 5. Receiver operating characteristic curve of AUC measured in the upper sample to confirm the non-responder status in post-stroke patients on clopidogrel. ROC analysis shows that AUC in the upper sample ≥ 62 indicates the non-responder status with a sensitivity of 84% and specificity of 71% (Area: 0.863, 95% CI: 0.728–0.998, $p < 0.001$).

controls respectively, but the differences were not statistically significant. This observation needs to be validated using a bigger sample size.

Next we explored factors influencing PAR value. The positive correlation between PAR and MPV suggests the role of size and, likely, the age of platelets as separating factors during gravity sedimentation. In addition, the positive correlation between the serum concentration of CRP and the platelet count in the upper sample indicates the role of inflammatory processes as a determinant of the ascending motion of platelets. Not only experimental but also growing clinical evidence support an association between CRP and activation of platelets [11]. In the non-responder subgroup, the serum concentration of CRP also showed a significant positive correlation with the percentage of H-IPF in the upper sample suggesting that more intense vascular or systemic inflammatory response may be associated to increased production of immature platelets [12–14]. This is in accordance with our observation that the highest H-IPF percentage was observed in the upper samples of non-responders [3, 4]. Moreover, following the separation of the upper sample after 1-hour gravity sedimentation, the Multiplate aggregometry revealed platelet hyperreactivity in 59% of patients on clopidogrel. Concluding these findings, we assume that chronic inflammatory state in association with increased number of immature and overactivated platelets might be responsible for *ex vivo* attenuated responseiveness of platelets. Historically, other platelet separation methods also showed differences in platelet aggregation suggesting that large platelets may be functionally more important than smaller platelets [15]. The high incidence of AUC > 53 in the upper samples among non-responders may help to stratify patients with high residual platelet reactivity.

The *ex vivo* hyperaggregability in the presence of ADP based on AUC measured in the upper samples in 40% of healthy controls and the overall lack of aggregability in the lower samples suggest significant differences in certain characteristics of normal platelets. Notably, ascending (probably younger) platelets show hyperreactivity, while sinking (probably older) platelets can not be activated by ADP *ex vivo*. However, the exact mechanism, driving the platelets opposite direction during 1-hour gravity sedimentation, is not clear. Further studies should be addressed to explore whether platelets *per se* or non-platelet sources are responsible for this phenomenon. Therefore, as a future perspective, the role of thrombo-inflammatory molecules related to platelet-leukocyte interaction and microparticles should be extensively studied [16, 17].

Importantly, the mechanism of 'on treatment' residual platelet reactivity can be very complex as platelets are not only regulators of inflammation contributing to vascular damage in acute or chronic inflammation such as atherosclerosis, but also play an important role in the resolution of inflammation, vascular protection and repair [18]. Ultimately, the aim of this study was to stratify patients with residual platelet reactivity despite clopidogrel therapy by using a combination of PAR and Multiplate aggregometry, which was modified by a prior platelet separation method. This approach might be used to select patients with an increased risk for vascular complications, thus an individually tailored antiplatelet therapy (including appropriate dosage) can be initiated to achieve a more effective prevention.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

The authors thank for valuable comments of Professor Miklós Tekeres. This clinical study was supported by EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 at the University of Pecs.

