

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Egészséges és beteg kutyák thrombocytaszámának és a thrombocyták  
morfológiájának, valamint funkciójának vizsgálata**

**PhD értekezés**

Készítette:

**Dr. Halmay Dóra**

**2007**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....

**Prof. Dr. Sótonyi Péter**

tanszékvezető egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány  
kandidátusa

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Anatómiai és Szövettani Tanszék

Témabizottsági tagok:

.....

**Prof. Dr. Hajós Ferenc**

egyetemi tanár, a biológiai tudomány doktora

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Anatómiai és Szövettani Tanszék

.....

**Prof. Dr. Gaál Tibor**

egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

.....

**Prof. Dr. Vetési Ferenc**

egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a példány

.....

dr. Halmay Dóra

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	1
1. 1. A thrombocyták szerepe és szerkezete	1
1. 2. A thrombocyták mennyiségi viszonyai	2
1. 3. Kutyák thrombocytáinak morfológiai vizsgálata	2
1. 4. A thrombocytafunkció vizsgálata	5
1. 5. Az értekezés célja	14
<b>2. Anyagok és módszerek</b>	15
<b>3. Eredmények</b>	22
3. 1. A thrombocyták mennyiségi viszonyai	22
3. 2. Morfológiai vizsgálatok	24
3. 3. Optikai aggregometria	30
3. 4. Mechanikai módszer: a PFA-100 thrombocytafunkció-analizátorral végzett vizsgálatok	34
<b>4. Megbeszélés</b>	35
<b>5. Következtetések</b>	47
<b>6. Új tudományos eredmények</b>	50
<b>7. Összefoglalás</b>	52
<b>8. Summary</b>	54
<b>9. Irodalomjegyzék</b>	56
<b>10. Publikációk</b>	65
<b>11. Köszönetnyilvánítás</b>	67

# 1. Bevezetés

## 1. 1. A thrombocyták szerepe és szerkezete

A vérlemezkék a legkisebb véresejtek, átlagosan 2–4  $\mu\text{m}$  átmérőjűek (Jain 1993). Termelődésük a csontvelőben zajlik (thrombopoiesis), majd a megacaryocyták citoplazma-fragmentumaiként kerülnek ki a perifériás vérbe. A teljes folyamat 3–4 napot vesz igénybe, amelynek szabályozásában különféle stimuláló (pl. megacaryocytá-kolónia stimuláló faktor, a vese által termelt trombopoietin, az interleukin-3, a granulocytá-monocytá-kolónia stimuláló faktor) és gátló anyagok (pl.  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon) vesznek részt (Jain 1993, Lewis 2000). Túlélési idejük 3–11 nap (Jain 1993). Az előregedett, illetve károsodott sejteket a máj, a lép és a csontvelő makrofágjai távolítják el (Jain 1993).

A vérlemezkék nagyobb hányada *keringő* thrombocytá, másik részük pedig különböző szervek kapillárisaiban ("pool"-okban) raktározódik. Ezekről a helyekről szükség esetén könnyen mozgósíthatók. Élettani körülmények között az összhrombocytá-mennyiség mintegy 30–40 %-a található a lépben, és csak kis mennyiségük raktározódik egyéb szervekben (tüdő, máj, szív, csontvelő; Jain 1993). Alapvető szerepük a *hemosztázis fenntartása* (McConnell 2000, Jain 1993). Mind a primer, mind a szekunder folyamatokban részt vesznek. A vérlemezkék nem pontosan tisztázott módon segítenek a *kapilláris-endothel szerkezeti integritásának megőrzésében* is: thrombocytopenia esetén az endothelsejtek közötti kapcsolat meggyengül, így az érfal a vörösvérsejtek számára szabadon átjárhatóvá válik. Ezt jelzi a petechiák, ecchymosisok megjelenése. Vasoactiv anyagaik révén a vérlemezkék részt vesznek a *gyulladásos*, illetve a *szöveti regenerációs* folyamatokban is. Nyitott csatornarendszerük segítségével képesek baktériumok és különféle anyagok bekebelezésére, illetve  $\beta$ -lizinjüknek köszönhetően kífokú *baktericid* tulajdonsággal is rendelkeznek. Szerepük van az artériás és a vénás *thrombusképzésben*, károsító mediátoraik révén az *atherosclerosis kórfejlődésében*, és egyes megfigyelések szerint a *tumormetasztázisban* is (Jain 1993, Thomas és Rogers 1999).

A vérlemezkék kis méretük ellenére komplex feladatokat ellátó alakos elemek, melyek citoplazmája bonyolult szerkezetű. A különféle sejtalkotókat az **1. táblázatban** foglaljuk össze.

### 1. táblázat. A thrombocyták szerkezeti elemei. (Stokol, 2000)

külső membránrendszer	kettős foszfolipidréteg, glükoprotein-receptorok, ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP)
szol-gél zóna	microfilamentumok, microtubulusok, glükogénszemcsék
organellum zóna	mitokondriumok, peroxizómák, liposzómák, $\alpha$ -granulumok (vWf, fibronectin, fibrinogén, trombospondin, vitronektin, P-szelektin, növekedési és véralvadási faktorok), denz granulumok (ATP, ADP, $Ca^{2+}$ , szerotonin)
belső membránrendszer	nyitott csatornarendszer (OCS), denz tubuláris rendszer (DTS)

## 1. 2. A thrombocyták mennyiségi viszonyai

A thrombocytaszám határértékei egészséges kutyákban 200–500, macskákban 300–700 x 10<sup>9</sup>/l (Bush 1991). Ha a vérlemezkék mennyisége az alsó határérték alatt marad, *thrombocytopeniáról*, ha pedig a felső határértéket meghaladja, *thrombocytosisról* beszélünk. Az előbbi kórforma gyakoribb, kialakulása vérzéses diathesist okozhat. A thrombocytopenia megnyilvánulhat veleszületett és szerzett formában egyaránt. A szerzett forma jóval gyakoribb. Előidézhetheti képzési zavar, fokozott pusztulás (immun- vagy nemimmun eredetű), túlzott vérlemezkevesztés és fokozott felhasználás, kóros megoszlás és hígulás (Weiss 2000, Jain 1993). A thrombocytosis kialakulása a véralvadási mechanizmus erősödését, fokozott trombólíziskészséget eredményezhet. A mindennapi szóhasználatban *thrombocytosisnak* (vagy relatív thrombocytosisnak, Jain 1993) a keringő thrombocyták számának szekunder okokra visszavezethető növekedését nevezzük. Ez a jelenség átmeneti, és klinikai tüneteket többnyire nem okoz (Lewis 2000). Ha a thrombocyta-termelés fokozódását a csontvelő funkció-növekedése okozza, azaz primer folyamatokról van szó, akkor helyesebb *thrombocytaemiáról* beszélni. A csontvelőben ilyenkor megacaryocyta-proliferáció figyelhető meg (Jain 1993). A thrombocytosis lehet élettani vagy kóros, utóbbi pedig abszolút vagy relatív (Weiss 2000).

## 1. 3. Kutyák thrombocytáinak morfológiai vizsgálata

Csak néhány tanulmány foglalkozik a vérlemezkék morfológiai vizsgálatával, általában a hematológia könyvek is csak néhány sorban emlékeznek meg azokról. A vérlemezkék a legkisebb vérsejtek, szerkezeti felépítésük egyszerű, így fénymikroszkópos vizsgálatuk a hagyományos festési eljárásokkal készült vérkenetekben (pl. May-Grünwald, Pappenheim, Giemsa, Diff-quick) nehézségekbe ütközik. Sajnos a hematológiai diagnosztikából jól ismert citokémiai festési

technikák is kevés további információt nyújtanak (Jain 1993). A felsoroltak közül a Giemsa-festés tűnik a legegyszerűbbnek és a legalkalmasabbnak arra, hogy a sejtek finom struktúráját láthatóvá tegyük, ezért munkánk során ezt a módszert vettük igénybe egészséges és beteg kutyák thrombocytáinak egyszerű morfológiai vizsgálatára.

A továbbiakban olyan festési eljárást is szerettünk volna alkalmazni, amely a thrombocyták valamely jellegzetes szerkezeti elemét képes kimutatni. Ilyen speciális eljárás a PAS-festés, amely a vérlemezkék glükogéntartalmát mutatja ki. A glükogén a vérlemezkék fő energia forrása. A citoplazmában diffúzan helyeződik glükogéngranulumok formájában. Úgy gondoltam, PAS-festést alkalmazva könnyen nyomon követhetővé válik a glükogén mennyiségi és eloszlásbeli változása a különféle kórformákban. Ezt az eljárást viszonylag ritkán alkalmazzák a hematológiai vizsgálatokban (Szász et al. 1981, Powers 1989, Reagan et al., 1998, Cowell et al., 1999), a vérlemezkék morfológiai elemzésére pedig szinte soha. Az egyéb vérsejtek PAS-szerint festett vérkenetekben jellegzetes festődést mutatnak, az ettől való eltérés mindig kóros, nem ritkán valamilyen myeloproliferatív kórkép velejárója (Szász et al. 1981).

Funkciójuk szerint a glükogénszemcsék a sejt elsődleges energiaraktárai. A thrombocyták az energiát aktív anaerob glükolízisből nyerik (Jain 1993). A glükóz az ATP-termelés fő energiaforrását jelenti (Gentry 2000). A glükogén lebontását az amilo-1,6-glükozidáz és a glükogén-foszforiláz enzimrendszer szabályozza (Tablin 2000). A vérlemezkék a glükóz aktív felvételére is képesek (bár a glükogéngranulumok nagy része a megacaryocytákból származik), ami azután vagy a glükolízis során használandó fel ATP termelésre, vagy a még kevésbé tanulmányozott hexóz-monofoszfát söntön keresztül metabolizálódik (Holmsen 1994).

#### *Egészséges kutyák thrombocytáinak morfológiája Giemsa-szerint festett vérkenetekben*

A vérlemezkék fénymikroszkópban halványkékek és mag nélküliek (Bessis 1972, Jain 1993, Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997, McConnell 2000). A többségük közepes nagyságú (Cowell et al. 1999), alakjuk kerek vagy ovális (Bessis 1972, Erslev és Gabuzda 1975, Handagama et al. 1986, Powers 1989, Jain 1993). Ha a kenet nem megfelelően fixált, bizarr alakot vehetnek fel (Bessis 1972). A vérvétel során aktiválódhatnak, ekkor vékony citoplazma nyúlványokat, állábakat növesztenek, amelyek a festett kenetben jól láthatók (Hoffbrand és Pettit 1997, Cowell et al. 1999). Citoplazmájuk finom, lilás granulációt mutat, amelyek vagy a sejt közepén csoportosulnak, vagy diffúzan elszórva figyelhetők meg (Bessis 1972, Jain 1993, Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997, McConnell 2000). Az idősebb vérlemezkék kisebbek, és gyengébb denzitásúak, vagyis halványabbak, mint a fiatalabbak (Bessis 1972, Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997). Élettani viszonyok között nem vakuolizáltak, azonban ha vérvételkor antikoagulánsként EDTA-t használunk, vagy a levett vérmintát több, mint 24 órán át tároljuk, kifejezett citoplazma-

vakuolizáció jelenhet meg bennük (Bessis 1972). Még helyes mintakezelés és kenetkészítés mellett is előfordulhat a vérlemezkék összezsugorodása (aggregálódása), azonban ezek élettani körülmények között kis méretűek (Bessis 1972, Hoffbrand és Pettit 1997).

A vérlemezkék morfológiája számos veleszületett és szerzett kórformában változhat (Stobbl 1959, Nolte és Mischke 1995). Egyszerű festési eljárásokkal készült vérkenetekben általában a következő szempontok szerint történik értékelésük (Jain 1993, Cowell et al. 1999).

1. *Festődési sajátosságok.* A vörösvérsejtekénél ismert terminológiák a vérlemezkéknél is jól alkalmazhatók, eszerint *polychromasiáról* beszélünk, ha a kenetben a vérlemezkék festődése eltérő, vagyis gyengén festődő (*hypochrom*) és erőteljes festődést mutató, basophil (*hyperchrom*) alakok együttesen fordulnak elő.

2. *Méret.* A vérlemezkéket a vörösvérsejtek méretéhez viszonyítjuk, és eszerint adjuk meg a következő típusokat:

- *microcyták:* a vörösvérsejtek 1/4-énél kisebb vérlemezkék (1-2 $\mu$ m),
- *közepes nagyságú vérlemezkék:* méretük a vörösvérsejtek 1/4–1/3-a (2-3 $\mu$ m),
- *macrocyták:* vörösvérsejt-nagyságú vérlemezkék,
- *óriás thrombocyták:* a vörösvérsejtekénél nagyobb vérlemezkék (>7 $\mu$ m).

Ha egyidejűleg különböző méretű vérlemezkék vannak jelen a kenetben, *anisocytosisról* beszélünk.

3. *Polimorfizmus:* A fiziológiás kerek, ill. ovális vérlemezkéktől eltérő sejtalakok megjelenése

4. *Aktivált és nem aktivált vérlemezkék jelenléte:* állábak előfordulása

5. *Patológias granularitás:* az élettanitól eltérő granulomeloszlás

6. *Citoplazma vakuolizáció:* vakuolumok előfordulása a cytoplasmában

A fent említett elváltozások 1–3%-ban egészséges kutyákban is jelen lehetnek (Bessis 1972). Kórosnak a humán hematológiában általában azt tekinthető, amikor a kenetben óriás thrombocyták és microcyták egyidejűleg vannak jelen, ha a hialomer festési sajátosságai az egészségestől eltérőek (basophilia) és ha a granulomer nagyon kifejezett, vagyis a granuláció erőteljes (Stobbl 1959, Mende et al. 1975, Keller 1986).

*Egészséges kutyák vérlemezkéinek morfológiája PAS-szerint festett vérkenetben*

A vérsejtek PAS-festése a humán hematológiai diagnosztikában ismert eljárás, azonban a vérlemezkéket PAS-festődési jellegzetességeik alapján külön nem szokták értékelni (Szász et al. 1981). A festődési sajátosságok ismérveit a **2. táblázat** tartalmazza.

## 2. táblázat: Az egyes vérsejtek festődése PAS szerint

Vérsejttípus	Festődési sajátosságok
- neutrophil granulocyták - előalakok	- citoplazmájukban PAS-pozitív, liláspiros granulomok - festődésük gyenge, az érettségi fokkal erősödik a pozitivitás
lymphoid sejtek	PAS-negatívak, esetenként nagyon gyenge, diffúz szemcsézettség figyelhető meg
monocyták	többségük nem festődik, vagy halvány diffúz pozitivitást ad
erythroid sejtek	csak kóros esetben festődnek (pl. erythroid-leukaemia)
vérlemezkek	glükogéntartalmuk nagyobb, mint a granulocytáké (Jain 1993)

A glükogén-szemcsék elszórva helyeződnek a sejt citoplazmájában, a hialomer és granulomer zónában egyaránt megtalálhatók. Szabálytalan alakúak, gyakran nagyobb csoportokat, csomókat képeznek (Bessis 1972). Az ismert tanulmányok az emberi vérlemezkek glükogéntartalmának változásait főként elektronmikroszkóppal követték nyomon, és csak néhányan vizsgálták fénymikroszkóppal (Bessis 1972).

A hiányos és kevésbé részletes irodalmi adatokra való tekintettel munkánk célja az egészséges és beteg kutyák vérlemezkeinek több szempontú morfológiai vizsgálata volt Giemsa- és PAS-szerint festett vérkenetekben.

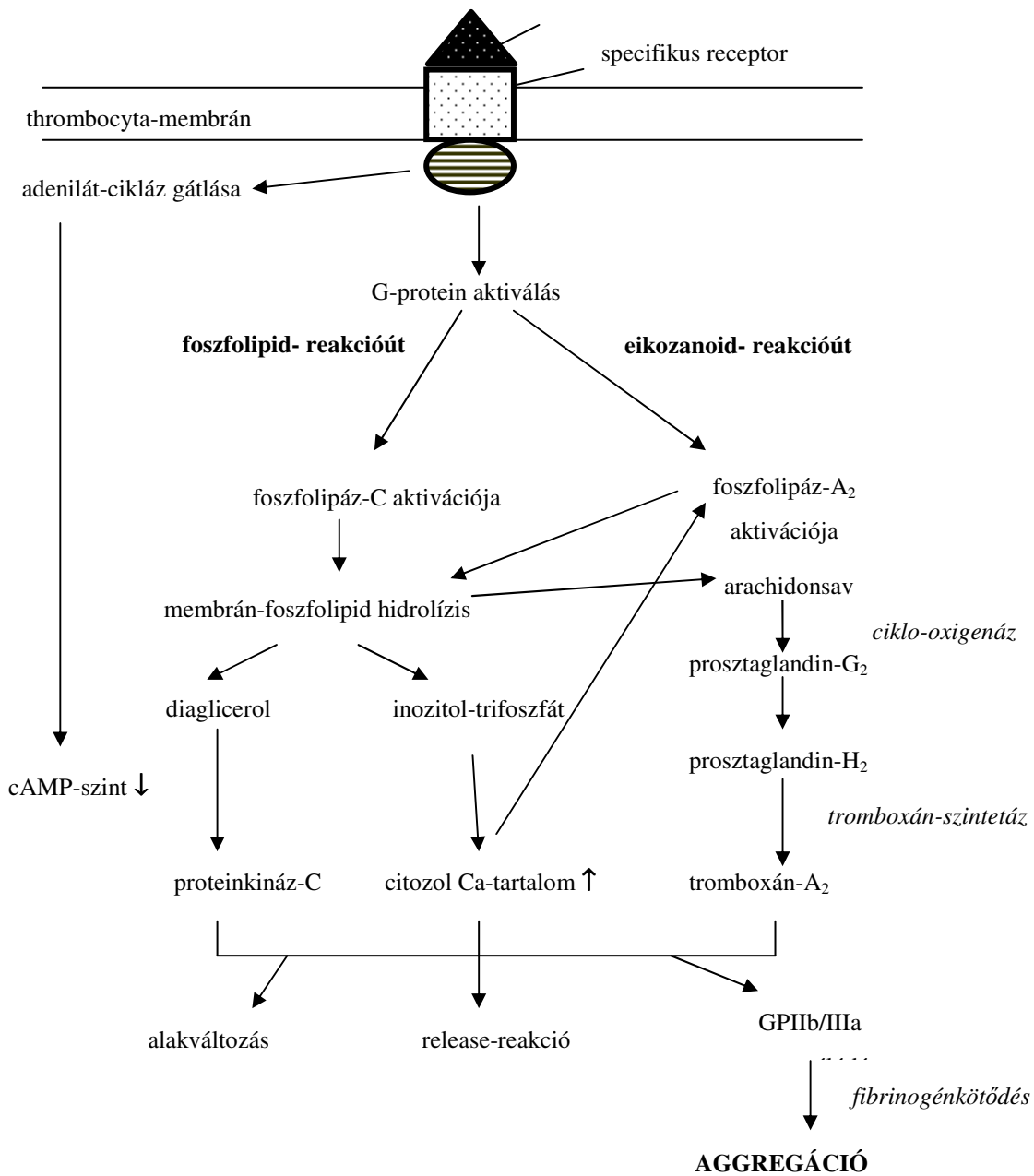
### 1. 4. A thrombocyta-funkció vizsgálata

A vérlemezket ért inger hatására az addig nyugvó sejt aktiválódik, és olyan morfológiai, illetve biokémiai változásokon megy keresztül, ami képessé teszi a hemosztázisban való részvételre. A primer hemosztázis négy folyamatában is részt vesznek a thrombocyták (McConnell 2000). Ezek az adhézió, az aggregáció, a release-reakció és a prokoaguláns felszín kialakulása.

