

OCENA TROMBOCITNE FUNKCIJE Z MERJENJEM ADHEZIJE IN AGREGACIJE TROMBOCITOV NA POLISTIRENSKI MEMBRANI PRI BOLNIKIHZ ESENCIALNO TROMBOCITEMIJO

EVALUATION OF PLATELET FUNCTION BY MEASURING PLATELET ADHESION AND AGGREGATION ON POLYSTYRENE SURFACE IN PATIENTS WITH ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA

Katarina Trdina, Jana Kralj, Peter Černelč

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Bolniki z esencionalno trombocitemijo (ET) imajo povečano število trombocitov v periferni krvi in pogosto tudi okvarjeno funkcijo trombocitov. Zapleti se pojavljajo v obliki tromboz ali krvavitvev. Za preprečevanje tromboz bolniki pogosto profilaktično dobivajo acetilsalicilno kislino (ASA). Danes je na voljo več načinov za oceno trombocitne funkcije, na primer agregometrija in zapiralni čas. Mnogi izmed njih imajo številne pomanjkljivosti. V okviru raziskave smo skušali ovrednotiti nov način adhezije in agregacije trombocitov na polistirenski membrani (AAPM).*
- Metode** *V raziskavo smo vključili 69 bolnikov z ET. Od tega je bilo 49 bolnikov, ki so prejeli ASA, in 20 bolnikov, ki niso prejeli ASA. Bolnikom smo izmerili agregacijo trombocitov z agregometrom, zapiralni čas ter preskušali funkcijo trombocitov z načinom AAPM. Izmerjene vrednosti smo primerjali z vrednostmi zdravih oseb.*
- Rezultati** *Pri bolnikih z ET v primerjavi z zdravimi osebami sta bila delež pokrite površine (1,7 % proti 3,3 %) in povprečna velikost trombocitov in trombocitnih agregatov ($32 \mu\text{m}^2$ proti $45 \mu\text{m}^2$) prirejene preiskave AAPM statistično manjša ($p < 0,05$). Bolniki, ki so prejeli ASA, v primerjavi z bolniki, ki niso prejeli ASA, so imeli povečan delež pokrite površine (11 % proti 1,7 %), povprečno velikost trombocitov in trombocitnih agregatov ($42 \mu\text{m}^2$ proti $32 \mu\text{m}^2$) in število trombocitov in trombocitnih agregatov (1421 proti 263) prirejene preiskave AAPM ($p < 0,05$).*
- Zaključki** *Ugotovili smo, da je prirejena preiskava AAPM primerni način za določanje motenj funkcije trombocitov pri bolnikih z ET. Poleg tega je prirejena preiskava AAPM primerna tudi za spremljanje učinka profilakse z ASA in za odkrivanje bolnikov z rezistenco na ASA. Ugotovili smo še, da številčna koncentracija trombocitov v krvi vpliva na število trombocitov in trombocitnih agregatov, izmerjenih s standardno preiskavo AAPM.*
- Ključne besede** *agregometrija; zapiralni čas; acetilsalicilna kislina*

Abstract

- Background** *People with essential thrombocythemia (ET) have increased number of circulating platelets. The function of platelets is often impaired. Some people with ET can suffer from bleeding or clotting due to their disease. Acetylsalicylic acid (ASA) may be useful in treating patients with symptoms of microvascular occlusion. Numerous methods for evaluation of platelet function are available. Most of them have numerous disadvantages. In this research a new method adhesion and aggregation on polystyrene surface (AAPS) was assessed.*

Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Katarina Trdina, mag. farm., Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana, katarina_trdina@hotmail.com

Methods	<i>The research comprised 69 patients with ET. The study group consisted of 49 patients that were treated with ASA and 20 patients that were not treated with ASA. We measured platelet aggregation using aggregometer and closure time. We were also testing platelet function using the new method AAPS. The measured values were compared to values of healthy subjects.</i>
Results	<i>Surface coverage (3.3 % vs. 1.7 %) and average size of platelets and platelet aggregates (45 μm^2 vs. 32 μm^2) of the modified test AAPS were decreased for patients that were not treated with ASA versus healthy subjects ($p < 0.05$). Surface coverage (1.7 % vs. 11 %), average size of platelets and platelet aggregates (32 μm^2 vs. 42 μm^2) and number of platelets and platelet aggregates (263 vs. 1421) of the modified test AAPS for patients that were treated with ASA versus patients that were not treated with ASA were increased ($p < 0.05$).</i>
Conclusions	<i>We found out that the AAPS modified test is useful for evaluation of platelet dysfunction in patients with ET. Furthermore the AAPS modified test is suitable for monitoring treatment with ASA and screening patients with »acetylsalicylic acid resistance«. We also found out that the number of platelets in blood exerts influence upon number of platelets and platelet aggregates measured by the standard test AAPS.</i>
Key words	<i>aggregometry; closure time; acetylsalicylic acid</i>