References

- [1] Olie RH, van der Meijden PEJ, Ten Cate H. The coagulation system in atherothrombosis: Implications for new therapeutic strategies. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(2):188-98.
- [2] Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013;201(6):785-96.
- [3] Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schüpke S, Haller B, Schulz C. et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J.* 2015;36(45):3202-10.
- [4] Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, Guthikonda S, Kleiman NS. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;33(2):137-42.
- [5] Bogar L, Tarsoly P, Jakso P. Characteristics of light and heavy polymorphonuclear leukocytes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2002;27(2):149-53.
- [6] Bogar L, Molnar Z, Kenyeres P, Tarsoly P. Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. *J Clin Pathol.* 2006;59(5):523-5.
- [7] Bogar L, Tarsoly P. Leukocyte sedimentation and inflammatory complications after thoraco-abdominal operations [abstract]. *Biorheol.* 1999;36:91-2.
- [8] Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, L Szapary L, Komoly S, et al. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome. *J Clin Pathol.* 2008;61(11):1209-13.
- [9] Bonello L, Tantry U.S, R. Marcucci, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-33.
- [10] Kim J, Cho CH, Jung BK, Nam J, Seo HS, Shin S, Lim CS. Comparative evaluation of Plateletworks, Multiplate analyzer and Platelet function analyzer-200 in cardiology patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(3):257-65.
- [11] Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, Kurokawa T, Kohno K, Akashi Y, et al. Platelet×CRP Multiplier Value as an Indicator of Poor Prognosis in Patients With Resectable Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2017;46(1):35-41.
- [12] Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost.* 2015;114(3):449-58.
- [13] Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon J.M, Cognasse F. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions-new clues for immunopathology? *Crit Care.* 2013;17(4):236.
- [14] Liverani E, Kilpatrick L.E, Tsygankov A.Y, Kunapuli SP. The Role of P2Y12 Receptor and Activated Platelets During Inflammation. *Curr Drug Targets.* 2014;15(7):720-8.

- [15] Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, Rushin CA, Valeri CR. Size dependent platelet subpopulations: Relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol.* 1982;50(3):509-19.
- [16] Becatti M, Fiorillo C, Gori AM, Marcucci R, Paniccia R, Giusti B. et al. Platelet and leukocyte ROS production and lipoperoxidation are associated with high platelet reactivity in Non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients on dual antiplatelet treatment. *Atherosclerosis.* 2013;231(2):392-400.
- [17] Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: Generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood.* 2017;130(20):2171-9.
- [18] Reinhart WH. Platelets in vascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53(1-2):71-9.

Corrected Proof

Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke

Peter Csecsei,* Gabriella Pusch, PhD,* Erzsebet Ezer,† Timea Berki, PhD, DSc,‡
Laszlo Szapary, PhD,* Zsolt Illes, PhD, DSc,§|| and Tihamer Molnar, PhD†

Background: In patients with acute ischemic stroke (AIS) without cardiovascular complications, we investigated the association of serum concentration of cardiac troponin (high-sensitivity cardiac troponin T [hs-cTnT]) with thrombo-inflammatory markers. *Methods:* Thirty-five patients with first-ever AIS were prospectively examined. Serum hs-cTnT was measured 6 and 24 hours after stroke, whereas S100B, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), soluble CD40 ligand, tissue plasminogen activator (tPA), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and P-selectin were measured 6 and 72 hours after stroke. Severity of stroke was assessed by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) on admission, 24 hours later, and at discharge. *Results:* Concentration of MCP-1 at 6 hours was higher in the serum of patients with worsened NIHSS by 24 hours ($P = .009$). Concentration of hs-cTnT at both 6 and 24 hours was higher, if NIHSS worsened by discharge ($P = .026$ and $P = .001$). A cutoff value for hs-cTnT measured at T24 greater than or equal to 9.4 predicted worsened NIHSS on discharge with a sensitivity of 81% and a specificity of 74% (area: .808, $P = .002$). Concentration of hs-cTnT at both 6 and 24 hours was also higher in nonsurvivors compared with survivors ($P = .03$, respectively), and correlated with (1) tPA levels at 6 hours ($P = .001$ and $P = .002$, respectively); (2) MCP-1 concentration at 6 hours ($P = .01$ and $P = .015$, respectively); and increased hsCRP levels at 72 hours ($P = .01$, respectively). Concentration of hs-cTnT at 24 hours was an independent predictor of worsened NIHSS at discharge (odds ratio: 1.58, 95% confidence interval: 1.063-2.370, $P = .024$). *Conclusions:* Elevated concentration of hs-cTnT measured 24 hours after AIS is an independent predictor of progressing neurologic deficit in patients without apparent myocardial damage, and also correlates with acute elevation of tPA and MCP-1. **Key Words:** Acute ischemic stroke—outcome—monocyte chemoattractant protein-1—high-sensitivity troponin t—S100B.