Az érsérülés helyén, vagyis ahol az endothelréteg folytonossága megszakad, szabaddá válik a thrombogenicus hatású kollagén. Az adhézió során a vérlemezkek specifikus glükoprotein-receptoraik révén a kollagénhez, illetve a sérült endothelből szabaddá vált von Willebrand-faktorhoz (vWf) kötődnek. Ha az endothelsérülés kifejezett, a szabaddá váló kollagénrostok jelentik a fő aktiváló tényezőt. Kisebb trauma esetén a vWf és a fibrinogén felelősek elsősorban az adhézióért (Gentry 2000). Az adhézió során a vérlemezkek mintegy rögzítik magukat a károsodott érfalhoz. A folyamat nem egyformán zajlik a szervezet különböző helyein, illetve az adott ponton tapasztalható belső folyadéksúrlódás („shear”) nagysága is befolyásolja: az alacsony áramlású



helyeken a fibrinogén és a GPIIb/IIIa (fibrinogén-receptor, vagy  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin, Boudreaux et al. 1994) receptorok közti interakció elegendő az aggregálódáshoz. A magas áramlású helyeken a vWf és a GPIb/IX/V receptor komplexek között létrejövő interakciók segítik az adhéziót (Gentry 2000). Az adhéziót követően megindul a thrombocyta-aktiváció, amely gyakorlatilag a sejtek alakváltozását jelenti: felszínükön hosszú citoplazmanyúlványok, állábak jelennek meg, ezzel felületük megnő, és a későbbiekben kulcsszerepet játszó fibrinogén-receptoruk (GPIIb-IIIa) hozzáférhetővé válik. A folyamat alapfeltétele a GPIIb/IIIa-receptor aktiválódása. Ez két párhuzamosan zajló, egymással számos ponton összefüggő mechanizmust foglal magába: az ún. foszfolipid- és az eikozanoid (arachidonsav)-reakcióutat (**1. ábra**).



**1. ábra. Az aggregáció folyamata, az eikozanoid- és a foszfolipid-reakcióút**

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát.

(Forrás: Stokol T.: Disorders of Platelet Function. Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. BSAVA, 2000.)

Az aggregáció során a fibrinogén képez hidat a szomszédos vérlemezkék között (Blaskó 1998, Jain 1993, McConnell 2000). A fibrinogén-receptor expresszáldását számos vegyület, ún. agonista aktiválhatja, amelyekre nézve a thrombocyták szintén saját receptorral rendelkeznek (Zhou és Schmaier 2005). Megkülönböztetünk az aggregációt erősen és gyengén befolyásoló agonistákat. Az előbbiek a foszfolipid- és eikozanoid-reakcióúton keresztül indukálnak aggregációt, sőt, képesek a release-reakció kiváltására is akkor, ha a primer aggregáció valamiért gátolt. A gyenge agonisták csak az eikozanoid reakcióutat képesek aktiválni. Vagyis ha ezt a folyamatot valami gátolja, nem következik be aggregáció (Blaskó 1998, McConnell 2000). A fontosabb aggregációt kiváltó anyagokat, az eredetüket és az aggregációban betöltött szerepüket a **3. táblázatban** tüntettük fel (Wilner et al. 1968, Jain 1993, Soloviev et al. 1997, Blaskó 1998, Boda 1999, Boudreaux 2000, Stokol 2000, Sink 2002).

A folyamat során kollagén- vagy trombinhatásra a vérlemezkék granulumai kiürülnek (Blaskó 1998, McConnell 2000). Az extracelluláris térbe kerülő anyagok (pl. ADP, tromboxánok, szerotonin) egyrészt az adhéziót segítik, másrészt további aggregációt indukálnak, növelve ezzel a primer trombus nagyságát. A release-reakció irreverzibilis, mert párhuzamosan már a protrombin-trombin átalakulás is végbemegy (Blaskó 1998, McConnell 2000, Jain 1993, Jones 1979). A release-reakció során különböző enzimek és a véralvadási kaszkád egyes kofaktorai is szekretálódnak (McConnell 2000).

A folyamat a hemosztázis szekunder fázisát készíti elő (McConnell 2000). Alapvető feltétel egy olyan foszfolipidfelszín kialakulása a thrombocytán, ami lehetővé teszi a véralvadási fehérjék megkötését. Ez a thrombocyt-aktiváció idején következik be (McConnell 2000, Hoffbrand és Pettit 1997).

**3. táblázat. A thrombocyta-aggregációban résztvevő agonisták és hatásuk jellege**

Agonista	Származási hely, szerepük	A hatás jellege; az aggregációs válasz jellemzői PRP* esetén
ADP	endothel, vörösvérsejtek, a vérlemezkék denz granulumai; a release-reakció során további aggregációt indukál	gyenge agonista
kollagén	subendothelialis kötőszövet; a traumát követő első aggregációs faktor	erős agonista, gyors, irreverzibilis aggregáció; egyfázisú görbe, 7–11 sec lagfázis
epinefrin	a vérlemezkék denz granulumai; a primer thrombus kialakulásakor bocsátódik ki és indukál további aggregációt	gyenge agonista
trombin	a hemosztázis előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben van jelen	erős agonista, gyors irreverzibilis aggregáció, egyéb vérlemezke-funkciókat is támogat
szerotonin	a vérlemezkék denz granulumai	gyenge agonista, gyakran csak alakváltozás
arachidonsav	vérlemezkék	gyenge (egyes fajtákban erős) agonista; egyfázisú görbe
thrombocyta-aktiváló faktor (PAF)	az aktiválódó vérlemezkékben termelődik, aktivált fehérvérsejtekből is felszabadul	gyenge agonista
tromboxán-A <sub>2</sub>	az aktiválódó vérlemezkékben termelődik	gyenge agonista
Ca <sup>2+</sup>	vérlemezkék	erős agonista
risztocetin, risztomicin	antibiotikum; agglutinációt okoz	0,12 mg/ml koncentrációban nem indukál aggregációt
vazopresszin		gyenge agonista

(\*PRP: thrombocytadús plazma)

### *A thrombocyta-aggregáció vizsgálatának lehetőségei kutyában*

Ha a fent említett négy folyamat bármelyike zavart szenved, a vérlemezke nem képes a hemosztázisban betöltendő szerepét ellátni. Ennek következményei lehetnek szubklinikaiak, vagy megnyilvánulhatnak hemosztázis zavarokban, illetve vérzéses diathesisben (petechia, ecchymosis, suffusio).

A vérlemezkék funkciózavarai öröklött (pl. Glanzmann-féle thrombasthenia, Basset hound thrombopathia, spiccek thrombopathiája stb.) és jóval gyakrabban szerzett (malignus kórképek, fertőző betegségek, hepatopathia, pancreatitis, DIC, immunmediált thrombocytopenia, egyes gyógyszerek hatásaként) formában nyilvánulhatnak meg (Boudreaux 2000, Stokol 2000).

Rutindiagnosztikai módszerekkel a vérlemezkék funkciózavarának, vagyis a thrombopathiának csak a gyanúját állapíthatjuk meg. A pontos kórhatározás speciális laboratóriumi felszereltséget igényel. A thrombocytopathia megállapítására irányuló diagnosztikai lépések a következők lehetnek (Stokoll 2000, Jones 1979) (a \*-gal jelölt vizsgálatok speciális műszerezettséget, kutatólaboratóriumi háttérrel igényelnek):

- részletes kórelőzmény (életkor, fajta, családtörténet, korábbi vérzéses epizódok, előzetes gyógyszeres kezelés),
- fizikális vizsgálat (a vérzések jellege, fennálló egyéb betegségek),
- vérzési idő,
- thrombocytaszám,
- vérlemezke-morfológia festett vérkenetben,
- véralvadási vizsgálatok (APTI, PTI, fibrinogénszint, FDP/D-dimer),
- véralvadék retrakció\*,
- von Willebrand faktor (vWf) teszt,
- thrombocyta-retenció üvegyöngyökön\*,
- aggregációs vizsgálatok,
- thrombocyta-release vizsgálat\*,
- thrombocyta-funkció analízis\*,
- a vérlemezkék ATP/ADP arányának meghatározása\*,
- glükoprotein-receptorok vizsgálata\*,
- prokoaguláns aktivitás mérése\*.

Leggyakoribb ezek közül az aggregációs készség vizsgálata (Stokol 2000, Jain 1993).

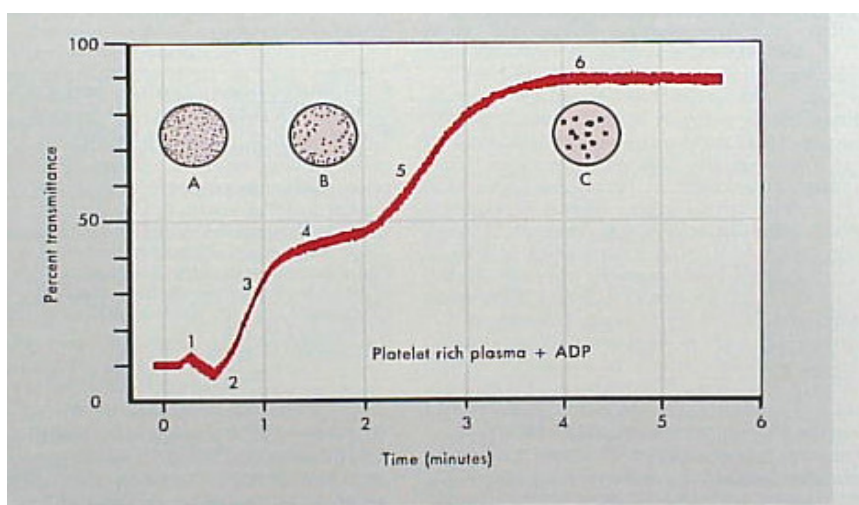
Több tanulmány foglalkozik a vérlemezke-aggregáció jellemzőivel állatokban (Sinakos és Caen 1967, Mason és Read 1967, Donner és Houskova 1972, Dodds 1978, MacMillan és Sin 1970, Clemmons és Meyers 1984, Soloviev et al. 1997). A funkciókárosodás kimutatására számos

módszer ismert az egyszerűbbektől (pl. mikroszkópos, sejtszámláláson alapuló; Sinakos 1967 Frojmovic et al. 1989) a bonyolultabbakig (optikai, teljes vér impedancia, mechanikai; Born 1962, Kurata 1995, Soloviev 1997). A vizsgálatok lényege, hogy thrombocyta-szuszpenzióhoz vagy teljes vérhez aggregáló ágenst adva a vérlemezkék in vitro aggregálódnak, aminek mértéke számszerűsíthető. A legtöbb vizsgálat ezek közül nem tartozik a rutin diagnosztikai eljárások közé, speciális laboratóriumi felszereltséget és mintakezelést igényel. Munkánk során a napjainkban általánosan elterjedt optikai és az állatorvosi gyakorlatban még kevésbé ismert mechanikai aggregáción alapuló módszereket alkalmaztunk.

### **Optikai aggregometriás vizsgálatok**

A módszer során teljes, citrátos vér alacsony fordulatszámon történő centrifugálásával nyert mintát (PRP) használunk. A minta vérlemezke-számát a teljes vér nagy fordulatszámon történő továbbcentrifugálásával nyert plazmával (thrombocytaszegény plazma, PPP) állítjuk be. A mintához különböző aggregációs reagenst adva a vérlemezkék összezapódnak, megváltoztatva a PRP fényáteresztő-képességét, azaz optikai sűrűségét. A PRP optikai sűrűségét 100%-nak, fényáteresztő képességét pedig 0%-nak tekintjük (a thrombocyták nem aggregálódnak, az aggregáció mértéke 0%), a PPP optikai sűrűsége 0%, fényáteresztő képessége pedig 100% (az aggregáció mértéke elméletileg 100%). Az agonista hozzáadása után az aggregátumok képződésével egyidejűleg az oldat fényáteresztő-képessége folyamatosan nő, mert az összezapódó thrombocyták között több fény jut át a küvettán. Ez tehát az oldat optikai sűrűségének csökkenését okozza, megközelítve a PPP-jét. A folyamat egy görbével írható le, aminek amplitúdója az a pont (%-ban), ahol az aggregáció eléri a maximumát.

Az aggregációs görbe egészséges kutyákban különböző fázisokból áll az alkalmazott reagens típusától és koncentrációjától függően. A reagens beadása után általában egy rövid, negatív irányba történő kitérés jelzi a vérlemezkék alakváltozását. Ezt követi a primer fázis, ami az agonistára adott azonnali hatás, a thrombocyta-trombusok képződésének kezdete. A szekunder fázis a már aggregálódott vérlemezkék granulumaiból a release-reakció során kiürülő ADP és az egyéb faktorok további aggregációt kiváltó hatását mutatja (Jones 1979, Hoffbrand és Pettit 1997). A reagens típusától függően előfordul, hogy az agonista beadása után nincs azonnali aggregáció, hanem csak néhány másodperces késedelem, azaz lagfázis után. Ekkor a görbe nem mozdul el az alapvonalról. Az aggregáció lehet reverzibilis, amikor a vérlemezkék az aggregációs maximum elérése után szétválhatnak, diszaggregálódnak, és irreverzibilis, amikor együtt maradnak (Avram et al. 2001). Az aggregációs görbe jellemzőit a **2. ábrán** mutatjuk be.



**2. ábra. Tipikus görbe ADP-indukálta aggregáció során emberben, bifázisos, irreverzibilis jellegű.**

1: a reagens beadása 2: alakváltozás 3: primer aggregáció 4: release-reakció 5: szekunder aggregáció 6: aggregációs maximum (Forrás: LW Powers, Diagnostic Haematology. Clinical and Technical Principles. Mosby, 1989).

A thrombocyt-funkciókkal kapcsolatos vizsgálatok célja a következő volt:

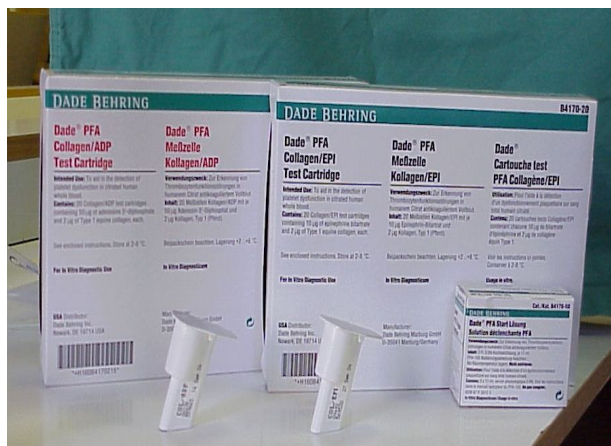
- Az ADP- EPI-és risztomicin-indukálta thrombocyt-aggregációjának tanulmányozása Carat TX4 optikai aggregométerrel, amit elsőként alkalmaztunk állatorvosi célokra.
- Az általunk használt koncentrációk esetén egészséges kutyákban a standard értékek meghatározása, az adott reagens esetében várható aggregációs maximum megállapítása és az aggregációs görbe jellemzőinek leírása.
- Néhány betegség hatásának vizsgálata a különböző induktorokkal végzett thrombocyt-aggregációra, a változás jellegének leírása.
- Két ismert NSAID, a ketoprofén (ketoprofen) és a karprofén (carprofen) hosszú távú alkalmazásának hatásvizsgálata az ADP- és EPI-indukálta thrombocyt-aggregációra.

### **Mechanikai aggregációs vizsgálatok: a PFA-100 funkcióanalizátor**

A thrombocyt-funkciót vizsgáló eljárások, ahogy az előbbiekből kiderült, speciális felszereltséget és mintakezelést igényelnek. Ezek gyakran időrablóak, és számos hibalehetőséget rejtenek magukban (Callan és Giger 2001, Francis et al. 1999). Az igény az aggregometriában is megvan egyszerű, de mégis megbízható mérési technikák és mérőműszerek kifejlesztésére. Ilyen készüléknek ígérzik a viszonylag új, az állatorvosi medicinában még alig használatos PFA-100 thrombocyt-funkció analizátor (Dade-Behring Inc., USA, CA, **3. ábra**).



3. ábra. A PFA-100 mérés közben



4. ábra. A PFA-100 egyszer használatos ADP és EPI patronjai

A PFA-100 egy viszonylag új, elsőként a humánorvosi gyakorlatban alkalmazott “point-of-care” készülék (Kundu et al. 1997), amely teljes mértékben alkalmas mind a veleszületett, mind a szerzett thrombocyt-funkció károsodások gyors és egyszerű vizsgálatára (Callan és Giger 2001). Emberekben manapság teljes mértékben kiváltja a vérzési idő mérését, ami pedig sokáig a vérlemezkefunkció károsodásának legmegbízhatóbbnak tartott indikátora volt (Francis et al. 1999). A műszer képes a vérlemezke adhéziójának és aggregációjának *in vitro* meghatározására. A vizsgálat teljes vérből történik, egyszer használatos patronokkal (4. ábra), a reakció közegben pedig magas áramlási viszonyokat („high shear”) teremt. Mindezekkel a szervezet fiziológiás környezeti viszonyait igyekszik létrehozni (Kottke-Marchant et al. 1999).

A korábbi, emberi vérmintákkal elvégzett vizsgálatok szerint a PFA-100 eredményei szoros korrelációt mutatnak a teljes vérből vagy thrombocyt dús plazmából (PRP) végzett aggregációs vizsgálatok eredményeivel (Francis et al. 1990, Mammen et al. 1998, Dade Behring 2002, Kottke-Marchant et al. 1999). Az első, állatorvosi alkalmazásról szóló tanulmány 1998-ban jelent meg (Keidel és Mischke 1998). Mische és Keidel (2002) a műszer pontosságát és a vérminta maximális tárolási idejét is értékelték kutyában, és két órában maximalizálták azt az időt, ami a vérvétel és az analízis között eltelhet. Callan és Giger egészséges és kisszámú, optikai aggregációval thrombopathiásnak bizonyult kutyákban tesztelték a PFA-100-t. Az ADP-CT az esetek többségében, az EPI-CT pedig minden esetben túlhaladta a 300 másodpercet a beteg kutyákban. Munkánk során a karprofén és a ketoprofén hosszú távú, terápiás dózisu alkalmazásának thrombocyt-funkcióra gyakorolt hatását vizsgáltuk a PFA-100 thrombocyt-funkció analízátorral.



## 1. 5. Az értekezés célja

A Bevezetőből kitűnik, hogy az állatorvoslásban a vérlemezkékkel kapcsolatos ismereteink még bővítésre szorulnak. A legtöbb velük kapcsolatos vizsgálati módszer még kevésbé elterjedt és nem rutinszerű, a leírt tudományos publikációk pedig sok ellentmondást tartalmaznak. Ennek szellemében fogalmaztuk meg céljainkat, amelyek a következők voltak:

- A Kórházunkban előforduló, thrombocytaszám eltérést mutató kutyák betegség szerinti csoportosítása; annak megállapítása, hogy a thrombocytopenia vagy thrombocytosis Magyarországon milyen kórképekben, milyen gyakorisággal fordul elő.
- Egy egyszerű festési eljárással, a Giemsa-festéssel a vérlemezkék morfológiájának tanulmányozása egészséges és beteg kutyákban; annak vizsgálata, hogy különböző betegségekben milyen morfológiai eltérések jelenhetnek meg; illetve annak megállapítása, hogy a talált morfológiai elváltozás specifikus lehet-e az adott betegségre.
- Specifikus festési eljárás (PAS-festés) alkalmazása: a vérlemezke-glikogéntartalom változásának nyomon követése különböző kórformákban. Összefüggés keresése az alpbántalom és az észlelt eltérések között.
- Az optikai aggregometria tanulmányozása három reagens (ADP, EPI és risztomicin) segítségével; annak vizsgálata, hogy különböző betegségek hogyan befolyásolják az adott reagensre adott aggregációs választ.
- Egy új thrombocytafunkció analízáló készülék (PFA-100) kipróbálása egészséges kutyákon; annak vizsgálata, hogy karprofénnel vagy ketoprofénnel terápiás dózisban kezelt állatokban kimutatható-e a vérlemezke funkció megváltozása.

## 2. Anyagok és módszerek

### A thrombocyták mennyiségi viszonyai

Munkánk kezdetén a laboratóriumban előforduló vérmintákat szűrőpróbaszerűen a szerint elemeztük, hogy az esetlegesen fennálló thrombocytopenia (n=212) vagy thrombocytosis (n=89) leggyakoribb okait összegyűjtjük.

### Morfológiai vizsgálatok

#### *Állatok*

Kétszázegy különböző fajtájú, korú és ivarú kutya vérmintáját használtuk, amelyek a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Belgyógyászati Tanszékének beteganyagából és egészséges kutyákból származtak.