Uvod

Esencialna trombocitemija je kronična mieloproliferativna bolezen, ki prizadene predvsem megakariocitno vrsto. Značilno je razraščanje megakariocitov v kostnem mozgu in zato povečano število trombocitov v periferni krvi. Pogosto je okrnjena tudi njihova funkcija. Zapleti se pojavljajo v obliki tromboz in krvavitev. Za preprečevanja tromboz bolniki pogosto prejemajo majhne odmerke ASA.¹⁻⁴ ASA inhibira encim ciklooksigenazo, ki sodeluje pri sintezi tromboksana A₂ (TXA₂) in prostaciklina. TXA₂ agregacijo trombocitov pospešuje, medtem ko jo prostaciklin zavira. Encim ciklooksigenaza deluje zlasti na konstitutivni encim COX-1. Z inhibicijo encima se zmanjša sinteza TXA₂ v trombocitih, prav tako pa se zmanjša tudi sinteza prostaciklina v endoteliju. Ker trombociti nimajo jedra, ciklooksigenaze ne morejo več sintetizirati. Njihova okvara je tako dokončna, žilne endotelijske celice pa sintetizirajo nov encim. Inhibicija endotelijske ciklooksigenaze zahteva večje količine ASA, predvsem v primeru peroralnega jemanja. Sistemsko ožilje je namreč zaščiteno pred delovanjem ASA, saj jo esterase v jetrih v okviru predsistemske presnove pretvorijo v salicilat. Trombociti pa so ASA izpostavljeni že v portalni krvi.

Za preprečevanje se tako uporabljajo majhni odmerki ASA, saj se na ta način zmanjša sinteza TXA₂, brez znatnega zmanjšanja sinteze prostaciklina.^{5,6}

Med načini, ki preskušajo funkcijo trombocitov, se uporabljata tudi agregometrija in merjenje zapiralnega časa.

Bolniki in metode

Bolniki

V raziskavo smo vključili 69 bolnikov, in sicer 22 moških in 47 žensk z ET, ki se zdravijo v hematološki ambulanti Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani. Povprečna starost bolnikov je bila 59 let.

Bolnikom smo izmerili agregacijo trombocitov z agregometrom, zapiralni čas ter preskušali funkcijo trombocitov z načinom AAPM. Izmerjene vrednosti smo primerjali z vrednostmi zdravih oseb.

V skupini bolnikov, ki so prejemali ASA, smo izključili 4 bolnike z ugotovljeno rezistenco na ASA. Izključeni bolniki predstavljajo 8,2 % bolnikov, ki so prejemali ASA.

Metode

Agregometer je prirejen spektrofotometer, katerega osnova za merjenje agregacije trombocitov temelji na spektrofotometričnem merjenju spremembe prepustnosti svetlobe skozi plazmo s trombociti. V primeru, da v plazmi poteka proces agregacije trombocitov, prepustnost svetlobe narašča. Agregometrija je osnovni preskus za oceno funkcije trombocitov. Agregometer ni občutljiv na majhne agregate trombocitov, ker ne zazna začetne faze agregacije trombocitov. Poleg tega na agregacijo vpliva tudi majhna številčna koncentracija trombocitov, zato se način ne smatra za zanesljivega, ko je številčna koncentracija trombocitov manjša od $100 \times 10^9/\text{L}$. Postopek je dolgotrajen in zahteva pripravo vzorca.¹¹⁻¹⁴ Način zapiralnega časa temelji na merjenju časa, ki je potreben za nastanek trombocitnega čepa, ki zapre odprtino v membrani merilne celice in s tem prekine tok krvi. Membrana je v eni merilni celici prekrita s kolagenom in epinefrinom, v drugi pa s kolagenom in ADP. Kot posledica izpostavitve trombocitov strižnim silam in aktivatorjem trombocitov, kot so kolagen in ADP/adrenalin, pride do aktivacije in aglutinacije trombocitov. Nastane strdek, ki zamaši odprtino v membrani merilne celice. Pomanjkljivost je maksimalni čas merjenja 300 s. Po izteku tega časa se merjenje prekine in aparat nam ne posreduje podatkov, v kolikšnem času bi dejansko prišlo do zaprtja odprtine. Poleg tega je aparat prirejen za merjenje zapiralnega časa pri številčni koncentraciji trombocitov $100-500 \times 10^9/\text{L}$ in hematokritu od 0,350 do 0,500.¹⁰⁻¹²