© 2018 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

From the *Department of Neurology; †Department of Anesthesiology and Intensive Care; ‡Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary; §Department of Neurology, Odense University Hospital, Odense, Denmark; and ||Institute of Clinical Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark.

Received August 16, 2017; revision received October 11, 2017; accepted October 31, 2017.

Grant support: This study was supported by a grant from the University of Pecs AOK-KA- 34039/10-17 to T. Molnar.

Address correspondence to Tihamer Molnar, MD, PhD, Department of Anesthesiology and Intensive Care, University of Pecs, Faculty of Medicine, Ifjusag u 13, Pecs, Pecs 7624, Hungary. E-mail: tihamermolnar@yahoo.com.

1052-3057/\$ - see front matter

© 2018 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.040>

Introduction

Cerebrovascular and cardiovascular diseases are major causes of death and disability worldwide. Elevated levels of cardiac troponin (cTn) in the serum reflect myocardial damage and also predict poor prognosis in acute ischemic stroke (AIS).¹ Ischemic stroke is a frequent complication in cardiac diseases, and cardiac complications commonly cause early clinical worsening and death after stroke.² In addition, acute myocardial infarction is a common complication of AIS.

Increased cTn concentrations in the serum in patients with acute coronary syndrome (ACS) indicate ongoing myocardial necrosis. Beyond ACS, it implies an increased risk for adverse outcome in patients with various cardiovascular conditions such as heart failure, stroke, myocarditis, Takotsubo cardiomyopathy, aortic dissection, arrhythmias, valvular diseases.³ The prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) in a low-risk outpatient population also provided excellent risk stratification on all-cause mortality, acute myocardial infarction, and stroke.⁴

However, the reason of cTn elevation in stroke patients without apparent cardiovascular damage is not yet explored. Recently, the association between poststroke mortality and abnormal results of cardiac troponin/echocardiogram was evaluated in a large number of patients with AIS, who presented to an emergency department: elevated troponin concentration was associated with increased mortality at 1 and 3 years even in the absence of concomitant myocardial infarction.⁵

Several blood biomarkers have been proposed to be associated with AIS. S100B in the peripheral blood is a sensitive marker of both blood-brain barrier dysfunction and ischemic brain damage and predictor of stroke outcome.^{6,7} Increased high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in the subacute stage is an independent predictor of death.⁸ Thrombo-inflammatory molecules (tissue plasminogen activator [tPA], soluble CD40 ligand [sCD40L], P-selectin, interleukin-6, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]) connect the prothrombotic state, endothelial dysfunction, and systemic/local inflammation in acute vascular events such as myocardial infarction or ischemic stroke.^{9,10} Besides other factors, MCP-1 plays a crucial role in atherogenesis.¹¹ On the other hand, shear stress-induced overexpression of MCP-1 contributes significantly to the development of protective collaterals in the heart, but little is known about its role in the cerebral vasculature.¹²

The aim of this study was to explore the associations among hs-cTnT, S100B, hsCRP and thrombo-inflammatory markers such as MCP-1, tPA, sCD40L, and P-selectin.

Materials and Methods

The study protocol was approved by the Local Ethics Committee at University of Pecs, Faculty of

Medicine, and informed consent was obtained from each patient.