- kontrollcsoport (n=20); egészséges kutyák
- beteg csoport (n=181); ebből 84 kutya közvetlenül a vérképzőszervet érintő betegségben, 97 pedig egyéb betegségben szenvedett.

A végső diagnózisra alapozva a betegségek megoszlását a **4. táblázat** mutatja.

#### *Mintagyűjtés, festés, fénymikroszkópos elbírálás*

A Giemsa-festéshez 3,8%-os nátrium-citrát oldatot tartalmazó gyári vákuumos csőbe vettünk vénás vért a V. cephalica antebrachii-ből illetve a V. saphena-ból 18–20 G-s tűvel. Állatonként két vérkenetet készítettünk és Giemsa-szerint megfestettük (Bessis 1972). A mintákat minden esetben 24 órán belül feldolgoztuk. A vérkenetet először 400x-os nagyítással vizsgáltuk, hogy megbecsüljük a thrombocytaszámot, és észlelhessük az esetleges aggregátumképződést. A finomabb morfológiai eltérések vizsgálatára 1000x-es nagyítást és immerziós objektívet használtunk. Az állat vérlemezke számától függően 50–100 sejt értékelését végeztük el. Az elbírálás szempontjai a következők voltak:

- festődési sajátosságok,
- méretbeli eltérések,
- polymorphismus jelenléte,
- aktivált és nemaktivált formák megjelenése,
- élettani és kóros granuláció előfordulása,
- citoplazma-vakuolizáció,

- egyéb morfológiai eltérések.

**4. táblázat. A vizsgálatban szereplők állatok besorolása.**

Csoportok	
<i>Kontrollcsoport</i> (n=20)	<i>egészséges kutyák</i>
<i>Betegcsoport</i> (n=181)*	<i>kórképek, betegségek</i>
n=84, eltérő hematológiai paraméterekkel	vérzés, haemolysis (18), babesiosis (48), immun-haemolyticus anaemia (19)
n=97, élettani hematológiai paraméterekkel	vérképzőszervi megbetegedések (15): ITP, lymphoma, CLL, erythroid myelosis, CML, esszenciális thrombocytaemia, polycytaemia vera, panmyelophthisis
	májbetegségek (60): posthaemorrhagicus vagy posthaemolyticus hepatopathia, májlipidosis, hepatitis, pancreatitishez kapcsolódó hepatopathia, hepato-encephalopathia, toxicus hepatopathia, májdaganat, egyéb
	vesebetegségek (41): tubuláris nephrosis, IRC, IRA, glomerulonephritis, vesedysplasia, oxalátnephrosis
	daganatos kórformák (22): mellúri, hasúri, bél-, húgyhólyag-, léphaemangioma, gyomor-, máj-, emlő-, bőr-, méhdaganat
	gastrointestinalis kórképek (35): haemorrhagiás gastroenteritis, ascariidosis, fehérjevesztéses enteropathia, ileus, pancreatitis
	szív- és érrendszeri betegségek (11): HCM, DCM, AV-blokk, mitralis vagy tricuspidalis insufficiencia, myocarditis, aorta stenosis, haemopericardium
	endokrin kórképek (11): DM, Cushing-kór, hypoadrenocorticismus, hypothyreosis
	szepszis (20)

\*: Néhány állatot több alcsoportba is besoroltunk.

*Rövidítések:* ITP: immunmediált thrombocytopenia, CLL: krónikus lymphoid leukaemia, CML: krónikus myeloid leukaemia, IRC: krónikus veseelégtelenség, IRA: akut veseelégtelenség, HC: hypertrophiás cardiomyopathia, DCM: dilatációs cardiomyopathia, DM: diabetes mellitus

Mint ahogy a 4. táblázatból kitűnik, egy-egy állat több betegségben is szenvedett. Esetükben a megfigyelt morfológiai eltérés nehezen tudtuk volna egy adott kórképhez kapcsolni, így az összes alapbántalomnál feltűntettük.

A PAS-festéshez K-EDTA tartalmú gyári vérvételi csőbe gyűjtöttünk vérmintákat, majd ezekből a mintavétel után azonnal vékony keneteket készítetünk és ezeket perjódsavas Schiff-reagenssel megfestettük (Bessis 1972, Szász et al. 1981). A festéshez használt reagenseket a SIGMA-Aldrich Kft.-től szereztük be. A festés menetét az **5. táblázatban** tüntettük fel.

#### 5. táblázat. A PAS-festés lépései

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. 1 %-os, (1,5 g/dl) perjódsav 10 perc,</li><li>2. desztillált víz 2x5 perc,</li><li>3. Schiff-reagens 30 perc,</li><li>4. biszulfidos desztillált vizes mosás,</li><li>5. hematoxin-eozin festés 5 perc (magfestés),</li><li>6. csapvizes mosás (kékítés).</li></ol> |
|--|

A diasztázos PAS-festéstől a vizsgálat során eltekintettünk, mert esetünkben a vérlemezkék PAS-pozitivitását csak a bennük lévő glükogén adja, így más PAS-pozitivitású anyagtól nem kellett elkülöníteni ezeket. Kenetenként 50–100 sejtet bíráltunk el a következő szempontok szerint:

- *PAS-negatív vérlemezkék*, halványan festődő citoplazma, határozatlan sejthatárral,
- *PAS-pozitív vérlemezkék*, halvány citoplazma, amelyben finom vagy rögös acidophil granulomok láthatók.

A granuláció típusa szerint 3 alcsoportot különítettünk el:

- *perifériás*: a granulom(ok) a sejtmembrán közelében látható(k),
- *excentrikus*: a granulom(ok) a citoplazmában látható(k),
- *diffúz*: a finom vagy durva granulomok a citoplazmában szórta helyeződnek, ez gyakran erős acidophil festődést ad a sejtnek.

Az értékelés során a PAS-pozitív és –negatív vérlemezkék arányát és a granuláció jellegét vizsgáltuk. Minden állat esetében megadtuk a vizsgált vérlemezkék százalékos megoszlását, majd kiszámoltuk a csoportátlagokat. Munkánk során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- milyen a PAS szerint megfestett thrombocyták granuláltsága, morfológiája egészséges állatok esetében,
- van-e különbség a kontroll, a vérképzőszervi, illetve az egyéb betegségben szenvedő csoport vérlemezkéinek morfológiai sajátosságai között.

A kenet elemzése során az egyéb vérsejtek festődési sajátosságait is vizsgáltuk, így ellenőriztük a festés sikerességét, kizárva ezzel a technikai hibákból adódó tévesen negatív eredményeket (pl. minden vérsejtípus gyengén festődik).

## Optikai aggregometria

### Állatok

A kutyák a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Belgyógyászati, Sebészeti és Szülészeti Tanszékének beteganyagából, illetve a Triovet Állatorvosi Rendelő páciensei közül került ki. Száztizenöt különféle fajtájú, korú és ivarú kutyát vontunk be a vizsgálatba. Három csoportra osztottuk őket.

1. Kontrollcsoport (n=43): egészséges kutyák, amelyek a megelőző 2 hétben gyógyszeres kezelésben nem részesültek
2. Beteg csoport (n=47): normál hemosztázisú állatok; a betegségek listáját a **6. táblázatban** tüntettük fel.
3. Kezelt csoport (n=25): arthropathia miatt NSAID-kezelésben részesült állatok, amelyek egyéb szempontból egészségesek voltak. Ebbe a csoportba olyan kutyákat vontunk be, amelyek legalább 10 napja terápiás dózisban karprofént (2-4 mg/ttkg/12h) vagy ketoprofént (1 mg/ttkg/24h) kaptak szájon át.

**6. táblázat. Az állatok csoportosítása**

Csoportok	A csoport jellemzői
Kontrollcsoport	egészséges állatok
Beteg csoport	diabetes mellitus, Cushing-kór, diabetes mellitus + Cushing-kór, hypothyreosis, pancreatitis, pancreas fibrosis, gastritis, enteritis haemorrhagia, hepatopathia, lymphoproliferatív betegség, immun-haemolyticus anaemia, coagulopathia, sarcoma, mastocytoma, haemangiosarcoma, emlődaganat, cystitis, prostata hyperplasia, prostatitis, krónikus veseelégtelenség, mitralis insufficiencia, dilatációs cardiomyopathia, encephalopathia, szepszis, Lyme-borreliosis
Kezelt csoport	karprofén 2-4 mg/ttkg/12h vagy ketoprofén 1 mg/kg/24h, legalább 10 napig

### Mintagyűjtés, mintakezelés

Minden állattól 4,5 ml vénás vért vettünk 3,8% Na-citátot tartalmazó gyári vérvételi csőbe az aggregometriához, és további 2,5 ml-t EDTA-tartalmú csőbe a sejtszámlálás elvégzéséhez. Hemolizált, lipémiás vagy icterusos mintákat nem használtunk fel, ahogy olyanokat sem, amelyekben a vérlemezkeszám 150 G/l alatt volt. A mintavétel és a vizsgálat között eltelt idő nem volt több 4 óránál.

A PRP-t a teljes vér kis fordulatszámon (150 g 10 perc; Sink 2002, Moroff és Holme 1991) történő

centrifugálásával nyertük, majd a PPP előállításához a megmaradt vérmintát magas fordulatszámon tovább centrifugáltuk (2000 g, 10 perc).

### Műszerek

TX4 négy csatornás optikai aggregométer (Carat Kft. **5. ábra**)

M-200 két csatornás optikai aggregométer (Omker **6. ábra**)

Servintern Seisystem Labo Centrifuga

Abacus Junior Vet Haemocytometer



**5. ábra. Carat TX4 optikai aggregométer számítógépes összeköttetéssel**



**6. ábra. M-200 optikai aggregométer és rekorder**

### A Carat TX4 optikai aggregométer

A műszer (Entec GmbH, Ilmenau, Germany) olyan Born-típusú négy csatornás optikai aggregométer, amely saját számítógépes szoftvere segítségével a mérések során kapott aggregációs görbék elemzését is elvégzi (megadott görbe-paraméterek: maximális aggregáció, az aggregáció végértéke, a lagfázis ideje stb.). A műszer központi egysége egy infravörös érzékelő segítségével meghatározza a PPP és PRP optikai sűrűségének arányát (Optical Density Ratio, ODR). Az ODR 250–350 között kell, hogy legyen, ugyanis a PRP thrombocytaszáma ekkor optimális. Ha ennél több, a PRP-t a PPP segítségével hígítani kell. Az ODR mellett az aggregométer kijelez egy másik értéket is, ami a PPP fényáteresztő képességével áll arányban. Ha ez a szám kívül esik a 700–900 tartományon, azt mutatja, hogy a PPP nem megfelelő tisztaságú (lipémiás, vagy túl sok vérlemezkét tartalmaz). A mérések során Therocont-reagens kittet (Carat Kft.) és Aggristin plus reagenskészletet (Reanal Finomvegyszergyár Rt.) használtunk fel. Az alkalmazott induktorok végkoncentrációja a reakció során a következő volt:

ADP	10 $\mu\text{mol/l}$
EPI	10 $\mu\text{mol/l}$
Risztomicin	1,5 mg/ml

A vizsgálat kivitelezésekor a gyári instrukciókat vettük figyelembe. A méréseket legalább 4, maximum 10 percig végeztük az irodalom ajánlásai szerint (Zhou és Schmaier 2005, Bennet 1990,

Sink 2002). A rendelkezésre álló vérminta mennyiségétől függően 20 vagy 30 µl reagenst adtunk 180, illetve 270 µl thrombocytadús plazmához, vagyis mindig 1:9 arányban. A kapott aggregációs görbéket a következők szerint elemeztük:

- van-e az adott reagensre aggregációs válasz,
- van-e lagfázis (a reagens beadása után az aggregáció indukálásához szükséges idő),
- van-e alakváltozás (a fényáteresztő képesség csökkenése, a reagens beadása után a görbe negatív irányba való kitérése),
- aggregációs maximum (max.), % (az aggregációs görbe maximális amplitúdója; csoportonkénti átlag, szórás, tartomány megadásával),
- primer és szekunder fázis jelenléte,
- az aggregáció reverzibilitása vagy irreverzibilitása.

## **Mechanikai módszer (PFA-100)**

### *Állatok, műszerek, kísérleti terv*

A vizsgálatba 96 különböző fajtájú, korú és ivarú kutyát vontunk be. A kontrollcsoportot 58 egészséges állat alkotta, amelyek véralvadási mutatói megfelelőek voltak (életteni tartományon belüli vézési idő, hematokritérték, vérlemezkeszám, aktivált parciális tromboplastin idő, protrombin idő). A kezelt csoportba 38 állatot soroltunk be: ezek naponta egyszer 1 mg/ttkg ketoprofént (n=7) vagy naponta kétszer 2–4 mg/ttkg karprofént (n=31) kaptak per os, legalább 10 napon át.

### *A PFA-100 thrombocyta-funkció analízátorral történő mérés*

A mérés során 800 µl teljes, citrátos vért fecskendezünk az adott egyszer használatos **patronba (4. kép)**, aminek kollagénnel bevont kapillárisa induktorként ADP-t vagy epinefrint (EPI) tartalmaz. Az analízátor tulajdonképpen mechanikus aggregométer, ami méri azt az időt, ami ahhoz szükséges, hogy a patron vékony kapillárisában a reagens hatására thrombocyta-aggregátum jöjjön létre. Ez egy idő után elzárja a kapillárist, és megakadályozza a vér további átfolyását. Ez az ún. „záródási idő” (closure time, CT), amelyet a műszer másodpercben jelez ki. A záródási idő a gyári beállítás szerint maximum 300 másodperc lehet, ha az aggregáció ennél hosszabb, „>300 sec” figyelmeztető jelzést kapunk.

### *Mintagyűjtés, mintakezelés*

A vérmintákat, ami kutyánként kb. 5 ml volt, gyári, Na-citrát tartalmú (1:9 v/v) vacutainer csőbe (hemosztázis paraméterek meghatározása, PFA-100 vizsgálat), és K-EDTA-s csőbe (hematológiai

vizsgálat) vettük.

A PFA-100 készülék használata során a gyári előírásokat vettük figyelembe. Minden alkalommal kétféle patront alkalmaztunk (ADP-kollagén, EPI-kollagén), és a méréseket a mintavételt követő két órán belül elvégeztük.

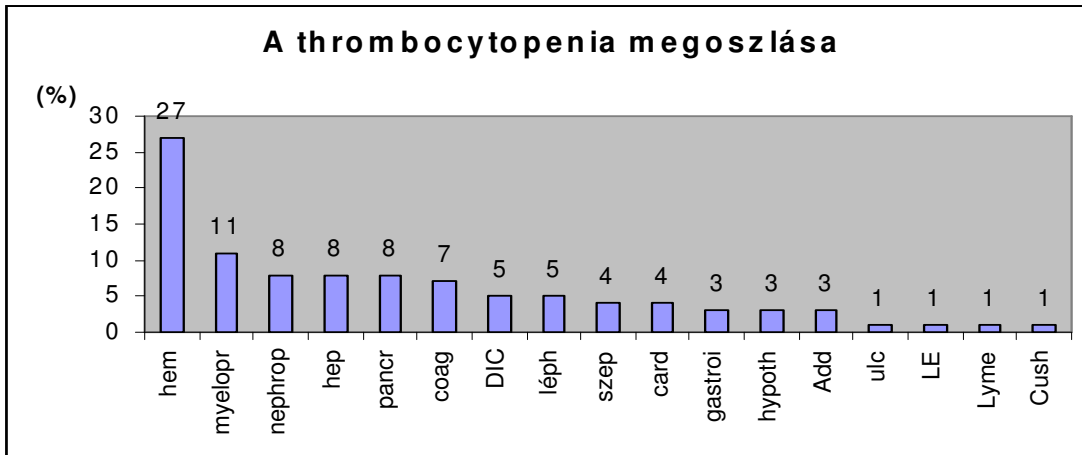
### *Statisztika*

Az eredményeket a következőképpen adtuk meg: átlag±szórás, tartomány. Az egészséges és kezelt csoport értékeit az ADP esetben ANOVA-teszttel hasonlítottuk össze. Az EPI mérések eredményeinél a Kruskal-Wallis „rank sum tesztet” alkalmaztuk, mivel azokban az esetekben, amikor a záródási idő értéke meghaladta a műszer cut-off pontját (>300 sec), nem kaptunk pontos értéket. Az analízáláshoz a R 2.1.1 Language and Environment for Statistical Computing programot használtuk (R Development Core Team 2005).

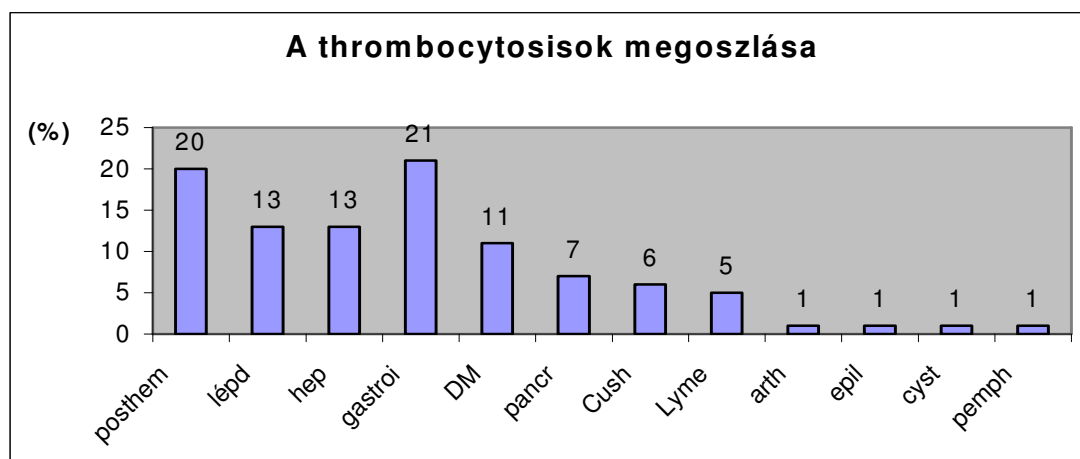


### 3. Eredmények

#### 3. 1. A thrombocyták mennyiségi viszonyai



betegség	rövidítés	esetszám	betegség	rövidítés	esetszám
hemolízis	(hem)	57	szezsizis	(szep)	8
myeloproliferatív b.	(myelopr)	24	cardiomyopathia	(card)	8
nephropathia	(nephrop)	17	gastroenteritis	(gastroi)	6
hepatopathia	(hep)	17	hypothyreosis	(hypoth)	6
pancreatitis	(pancr)	17	Addison-kór	(Add)	6
coagulopathia	(coag)	14	ulcus	(ulc)	2
DIC	DIC	11	lupus erythematosus	(LE)	2
léphaemangioma	(léph)	11	Lyme-borreliosis	(Lyme)	2
			Cushing-kór	(Cush)	2



betegség	rövidítés	esetszám	betegség	rövidítés	esetszám
posthaemolyticus anaemia	(posthem)	18	Cushing-kór	(Cush)	5
léphaemangioma	(lépd)	12	Lyme-borreliosis	(Lyme)	3
hepatopathia	(hep)	12	arthritus	(arth)	1
gastroenteritis	(gastroi)	19	genuin epilepsia	(epil)	1
diabetes mellitus	(DM)	10	cysta ovarii	(cyst)	1
pancreatitis	(pancr)	6	pemphigus	(pemph)	1

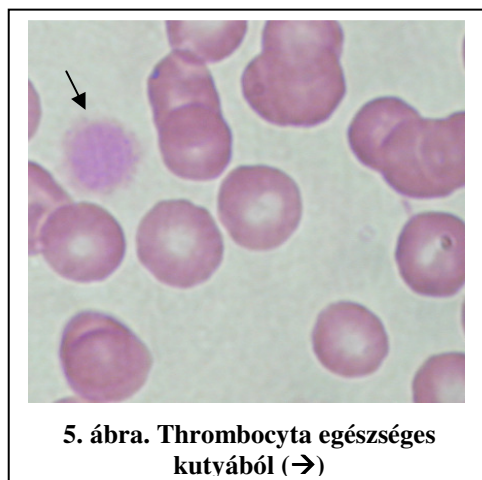
### 3. 2. Morfológiai vizsgálatok

Az alább közölt ábrák 100x-es nagyítással, Giemsa-szerint (**5–12. ábra**), illetve PAS-szerint (**13. ábra**) megfestett vérkenetéről készültek.