AAPM je nov način za preskušanje funkcije trombocitov (adhezija in agregacija) pod skoraj fiziološkimi pogoji. V način AAPM je vpet princip posodice in konusa, ki ustvarja laminarni tok preko površine posodice. Z vrtenjem pri 720 obratih na minuto posnema arterijski tok krvi. Pri danih pogojih vrtenja se vzpostavijo močne strižne sile, ki so potrebne za aktiviranje adhezije. Na vsaki točki površine posodice so strižne sile obratno sorazmerne razdalji konusa in površine posodice ter premo sorazmerne s kotno hitrostjo. Površina posodice je obdana s polistirenom, na katero se takoj po dodatku krvi adherirajo plazemski proteini (fibrinogen, vWf) in postanejo privlačni za trombocite. Rezultat tega je adhezija in agregacija trombocitov na površini membrane. Po izpiranju ostanka krvi in barvanju adheriranih trombocitov sledi kvantifikacija reakcij s pomočjo slikovnega analizatorja. Rezultati adhezije in agregacije so izraženi v numerični obliki, in sicer: delež pokrite površine (SC) s trombociti in trombocitnimi agregati, kar predstavlja adhezijo trombocitov; povprečna velikost trombocitov in trombocitnih agregatov, vezanih na površino membrane (ASTTA) v μm^2 , kar predstavlja agregacijo trombocitov; število trombocitov in trombocitnih agregatov (NTTA). SC nad 7,5 % in ASTTA nad 25 μm^2 sta opredeljeni kot normalni vrednosti.

a) *Standardna preiskava AAPM* preskuša funkcijo trombocitov pod skoraj fiziološkimi pogoji (posnemanje arterijskega toka, preskušanje poteka v polni krvi in na površini, ki je podobna žilni steni) in brez dodatka reagentov.

ASA in druge antiagregacijske učinkovine (npr. klopidogrel) na standardno preiskavo AAPM nimajo vpliva, saj po večini predstavlja adhezijske lastnosti trombocitov. Tako sta SC in ASTTA pri bolnikih, ki prejemajo ASA, normalna.

b) *Prirajena preiskava AAPM* se uporablja za preskušanje odziva na ASA. Od standardne preiskave se razlikuje v tem, da vzorcu krvi dodamo arahidonsko kislino pred izvedbo standardne preiskave AAPM.

Preinkubacija vzorca z arahidonsko kislino povzroči aktivacijo in aglutinacijo trombocitov, kar se kaže v močno zmanjšani adheziji. Nastanejo namreč majhni agregati trombocitov, ki začasno izgubijo adhezijske lastnosti, dokler se ne pojavi spontana deagregacija. V primeru bolnikov, ki prejemajo ASA, pride do večje adhezije trombocitov kot posledica inhibicije arahidonske kisline z ASA.^{5, 8, 9, 11, 12}

Statistični postopki

Statistično vrednotenje rezultatov smo opravili s statističnim računalniškim programom SPSS 10.0. Primerjavo posameznih kazalcev med neodvisnimi vzorci smo izvedli z Mann-Whitneyjevim preskusom. Pri vseh statističnih postopkih smo izbrali 5-odstotno stopnjo tveganja. Razlike smo označili kot statistično značilne v primeru, ko je bila vrednost »p« manjša od 0,05. Izračunali smo tudi Spearmanov korelacijski koeficient za oceno povezave med posameznimi kazalci. Korelacija med kazalci je bila statistično značilna, ko je bila vrednost »p« manjša od 0,05.

Rezultati

V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je nov način AAPM primeren za določanje motenj funkcije trombocitov pri bolnikih z ET. V ta namen smo primerjali preiskovane kazalce za oceno trombocitne funkcije zdravih oseb in bolnikov, ki niso prejeli ASA (Razpr. 1).