Subjects

Thirty-five patients were enrolled within 6 hours after onset of first-ever AIS at the Department of Neurology, University of Pecs. Initial assessment of each patient, including cardiac anamnesis, 12-lead electrocardiogram recording, and physical examination, was performed to enroll only patients without acute cardiovascular event into this prospective study. Severity of stroke was measured by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) on admission and on a daily basis until discharge or death.¹³

Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion criteria were (1) first-ever ischemic stroke; (2) onset of AIS within 6 hours; (3) duration of neurologic symptoms over 24 hours; (3) computed tomography or magnetic resonance result showed infarction in the brain area corresponding to the clinical symptoms and signs. The enrolled patients were conservatively treated; therefore, we were exclusively assaying the circulating levels of endogenous tPA after stroke. Exclusion criteria were (1) hemorrhagic stroke; (2) patients with ACS, myocardial infarction, stable angina, or the presence of clinical symptoms indicating acute infections, and other chronic infectious diseases; (3) patients with immune disorders, liver or kidney dysfunction, myopathy, and tissue injury outside of the brain; (4) recent use of both prescribed and over-the-counter anti-inflammatory drugs.

Biomarkers

Venous blood samples were taken for the measurement of hs-cTnT within 6 hours after onset of first neurologic symptoms and 24 hours later. P-selectin, MCP-1, sCD40L, and tPA, hsCRP, and S100B were measured within 6 hours after onset and at 72 poststroke hours. Blood samples were centrifuged at $3000 \times g$ for 10 minutes. Supernatants were frozen and stored at -80°C until analysis. hs-cTnT concentrations were measured by a fully automated solid phase electrochemiluminescence immunoassay (Roche), (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) using a Cobas e 411 analyzer (Roche). Serum levels of S100B were examined by automated electrochemiluminescent immunoassay (Liaison Sangtec 100 system, DiaSorin, Bromma, Sweden). Serum levels of hsCRP were examined by automated fluorescence immunoassay (BRAHMS Kryptor, Berlin, Germany). Concentration of P-selectin, MCP-1, sCD40L, and tPA were examined by immunoassay (BMS711F, Bender GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria).

Statistical Analysis

Data were evaluated using SPSS software package (Version 19.0, IBM Corp., Armonk, NY). Categorical data were summarized by means of absolute and relative frequencies (counts and percentages). Quantitative data were presented as mean and 95% confidence interval, as well as mean ± SD. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to check for normality. Chi-square test for categorical data and Student *t* test for continuous data were used for analysis of demographic and clinical factors. Nonparametric Mann-Whitney *U* test was used for non-normally distributed markers. Binary logistic regression analysis was applied to confirm independent predictors. Correlation analysis was performed calculating Spearman correlation coefficient (*r*). A *P* value <.05 was considered statistically significant.

Results

The mean age for patients was 66.8 ± 11.7 years (ranging from 40 to 90). Demographic and clinical data are summarized in Table 1. There were significantly more patients with diabetes (male: 6 of 16 versus female: 2 of 19, *P* = .04) and smokers (male: 8 of 16 versus female: 0 of 19, *P* = .003) among male subjects.

Progression of Neurologic Deficit

The concentration of MCP-1 within 6 hours after stroke was increased in the serum of patients with worsened

NIHSS by 24 hours compared with patients with stable or improving NIHSS (*P* = .009). The concentration of hs-cTnT was elevated at both within 6 hours and 24 hours after stroke onset in the serum of patients with worsened NIHSS at discharge from hospital (*P* = .026 and *P* = .001, respectively). A cutoff value 9.4 ng/L or greater for hs-cTnT measured 24 hours after AIS predicted worsened NIHSS at hospital discharge with a sensitivity of 81% and a specificity of 74% using a receiver operating characteristic curve analysis (area: .808, *P* = .002) Table 2.

Biomarkers and Outcome

Higher concentration of hs-cTnT within 6 hours and 24 hours after AIS was found in the serum of nonsurvivors (*n* = 7) compared with survivors (6 hours: median: 17.4, 25th-75th percentiles: 15.6-25.5 versus 7.8, 5.1-17.2; after 24 hours: 19.2, 16.3-26.2 versus 7.1, 6.4-20.5, *P* = .03, respectively). However, nonsurvivors were significantly older (80 ± 8 versus 67 ± 11 years, *P* < .001), and we found a significantly positive correlation between age and hs-cTnT measured at both 6 and 24 hours after AIS (*r* = .492, *P* = .003 and *r* = .538, *P* = .001, respectively).