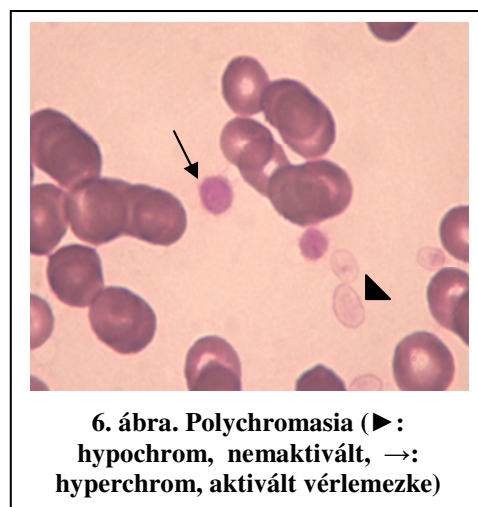
#### Giemsa-festés

#### *Festődési sajátosságok*

- A kontrollcsoport vérlemezkéi egységesen halványkék festődésűek voltak, általában jól elkülönülő granulomer és hialomer zónával (**5. ábra**).

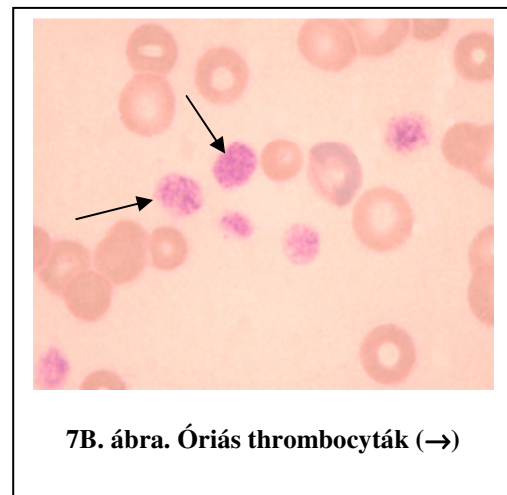
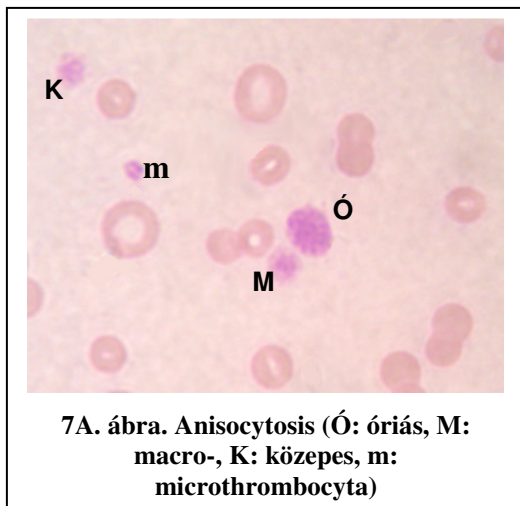


- Polychromasia (polychromophilia) eltérő gyakoriságban fordult elő a beteg állatokban (**6. ábra**). Vérzéssel (pl. thymus apoplexia) és hemolízissel (pl. immunhaemolyticus anaemia: IHA) járó betegségekben jelentek meg a legnagyobb arányban, de gyakoriak voltak nephropathia, gastrointestinalis megbetegedések, diabetes mellitus és hyperadrenocorticismus során is.



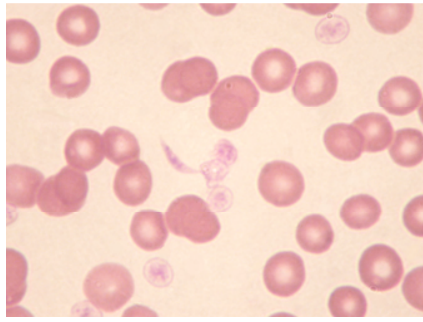
### Méretbeli eltérések

- Egészséges állatokban zömmel közepes nagyságú vérlemezkék fordultak elő, néhány macrocyta társaságában.
- Anisocytosis minden betegcsoportban előfordult, kivéve az immunhaemolyticus anaemiát. Legszembetűnőbb anisocytosis hyperadrenocorticismusban és diabetes mellitusban tapasztaltam, kevésbé gyakrabban pedig daganatos kórképekkel kapcsolatban.
- A microcyták vagy óriás vérlemezkék dominanciája nagyon ritkán volt megfigyelhető. Nephropathiában, májdaganat során, hyperadrenocorticismusban és diabetes mellitusban a microcyták száma meghaladta az egyéb méretű vérlemezkékét (**7A. ábra**). Az óriás vérlemezkék nagyszámú megjelenése leginkább a vérzéssel és hemolízissel járó kórképekre volt jellemző (**7B. ábra**), előfordultak még hepatopathiában, lép haemangioma, pancreatitis és hypoadrenocorticismus során.



### Polymorphismus

- A kontroll ebekben csak kerek és ovális alakú thrombocyták fordultak elő.
- A betegek között a polimorfizmus számos formája előfordult. A leggyakrabbak a következők voltak: vessző-, masni-, szalagforma. Egyes kórképekben, mint a lymphoma vagy az immunmediált thrombocytopenia, polimorfizmus nem volt tapasztalható. A súlyos vérzéssel kísért thymus apoplexiában észleltük a legtöbb alakbeli változatosságot (**8. ábra**).

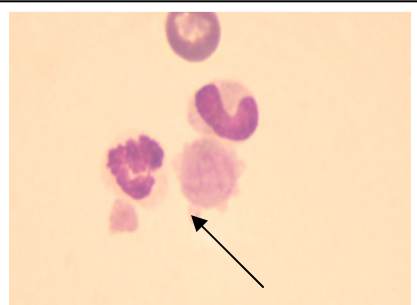


**8. ábra. Poikilocytosis**

#### *Aktivált és nemaktivált formák megjelenése*

Az aktiváció morfológiai jele a vékony, póklábszerű citoplazma-nyúlványok kialakulása a vérlemezke felszínén. A „kórosan aktivált” vagy „nemaktivált” vérlemezkék definiálására a szakirodalomban nincs megfelelő megjelölés. Vizsgálataink során ezért saját elhatározásunkból akkor tekintettük kórosnak a nemaktivált vérlemezkék jelenlétét, ha számuk meghaladta az összes vérlemezkének 50%-át, illetve ha egyidejűleg egyéb morfológiai eltérést is mutattak (pl. hypochromasia, vakuolizáció).

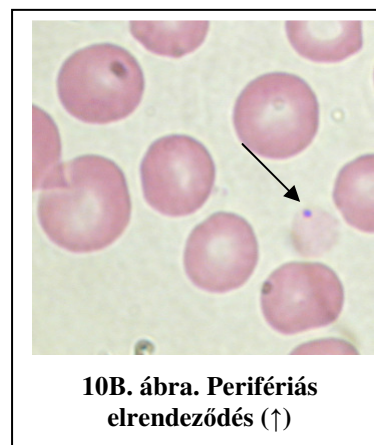
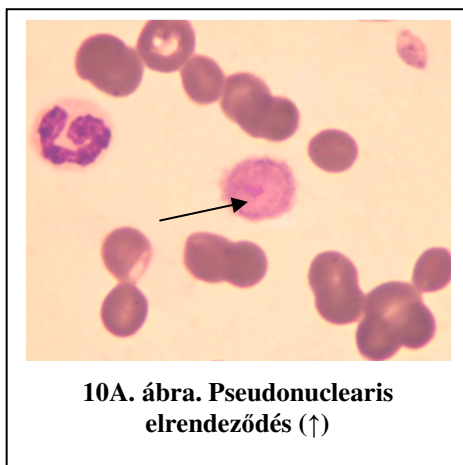
- Egészséges állatok vérkenetében kb. egyenlő arányban voltak jelen aktivált és nemaktivált thrombocyták.
- A nemaktivált vérlemezkék nagy aránya volt megfigyelhető thymus apoplexiában (**6. ábra**), kisebb arányban nephropathiában és néhány egyéb betegségben.
- Az élettanitól eltérő, vaskos citoplazma nyúlványok megjelenését tapasztaltuk néhány haemolyticus kórkép során (pl. IHA, babesiosis), illetve hepatopathiákban, lép haemangiomában és szepszisben (**9. ábra**).



**9. ábra. Extrém aktiváció, vaskos citoplazma-nyúlvány óriás thrombocytán (↑)**

### *Élettani és kóros granuláció előfordulása*

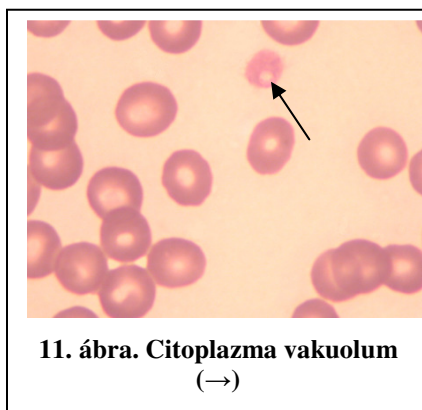
- Egészséges kutyák vérlemezkéinek citoplazmájában finom, diffúz, azurophil granulumokat lehetett megfigyelni.
- A beteg csoportban a kóros granulációnak kétféle formájával lehetett találkozni.
  - A „*magszerű elrendeződés*” során a durva granulumok a sejt közepén csoportosultak, ezáltal a vérlemezke magvas sejt benyomását keltette („*pseudonuclearis*” elrendeződés; **10A. ábra**).
  - A „*perifériás elrendeződés*” folyamán a sejt széléhez közel, excentrikusan, egy vagy több nagy, jól festődő granulum volt megfigyelhető (**10B. ábra**).



A patológiás granuláció kevésbé intenzívebb vagy erőteljesebb formájával minden betegcsoportban találkoztunk. A perifériás elrendeződés jóval gyakrabban fordult elő, mint a pseudonuclearis. Thymus apoplexiában, hyperadrenocorticismusban és diabetes mellitusban láttunk a leggyakrabban kóros, kifejezett granulációt mutató vérlemezkéket. Megfigyelhetők voltak még IHA-ban, hepatopathiában és egyes daganatos kórképeknél (pl. béldaganat, májdaganat, léphaemangioma). A granulumok magszerű elrendeződése IHA-ban, egyes szívbetegségekben, esszenciális thrombocytaemiában, babesiosisban, hepatopathiában és egyes daganatok esetén volt látható. ITP és bőrgyulladások fennállásakor a vérlemezkék nem mutattak kóros granulációt.

### *Citoplazma-vakuolizáció*

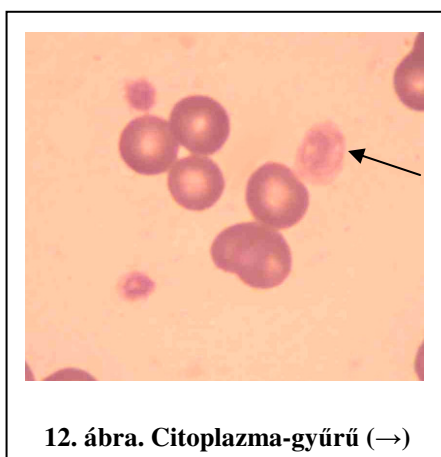
- Egészséges kutyákban nem fordult elő.
- Egy vagy több vakuolum megjelenése sokszor volt tapasztalható a beteg állatokban függetlenül a kórformától. Leggyakrabban thymus apoplexiában volt látható, de gyakori jelenség volt pancreatitisben, diabetes mellitusban és Cushing-kórban is (**11. ábra**).



**11. ábra. Citoplazma vakuolum**  
(→)

### *Egyéb morfológiai eltérések*

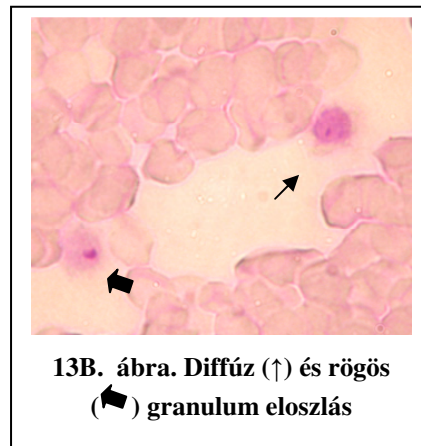
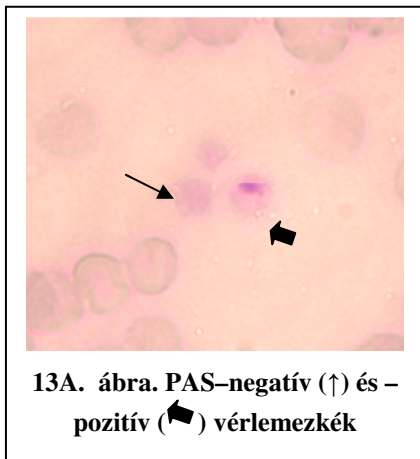
Néhány thrombocytában találtunk egy korábban nem ismert, valószínűleg élettani jelenséget, amely mind az egészséges, mind a beteg csoportban előfordult. Ez egy vékony, azurophil gyűrű megjelenése volt a sejt perifériájához közel (**12. ábra**), ami az érintett egyedek vérlemezkéinek nem több mint 1%-ában fordult elő.



**12. ábra. Citoplazma-gyűrű (→)**

### PAS-festés

A PAS-szerint festett vérkenetekben a PAS-negatív (**13A. ábra**) és –pozitív (glükogén-szemcséket tartalmazó) vérlemezkék aránya csoportonként és betegségenként eltért egymástól. A PAS-pozitivitást granulomok vagy lokálisan vagy, diffúzan helyeződtek. A lokális helyeződés esetében a sejt perifériáján csoportosultak közel a sejtmembránhoz, vagy a citoplazmában, excentrikusan helyeződtek. Mindkét esetben erős festődést mutattak (**13A. és 13B. ábra**). Diffúz eloszláskor számos finom vagy durvább szemcsékként terültek szét a citoplazmában, jellegzetes erős acidophil festődést adva ezzel a vérlemezkének (**13B. ábra**).



- Egészséges állatokban a vérlemezkek nagyobb hányada (62%-a) PAS-negatívan festődött. A PAS-pozitív sejtek között többségben voltak a perifériás vagy excentrikus granulumot tartalmazó alakok, és a granuláció egyszer sem volt erőteljes.
- Azokban a betegekben, amelyekben hematológiai eltérés volt tapasztalható, a PAS-pozitív vérlemezkek aránya megnőtt (>65%). A vérzéssel vagy hemolízissel járó kórképekben kifejezett, excentrikus PAS-pozitív granulum megjelenése volt tapasztalható. ITP-ben a pozitív granulumok eloszlása diffúz volt. Pyometra és diabetes mellitus esetén majdnem minden vérlemezke PAS-pozitívan festődött. Arányuk szintén magasabb volt szepszisben, nephropathiában és a daganatos betegségekben. Ezekben a kórformákban az erősen festődő granulumok megjelenése volt jellemző. Nephropathiában a granulumok főleg a sejt perifériáján mutatkoztak, pyometra és szepszis esetén pedig inkább excentrikusan.

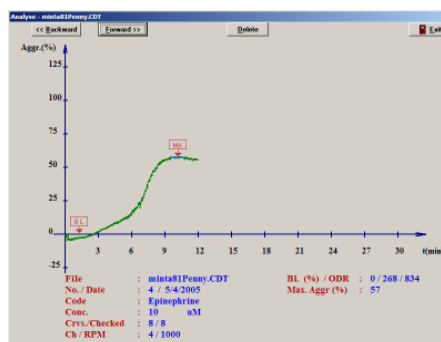
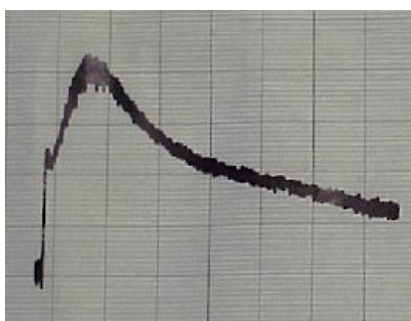


### 3. 3. Optikai aggregometria

7. táblázat. Egészséges kutyák thrombocytáinak aggregációs vizsgálata

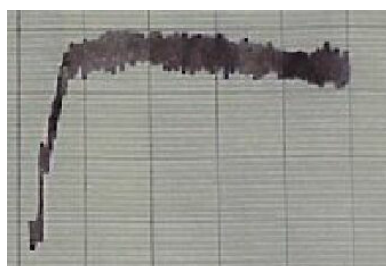
Van-e	ADP (10 µmol/l) (n=43)	EPI (10 µmol/l) (n=29)	Risztomicin (1,5 mg/ml) (n=21)
- aggregációs válasz	mindig	13 esetben (45%)	9 esetben (42%)
- alakváltozás az aggregáció előtt	mindig	soha	mindig
- csak alakváltozás, aggregációs válasz nélkül	soha	soha	6 esetben (28%)
- lagfázis	soha	9 esetben (31%), 3-8 sec	soha
Aggregációs max (átlag±szórás)	41 ± 18	34 ± 20	37 ± 24
tartomány	13 – 87	8 – 57	14 – 84
Az aggregációs görbe jellemzői	kétfázisú reverzibilis/ irreverzibilis	egy- vagy kétfázisú irreverzibilis	két- vagy egyfázisú irreverzibilis

Egészséges kutyákban csak az ADP indukált aggregációt minden állatban (14. ábra), EPI és risztomicin (15. és 16. ábra) esetében változatos válaszokat kaptunk. A különböző induktorokra adott aggregációs maximumok átlaga hasonlóan adódott. Az egyedi értékek mind a három ágens esetében igen tág határon belül mozogtak.