Razpr. 1. *Primerjava preiskovanih kazalcev za oceno trombocitne funkcije zdravih oseb in bolnikov, ki niso prejeli ASA.*

Table 1. *Comparison of the investigated parameters for the assessment of platelet function in healthy subjects and in patients that were not treated with ASA.*

Kazalec Parameter	Nz	Mez	N	Me	s/ns
Agregometrija					
Agregometry					
ADP (%), 10 $\mu\text{mol/L}$	62	82	20	98	s, p = 0,001
ADR (%), 10 $\mu\text{mol/L}$	62	43	20	12,5	s, p < 0,001
COL (%), 5 $\mu\text{g/mL}$	62	82	20	4	s, p < 0,001
AA (%), 1 mmol/L	62	80	20	82	ns
Zapiralni čas					
Closure time					
CT-ADP (s)	30	82	20	103	s, p = 0,006
CT-EPI (s)	30	104	20	152	s, p = 0,003
Standardna preiskava AAPM					
AAPM standard examination					
SC (%)	30	12,5	20	12,5	ns
ASTTA (μm^2)	30	45	20	39	ns
NTTA	30	1680	20	1862	s, p = 0,027
Prirajena preiskava AAPM					
Modified AAPM examination					
SC-AA (%)	10	3,3	20	1,7	s, p = 0,022
ASTTA-AA (μm^2)	10	45	20	32	s, p = 0,020
NTTA-AA	10	473	20	263	ns

Nz - število zdravih oseb; Mez - mediana zdravih oseb; N - število bolnikov, ki niso prejeli ASA; Me - mediana bolnikov, ki niso prejeli ASA; s - značilnost razlik; ns - ni značilnih razlik.

Nz - number of healthy subjects; Mez - median of healthy subjects; N - number of patients that were not treated with ASA; Me - median of patients that were not treated with ASA; s - significant differences; ns - differences were not significant.

ADP - adenosine diphosphate; ADR/EPI - adrenalin; COL - kolagen; AA - arahidonska kislina; CT - zapiralni čas; SC - delež pokrite površine s trombociti in trombocitnimi agregati; ASTTA - povprečna velikost trombocitov in trombocitnih agregatov, vezanih na površino membrane; NTTA - število trombocitov in trombocitnih agregatov.

ADP - adenosine diphosphate; ADR/EPI - adrenaline; COL - collagen; AA - arachidonic acid; CT - closure time; SC - surface coverage with platelets and platelet aggregates; ASTTA - average size of platelets and platelet aggregates; NTTA - number of platelets and platelet aggregates.

V okviru raziskave smo želeli tudi ugotoviti, ali ASA vpliva na AAPM, zapiralni čas in na delež agregacije, izmerjen z agregometrom. Zato smo primerjali številčno koncentracijo trombocitov, številčno koncentracijo levkocitov, koncentracijo hemoglobina in preiskovane kazalce bolnikov, ki so prejeli ASA, in bolnikov, ki ASA niso prejeli (Razpr. 2).

Želeli smo tudi ugotoviti, ali število trombocitov pri bolnikih z esencialno trombocitemijo vpliva na preiskovane kazalce za oceno trombocitne funkcije. V ta namen smo primerjali številčno koncentracijo levkocitov, koncentracije hemoglobina in preiskovane kazalce bolnikov, ki niso prejeli ASA in so imeli številčno koncentracijo trombocitov manjšo od $600 \times 10^9/L$, ter bolnikov, ki prav tako niso prejeli ASA in so imeli številčno koncentracijo trombocitov večjo od $600 \times 10^9/L$ (Razpr. 3).

Razpr. 2. Primerjava številčne koncentracij trombocitov, levkocitov, koncentracij hemoglobina in preiskovanih kazalcev za oceno trombocitne funkcije bolnikov, ki niso prejeli ASA, in bolnikov, ki so prejeli ASA.

Table 2. Comparison of the concentration of platelets, leucocytes, haemoglobin values and the investigated parameters in patients that were not treated with ASA and patients that were treated with ASA.

Kazalec Parameter	N	Me	N _{ASA}	Me _{ASA}	s/ns
Krvna slika Blood picture					
Tr ($\times 10^9/L$)	20	676	45	661	ns
L ($\times 10^9/L$)	20	8,1	45	8,4	ns
Hb (g/L)	20	137	45	126	ns
Agregometrija Agregometry					
ADP (%), 10 $\mu\text{mol/L}$	20	98	45	66	s, p < 0,001
ADR (%), 10 $\mu\text{mol/L}$	20	12,5	45	12	ns
COL (%), 5 $\mu\text{g/mL}$	20	4	45	5	ns
AA (%), 1 mmol/L	20	82	45	4	s, p < 0,001
Zapiralni čas Closure time					
CT-ADP (s)	20	103	45	105	ns
CT-EPI (s)	20	152	45	248	s, p < 0,001
Standardna preiskava AAPM Standard AAPM examination					
SC (%)	20	12,5	45	14	ns
ASTTA (μm^2)	20	39	45	42	ns
NTTA	20	1862	45	1925	ns
Prirajena preiskava AAPM Modified AAPM examination					
SC-AA (%)	20	1,7	45	11	s, p < 0,001
ASTTA-AA (μm^2)	20	32	45	42	s, p = 0,002
NTTA-AA	20	263	45	1421	s, p < 0,001