S100B concentration within 6 hours after AIS was also significantly higher in patients (*n* = 7) who died compared to survivors (median: 1.17, 25th-75th percentiles: .17-2.24 versus .13, .09-0.29, *P* = .009). Serum concentration of hsCRP (mg/L) 72 hours after AIS was also higher among nonsurvivors (median: 114.1, 25th-75th percentiles: 40.8-204 versus 4.0, 2.7-14.2, *P* = .001).

Table 1. Demography and clinical characteristics of patients with improved and worsened NIHSS by poststroke 24 hours

	All patients	NIHSS improved	NIHSS worsened	<i>P</i>
N	35	13	22	
Age (y)	67 ± 11	61 ± 10	70 ± 11	.02
Male, %	16 (46)	7 (54)	9 (41)	NS
BMI	27.3 ± 4.4	26.8 ± 4.6	27.7 ± 3.0	NS
Smoking, %	8 (23)	3 (23)	5 (23)	NS
Hypertension, %	29 (83)	10 (77)	19 (86)	NS
Diabetes mellitus, %	8 (23)	4 (31)	4 (18)	NS
Dyslipidemia, %	10 (29)	4 (31)	6 (27)	NS
Cardioembolic, %	12 (34)	2 (15)	10 (45)	NS
Atherothrombotic, %	21 (60)	9 (69)	12 (55)	NS
Lacunar, %	2 (6)	1 (8)	1 (5)	NS
NIHSS on admission	12 ± 6	9 ± 6	14 ± 6	.04
NIHSS day 2	12 ± 6	7 ± 5	15 ± 6	.05
NIHSS on discharge	9.5 ± 6	3.5 ± 1	11 ± 6	.04
Death, %	7 (20)	0 (0)	7 (32)	.02
Sampling time, min	310 ± 24	300 ± 35	320 ± 15	NS

Abbreviations: BMI, body mass index; N, number of cases; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; NS, not significant. Sampling time is time in minutes between stroke onset and the first sample draw. Data are presented as mean ± SD or number (percentage).

Table 2. Median serum concentration of biomarkers in patients with improved and worsened NIHSS by poststroke 24 hours and hospital discharge

	NIHSS ₂₄ improved n = 13	NIHSS ₂₄ worsened n = 22	P	NIHSS _{discharge} improved n = 19	NIHSS _{discharge} worsened n = 16	P
Within 6 h after onset of stroke						
hs-cTnT	5.9	16.6	.001	7.4	16.6	.023
S100B	.09	.20	.001	.10	.30	.005
hsCRP	3.9	5.3	NS	4.1	5.9	NS
MCP-1	9146	18927	<.001	10220	13755	NS
tPA	22918	41315	.005	26711	31827	NS
sCD40L	41008	353008	.03	109986	250015	NS
P-selectin	1129	911	NS	911	984	NS
At poststroke 72 h						
hs-cTnT*	6.4	17.7	.001	6.5	18.2	.002
S100B	.07	1.01	.001	.10	.31	NS
hsCRP	3.1	19.2	.003	3.4	38.3	.001
MCP-1	13083	15640	NS	13940	15984	NS
tPA	23441	42915	NS	34954	28836	NS
sCD40L	63873	336485	.05	114396	45196	NS
P-selectin	1062	944	NS	887	1091	NS

Abbreviations: hsCRP (mg/L), high-sensitivity C-reactive protein; hs-cTnT (ng/mL), high-sensitivity cardiac troponin T; MCP-1 (pg/mL), monocyte chemoattractant protein-1; N, number of cases; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; sCD40L (pg/mL), soluble CD40 ligand; tPA (pg/mL), tissue plasminogen activator.

Data are presented as median.

P-selectin (ng/mL); S100B (ng/mL).

*hs-cTnT was measured at 24 h.