14. ábra. ADP-indukálta aggregációs válasz egészséges kutyában, kétfázisú, reverzibilis (M-200 aggregométerrel)

15. ábra. EPI-indukálta aggregációs válasz egészséges kutyában. Lagfázissal, egyfázisú, irreverzibilis (Carat TX4 aggregométerrel)



16. ábra. Risztomicin-indukálta aggregációs válasz egészséges kutyában. Kétfázisú, irreverzibilis (M-200 aggregométerrel)

8. táblázat. Beteg kutyák thrombocytáinak aggregációs vizsgálata

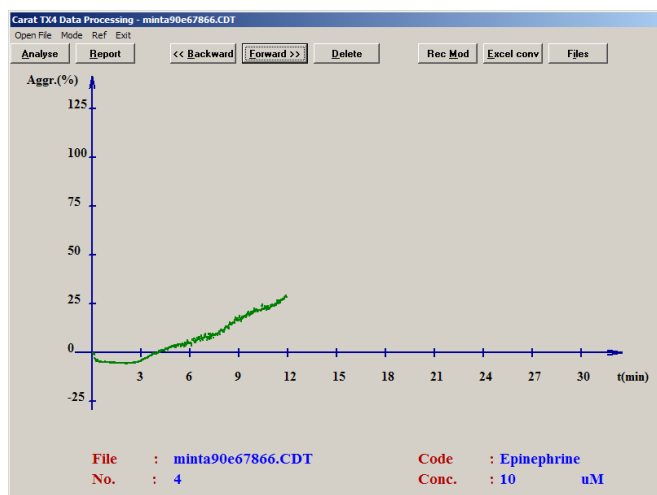
	ADP (10 µmol/l)	EPI (10 µmol/l)	Risztomicin (1,5 mg/ml)
<b>Aggregációs válasz</b>	mindig	változatos	változatos
<b>Alakváltozás az aggregációs válasz előtt</b>	mindig	soha	aggregációs válasz esetén mindig
<b>Csak alakváltozás, aggregációs válasz nélkül</b>	soha	soha	diabetes mellitus, hepatopathia, krónikus veseelégtelenség, Lyme-borreliosis
<b>Lagfázis jelenléte</b>	soha	gyakran, 3-5 sec: lymphoproliferatív bet., mastocytoma	5–30 sec: cystitis, mitralis insufficiencia, Lyme-borreliosis, haemangiosarcoma, DCMP
<b>Fokozott aggregációs válasz (aggregációs max., %)</b>	diabetes mellitus (78)*, Cushing-kór (98), pancreas fibrosis (74), lymphoproliferatív bet. (98), krónikus veseelégtelenség (63)	mastocytoma (63)	diabetes mellitus (63), immunhaemolyticus anaemia (50), haemangiosarcoma (53)
<b>Csökkent aggregációs válasz (aggregációs max., %)</b>	sarcoma (29), mastocytoma (31), emlődaganat (11), krónikus veseelégtelenség (11), DCMP (21), encephalopathia (28), szepszis (11)	lymphoproliferatív betegség (5)	pancreas-fibrosis (19), lymphoproliferatív betegség (19), DCMP (19)
<b>A görbe lefutásának (jellegének) megváltozása</b>	nem	nem	reverzibilis: Cushing-kór, hepatopathia esetében

\*: A zárójelben szereplő számok az adott kórformában jellemző aggregációs maximumok átlagértékei (%)

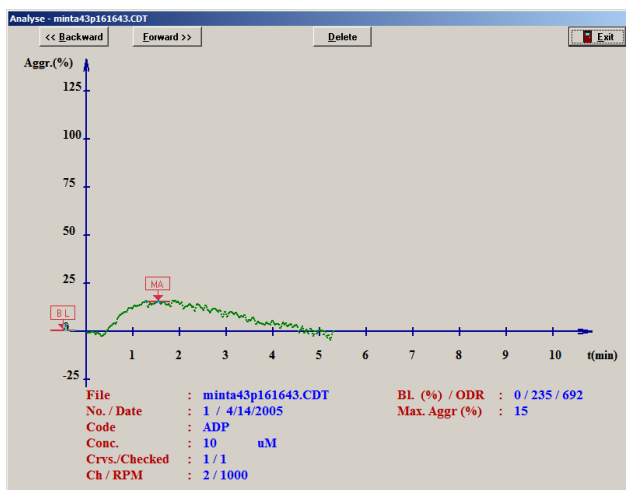
A beteg csoportban az adott betegségekben tapasztalt aggregációs maximum átlagait hasonlítottuk össze az egészséges csoportra jellemző átlagértékkel. Az ADP minden esetben indukált aggregációt, azonban EPI és risztomicin esetén, az egészséges állatokhoz hasonlóan, változatos válaszokat kaptunk. Az alakváltozás előfordulását illetően nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az egészséges állatokhoz képest, azonban a risztomicin-indukálta válasz egyes esetekben csak alakváltozásban nyilvánult meg, amit tényleges aggregáció nem követett. A görbe jellege nem változott egyik betegségben sem, bár Cushing-kór és hepatopathia esetében a risztomicin-indukálta válaszok között reverzibilis folyamattal is találkoztunk. Risztomicin esetén néhány betegség kapcsán lagfázis megjelenését észleltük, amelynek ideje a fél percet is elérte. EPI-esetében néha

késedelmes aggregáció volt tapasztalható, vagyis a folyamat még 12 perc alatt sem érte el maximumát (**17. ábra**). Számos kórkép befolyásolta az aggregációs választ. Krónikus veseelégtelenségben az ADP-indukálta aggregációban egyaránt megfigyelhető volt az aggregációs maximum növekedése és csökkenése. A legerélyesebb növekedés lymphoma és Cushing-kór esetén jelentkezett. Risztomicin esetében a legnagyobb aggregációs maximum diabetes mellitusban fordult elő. A többi betegség csak kisfokban növelte vagy csökkentette az aggregációs maximumot. Megfigyelhető, hogy egyes kórképek ellentétesen hatottak az aggregációra aszerint, hogy milyen reagensekkel végeztük a vizsgálatot (pl. mastocytoma esetén az ADP-re csökkent, EPI-re megnőtt aggregációs maximumot észleltünk, **18. és 19. ábra**; lymphomában fokozott aggregációs készség jelentkezett ADP-re, de csökkent EPI-re (**20. ábra**).

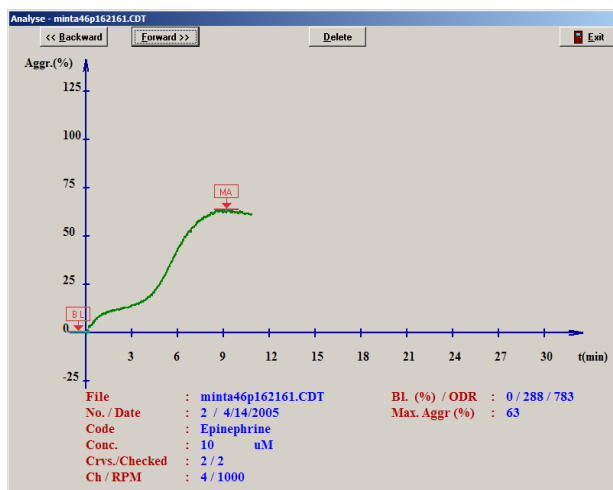
Egyes betegségek (pl. gastroenteritis, hepatopathia, cystitis, prostatitis) egyáltalán nem befolyásolták az aggregáció mértékét.



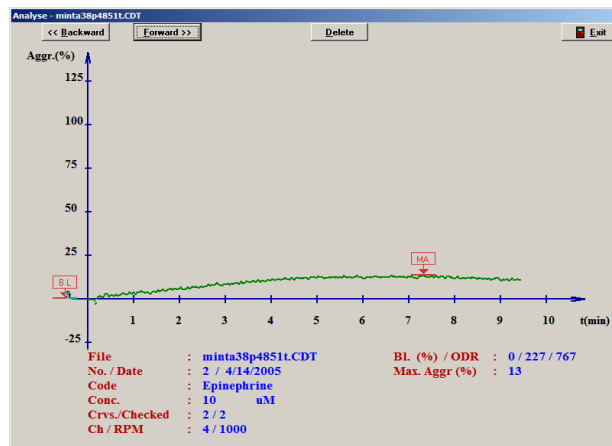
**17. ábra. Késleltetett aggregációs válasz lagfázissal EPI esetében (Carat TX4)**



**18. ábra. Csökkent aggregációs válasz ADP-re mastocytomában (Carat TX4)**



**19. ábra Fokozott aggregációs válasz EPI-re mastocytomában (Carat TX4)**



20. ábra Csökkent aggregációs válasz EPI-re lymphomában (Carat TX4)

9. táblázat. Kezelt kutyák thrombocytáinak aggregációs vizsgálata

	Ketoprofén		Karpofén	
	ADP (10 µmol/l) (n=9)	EPI (10 µmol/l) (n=9)	ADP (10 µmol/l) (n=16)	EPI (10 µmol/l) (n=16)
Aggregációs válasz	mindig	6 esetben (67%)	mindig	9 esetben (56%)
Alakváltozás az aggregációs válasz előtt	mindig	nem	mindig	nem
Csak alakváltozás, aggregációs válasz nélkül	nem	nem	nem	nem
Lagfázis	nem	nem	nem	8 esetben (50%), 3-6 sec
Aggregációs max.(%) átlag ±SD	23* ± 7	14* ± 4	43 ± 19	35 ± 21
Tartomány (minimum-maximum)	13 – 38	9–19	16– 70	9 – 62
A görbe jellegének megváltozása	nem	nem	nem	nem

\* szignifikánsan alacsonyabb értékek, mint az egészséges állatokban (p<0.05)

A karpofén kezelésben részesült állatokban az ADP-re és EPI-re adott aggregációs válaszok hasonlóak voltak az egészséges csoportéhoz. A ketoprofénrel kezelt kutyákban az ADP-indukálta aggregációs maximum csupán 61%-a, az EPI-indukálta aggregációs maximum pedig 41%-a volt az egészséges állatokénak. A két vizsgált NSAID az alakváltozást, a lagfázist, illetve a görbe jellegét nem befolyásolta.

### 3. 4. Mechanikai módszer:

#### A PFA-100 thrombocyta-funkcióanalizátorral végzett vizsgálatok

Az egészséges és beteg csoportokra kapott záródási időket a **10. táblázatban** tüntettük fel. Mind a karprofén, mind a ketoprofén a záródási idők kismértékű, de nem szignifikáns megnyúlását okozta ( $P > 10\%$  az ADP-CT és  $P = 5.7\%$  az EPI-CT esetén).

#### 10. táblázat. Záródási idők és tartományok az egészséges és a kezelt állatokban.

(\*: A zárójelben feltüntetett értékek azoknak az eseteknek a számát jelölik, amikor az EPI-CT meghaladta a 300 másodpercet. A statisztikai analízis során ezeket az értékeket 301 másodpercként vettük figyelembe.)

		Záródási idő (másodperc)	
		átlag $\pm$ szórás és tartomány	
		ADP-CT	EPI-CT
Kontrollcsoport	saját eredmények (n=58)	77 $\pm$ 19	180 $\pm$ 70
		55-148	85-301 (6)*
	Keidel és Mischke, 1998	47-81	67-210
	Callan és Giger, 2001	67 $\pm$ 7.8	151 $\pm$ 38
		52-86	97-225
Kezelt csoport	Karprofén (n=31)	85 $\pm$ 20	210 $\pm$ 83
		54-117	69-301 (8)*
	Ketoprofén (n=7)	77 $\pm$ 104	247 $\pm$ 57
		62-92	166-301 (3)*

## 4. Megbeszélés

### A thrombocyták mennyiségi viszonyai

A thrombocytopeniák és thrombocytosisok okait összegyűjtő felmérés már több is készült világszerte, mi magunk a nálunk előforduló esetek betegség szerinti megoszlására helyeztünk hangsúlyt. Vizsgálatunk tájékoztató jellegű, statisztikai következmény nem vonható le belőle.

### Morfológiai vizsgálatok

#### *Giemsa-festés*

A leggyakoribb morfológiai eltérés a Giemsa-szerint festett vérkenetekben a polychromasia volt, basophiliát mutató (hyperchrom) és halványan festődő (hypochrom) vérlemezkék együttes megjelenésével. A hyperchrom vérlemezkék jelenléte egyes szerzők szerint a thrombopoiesis zavarát, illetve fiatal, frissen termelődött vérlemezkék megjelenését jelzi (Bessis 1972). A hypochromasia az elöregedett, illetve agranulált vérlemezkékre jellemző morfológiai eltérés, az ilyen sejtek feltételezhetően kevésbé aktívak, funkciójuk károsodott (Jain 1993). Vizsgálatunk során elsőként mutattunk ki kapcsolatot kutyákban egyes betegségek (pl. thymus apoplexia, nephropathia, diabetes mellitus, Cushing-kór) és a polychromasia kialakulása között.

Az anisocytosis szintén a megzavart thrombopoiesis jele (Bessis 1972). Érdekeség, hogy ITP esetén nem talákoztunk anisocytosissal, ennek oka azonban valószínűleg az igen kifejezett thrombocytopenia és az alacsony esetszám (n=4). A microthrombocyták jelenléte leggyakrabban vashiányra és immunmediált thrombocytopeniára utal (Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997, McConnell 2000). Jelenlétüket ezeken kívül nephropathiában, májdaganat előfordulásakor, diabetes mellitusban és Cushing-kórban is tapasztaltuk. Véleményünk szerint a kórképek során kialakuló vasmetabolizmus-zavar és a következményes másodlagos vashiány lehet a jelenség magyarázata. Óriás thrombocyták (más néven stressz- vagy „shift”-thrombocyták, illetve megathrombocyták, Bessis 1972, Weiss 2000) megjelenése mindig valamilyen kóros folyamatot jelez (Cowell et al. 1999). Ritkán súlyos thrombocytopeniában láthatók, sokkal gyakoribbak azonban thrombocytosisban és thrombocytopathiában. Lehetnek a károsodott thrombopoiesis mutatói, illetve nagyfokú perifériás vérlemezke-felhasználódáskor is beléphetnek a vérkeringésbe. Jelenlétük a csontvelő regenerációs képességét is tükrözheti: az egészséges állatok csontvelője erőltetett thrombocytaképzéssel a megnőtt igényt gyorsan kompenzálni képes (Bessis 1972, Jain 1993, Bush 1991, Cowell et al. 1999, Hoffbrand és Pettit 1997, Lewis 2000). A vérlemezkék mérete (mean

platelet volume: MPV) nem korrelál a megnőtt thrombocyta-produkció mértékével (Weiss 2000). Az óriás vérlemezkék jelenléte a perifériás vérben myeloproliferatív folyamatra, esetleg myelofibrosisra kelthet gyanút (Jain 1993, Cowell et al. 1999, Lewis 2000).

Számos thrombocyta sejtalakot (pl. csillag-, vessző-, szivar-, pillangó- stb. forma) ismertet a szakirodalom (Bessis 1972, Hoffbrand és Pettit 1997). E bizarr alakok feltűnése jó indikátorai a csontvelő megbetegedésének és valószínűsítik a károsodott thrombocytafunkciót (Hoffbrand és Pettit 1997, Cowell et al. 1999). Ha a thrombocyták nagyok, szabálytalanok és egyidejűleg thrombocytopenia is fennáll, feltehetően nagyfokú vérlemezke-destrukció zajlik a periférián (Bush 1991). *Ahogy vizsgálatunk során kiderült, thymus apoplexia esetén kifejezetten tapasztalható a jelenség. Szerintünk a hypochrom, lekerekedett vérlemezkék is funkcionálisan károsodottnak tekinthetők, ezért ha ilyen sejtek dominanciáját észleletük, a vérkenetet patológiásnak minősítettük.*

A vékony, póklábszerű nyúlványokkal rendelkező thrombocyták jelenléte a vérkenetben élettani jelenség, a thrombocyta-aktiváció jele (Hoffbrand és Pettit 1997, Cowell et al. 1999). Ezek a sejtek a vérvétel során is aktiválódhattak (Jain 1993). Nehéz különbséget tenni a vérvétel során aktívvá vált és a „hiperaggregábilis”, azaz funkciójukat tekintve eleve aktívabb vérlemezkék között (Stokol 2000). Nincs rá irodalmi utalás, hogy miként lehetséges a vérkenetben morfológiailag különbséget tenni az élettani és kóros vérlemezke-aktiváció között. Célszerű a lehető legkörültekintőbben végezni a vérvételt, hogy minél kevesebb vérlemezke aktiválódjon a procedúra során. *A vizsgálatunk során felismert vaskos citoplazmanyúlványokat egyes vérlemezkéken mint új, eddig nem észlelt morfológiai jegyet írtuk le, és a vérlemezke-aktiváció extrém esetének tekintettük.* Amikor a kenetben nagy számban nemaktivált (feltehetően hipoaktív) thrombocyták fordultak elő, azok mindig egyidejűleg más morfológiai eltérést is mutattak; ez alapján tudtuk az állapotot patológiásnak minősíteni (Bessis 1972).

Munkánk során kétféle, új granulációformát találtunk a Giemsa-szerint festett vérkenetekben. A „pseudonuclearis” formát eddig csak egészséges macskák esetében írták le (Jain 1993). A jól elkülönülő granulumok jelenlétét a károsodott thrombopoiesis jeleként említik egyes szerzők (Bessis 1972). Patológiás granulációt a csontvelő általános működészavarában is találtak emberekben és kutyában, illetve macskában (pl. myelofibrosisban; Hoffbrand et Pettit 1997, Cowell et al. 1999). Az általunk talált kóros granulumeloszlás is dysthrombopoiesisre, illetve erőltetett csontvelői képzésre utalhat, ami nem megfelelő citoplazmaérésben és granulumeloszlásban nyilvánulhat meg. Ismeretlen, hogy a granulumok miért csoportosulnak egyik esetben a periférián, más esetben a sejt belsejében, excentrikusan. A granulumok hiányát is megfigyelték már, ami elsősorban disszeminált intravasalis coagulopathia (DIC) esetén volt tapasztalható (Bush 1991).

A citoplazma vakuolizációt eddig csak DIC-ben írták le. A vakuolizáció nem feltétlenül jelenti egyben a vérlemezkék funkciókárosodását is (Bush 1991). Magunk a jelenséget thymus

apoplexiában, pancreatitisben, diabetes mellitusban és Cushing-kórban tapasztaltuk. Valószínű, hogy direkt toxikus hatás, DIC vagy immunmediált folyamat lehet a háttérben (a vizsgálat során DIC-re irányuló diagnosztikai vizsgálatokat egyik állat esetében sem végeztünk, de a betegek állatok között DIC-re jellemző klinikai tünet sosem fordult elő).

Mind az „egészséges”, mind a „beteg” csoport egyes egyedeiben talákoztunk eddig ismeretlen morfológiai jelenséggel, a *perifériás gyűrű megjelenésével*. Valószínűleg ez a vérlemezke citoskeletonja, amely microfilamentumokból és microtubulusokból áll. A nyugvó, nemaktivált thrombocytákban ugyanis, ezek közvetlenül a sejtmembrán alatt, gyűrűt formálnak. Ezt emberi vérlemezkék elektronmikroszkópos vizsgálata során állapították meg (Bessis 1972), fénymikroszkóppal vizsgált, festett vérkenetekben eddig még nem írták le.

#### *PAS-festés*

Ismert, hogy a fiatal, funkcionálisan és metabolikusan aktív vérlemezkék több glükogént tartalmaznak, mint a nyugvó, vagy előregedett sejtek (Bessis 1972, Hoffbrand és Pettit 1997), aktivitásukat a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szabályozza. Az alakváltozás során, az aktiváció kezdetén a vérlemezkék metabolizmusa és a glükóz oxidációja fokozódik. Minden olyan tényező, ami az intracellularis cAMP mennyiségét növeli, fokozza a sejt glükogéntartalmát (Jain 1993). Mivel a glükogén a thrombocyták fő energiaforrása, a PAS-pozitív glükogénszemcsék számának növekedése aktívabb glükogenezist feltételez. A glükogén mennyiségének változása már a thrombopoiesis lépcsőiben is megfigyelhető: az ún. érett megacaryocyták tartalmazzák a legnagyobb mennyiségben (Bessis 1972).

Bizonyos kórképek, mint pl. a szeptikus folyamatok, súlyos thrombocytopeniával járhatnak. A csontvelő kompenzáló működése miatt ekkor fokozott thrombopoiesis indul be, és ennek jeleként számos metabolikusan aktív, PAS-pozitív vérlemezke tűnik fel a perifériás vérben. Minél nagyobb PAS-pozitivitás tapasztalható, annál nagyobb a glükogenezis mértéke. Thrombocytosisban és thrombocyaemiában szintén a glükogénszemcsék számának növekedését figyelték meg (Bessis 1972). Több, a thrombopoiesist érintő egyéb emberi betegségben leírták a glükogéneloszlás zavarát. Ha a glükogénszemcsék a vérlemezkék több mint 10%-ban durva, nagy rögöket képeznek, károsodott thrombopoiesisre gondolhatunk (Bessis 1972). Hogy mi okozza a glükogéngranulumok megjelenését vagy eltűnését, illetve megoszlásuk megváltozását, nem ismert, további elektronmikroszkópos vizsgálatok szükségesek a jelenség magyarázatára. Vizsgálatunkban ritkábban talákoztunk olyan vérlemezkékkel, amelyek csökkent glükogéntartalmúak. Valószínűsíthető, hogy az ilyen sejtek metabolizmusa jóval gyengébb, mint a PAS-pozitív thrombocytáké. A vérkenet PAS-festése segíthet annak eldöntésében, hogy a perifériás vérben jelen vannak-e fiatal, élénk anyagcserét folytató, frissen képződött vérlemezkék. Hasonlóan az anaemiátípusok klasszifikációjához (reticulocytaszám-meghatározás a regeneráció fokának



elbírálására), thrombocytopeniát követően a fokozott PAS-pozitivitás a csontvelő thrombopoeticus aktivitásának megítélésére adhat jó támpontot. Mivel a metodika egyszerű, a mindennapi rutin diagnosztikában is alkalmazható.