N – število bolnikov, ki ASA niso prejeli; Me – mediana bolnikov, ki ASA niso prejeli; N_{ASA} – število bolnikov, ki so prejeli ASA; Me_{ASA} – mediana bolnikov, ki so prejeli ASA; s – značilnost razlik; ns – ni značilnih razlik.

N – number of patients that were not treated with ASA; Me – median of patients that were not treated with ASA; N_{ASA} – number of patients that were treated with ASA; Me_{ASA} – median of patients that were treated with ASA; s – significant differences; ns – differences were not significant.

Tr – številčna koncentracija trombocitov; L – številčna koncentracija levkocitov; Hb – koncentracija hemoglobina; ADP – adenoindifosfat; ADR/EPI – adrenalin; COL – kolagen; AA – arahidonska kislina; CT – zapiralni čas; SC – delež pokrite površine s trombociti in trombocitnimi agregati; ASTTA – povprečna velikost trombocitov in trombocitnih agregatov, vezanih na površino membrane; NTTA – število trombocitov in trombocitnih agregatov.

Tr – concentration of platelets; L – concentration of leucocytes; Hb – haemoglobin values; ADP – adenosine diphosphate; ADR/EPI – adrenaline; COL – collagen; AA – arachidonic acid; CT – closure time; SC – surface coverage with platelets and platelet aggregates; ASTTA – average size of platelets and platelet aggregates; NTTA – number of platelets and platelet aggregates.

Razpravljanje

Z raziskavo smo skušali ugotoviti, ali je nov način določanja AAPM primeren za določanje motenj funkcije trombocitov pri bolnikih z ET. V ta namen smo skupino bolnikov z ET, ki niso prejeli ASA, primerjali s skupino zdravih oseb.

Pri preskušanju plazme s trombociti pri bolnikih z ET je bil delež agregacije, povzročene z ADP, značilno večji glede na zdrave ljudi.

V literaturi¹⁵ zasledimo podatek, da se delež agregacije trombocitov, povzročene z adrenalinom pri bolnikih z ET glede na zdrave ljudi, značilno zmanjša.

Razpr. 3. Primerjava številčne koncentracije levkocitov, koncentracij hemoglobina in preiskovanih kazalcev za oceno trombocitne funkcije bolnikov, ki niso prejeli acetilsalicilne kisline, in s številčno koncentracijo trombocitov, manjšo od $600 \times 10^9/L$, in bolnikov, ki prav tako niso prejeli acetilsalicilne kisline, in s številčno koncentracijo trombocitov, večjo od $600 \times 10^9/L$.

Table 3. Comparison of the concentration of leucocytes, haemoglobin values and the investigated parameters in patients that were not treated with ASA and had concentration of platelets under $600 \times 10^9/L$ and patients that were not treated with ASA and had concentration of platelets over $600 \times 10^9/L$.

Kazalec Parameter	N ₁	Me ₁	N ₂	Me ₂	s/ns
Krvna slika Blood picture					
L ($\times 10^9/L$)	9	6,1	11	10	s, p = 0,044
Hb (g/L)	9	126	11	143	s, p = 0,023
Zapiralni čas Closure time					
CT-ADP (s)	9	100	11	105	ns
CT-EPI (s)	9	139	11	155	ns
Standardna preiskava AAPM Standard AAPM examination					
SC (%)	9	12	11	13	ns
ASTTA (μm^2)	9	38	11	40	ns
NTTA	9	1728	11	1963	s, p = 0,004
Prirajena preiskava AAPM Modified AAPM examination					
SC-AA (%)	9	2,1	11	1,5	ns
ASTTA-AA (μm^2)	9	34	11	31	ns
NTTA-AA	9	341	11	236	ns

N₁ – število bolnikov, ki niso prejeli ASA, in s številčno koncentracijo trombocitov, manjšo od $600 \times 10^9/L$; Me₁ – mediana bolnikov, ki niso prejeli ASA, in s številčno koncentracijo trombocitov, manjšo od $600 \times 10^9/L$; N₂ – število bolnikov, ki niso prejeli ASA, in s številčno koncentracijo trombocitov, večjo od $600 \times 10^9/L$; Me₂ – mediana bolnikov, ki niso prejeli ASA, in s številčno koncentracijo trombocitov, večjo od $600 \times 10^9/L$; s – značilnost razlik; ns – ni značilnih razlik.