Association between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammation

Higher serum concentration of hs-cTnT within 6 hours and 24 hours after AIS was associated with higher concentration of hsCRP measured 72 hours after AIS ($r = .592$ and $.596$, both $P = .001$, respectively); higher concentration of tPA within 6 hours of AIS ($r = .550$ and $.534$, $P = .001$ and $P = .002$, respectively); and higher concentration of MCP-1 within 6 hours of AIS ($r = .465$ and $.442$, $P = .01$ and $P = .015$, respectively). We found no correlation between hs-cTnT and S100B levels, but serum concentration of MCP-1 measured within 6 hours after onset of stroke positively correlated with S100B measured both within 6 hours and 72 hours after AIS ($r = .379$ and $.456$, $P = .04$ and $.019$, respectively) [Table 3](#).

Based on binary logistic regression analysis including age, gender, and biomarkers, only hs-cTnT measured 24 hours after AIS was an independent predictor of NIHSS worsening at hospital discharge (odds ratio: 1.58, 95% confidence interval: 1.063-2.370, $P = .024$), but not of death.

Discussion

The ultimate goal of this study was to explore associations among serum levels of cardiac troponin T, the brain damage marker S100B, the acute phase protein hsCRP, and thrombo-inflammatory markers such as tPA, sCD40L,

Table 3. Correlations between cardiac troponin T and S100B with thrombo-inflammatory markers

	hs-cTnT	P	S100B	P
On admission				
hs-cTnT	NA	NA	.307	NS
S100B	.307	NS	NA	NA
hsCRP	.345	NS	.111	NS
MCP-1	.464	.009	.379	.042
tPA	.550	.001	.298	NS
sCD40L	.280	NS	.121	NS
P-selectin	-.314	NS	.074	NS
At 72 h				
hs-cTnT*	NA	NA	.069	NS
S100B	.069	NS	NA	NA
hsCRP	.596	.001	.547	.007
MCP-1	.303	NS	.133	NS
tPA	.439	.013	.354	NS
sCD40L	.183	NS	.205	NS
P-selectin	-.194	NS	.057	NS

Abbreviations: hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; hs-cTnT, high-sensitivity cardiac troponin T; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NA, not applicable; NS, not significant. sCD40L, soluble CD40 ligand; tPA, tissue plasminogen activator.

Spearman correlation; data are presented as correlation coefficient (r) and P value.

*hs-cTnT was measured at 24 hours.

P-selectin, and MCP-1 in patients with first-ever AIS without acute cardiac events.

We found that higher concentration of hs-cTnT in the hyperacute (within 6 hours) and subacute stage (after 24 hours) of ischemic stroke was associated with elevated levels of thrombo-inflammatory molecules such as tPA, MCP-1, and hsCRP in patients with first-ever AIS. Although hs-cTnT and MCP-1 concentration in the hyperacute stage also predicted NIHSS worsening by 24 hours, only the elevated concentration of hs-cTnT at poststroke 24 hours remained an independent predictor of progressing neurologic deficit, indicating poor functional outcome on hospital discharge.

High-sensitivity cardiac troponin I was elevated in about 20% of patients with AIS in a very recent study, but ACS that required treatment was diagnosed only in a minority group. Thus, high-sensitivity cardiac troponin I elevation without dynamic changes can occur in stroke patients without apparent ACS due to different reasons that stress the heart.¹⁴ It is not clear whether increased troponin T reflects critical coronary artery disease or its elevation is due to other causes such as supraventricular tachycardia or myocardial fibrosis.¹⁵ We also found a positive correlation between age and hs-cTnT independent from comorbidities, similar to others.^{16,17}