## **Optikai aggregometria**

### *A Carat TX4 optikai aggregométer előnyei*

A Carat TX4 és az M200 optikai aggregométer egyaránt megfelelők bizonyult a kutyák vérlemezke-aggregációjának tanulmányozására. A Carat TX4 műszer előnyei:

- kis mintamennyiség szükséges (180 µl PRP is elegendő),
- az ODR (Optical Density Ratio; a PRP és PPP sűrűségének aránya) megadása miatt egyszerűbb a mintafeldolgozás,
- a vizsgálat során az adatok mentésre kerülnek, a készülék saját szoftvere segítségével feldolgozza azokat; az eredmények MS Excel<sup>®</sup> táblázatokba átvihetők.

### *Aggregációs válasz egészséges állatokban*

Az irodalmi hivatkozások alapján elmondható, hogy az ADP egészséges kutyákban, épp úgy, mint emberben, mindig indukál thrombocytá-aggregációt (Soloviev et al. 1997, Sinakos és Caen 1967, Feingold et al. 1986). Emberekben az alkalmazott végkoncentrációtól függően az aggregációs válasz egy- vagy kétfázisú aggregációs görbében nyilvánul meg (Zhou és Schmaier 2005), kutyákban a válasz sokrétű (Boudreaux et al. 1994, Jain 1993). Mi magunk 10 µmol/l koncentrációnál minden esetben bifázisos görbét kaptunk, és az aggregáció többnyire reverzibilis volt. A reagens koncentrációja nagymértékben befolyásolhatja az aggregáció mértékét: Mischke és Schulze (2004) 5,7–92% aggregációs maximumot tapasztalt 2.5 µmol/l, 71–95%-t 10 µmol/l, és 80–98%-t 25 µmol/l végkoncentráció esetén. Eredményeik 10 µmol/l ADP esetében a sajátunknál magasabbnak bizonyultak. Clemmons et al. (1984) szintén különféle koncentrációkat alkalmazva vizsgálták az ADP-indukálta aggregációt. 10 µmol/l koncentrációnál  $65.1 \pm 13,1$  % aggregációs maximumot tapasztaltak, ami eredményünknek 1,58-szorosa. Callan és Giger (2001) 10 µmol/l ADP esetében >60% aggregációs maximumot értek el egészséges kutyákban. Boudreaux et al. (1994) azonban ugyanilyen koncentrációval  $27 \pm 19$ %-os értéket észleltek, ami viszont még az általunk kapott eredménynél is kisebb.

Az EPI-re adott aggregációs válaszok emlősökben nagyon változatosak. Ennek oka, hogy az epinefrin a thrombocyták  $\alpha$ - és  $\beta$ -receptorain keresztül fejti ki hatását, az előbbi révén serkentve, az utóbbi révén pedig gátolva az aggregációt. Az aggregációs válasz jellege tehát attól függ, melyik

receptorhoz kötődik az ágens. Csupán néhány irodalmi adat szól a patkányok és a tengerimalac vérlemezkéin található adrenoreceptor típusok megoszlásáról, azonban kutyában erre nézve még nem közöltek adatokat (Soloviev et al. 1997). Egyes szerzők szerint az epinefrin úgy vált ki aggregációt, hogy elősegíti a thrombocytából az ADP kibocsátását (Mason és Read 1967). Embereknél az EPI-indukálta aggregációs görbe egy- vagy kétfázisú, lagfázis nem jelenik meg, és alakváltozás általában nem jellemző (Zhou és Schmaier 2005). Mason és Read (1967), illetve Soloviev et al. (1999) leírták, hogy a kutyák thrombocytái képesek aggregálódni EPI hatására, míg Sinakos és Caen (1967) ugyanezt korábban nem észlelték. Soslau et al. (1993) azt tapasztalták, hogy a kutyák vérlemezkéi kevésbé érzékenyek az EPI-indukálta aggregációra, mint az emberekéi. Ravera et al. (1981) emberben és kutyában hasonló mértékű és jellegű aggregációs választ tapasztalt. Mischke és Schulze (2004) EPI hatására változatos válaszokat kapott, köztük olyan esetek is előfordultak, amikor az EPI egyáltalán nem tudott kiváltani aggregációt. Több szerző (Hikasa et al. 1999, Nowak és Glusa 1989, Meyers et al. 1983, Koeiman és Hsu 1991, Jain 1993) azt állítja, hogy az epinefrin önmagában nem képes az aggregáció kiváltására kutyában, viszont dóziszfüggően potenciózza a más agonistákkal történő aggregációt. Saját eredményeink, miszerint az esetek nagy részében nem volt EPI-re adott aggregációs válasz, Mischke és Schulze (2004) tapasztalatait támasztják alá.

A risztomicint 1963-ban Brazhnikova et al. izolálták egy *Proactinomyces*-tenyészetből (Boda et al. 1978). Mivel kémiai tulajdonságai és az *in vitro* aggregációban játszott szerepe hasonló a risztocetinéhez, az aggregációs vizsgálatokban helyettesíthetik egymást (Howard és Firkin 1971, Pflieger et al. 1985). A risztocetin egy korábban használt antibiotikum, ami a vérlemezkéket agglutinálja von Willebrand faktor (vWf) jelenlétében, megváltoztatva ezzel a PRP fényáteresztőképességét és turbiditását. Ez a folyamat irreverzibilis, és független a tromboxán- $A_2$  képződéstől, (vagyis nem segíti elő a GPIIb-IIIa receptor expresszáldását és a fibrinogén kötődését, mint az egyéb agonisták. Howard és Firkin 1971; Soloviev et al. 1997). A reakció során a vérlemezke felszínén a risztocetin, a vWf és a GPIb/IX/V receptor- komplex interakciója jön létre, ami elősegíti a vérlemezkék összekapcsolódását (Zimmerman 2000, Zhou és Schmaier 2005). A von Willebrand betegségben szenvedő emberekben a risztomicin- vagy risztocetin-indukálta aggregáció mértéke csökken (Brandt 1994). A risztocetin és a vWf kapcsolatát kutyákban is vizsgálták (Johnston és Lotz 1980). Emberekben 1,2 mg/ml risztocetin hatására monofázisos görbe alakul ki, alakváltozás nélkül (Zhou és Schmaier 2005). A vizsgálat során magasabb, 1,5 mg/ml koncentrációt alkalmaztunk, mivel 1,2 mg/ml esetén sosem tapasztaltunk aggregációs választ (az eredmények között csak az 1,5 mg/ml koncentrációval végzett méréseket tüntettük fel). Az egészséges kutyák kevesebb, mint a fele (46%) reagált a risztomicinre. A szakirodalom megoszlja a kutyára jellemző risztocetin-indukálta aggregáció tekintetében (Leis et al. 1980, Johnstone 1980). A legtöbb szerző

szerint a risztocetin nem képes kutyában az aggregáció kiváltására (Jain 1993, Leis et al. 1980, Feingold et al. 1986). Mischke és Schulze (2004) változatos aggregációs válaszról számol be, tapasztalataik szerint mérhető aggregáció nem következik be. Emiatt, akárcsak az epinefrint (ld. előbb), a risztocetint sem tartják alkalmasnak a kutyák thrombocyta-aggregációjának tanulmányozására. Soloviev et al. (1999) teljes vérből történő, impedancián alapuló aggregációs vizsgálatuk során 19 kutyából 7 esetben (36,8%) mutattak ki aggregációs választ, 1 mg/ml risztocetin alkalmazása során.

#### *Alakváltozás egészséges kutyák aggregációjában*

Hasonlóan az irodalmi utalásokhoz (Clemmons és Meyers 1984), eredményeink szerint az ADP esetében mindig alakváltozás előzte meg az aggregációt. Risztomicin esetében is az aggregációs választ minden esetben alakváltozás előzte meg, ami eltér a Zhou és Schmaier által említett humán adatoktól (2005). Tudomásunk szerint a risztomicinre adott aggregációs válaszban létrejövő esetleges alakváltozásról kutyák esetében nincs leírás. EPI-indukálta aggregáció során alakváltozás sosem jelentkezett, ami alátámasztja Boudreaux et al. (1996) eredményeit. Az alakváltozás értelmezését tekintve nem egységes az irodalom. Maurer-Spurej és Devine (2001) egy tanulmányban cáfolták azt a korábbi feltételezést, hogy a görbén negatív hullámként jelentkező alakváltozás a vérlemezkék azon morfológiai megváltozása, amikor diszkoidból gömb alakúvá válnak és pszeudopódiumokat növesztenek. Kísérletük során az alakváltozás bekövetkezésekor a PRP-t fixálták és scanning elektronmikroszkóppal vizsgálták a bekövetkező morfológiai eltéréseket. Azt tapasztalták, hogy a vérlemezkék már ez alatt a fázis alatt összecsapódtak, mikroaggregátumokat képeztek. Mindezt a GPIIb-IIIa receptortól független folyamatként írták le, amit később követ teljes és tényleges aggregáció.

#### *Lagfázis egészséges kutyák aggregációjában*

A lagfázis jelentése sem egységes a szakirodalomban. Wilner et al. (1968) olyan késleltetett fázisként írják le, ami az induktor beadása és a görbe alapvonaltól való elemelkedése közötti szakaszt jelenti. Avram et al. (2001) szerint a lagfázis magába foglalja az alakváltozást is. Munkánk során a Wilner et al. definícióját fogadtuk el. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan (Clemmons és Meyers 1984) ADP esetében sosem tapasztaltuk lagfázis megjelenését. Ahogy ugyancsak ők írták le, az EPI-indukálta aggregáció választ gyakran előzte meg 3–8 másodperces lagfázis. Valószínűleg a lagfázis hosszát az aggregációban érintett adrenoreceptor-típusok befolyásolják, nem pedig az alkalmazott koncentráció. Mivel viszonylag gyakran fordult elő lagfázis az EPI-indukálta aggregáció során (**17. ábra**), érdekes lenne egy humán tanulmányban említetthez hasonlóan (Zhou és Schmaier 2005) megnövelni a reakcióban alkalmazott inkubációs időt (javaslatuk szerint akár tíz

percnél hosszabbra), illetve tanulmányozni a kutyák thrombocytáinak felszínén található adrenoreceptorok mennyiségét és minőségét. Egészséges kutyák thrombocytáinak risztomicinre adott aggregációs válaszában lagfázis nem jelent meg.

#### *Aggregációs válasz a beteg állatokban*

A beteg állatok között számos kórforma aggregációra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Mivel a csoporton belül egy-egy betegség típust kis számú egyed képviselt, célunk csupán annak megállapítása volt, hogy az adott kórkép befolyásolja-e a vizsgált reagensre adott aggregációs választ, nem pedig az, hogy eldöntsük, a változások szignifikánsak-e.

A beteg csoport egyedei között számos eltérést tapasztaltunk az aggregációs válaszban. Az aggregációs maximum növekedése és csökkenése egyaránt előfordult. Mivel az EPI-és risztomicin-indukálta aggregáció egészséges állatokban is igen változatos volt, az aggregációs maximum csökkenését csak fenntartással kezelhetjük patológiásként.

Az egyik legprominensebb aggregációs maximum növekedés diabetes mellitusban jelentkezett ADP és kisebb mértékben risztomicin hatására. Hasonló eredményeket ADP-indukálta aggregációban emberben már megfigyeltek, a microvascularis komplikációk megjelenésével magyarázva a funkciózavart (Jennings et al. 1986, Sagel et al. 1975), azonban nincs tudomásunk olyan tanulmányról, ami kutyák diabetes mellitusában ezt leírta volna. Ezzel ellentétben mesterségesen kiváltott diabetes során az egészséges és megbetegített kutyák ADP-indukálta aggregációjában nem találtak különbséget (Kern és Engerman 1984). EPI-hatására nem tapasztaltuk az aggregációs készség fokozódását, ellentétben Sagel et al. (1975) humán adataival.

Cushing-kórban kifejezett hyperreaktivitás jelentkezett ADP hatására. Az aggregációs készség fokozódása, többek között risztocetin esetén, ismert funkciózavar embereknél (Casonato et al. 1999). Ikkala et al. (1985) ezzel ellentétben csökkent aggregációs készségről számol be: a szekunder fázis hiányát tapasztalták ADP- és EPI-indukálta aggregáció során.

Elsőként írtuk le az aggregáció fokozódását ADP hatására kutyák pancreas-fibrosisában (egyidejűleg a risztomicin-indukálta aggregáció csökkenése jelentkezett). Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a pancreas-fibrosis és a thrombocyta-aggregáció esetleges kapcsolatáról. Luttenberger et al. (2000), megállapították, hogy a vérlemezkék fibrinogén mediátorai révén közreműködnek a pancreas-fibrosis kórfejlődésében. Vizsgálatukat pancreasból származó sejtenyészetben végezték.

Krónikus veseelégtelenség esetén különböző aggregációs válaszokat kaptunk. Nephrosis szindrómában ADP hatására megnőtt aggregációs maximum volt jellemző, ami megfelel a Green et al. (1985) által kutyában leírtaknak. A hiperaktivitás mind kutyákban, mind emberben a plazma albumin szintjével áll kapcsolatban (Goubran és Maklady 1988, Green et al. 1985). Az albumin

élettani körülmények között megköti a szabad arachidonsavat. A fent említett szerzők megfigyelték, hogy hypoalbuminaemia fennállásakor – ami a nephrosis szindróma velejárója – másodlagosan megemelkedik a plazmában a szabad arachidonsav mennyisége, így a thrombocytában nő a tromboxán produkció, ami az aggregáció fokozódásához és hiperreaktivitás kialakulásához vezet. Mischke és Schulz (2004) szintén uraemiás kutyák thrombocyta-aggregációs jellegzetességeit vizsgálta. Ők abban az esetben tapasztalták az aggregációs készség fokozódását, amikor alacsony koncentrációban (1  $\mu\text{mol/l}$ ) alkalmazták az ADP-t. Ha a mienkével hasonló koncentrációt, azaz 10  $\mu\text{mol/l}$  ADP-t használtak, hipoaggregabilitást figyeltek meg. Mivel a szerzők nem írták le az uraemia típusát, az eredmények nem feltétlenül ellentétesek a mieinkkel: nephritis chronicában például magunk is az ADP-indukálta aggregáció csökkenését észleltük. Krónikus veseelégtelenségben jelentkező, ugyancsak csökkent aggregációs hajlamról számolnak be tanulmányukban Wardrop et al. (1989). Egyes tanulmányok szerint az uraemiás emberekből származó plazma különböző adhézis fehérjék lebontási termékeit tartalmazza, amik a vérlemezkék felszínén lévő GPIIb/IIIa receptorhoz kötődve képesek megakadályozni a fibrinogén kötődését (Walkowiak et al. 1994). Kérdéses, hogy ilyen fehérjék veseelégtelenséget mutató kutyák plazmájában is jelen vannak-e (Boudreaux 2000). Akadnak ezektől eltérő megfigyelések is: Brassard et al. (1994) kísérletesen indukáltak kutyákban veseelégtelenséget, és az ADP-stimulálta aggregációs válasz megváltozását figyelték meg. Forsythe et al. (1989) olyan uraemiás kutyákban végeztek aggregációs vizsgálatot, amelyekben a vérplazma karbamidszintje  $\geq 20$  mmol/l volt. Mindannyian arról számoltak be, hogy a kontroll-csoportokéhoz képest a vérlemezkék aggregációs készsége nem változott, azonban az adhézis folyamatok zavart szenvedtek.

Vizsgáltuk számos malignus kórkép hatását a thrombocyta-aggregációra. Lymphoproliferatív kórképeknél (pl. lymphoma, lymphoid leukaemia) a Boudreaux által leírtakhoz hasonlóan (2000) ADP-re megnövekedett aggregációs maximumot tapasztaltunk, azonban EPI és risztomicin hatására az aggregációs készség csökkent (**20. ábra**). Thomas és Rogers (1999) kezeletlen lymphomás kutyákban szintén az ADP-re adott válasz fokozódását tapasztalta. Egy 1997-es tanulmány szerint a kutyák vérlemezkéi általánosan malignus kórképekben már alacsony ADP-koncentrációban is erős aggregációs választ mutatnak (McNiel et al. 1997). A hiperaktív vérlemezkék jelentős szerepet játszanak a tumormetasztázisban (Thomas és Rogers 1999). A lymphoproliferatív betegségekben a vérlemezkék metabolizmusa fokozódik, illetve a csontvelői erőltetett thrombocytaképzés révén is nagyobb, aktívabb vérlemezkék keletkeznek (Jain 1993). Egyéb haemopoieticus malignus kórképekben, pl. krónikus myeloproliferatív folyamatokban szintén előfordulnak a thrombocytákat érintő funkciózavarok. Ezeknél általában a granulomok hiánya, az arachidonsav-metabolizmus zavara, vagy a membrán glükoprotein-receptorok abnormalitása áll a háttérben (Avram et al. 2001). Következésképpen hipo- és hiperaggregabilitás egyaránt előfordulhat, ami embereknél leginkább

az ADP- és EPI-indukálta aggregációt érinti (Manoharan et al. 1989, Cortelazzo 1981, Yamamoto et al. 1984).

Más neoplasticus folyamatok is befolyásolhatják a thrombocyta-aggregációt. Kisfokú hiperaktivitást tapasztaltunk a risztomicin-indukálta aggregációban haemangiosarcoma esetén, és az EPI-indukálta aggregációban mastocytoma fennállásakor. Ezeket az elváltozásokat mi írtuk le először. Egyidejűleg mindkét daganattípus esetében csökkent választ kaptunk az ADP-indukálta aggregáció során. Bishop és Donald (1979) vizsgálta a mastocytoma-sejtek aggregációt kiváltó hatását. Az intravénásan bejuttatott daganatsejtek egerekben nem indukáltak aggregációt. Mehta et al. (1986) leírták, hogy a különféle daganatok kiválthatnak vérlemezke aggregációt, mégpedig úgy, hogy tromboxán-A<sub>2</sub> kibocsátást idéznek elő. A daganatos kórképekben jelentkező csökkent aggregációs készség más patomechanizmussal magyarázható. Mint ismeretes, neoplasmák esetén gyakran tapasztalni disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC) kialakulását, ami a fibrin-degradációs termékek (FDP) felszaporodását eredményezi a vérplazmában (Jain, 1993). Az FDP-k versengenek a fibrinogénnel a vérlemezkék felszínén lévő GPIIb/IIIa-receptor kötőhelyekért, így aggregációs zavart idézhetnek elő (Stokol 2000).

Immunhaemolyticus anaemiában (IHA) a risztomicin-indukálta aggregációs válasz kismértékben fokozott volt, ez első ízben került leírásra. Korábbi irodalmi hivatkozások említik a vérlemezkék hiperaktivitásának megjelenését IHA-ban: Wolf et al. (1997) a magas erythropoietin-szinttel hozták összefüggésbe az aggregációs készség növekedését, amit tanulmányukban trombinnal vizsgáltak. Nem tudunk magyarázatot adni a risztomicin-indukálta aggregáció fokozódására, de véleményünk szerint ennek klinikai jelentősége csekély.

Néhány betegség a vérlemezkék aggregációs maximumának csökkenését idézte elő.

Elsőként tapasztaltuk az ADP-indukálta aggregációs maximum csökkenését babesiosis-okozta encephalopathiában. Szepszisben szintén az ADP-re adott válasz redukciójával találkoztunk. Az irodalom fertőző ágens jelenlétében hipo- és hiperaggregabilitásról egyaránt beszámol (Fletcher és Ramwell 1980, Jain 1993, Manning et al. 1994). A gyulladós folyamatok aktiválhatják a hemosztázisrendszert, ami hiperaktív vérlemezkék megjelenéséhez vezet (Fox 1998). Emiatt a DIC kialakulásának esélye megnő, és a keletkező FDP-k a már fent említett módon végül is a vérlemezkék funkciózavarához járulhatnak hozzá.

Dilatációs cardiomyopathiában elsőként észleltük a vérlemezkék ADP-re és risztomicinre adott csökkent válaszát. Más szívbetegségben, mitralis insufficienciában egyes szerzők már végeztek aggregációs vizsgálatokat. Azt tapasztalták, hogy a thrombocyták szenzitivitása ugyan csökkent, de az ADP görbe aggregációs maximuma nem változott a kontrollokéhoz képest (Tanaka és Yamane 2000). Macska cardiomyopathiájában retrospektív módon tanulmányozták a vérlemezkék aggregációs készségét (Fox 1998). A kollagénre adott aggregációs választ fokozottnak találták,

ADP esetében pedig, akárcsak mi magunk kutyáknál, csökkent aggregábilítást észlelték. A risztomicin-indukálta aggregáció csökkenésére eddigi vizsgálataink alapján egyelőre nem tudunk magyarázatot adni.