N₁ – number of patients that were not treated with ASA and concentration of platelets under $600 \times 10^9/L$; Me₁ – median of patients that were not treated with ASA and concentration of platelets under $600 \times 10^9/L$; N₂ – number of patients that were not treated with ASA and concentration of platelets over $600 \times 10^9/L$; Me₂ – median of patients that were not treated with ASA and concentration of platelets over $600 \times 10^9/L$; s – significant differences; ns – differences were not significant.

L – številčna koncentracija levkocitov; Hb – koncentracija hemoglobina; ADP – adenoindifosfat; ADR/EPI – adrenalin; AA – arahidonska kislina; CT – zapiralni čas; SC – delež pokrite površine s trombociti in trombocitnimi agregati; ASTTA – povprečna velikost trombocitov in trombocitnih agregatov, vezanih na površino membrane; NTTA – število trombocitov in trombocitnih agregatov.

L – concentration of leucocytes; Hb – haemoglobin values; ADP – adenosine diphosphate; ADR/EPI – adrenaline; AA – arachidonic acid; CT – closure time; SC – surface coverage with platelets and platelet aggregates; ASTTA – average size of platelets and platelet aggregates; NTTA – number of platelets and platelet aggregates.

Zmanjšana delež agregacije, povzročene z adrenalinom, pa smo ugotovili tudi v raziskavi. Ti rezultati potrjujejo, da imajo bolniki z ET okvarjeno funkcijo trombocitov. Sklepamo, da je dodani adrenalin primeren za oceno trombocitne funkcije pri bolnikih z ET.

Prav tako v literaturi¹⁵ zasledimo podatek, da se delež agregacije povzročene s kolagenom pri bolnikih z ET glede na zdrave ljudi, značilno zmanjša. Slednje kažejo tudi rezultati naše raziskave. Ti rezultati potrjujejo, da imajo bolniki z ET okvarjeno funkcijo trombocitov. Sklepamo, da je reagent kolagen primeren za oceno trombocitne funkcije pri bolnikih z ET.

Delež agregacije, povzročen z arahidonsko kislino, se pri bolnikih z ET ni statistično razlikoval glede na zdrave ljudi. Iz tega lahko sklepamo, da vzrok za moteno funkcijo trombocitov pri bolnikih z ET ni v encimih, ki pretvorijo arahidonsko kislino v TXA_2 . Zapiralni čas, izmerjen v merilnih celicah KOL/ADP in KOL/EPI, je bil statistično podaljšan pri bolnikih z ET. Slednji rezultati se skladajo s podatki iz literature.¹⁵ Iz tega lahko sklepamo, da imajo bolniki z ET okvarjeno funkcijo trombocitov.

Primerjava obeh skupin je pokazala značilno povečano NTTA standardne preiskave AAPM pri bolnikih z ET. Avtorji⁸ navajajo, da je stopnja adhezije in agregacije odvisna od števila trombocitov. Bolniki z ET imajo namreč povečano število trombocitov in na ta način lahko pride do večjega NTTA. Izsledki značilno povečanega NTTA in ne tudi drugih kazalcev standardne preiskave AAPM pri bolnikih z ET so pokazali, da ne moremo ločiti reaktivne trombocitoze (krvavitve) od bolezenskega povečanja števila trombocitov (ET). Značilno zmanjšanje SC-AA in ASTTA-AA prirejene preiskave AAPM smo ugotovili pri bolnikih z ET. V literaturi¹⁶ zasledimo podatek, da imajo bolniki z ET povečano aktivnost fosfolipaz. Po dodatku arahidonske kisline pride preko TXA_2 do aktivacije trombocitov in sekrecije iz trombocitnih zrn. Aktivirajo se tudi fosfolipaze, ki sprostijo arahidonsko kislino iz membrane trombocitov. Večja aktivnost fosfolipaz pri bolnikih z ET lahko na ta način povzroči sprostitve večjih količin endogene arahidonske kisline. Arahidonska kislina povzroči aktivacijo in aglutinacijo trombocitov, kar se kaže v močno zmanjšani adheziji. Nastanejo namreč majhni agregati trombocitov, ki začasno izgubijo adhezijske lastnosti, dokler se ne pojavi spontana deagregacija.⁸

Želeli smo ugotoviti, ali ASA vpliva na agregometrijo, zapiralni čas in AAPM. Bolnike z ET smo razdelili v skupino, ki je prejela ASA, in skupino, ki ASA ni prejela.