Furthermore, hs-cTnT was recently described as an atherosclerosis marker.¹⁸ We found a positive correlation between hs-cTnT levels and concentration of MCP-1 and tPA in the hyperacute stage, and hsCRP measured at poststroke 72 hours. The higher serum concentration of MCP-1 in the hyperacute stage of ischemic stroke may indicate the severity of atherosclerosis preceding the acute event.¹⁹ High baseline MCP-1 appeared to be a useful biomarker for selecting patients with AIS, who can benefit from early treatment with acetylsalicylic acid combined with extended release dipyridamole.¹⁹ MCP-1 elevation presumably predicts early progression of neurologic deficit but not the late outcome, as no association was found between MCP-1 levels and mortality in this cohort. Indeed, MCP-1 is a key regulator in "opening" the blood-brain barrier in animal models and in *in vitro* studies.^{20,21}

Beside hs-cTnT and MCP-1, serum concentration of endogenous tPA in the hyperacute stage was also increased in patients with AIS with worsened NIHSS by 24 hours, suggesting that hemostatic variables also play an important role in developing acute ischemic episodes. It has been shown that increased coagulation activity and disturbed fibrinolysis are predictors of future vascular events, including stroke, particularly in older population.²²

The acute phase reactant hsCRP measured at 72 poststroke hours, but not in the hyperacute stage, was significantly increased in patients with declining NIHSS both at 24 hours and hospital discharge. Previously, an increase in concentration of CRP between 12 and 24 hours after symptom onset was found to be a predictor of an unfavorable stroke outcome.²³ Importantly, hsCRP showed

a strong positive correlation with both hs-cTnT and S100B in the subacute stage of AIS in our cohort, suggesting a link between the cerebral ischemia induced inflammatory response and infarct size propagation.²⁴ It has been previously shown that both hsCRP and lesion area were independently associated with S100B, indicating that the degree of systemic inflammation is associated with astroglia-derived S100B concentration in AIS.²⁵

In general, there is a great body of evidence that inflammation following ischemic brain injury correlates with adverse outcome. Our findings provide an additional dimension indicating that elevated acute and subacute concentration of serum cardiac troponin T indicates an additional increased risk for adverse outcome in patients with cerebrovascular conditions without manifest cardiovascular events. Recently, biomarkers such as hs-cTnT were associated with cerebral microinfarcts on 3T magnetic resonance imaging in an older patient population attending a memory clinic.²⁶ Others also found association between high levels of hs-cTnT and steeper cognitive decline in the elderly independent of cardiovascular diseases.²⁷

We also found a positive correlation between serum concentration of MCP-1 and S100B in the hyperacute stage of AIS that persisted up to at least 72 poststroke hours. This association may suggest that more severe atherosclerosis reflected by increased MCP-1 is accompanied by higher infarct size.^{28,29} In contrast to cardiovascular studies, our findings did not confirm the hypothesis that an increased serum concentration of baseline MCP-1 reflecting better collateralization might be protective in cerebrovascular diseases as well.³⁰

In summary, our findings suggest that hs-cTnT, similar to other atherosclerosis markers, such as hsCRP or MCP-1, might be an indicator of preceding atherosclerotic burden in patients with first-ever ischemic stroke. Nevertheless, serial measurement of hs-cTnT and expert cardiologic workup is mandatory for best medical treatment, in order to decide whether elevated hs-cTnT supports a coexisting ACS in patients with AIS or rather predicts a progression of neurologic deficit reflected by declining NIHSS.¹⁴

References

1. Scheitz JF, Endres M, Mochmann HC, et al. Frequency, determinants and outcome of elevated troponin in acute ischemic stroke patients. *Int J Cardiol* 2012;157:239-242.
2. Arsava EM, Helenius J, Avery R, et al. Assessment of the predictive validity of etiologic stroke classification. *JAMA Neurol* 2017;74:419-426.
3. Eggers KM, Lindahl B. Application of cardiac troponin in cardiovascular diseases other than acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2017;63:223-235.
4. Biener M, Giannitsis E, Kuhner M, et al. Prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin T compared to risk scores in stable cardiovascular disease. *Am J Med* 2017;130:572-582. doi:10.1016/j.amjmed.2016.11.028.