#### *Alakváltozás beteg kutyákban*

Az alakváltozást tekintve a beteg állatok között nem találtunk eltérést, azonban mind az egészséges, mind a beteg állatok között előfordult, hogy risztomicin hatására a vérlemezkéknek csak az alakja változott, és ezt nem követte teljes aggregáció. Valószínűleg mikroaggregátumok képződtek ezalatt (Maurer-Spurej és Devine 2001).

#### *Lagfázis beteg kutyák aggregációjában*

ADP-indukálta aggregációban nem jelent meg lagfázis. Az epinefrin által stimulált aggregációt tekintve gyakran találoztunk lagfázissal az egészséges és beteg állatok között egyaránt. Elsőként írtuk le 5–30 másodperces lagfázis kialakulását a risztomicin/risztocetin-indukálta aggregációs választ megelőzően viszonylag több kórforma (pl. cystitis, mitralis insufficiencia, haemangiosarcoma, dilatációs cardiomyopathia és Lyme-borreliosis) esetén. Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy az EPI-nél leírtakhoz hasonlóan, risztomicin esetén is hosszabb inkubációs időre lenne szükség.

#### *A görbe jellegének megváltozása*

A görbék lefutásának jellege nem változott a beteg állatokban. Risztomicin-indukálta aggregáció esetén, Cushing-kórban és hepatopathiában, reverzibilis válasz is előfordul, ami kevésbé stabil aggregátumok képződését sejteti. Véleményünk szerint e jelenségnek nincs klinikai jelentősége.

#### *Aggregációs válasz a kezelt állatokban*

A nemszteroid gyulladáscsökkentőkkel végzett kezelés esetén azt tapasztaltuk, hogy a karprofén egyáltalán nem hatott az ADP- és EPI-indukálta aggregációra, a ketoprofén azonban mindkét induktor esetében jelentős mértékben csökkentette azt. A karprofén és a ketoprofén propionsavszármazékok. Az aszpirinhez hasonlóan a szervezet számos helyén gátolják a prosztaglandinszintézist, a ciklo-oxigenáz (COX) blokkolásával. A karprofén elsősorban a COX-2-re hat (Johnstone és Budsberg 1997, Dowling 2001), a ketoprofén esetében a COX-1:COX-2 szelektivitási arány 0,23 (Ricketts et al. 1993). Mivel a vérlemezkék kizárólag COX-1-t tartalmaznak (Hickford et al. 2001, Mitchell et al. 1993, Donnelly és Hawkey 1997, Johnston és Budsberg 1997, Ricketts et al. 1998), ezzel magyarázható, hogy a ketoprofén, ami mintegy

mellékhatásként a vérlemezkék COX-1-ét is befolyásolja, redukálja az ADP- és EPI-indukálta aggregációt. Eredményeink tükrözik a Lemke et al. (2002) és Grisneaux et al. (1999) által tapasztaltakat: ők a gyógyszer következtében a thrombocytá-aggregáció szignifikáns csökkenését tapasztalták, azonban csak a kollagén hatását vizsgálták. Tudomásunk szerint ketoprofénnel kezelt állatokban az ADP és EPI hatására létrejövő aggregációs válasz csökkenését mi írtuk le először. Csak néhány szerző foglalkozik a karprofén thrombocytafunkciót, illetve a primer hemosztázist érintő szerepével. Clemmons et al. (1997) egészséges kutyák vérlemezkéit karprofénnel inkubálva az ADP- és EPI-indukálta aggregáció dózisfüggő csökkenését tapasztalták. Ez a hatás csak nagyon magas dózis (a terápiásnak 5–10-szerese) esetén bizonyult szignifikánsnak. Amikor a terápiás dózis (2 és 4 mg/kg) egyszeri, vagy egy héten át tartó folyamatos adásának hatását elemezték, az aggregáció mértéke egyáltalán nem változott a kontrollcsoportéhoz képest. Egy másik kísérlet során (Hickford et al. 2001), amikor 2.2 mg/ttkg karprofént adtak kutyáknak 5 napon át, kisfokú csökkenést tapasztaltak az ADP hatására létrejövő aggregációs válaszban. Ezek a kisfokú hatások a karprofén fent említett, COX-2 szelektivitásával függenek össze, ami eredményeink szerint, még hosszú távú adagolásakor sem okozza a vérlemezke-aggregáció károsodását.

## **Mechanikai módszer (PFA-100)**

A kontrollcsoport eredményei hasonlóan adódtak a Keidel és Mischke, illetve Callan és Giger által kutyákban találtakhoz: Callan és Giger ADP esetében csupán 1,15-ször, EPI esetében pedig 1,19-szer hosszabb záródási időt talált. Keidel és Mischke csak tartományban fejezték ki az eredményt, átlagot nem adtak meg. Az általunk vizsgált, 58 egészséges kutya nagyobb esetszámot jelent, mint a fenti szerzőknél; Keidel és Mischke 41, Callan és Giger 29 kutya vérének elemezte. Az egészséges kutyákban általunk talált normálértékek EPI esetében hasonlóak voltak az emberihez (Francis et al 1999), az ADP-t tekintve viszont mi magunk csaknem feleakkora záródási időket tapasztaltunk. Az egészséges állatok közötti EPI-CT értékek közül 6 esetben (10,3%) 300 sec-nál hosszabb záródási időt kaptunk. Utóbbi megfigyelést Callan és Giger (2001) is alátámasztja, akik szintén találtak a kontroll állatok között olyan egyedeket, amelyeknél az EPI-CT meghaladta a 300 sec-t. Optikai aggregométerrel végzett vizsgálatuk ezekben az esetekben nem mutatott ki károsodott vérlemezkefunkciót. A szerzők emiatt, a félreérthető eredményközlés miatt az EPI-t nem tartják alkalmasnak a thrombocytá-funkció zavarának megítélésére. Ez felveti annak szükségességét, hogy az alapvetően humán célokra kifejlesztett PFA-100 készülék gyárilag beállított cut-off pontját kutyák EPI-mérése esetén kitoljuk.

A NSAID-ok közismerten hatnak a vérlemezke funkcióra. A legismertebb ilyen hatóanyag, az aszpirin a ciklo-oxigenázt irreverzibilisen, a “nemaszpirin” NSAID-ok pedig reverzibilisen



inaktiválják (Boudreaux, 2000).

A rövid ideig terápias, illetve magas dózisban adott karprofén és ketoprofén hatását a vérlemezke-aggregációra PRP-ben és teljes vérben az előző fejezetben ismertettük. E két hatóanyag vérlemezke-funkcióra gyakorolt hatását PFA-100-zal még nem vizsgálták, az egyéb nemszteroid-gyulladáscsökkentőket azonban már igen. Legtöbben az aszpirin hatását vizsgálták. Az aszpirin alacsony dózisban nem hosszabbítja meg a vérzési időt (William et al. 1993), és nem egyformán hat az ADP és az EPI indukálta aggregációra sem: embereknél az EPI-CT megnyúlását idézi elő, az ADP-CT-t azonban gyakorlatilag nem befolyásolja. (Francis et al. 1999, Kottke-Marchant et al. 1999). Fressinaud et al. (1998) szerint az ADP-patron csak 50%-os megbízhatósággal mutatja ki az aszpirinhatást emberben. Épp ezért másokkal egyetértésben (Harrison et al. 1999, Mammen et al. 1998) azt javasolják, hogy a mérést mindig EPI-vel kezdjük, és csak az EPI-CT megnyúlása esetén használjuk az ADP-patron is. Keidel és Mischke (1998) azt tapasztalta, hogy kutyáknál 20 mg/ttkg acetilszalicil-sav adása az ADP-CT 1,3-szoros megnyúlását okozta, azonban az értékek általában így sem estek túl a referencia-tartományon. Az EPI-CT változását ebben a tanulmányban nem követték nyomon.

Vizsgálatunkban a karprofén által okozott kisfokú záródási idő megnyúlás az egészséges állatokhoz képest ADP esetében 10%, EPI esetében 11,6% volt, amik egyike sem bizonyult szignifikánsnak. A ketoprofén az ADP-CT-t nem befolyásolta, az EPI-CT-ben nem szignifikáns, 1,37-szeres eltérést okozott. Mindezek arra engednek következtetni, hogy terápias dózisban sem a karprofén, sem a ketoprofén nem károsítja a vérlemezkefunkciót még hosszú távon adva sem.

## 5. Következtetések

### Morfológiai vizsgálatok

Összefoglalva megállapítható, hogy a vérlemezkék morfológiai elváltozásai nem jellemeznek kizárólagosan egy betegséget sem. Úgy tapasztaltuk, hogy a *legtöbb eltérés* (polychromasia, polymorphismus, nemaktivált vérlemezkék jelenléte, kóros granuláció, vakuolizáció) *thymus apoplexiában* jelentkezett. Ez mindenképpen súlyos thrombocyta-károsodásra és nagyfokú perifériás felhasználásra utalhat. Számos egyidejűleg jelentkező morfológiai abnormalitást tapasztaltunk diabetes mellitusban és Cushing-kórban is. Érdekesség, hogy immunmediált thrombocytopeniában a vérlemezkék nem mutattak eltérést, csak microcytosis volt látható. Erős csontvelői képzés hatására basophil, óriás thrombocyták jelentek meg a periférián, esetenként vaskos citoplazma-nyúlványokkal. Ezek a jegyek annak eldöntésében segíthetnek, hogy a thrombocytopenia regeneratív-e vagy sem. Ez, hasonlóan az anaemiatípusok elbírálásához, új diagnosztikai segítség lehet a csontvelő regeneratív képességének megállapítására.

### Optikai aggregometria

Eredményeinket összegezve az alábbi következtetések vonhatók le.

- A Carat TX4 a régebbi típusú M200 optikai aggregométerhez hasonlóan hasznos és alkalmas eszköz kutyák vérlemezke-aggregációjának vizsgálatára.
- Az ADP tűnik a legmegbízhatóbb induktornak kutyák aggregometriai vizsgálataiban.
- Az EPI nem minden esetben, de képes aggregáció kiváltására, amelyet gyakran lagfázis előz meg.
- A risztomicin vagy risztocetin az egészséges kutyák kb. felében 1.5 mg/l koncentrációban képes volt aggregáció indukálására.
- Néhány kórkép esetében (encephalopathia, mastocytoma, dilatációs cardiomyopathia, diabetes mellitus, pancreas-fibrosis) mi írtuk le elsőként a thrombocyta-aggregáció megváltozását.
- A ketoprofén szignifikánsan csökkenti az ADP- és EPI-indukálta aggregációt, a karprofén nem befolyásolja ezeket.

Az aggregációs vizsgálatokban alkalmazott reagensek köre és aggregációja igen változatos. Az irodalmi adatokból az is kiderül, hogy még ugyanazon koncentrációban alkalmazott reagens (pl. 10  $\mu\text{mol/l}$  ADP) esetében is különböző válaszokat kaptak. Véleményünk szerint a különbség oka az eltérő kísérleti elrendezésekben keresendő. Ebből is látszik, hogy nagy szükség lenne az

aggregációs vizsgálatok standardizálására. Azonban sem az emberi, sem az állatorvosi laboratóriumi diagnosztikában nem dolgoztak még ki standardizált metodikát (Zhou és Schmaier 2005).

Számos közlemény foglalkozik a thrombocyta-aggregációt befolyásoló faktorok vizsgálatával (pl. az optimális vérelemzke szám: Von Hoss et al. 1976; a megfelelő hőmérséklet, a mintavétel és a vizsgálat között eltelt idő megengedett hossza: Brackett et al 1976; a PRP előállítás, a centrifugálás körülményei: Clemmons et al. 1983; a helyesen megválasztott antikoaguláns: Lin et al. 1990; a PRP tárolása: Nolte and Mischke 1995, Klein et al. 1999). Zhou és Schmaier (2005) azzal a céllal végeztek emberi PRP felhasználásával különböző agonistákkal aggregációs vizsgálatokat, hogy megpróbálják standardizálni a körülményeket és az aggregometria pontos menetét. Eredményeik jó kiinduló pontot jelentenek az aggregációs vizsgálatokkal is foglalkozó laboratóriumok számára.

Szintén nem egységes az eredmények közlése sem. Mischke és Schulz (2004) a maximális aggregáció értékét tartományban adják meg. Boudreaux et al. (1994 és 1996) a maximális fényáteresztő-képesség (aggregációs maximum) átlagát és szórását közli. Callan és Giger (2001) illetve Avram et al. (2001) egy küszöbérték fölé helyezi a normálértéket (pl. 10  $\mu\text{mol/l}$  esetén a maximális aggregáció egészséges egyedekben >60%). A sokféle interpretáció miatt adtuk meg többféleképpen eredményeinket.

Az aggregometria állatorvosi standardizálása, a vizsgálat menetének és az eredmények közlésének kidolgozása a jövő feladata.

## **Mechanikai módszer (PFA-100)**

A vérelemzkefunkció vizsgálatára az optikai aggregometria szélesebb körben elterjedt módszer, mint a PFA-100-zal végzett analízis. Ennek oka, hogy az előbbi komplexebb, informatívabb, és bár a minta előkészítése és kezelése bonyolultabb, gazdaságosabb vizsgálati lehetőség. A PFA-100 kétségtelen előnye az egyszerűség, a befolyásoló tényezők kisebb száma (pl. lipaemia, icterus, hemolízis jelenléte a plazmában nem kizáró ok a vizsgálat elvégzésére). A microtrombusok jelenléte, a thrombocytopenia vagy a csökkent hematokritérték mindkét módszer eredményeit egyformán ronthatja (Keidel és Mische 1998).

Az a megállapítás, hogy a karprofén és ketoprofén kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a vérelemzkek működését, ellentmondani látszik a Carat TX4 optikai aggregométerrel végzett hasonló célú vizsgálatunk eredményeinek, miszerint a ketoprofén mind az ATP, mind az EPI esetében szignifikánsan csökkentette az aggregációs készséget. A két módszer véleményünk szerint teljes mértékben nem helyettesítheti egymást. A PFA-100 szűrővizsgálatok elvégzésére kiválóan alkalmas (pl. műtét előtti kontroll), de ha a thrombocyták funkciózavarának gyanúja áll fenn, inkább

a pontosabb és részletesebb eredményt nyújtó optikai aggregometriát javasoljuk.

Ezen kívül az egészséges kutyák között előforduló >300 másodperces EPI-CT-k miatt célszerűnek látjuk a PFA-100 cut-off pontjának megnövelését, és ez alapján újból megállapítani egészséges kutyák esetében az EPI-re vonatkozó standard értékeket.

## 6. Új tudományos eredmények

A vérlemezkek morfológiai elemzése során a következő új eredmények születtek:

### Giemsa-szerint festett vérkenetekben:

- A polychromasia és a nagyméretű vérlemezkek megjelenése tapasztalatunk szerint a leggyakoribb morfológiai eltérés. A microcytosis és óriás thrombocyták nagyobb számban való jelenlétét, illetve a citoplazma-vakuolizációt olyan kórformákban is leírtuk, amelyekkel kapcsolatban eddig még nem született közlemény (pl. thymus apoplexia, pancreatitis, diabetes mellitus, Cushing-kór).
- Az aktiváció extrém formájának tekintve írtuk le a vaskos állabak megjelenését a vérlemezkek felszínén, több kórképben is.
- Azt tapasztaltuk, hogy a vérlemezkek granulumoszlása változó, ebből kétféle: a „magszerű” és a „perifériás” elrendeződést elsőként közöltük.
- Megfigyeltünk egy eddig még nem említett, élettaninak tekinthető morfológiai jegyet, a perifériásan helyeződő citoplazmagyűrűt.

### PAS-szerint festett vérkenetekben:

- A glükogén szemcsék eloszlásának változását különböző kórképekben elsőként vizsgáltuk; megállapítottuk, hogy a hematológiai eltérést mutató állatokban megnőtt a PAS-pozitív vérlemezkek aránya.
- Háromféle granulumoszlást írtunk le: eszerint diffúzan, excentrikusan és perifériásan csoportosulhatnak a glükogén szemcsék.

A vérlemezkek funkciójának vizsgálata során a következő új eredmények születtek:

### Optikai aggregometria:

- A kutyákban általunk elsőként kipróbált Carat TX4 optikai aggregométert alkalmasnak találtuk a thrombocytá-aggregáció vizsgálatára, ennek során az ADP bizonyult a legalkalmasabb és legmegbízhatóbb aggregációs reagensnek. Az EPI képes volt az alkalmazott koncentrációban önmagában is az aggregáció kiváltására, de nem minden egyedben; gyakran volt megfigyelhető lagfázis kialakulása az aggregációs válasz előtt. A risztomicin 1.5 mg/l koncentrációban az egészséges kutyák kb. felében képes volt aggregáció indukálására.
- A beteg kutyák vizsgálata során azt észleltük, hogy bizonyos kórképekben a risztomicin-indukálta aggregációs válasz előtt lagfázis alakulhat ki (pl. cystitis, mitralis insufficiencia, Lyme borreliosis, haemangiosarcoma) Elsőként írtuk le egyes kórképek aggregációt érintő hatását (pl. mastocytoma, pancreas-fibrosis).
- A nemszteroid-gyulladáscsökkentővel kezelt állatok esetében megfigyeltük, hogy a ketoprofén szignifikáns csökkenést idéz elő az ADP- és az EPI-indukálta aggregációban.

#### A PFA-100 thrombocyt-funkció analizátor tesztelése

- A PFA-100 készüléket kutyákban hemosztázis-szűrővizsgálatok végzésére alkalmasnak találtuk.
- A karprofénnel vagy ketoprofénnel hosszú távon kezelt kutyákban a záródási idő egyik reagens esetén sem tér el a kontrollcsoport értékeitől.

## 7. Összefoglalás

**Kutatásaim első részében** egészséges (n=20) és beteg (n=181) kutyákban a vérlemezkék *morfológiai* jellegzetességeit (méret, festődésbeli sajátosságok, alak, aktiváltság, granuláció, vakuolizáció) elemeztük, a vérkeneteket Giemsa-szerint festettük. A beteg állatokat két csoportra osztottuk: 84 kutya vérképzőszervi megbetegedésben szenvedett, 97 pedig egyéb kórformában. Az észlelt morfológiai elváltozások egy betegségre sem voltak specifikusak. A leggyakoribb eltérés a polychromasia és a nagyméretű vérlemezkék megjelenése volt, amelyek leginkább vérszes és haemolyticus kórképekben mutatkoztak. Anisocytosis máj-, lép- és béldaganatokra, illetve endocrinopathiákra volt jellemző. Microcytosis ITP-ben, májdaganatban és endocrinopathiában, polymorphismus pedig elsősorban thymus apoplexiában fordult elő. Az aktiváció extrém megnyilvánulását láttuk haemolysis, hepatopathia, neoplasmák és szepszis esetén. Vakuolizáció thymus apoplexiában, pancreatitisben, diabetes mellitusban és Cushing-kórban volt jelen. Leírtunk egy új morfológiai jellegzetességet: a perifériás gyűrű megjelenését, ami egészséges és beteg kutyák között egyaránt előfordult. A kóros granulációnak két formáját elsőként figyeltük meg és írtuk le kutyákban: a „magszerű” és „perifériás” elrendeződést egyes betegségekben.

Ugyanezen állatok vérmintáiból PAS-szerint festett keneteket is készítettünk, hogy nyomon kövessük a vérlemezkék glükogén szemcséinek eloszlását speciális festéssel. A glükogén granulomok háromféle módon helyeződtek a citoplazmában: perifériásan, excentrikusan és diffúzan. A PAS-pozitív és -negatív vérlemezkék előfordulási arányát is elemeztük a különféle kórképekben.