Skupini bolnikov se v številčni koncentraciji trombocitov, levkocitov in koncentracijah hemoglobina nista razlikovale. ASA z acetiliranjem encima ciklooksigenaza-1 vpliva na samo delovanje trombocitov in ne na njihovo nastajanje. Prav tako nima vpliva na nastajanje levkocitov in koncentracije hemoglobina.^{6,7}

Primerjava bolnikov, ki so prejeli ASA, z bolniki, ki ASA niso prejeli, je pokazala značilno zmanjšano agregacijo povzročeno z ADP in arahidonsko kislino v primeru bolnikov, ki so prejeli ASA. Rezultati raziskave se ujemajo s podatki iz literature.^{5,7} ASA namreč inhibira nastanek TXA_2 in s tem sekundarni val z ADP povzročene agregacije. Pri dodatku arahidonske kisline kot aktivatorja trombocitov se ta prav tako ne more pretvoriti v TXA_2 zaradi inhibicije encima ciklooksigenaze z ASA. Posledica tega je zmanjšan delež agregacije. Delež agregacije, povzročen z adrenalinom in kolagenom, se med obema skupinama bolnikov ni značilno razlikoval. Vpliva ASA na agregacijo, povzročeno z adrenalinom in kolagenom, ne moremo ugotoviti, saj je bil delež agregacije z adrenalinom in kolagenom majhen že pri skupini bolnikov, ki ni prejela ASA. Sklepamo lahko, da je vzrok v okvarjeni funkciji trombocitov ali pa v neustreznem reagentu.

Literatura^{7, 10} navaja, da ASA podaljša zapiralni čas, izmerjen z merilno celico KOL/EPI, pri tem pa nima vpliva na zapiralni čas, izmerjen v merilni celici KOL/ADP. Slednje smo potrdili tudi z rezultati naše raziskave.

Skupini bolnikov se nista razlikovali v kazalcih standardne preiskave AAPM. Slednji rezultati se skladajo z literaturo,⁸ ki navaja, da ASA na standardno preiskavo AAPM nima vpliva, saj le-ta večinoma predstavlja adhezijske lastnosti trombocitov.

Primerjava obeh skupin bolnikov je pokazala pri bolnikih, ki so prejeli ASA, značilno povečan SC-AA, ASTTA-AA in NTTA-AA prirejene preiskave AAPM. Slednji rezultati prirejene preiskave AAPM so tudi v skladu z literaturo.⁸ Preinkubacija vzorca z arahidonsko kislino povzroči aktivacijo in aglutinacijo trombocitov, kar se kaže v zelo zmanjšani adheziji. Nastanejo namreč majhni agregati trombocitov, ki začasno izgubijo adhezijske lastnosti, dokler se ne pojavi spontana deagregacija. V primeru bolnikov, ki se zdravijo z ASA, pa pride do večje adhezije trombocitov kot posledica inhibicije arahidonske kisline z ASA.

V raziskavi smo tudi skušali ugotoviti, ali številčna koncentracija trombocitov pri bolnikih z esencialno trombocitemijo vpliva na zapiralni čas in AAPM.

V ta namen smo bolnike, ki niso prejeli ASA, razdelili v skupino s številčno koncentracijo, manjšo od $600 \times 10^9/\text{L}$, in skupino s številčno koncentracijo, večjo od $600 \times 10^9/\text{L}$.

Vpliva številčne koncentracije trombocitov na vrednosti deleža agregacije nismo preverjali, saj pri delu z agregometrom številčno koncentracijo trombocitov vedno uravnamo na $250 \times 10^9/\text{L}$.

V zapiralnih časih nam primerjava obeh skupin bolnikov ni pokazala značilnih razlik. Ena od možnih razlag je, da je zaradi okvarjene funkcije trombocitov pri bolnikih z esencialno trombocitemijo zapiralni čas podaljšan v obeh merilnih celicah. Zaradi slabosti naprave, tj. maksimalnega časa merjenja 300 sekund, tako ne vemo, za koliko se čas podaljša in v kolikšnem času bi dejansko prišlo do zaprtja odprtine. S tem pa tudi ne moremo ugotoviti, ali število trombocitov vpliva na zapiralni čas.