5. Wrigley P, Khoury J, Eckerle B, et al. Prevalence of positive troponin and echocardiogram findings and association with mortality in acute ischemic stroke. *Stroke* 2017;48:1226-1232.
6. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, et al. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol* 2005;62:1130-1134.
7. Molnar T, Pusch G, Papp V, et al. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2014;23:2206-2214.
8. Molnar T, Papp V, Szereday L, et al. Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;44:183-192.
9. Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:1677-1698.
10. Pusch G, Debrabant B, Molnar T, et al. Early dynamics of P-selectin and interleukin 6 predicts outcomes in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015;24:1938-1947.
11. Liu Y, Zhu S, Wang Y, et al. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning in focal cerebral infarction: relationship with upregulation of vascular endothelial growth factor. *Neural Regen Res* 2014;9:1117-1121.
12. Park HJ, Chang K, Park CS, et al. Coronary collaterals: the role of MCP-1 during the early phase of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008;130:409-413.
13. Adams HP Jr, Davis PH, Leira EC, et al. Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: a report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology* 1999;53:126-131.
14. Anders B, Alonso A, Artemis D, et al. What does elevated high-sensitive troponin I in stroke patients mean: concomitant acute myocardial infarction or a marker for high-risk patients? *Cerebrovasc Dis* 2013;36:211-217.
15. Murer M, Cuculi F, Toggweiler S, et al. Elevated high-sensitivity troponin does not indicate the presence of coronary artery disease in patients presenting with supraventricular tachycardia. *Cardiol J* 2017;doi:10.5603/CJ.a2017.0058.
16. Webb IG, Yam ST, Cooke R, et al. Elevated baseline cardiac troponin levels in the elderly—another variable to consider? *Heart Lung Circ* 2015;24:142-148.
17. Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? *Clin Chim Acta* 1997;257:99-115.
18. Divard G, Abbas R, Chenevier-Gobeaux C, et al. High-sensitivity cardiac troponin T is a biomarker for atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients: a cross-sectional controlled study. *Arthritis Res Ther* 2017;19:132. doi:10.1186/s13075-017-1352-7.
19. Worthmann H, Dengler R, Schumacher H, et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a potential biomarker for early anti-thrombotic therapy after ischemic stroke. *Int J Mol Sci* 2012;13:8670-8678.
20. Strecker JK, Minnerup J, Schütte-Nütgen K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency results in altered blood-brain barrier breakdown after experimental stroke. *Stroke* 2013;44:2536-2544.
21. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:593-606.
22. Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG, et al. Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3321-3325.
23. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, et al. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 2002;33:2459-2464.
24. Beer C, Blacker D, Hankey GJ, et al. Association of clinical and aetiological subtype of acute ischaemic stroke with inflammation, oxidative stress and vascular function: a cross-sectional observational study. *Med Sci Monit* 2011;17:CR467-CR473.
25. Beer C, Blacker D, Bynevelt M, et al. Systemic markers of inflammation are independently associated with S100B concentration: results of an observational study in subjects with acute ischaemic stroke. *J Neuroinflammation* 2010;7:71. doi:10.1186/1742-2094-7-71.
26. Hilal S, Chai YL, van Veluw S, et al. Association between subclinical cardiac biomarkers and clinically manifest cardiac diseases with cortical cerebral microinfarcts. *JAMA Neurol* 2017;74:403-410.
27. Wijsman LW, de Craen AJ, Trompet S, et al. High-sensitivity cardiac troponin T is associated with cognitive decline in older adults at high cardiovascular risk. *Eur J Prev Cardiol* 2016;23:1383-1392.
28. Lee S, Chu HX, Kim HA, et al. Effect of a broad-specificity chemokine-binding protein on brain leukocyte infiltration and infarct development. *Stroke* 2015;46:537-544.
29. Inose Y, Kato Y, Kitagawa K, et al. Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. *Neuropathology* 2015;35:209-223.
30. Meier P, Hemingway H, Lansky AJ, et al. The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2012;33:614-621.