Primerjava teh dveh skupin bolnikov nam je kazala značilno povečano NTTA standardne preiskave AAPM pri bolnikih s številčno koncentracijo, večjo od $600 \times 10^9/\text{L}$. Ti rezultati so v skladu s podatki iz literature,⁸ saj je stopnja adhezije in agregacije odvisna od števila trombocitov. Primerjava teh dveh skupin je pokazala tudi značilno povečano številčno koncentracijo levkocitov in koncentracije hemoglobina pri bolnikih s številčno koncentracijo, večjo od $600 \times 10^9/\text{L}$. Vendar so te razlike med obema skupinama lahko posledica dejstva, da je bilo v skupini z večjo številčno koncentracijo trombocitov več moških, ki imajo večjo koncentracijo hemoglobina kot ženske. Večja številčna koncentracija levkocitov in koncentracije hemoglobina lahko prispevajo k večji viskoznosti krvi in s tem k večjemu NTTA.

Skupini bolnikov se nista razlikovali v kazalcih prirejene preiskave AAPM, in sicer SC-AA, ASTTA-AA in NTTA-AA. Iz tega lahko sklepamo, da število trombocitov na prirejeno preiskavo AAPM ne vpliva.

Ugotovili smo korelacijo ($\rho = -0,446$; $p < 0,001$) med kazalcem SC-AA prirejene preiskave AAPM in deležem agregacije, povzročene z arahidonsko kislino. Prav tako pa smo ugotovili tudi korelacijo ($\rho = -0,462$; $p < 0,001$) med kazalcem NTTA-AA prirejene preiskave AAPM in deležem agregacije, povzročene z arahidonsko kislino.

V skupini bolnikov, ki so prejeli ASA, smo izločili 4 bolnike z ugotovljeno rezistenco na ASA. Njihovi rezultati namreč napačno vplivajo na statistično vrednotenje rezultatov in s tem tudi na sklepe.

Zaključki

Prirejena preiskava AAPM se je izkazala kot primerni način za določanje motenj funkcije trombocitov pri bolnikih z ET. Prirejena preiskava AAPM se je izkazala kot primeren način za spremljanje učinka profilakse z ASA. Poleg tega smo ugotovili, da omogoča odkrivanje bolnikov, ki so rezistentni na ASA. Ugotovili smo, da številčna koncentracija trombocitov v krvi pri bolnikih z ET vpliva na NTTA standardne preiskave AAPM.

Literatura

1. Modic M. Kronične mieloproliferativne bolezni. In: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D. Interna medicina, 3. izd. Ljubljana: DZS; 2005. 1240-9.
2. <http://www.emedicine.com/med/topic2266.htm>
3. Harrison NC. Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology* 2005; 1: 409-15.
4. Hassan AA, Kroll HM. Acquired disorders of platelet function. *Hematology* 2005; 1: 403-8.
5. Spectre G, Brill A, Gural A, Shinkman B, Touretsky N, Mosseri E, Savion N, Varon D. A new point-of-care method for monitoring anti-platelet therapy: application of the cone and plate(let) analyzer. *Platelets* 2005; 16: 293-9.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999.
7. Slapnik S. Laboratorijsko spremljanje zdravljenja z acetilsalicilno kislino pri bolnikih z esencialno trombocitemijo. Diplomsko naloga, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2002.
8. Priložena navodila: Impact-R proizvajalca DiaHem AG.
9. Varon D, Savion N. Cone and plate(let) analyzer. V: Michelson AD. *Platelets*. Worcester: Academic Press; 2002. p 337-45.
10. Mlakar U, Preložnik Zupan I, Strauch R. Ocena primarne hemostaze z analizatorjem trombocitne funkcije PFA-100. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 485-8.
11. Rand LM, Leung R, Packham MA: Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science* 2003; 28: 307-17.
12. Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* 2000; 111: 733-44.
13. Bohinjec J. Temelji klinične hematologije. Ljubljana: Dopolna delavska univerza UNIVERZUM; 1983.
14. http://www.nodia.nl/Hart_KI_docs/platelet_aggr_reagents.htm
15. Cesar JM, Miguel D, Garcia AA, Burgaleta C. Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, PFA-100. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 772-7.
16. Mayordomo O, Carcamo C, Vecino AM, Navarro JL, Cesar JM. Arachidonic acid metabolism in platelets of patients with essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1995; 78: 315-21.

Prispelo 2008-02-20, sprejeto 2008-03-03