**Kutatásaim második részében** a vérlemezkék *funkcióját* ADP-, epinefrin- és risztomicin-reagenssekkel vizsgáltuk. A vizsgálat célja néhány kórkép és két NSAID: a karprofén és a ketoprofén thrombocytá-aggregációt befolyásoló hatásának kimutatása volt. Az elemzésbe 115 kutyát vontunk be. Az első csoportot egészséges kutyák (n=43), a másodikat a kifogástalan hemosztázisú, de beteg állatok (n=47), a harmadikat pedig a karprofénnel (1 mg/ttkg/24h) vagy ketoprofénnel (2–4 mg/ttkg/24h) hosszú távon kezelt kutyák alkották. A méréseket M-200, illetve az állatorvoslásba újonnan bevezetett Carat TX4 optikai aggregométerekkel végeztük, thrombocytadús plazmából. Az egészséges állatokra jellemző aggregációs paraméterek megállapítása után elemeztük azokat az eseteket, amikor az aggregációs maximum nőtt vagy csökkent, vagy az aggregációs görbe jellege megváltozott. Úgy találtuk, hogy a karprofén az aggregációs választ nem befolyásolja, a ketoprofén azonban mind az ADP-, mind az EPI-indukálta aggregációs maximumot szignifikánsan csökkentette.

**A kutatás harmadik részében** egy, az állatorvosi diagnosztikában még újnak számító készülék, a PFA-100 thrombocytafunkció-analizátor segítségével vizsgáltuk a thrombocyták működését. A karprofén és a ketoprofén terápiás dózisé, hosszú távú adásának hatását a vérlemezke funkcióra ezzel az eszközzel szintén vizsgáltuk ADP- és EPI-tartalmú patronokkal. Ötvenöt egészséges és 38 kezelt (n=7 ketoprofénnel, n=31 karprofénnel) kutya vérmintáit elemeztük. Megállapítottuk, a ketoprofen és a carprofen az ADP-re és EPI-re jellemző záródási időket az egészséges állatokhoz képest nem befolyásolta szignifikánsan. A PFA-100 véleményünk szerint megfelelő kutyák hemosztázis szűrővizsgálataihoz, azonban a készülék cut-off-pontját EPI esetében 300 másodperc fölé szükséges állítani. A thrombocyta-funkciózavarok diagnosztizálásához és részletesebb elemzéséhez az optikai aggregometriát alkalmasabb módszernek tartjuk.



## 8. Summary

The investigation of platelets, the smallest blood cells, is difficult with light microscope when the smear is stained by routine haematological dyes. Morphology of canine platelets (changes in size, shape, staining characteristics, degree of activation and clump-formation, distribution of granules, appearance of vacuoles on Giemsa-stained smears) were investigated in 20 healthy control and 181 diseased dogs. In the group of the sick dogs 84 animals suffered from disorders affecting directly the haematological parameters or the haemopoietic organs (i.e. bleeding, thymus haemorrhage, haemolytic disorders, lymphoma, immune-mediated thrombocytopenia). Ninety-seven dogs suffered from other diseases (hepatopathy, nephropathy, hepatic, splenic or intestinal neoplasm, skin diseases, diabetes mellitus, Cushing's-disease, sepsis) were also involved. The alterations found in platelet morphology were not specific to any disorders. Most common platelet abnormalities were polychromasia and presence of giant platelets. These changes occurred in great number in disorders accompanied by bleeding or haemolysis. Anisocytosis was the most frequent finding in hepatic, splenic or intestinal neoplasmas and certain endocrinopathies. Microcytosis was observed in immune-mediated thrombocytopenia, hepatic neoplasmas and endocrine disorders. Extreme platelet activation was characteristic of haemolysis, hepatopathies, neoplastic diseases and sepsis. Vacuolisation was present in thymus haemorrhage, pancreatitis, diabetes mellitus and Cushing's disease. A new morphologic phenomenon i.e. a ring-like formation of granules was described in the cytoplasm of the platelets both in healthy and diseased animals. In addition, two forms of pathologic granulation were also first described in Giemsa-stained blood smears: the pseudonuclear and the spot-like formation of granules, which were observed especially in disorders of affecting platelets.

The granulation and morphological characteristics of platelets in smears stained by periodic acid-Schiff reaction (PAS) were also studied. Three granulation localisation were observed: peripheral, eccentric and diffuse ones. The ratio of PAS-positive and -negative platelets was evaluated in several diseases. Our findings might support the diagnostic value of evaluation of platelets with light microscope and help clinicians to understand why morphologic changes of thrombocytes might be expected in several diseases.

Functional defects can be studied by in vitro aggregation tests with chemical compounds such as ADP, epinephrine and ristomycin. The aim of the present work was to investigate the effect of some diseases and that of non-steroid anti-inflammatory drug treatment in dogs on platelet aggregation. The examination had been carried out on 115 dog patients in M-200 optical aggregometer and in a CARAT TX4 optical aggregometer, that was used first in veterinary practice. Dogs were divided in three groups: healthy (control) dogs (n=43), diseased dogs with normal haemostasis-profile (n=47)

and dogs with arthropathies and long-term treated (n=25) with ketoprofen (1 mg/bw once daily) or carprofen (2-4 mg/bw twice daily) per orally. CARAT TX4 aggregometer proved to be a useful instrument in studying platelet aggregation in platelet-rich plasma of dogs. After determination of normal platelet aggregation curves in healthy dogs we described increased or decreased aggregation maximum in several illnesses. Carprofen treatment had no effect on platelet aggregation while ketoprofen decreased the aggregation maximum. Standardisation in aggregation methodology is highly recommended.

The PFA-100<sup>®</sup> analyzer (Dade-Behring) is a new point-of-care mechanical aggregometer aimed to fulfil the criteria that are necessary for the evaluation of platelet function. The effect of carprofen and ketoprofen on platelet aggregation was evaluated also by the PFA-100 using ADP and EPI cartridges. Aggregation of platelets was evaluated by PFA-100 in fifty-five healthy dogs, in seven dogs treated with ketoprofen and in thirty-one dogs treated with carprofen in a therapeutic dose for minimum 5 days. Analysis by PFA-100 proved to be simple and reliable. Therapeutic doses of carprofen and ketoprofen had only a minimal effect on platelet aggregation as measured by the closure time of PFA-100, which is the mark of platelet function. The closure times for both the healthy (control) and the treated dogs were often longer than the upper cut-off point (300 sec) of the device, similar to that in trials with humans. The PFA-100 could be a useful tool for veterinary use. This includes the evaluation of platelet aggregation in NSAIDs-treated dogs. The aggregation is not altered by therapeutic doses either of carprofen or ketoprofen. The upper cut-off point should be extended to 350 sec.

## 9. Irodalomjegyzék

1. AVRAM S. et al.: Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *J Cell Mol Med.* 2001, 1: p. 79-87.
2. BENNET J.S.: Platelet aggregation. In: WILLIAMS W.J., BEUTLER E., ERSLEV A.J. et al. eds. *Hematology.* 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Book co. 1990, p. 1778-1781.
3. BESSIS, M.: Living Blood Cells and their Ultrastructure. Paris: Masson & Cie, 1972, p. 367-412; 555-673; 727-730.
4. BISHOP C.J., DONALD K.J.: Non-immunological cell death of intravenously injected murine tumour cells. *Br J Exp Pathol.* 1979, 60: p. 29-37.
5. BLASKÓ GY.: A vér alvadását gátló gyógyszerek. II. Thrombocyta aggregáció gátlók. *Gyógyszereink.* 1998, 48: p. 1-12.
6. BODA Z.: A haemostatisis tényezői. In: BODA Z., RÁK K., UDVARDY M. eds. *Klinikai haemostaseologia.* Budapest: Springer Orvosi Kiadó, 1999, p. 19-27.
7. BODA Z.: Haemorrágiák. In: BODA Z., RÁK K., UDVARDY M. eds. *Klinikai haemostaseologia.* Budapest: Springer Orvosi Kiadó, 1999, p. 272-278..
8. BODA Z. és mtsai: Ristomycin: új thrombocyta aggregáló anyag. *Orvosi Hetilap.* 1978, 119: p. 259-261.
9. BORN G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962, 194: p. 927-929.
10. BOUDREAUX M.K. et al.: Identification of an intrinsic platelet function defect in spitz dogs. *J Vet Int Med.* 1994, 8: p. 93-98.
11. BOUDREAUX M.K. et al.: Type I. Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees Dog. *Vet Path.* 1996, 33: p. 503-511.
12. BOUDREAUX M.K.: Acquired platelet dysfunction. In: FELDMAN B.F., ZINKL J.G., JAIN N.C. eds. *Schalm's Veterinary Hematology.* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company, 2000, p. 496.
13. BRACKETT D.J. et al.: Influence of time, temperature and platelet concentration on dog platelet aggregation. *Thromb Res.* 1976, 8: p. 441-451.
14. BRANDT J.: Laboratory evaluation of platelet disorders. In: MCCLATCHEY K. ed. *Clinical laboratory medicine.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, p. 1063-1080.
15. BRASSARD J.A. et al.: Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model for uremic bleeding. *J of Lab and Clin Med.* 1994, 124: p. 48-54.
16. BUSH, B.M.: Interpretation of Laboratory Results for Small Animals Clinicians. Oxford: *Blackwell Scientific Publications,* 1991, p. 196-221.

17. CALLAN M.B., GRIGER U: Assesment of a point-of-care instrument for identification of primary hemostatic disorders in dogs. *Am J Vet Res.* 2001, 5: p. 652-658.
18. CASONATO A. et al.: Abnormalities of von Willebrandt factor are also part of the prothrombotic state of Cushing-syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999, 10: p. 145-151.
19. CLEMMONS R.M. et al.: Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb Haemost.* 1983, 50: p. 838-843.
20. CLEMMONS R.M., MEYERS K.M.: Acquisition and aggregation of canine blood platelets: basic mechanisms of function and differences because of breed origin. *Am J Vet Res.* 1984, 1: p.137-144.
21. CLEMMONS R.M. et al.: The effects of Rimadyl (Carprofen) on canine platelet function. Available at: <http://www.redveterinaria.com/cyber/clinica5.php>
22. CORTELAZZO S. al.: Spectrum of platelet aggregation abnormalities in myeloproliferative diseases. *Ric Clin Lab.* 1981, 11: p. 35-42.
23. COWELL R.L. et al.: Diagnostic Cytology and Haematology of the Dog and Cat. 2<sup>nd</sup> Edition, Mosby, 1999.
24. CRONBERG S. et al.: Effect on platelet aggregation of oral administration of 10 non-steroidal analgesics to humans. *Scand J Haematol* 1984, 33: p. 155-159.
25. DODDS W.J.: Platelet function in animals: Species specificities. In DEGAETANO G., GARRATINI S.. eds. *Platelets: A multidisciplinary approach.* New York: Raven Press, 1978, p. 45-59.
26. DONELLY M.T., HAWKEY C.J.: COX-II inhibitors – a new generation of safer NSAIDs? *Aliment Pharmacol Ther.* 1997, 11: p. 227–236.
27. DONNER L., HOUSKOVA J.: Some properties of blood platelets in animal species. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* 1972, 98: p. 296-302.
28. DOWLING P.: Managing chronic pain: the NSAIDs [abstract]. In: Proceedings of the 26<sup>th</sup> WSAVA Congress, Vancouver, British Columbia, Canada; 2001.
29. DRVOTA V. et al.: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the in vivo synthesis of thromboxan and prostacyclin in humans. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1991, 21A: p. 153-156.
30. ERSLEV A.J., GABUZDA T.G.: Pathophysiology of Blood. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1975.
31. ESCUDERO C. et al.: Effects of different doses of acetylsalicylic acid on platelet aggregation: an experimental study of prosthetic materials in dogs. *Life Support Syst.* 1986, 4: p. 325–334.
32. FEINGOLD H.M. et al.: Coagulation assays and platelet aggregation pattern in human, baboon

- and canine blood. *Am J Vet Res.* 1986, 47: p. 2197-2199.
33. FIJNHEER R. et al.: Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transf.* 1989, 29: p. 36-40.
  34. FLETCHER J.R., RAMWELL P.W.: The effects of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) on endotoxin shock and endotoxin-induced platelet aggregation in dogs. *Circ-Shock.* 1980, 7: p. 299-308.
  35. FORSYTHE L.T. et al.: Whole blood platelet aggregation in uremic dogs. *Am J Vet Res.* 1989, 50: p. 1754-1757.
  36. FRANCIS J. et al.: Can the platelet function analyzer (PFA-100 test) substitute for the template bleeding time in routine clinical practice? *Platelets.* 1999, 10: p. 132–136.
  37. FRESSINAUD E. et al.: Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood.* 1998, 91: p. 1325–1331.
  38. FOX PR.: Arterial thromboembolism. Available at:  
[http://maxshoue.com/arterial\\_thromboembolism.htm](http://maxshoue.com/arterial_thromboembolism.htm). Accessed in:1998.
  39. FROJMOVIC M.M. et al.: Platelet aggregation measured in vitro by microscopic and electronic particle counting. *Methods in Enzimology.* Academic Press, 1989. 169: p. 134-149.
  40. GENRTY P.A.: Platelet biology. In: FELDMAN B.F., ZINKL J.G., JAIN N.C. eds. *Schalm's Veterinary Hematology.* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company, 2000, p. 459-466.
  41. GOUBRAN F., MAKLADY F.: In vivo platelet activity and serum albumin concentration in nephrotic syndrome. *Blut* 1988, 57: p. 15-17.
  42. GRAUER G.F. et al.: Effects of low dose aspirin and specific thromboxane synthetase inhibition on whole blood aggregation and adenosine triphosphate secretion in healthy dogs. *Am J Vet Res.* 1992, 53: p. 1631-1635.
  43. GREEN R.A. et al.: Hypoalbuminaemia-related platelet hypersensitivity in two dogs with nephrotic syndrome. *J Am Vet Med Assoc* 1985, 186: p. 485-488.
  44. GRISNEAUX E. et al.: Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1999, 215:p. 1105-1110.
  45. HANDAGAMA P. et al.: Mean platelet volume artefacts: the effect of anticoagulants and temperature on canine platelets. *Vet. Clin. Path.* 1986, 15: p. 13-17.
  46. HARRISON P. et al.: Performance of the platelet function analyser PFA-100® in testing abnormalities of primary hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999, 10: p. 25–31 és 215: p. 1105–1110
  47. HAYHOE F.G.J., FLEMANS R.J.: *A Colour Atlas of Haematological Cytology.* St. Louis: Mosby, 1992.

48. HICKFORD F.H. et al.: Effect of carprofen on hemostatic variables in dogs. *Am J Vet Res.* 2001, 10: p. 1642-1646.
49. HIKASA Y. et al.: Effects of imidazoline and non-imidazoline alpha-adrenergic agents on canine platelet aggregation. *Pharmacology.* 1999, 58: p. 171-182.
50. HOFFBRAND A.V., PETTIT J.E.: A thrombocyták, véralvadás és a haemostasis. In: *A klinikai haematologia alapja.* Budapest: Springer Hungarica, 1997, p. 326-332.
51. HOLMSEN H.: Platelet secretion and energy metabolism. In: COLMAN R.W., HIRSH J., MARDER V.J., SALZMAN E.W., eds. *Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice.* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincort Company, 1994, p. 524-545.
52. HOPPER P.E. et al.: Probable essential thrombocythemia in a dog. *J Vet.-Int. Med.* 1989, 3: p. 79-85.
53. HOWARD M.A., FIRKIN B.G.: Ristocetin a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh.* 1971, 26: p. 362.
54. IKKALA E. et al.: Hemostatic parameters in Cushing's syndrome. *Acta Med Scand.* 1985, 217: p. 507-511.
55. JAIN N.C.: The platelets. Aggregation and release reaction. In: *Essentials of Veterinary Hematology.* Philadelphia: Lea Febiger, 1993, p. 82-104. és 105-132.
56. JENNINGS P.E. et al.: Abnormal platelet aggregation in chronic symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med.* 1986, 3: p. 237-240.
57. JOHNSTONE I.B., LOTZ F.: Ristocetin-Willebrand factor activity in dog plasma. *Can J Physiol Pharmacol.* 1980, 58: p. 1128-1134.
58. JOHNSTON S.A., BUDSBERG S.C.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids for the management of canine osteoarthritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1997, 27: p. 841-862.
59. JONES B.E.: Diagnosis of disorders of haemostasis (dog & horse). *Svensk-Veterinartidning.* 1979, 31: p. 423-427.
60. JUTTNER C. et al.: Optimal conditions for simultaneous measurement of platelet aggregation and ATP secretion in canine whole blood. *Res Vet Sci.* 2000, 68: p. 27-32.
61. KEIDEL A., MISCHKE R.: Untersuchungen zur Klinischen Anwendung des Plättchenfunktionanalysengerätes PFA-100 beim Hund. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1998, 111: p. 452-456.
62. KELLER, P.: Die Beurteilung hematologischer Befunde bei Hund und Katze: Möglichkeiten zur Objektivierung und Interpretation von Laborresultaten im Hinblick auf Diagnose, Prognose und Therapie. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.* 1986, 128: p. 121-139.
63. KERN T.S., ENGERMAN R.L.: Platelet aggregation in experimental diabetes and experimental

- galactosemia. *Diabetes*. 1984, 9: p. 846-850.
64. KLEIN A. et al.: Changes in platelet concentrates from dogs due to storage. I. Platelet count and in vitro function. *Berl Münch Tierarztl-Wochenschr*. 1999, 112: p. 243-253.
  65. KOEIMAN N.R., HSU W.H.: Interaction between amitraz and alpha-adrenoreceptors: inhibits epinephrine-induced canine platelet aggregation. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1991, 310: p. 56-65.
  66. KOTTKE-MARCHANT K. et al. : The effect of antiplatelet drugs, heparin and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis*. 1999, 2: p. 122–130.
  67. KUNDU S.K. et al.: Description of an *in vitro* platelet function analyser – PFA-100®-100. *Semin Thromb Hemost*. 1995, 21: p. 106–112.
  68. KURATA M. et al.: a comparative study of whole blood platelet aggregation in laboratory animals: its species differences and comparison with turbidimetric method. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1995, 112: p. 359-365.
  69. LEIS L.A. et al.: Ristocetin-induced aggregation of canine platelets. *Thromb Res*. 1980, 19: p. 309-316.
  70. LEMKE K.A. et al.: Effects of preoperative administration of ketoprofen on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time and hematologic indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *J Am Vet Med Assoc*. 2002, 12: p. 1818:1822.
  71. LEWIS D.C.: Disorders of Platelet Number. In: DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. eds.: *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 1<sup>st</sup> ed. Gloucester: BSAVA, 2000, p. 183-195.
  72. LIN H.C. et al.: Study on the effect of various conditions and age to blood platelet aggregation test. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1990, 12: p. 636-642.
  73. LUTTENBERGER T. et al.: Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest*. 2000, 80: p. 47-55.
  74. MACMILLAN D.C., SIM A.K.: A comparative study of platelet aggregation in man and laboratory animals. *Thromb Diath Haemorrh*. 1970, 24: p. 385-394.
  75. MAMMEN E.F. et al. : PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost*. 1998, 24: p. 195–202.
  76. MANNING J.E. et al.: a comparative study of the aggregation of human, rat and rabbit platelets by members of the streptococcus sanguis group. *J Med Microbiol*. 1994, 41: p. 10-13.
  77. MANOHARAN A. et al.: Thrombosis and bleeding in myeloproliferative disorders: identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies. *Brit J Haem*.

- 1989, 50: p. 1893-1897.
78. MASON R.G., READ M.S.: Platelet response to six agglutinating agents: species similarities and differences. *Exp Mol Pathol.* 1967, 6: p. 370-381.
  79. MATTSON J.C. et al.: Defective contact activation of platelets from dogs with basset hound hereditary thrombopathy. *Thromb Res.* 1986, 44: p. 23-38.
  80. MAURER-SPUREJ E., DEVINE D.V.: Platelet aggregation is not initiated by platelet shape change. *Lab Invest.* 2001, 81: p. 1517-1525.
  81. MCCONNELL M.F.: Overview of haemostasis. In: DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. eds.: *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.* 1<sup>st</sup> ed. Gloucester: BSAVA, 2000, p. 165-171.
  82. MCCONNELL M.F.: Haemostatic Diagnostic Techniques. In: DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. eds.: *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.* 1<sup>st</sup> ed. Gloucester: BSAVA, 2000, p. 173-181.
  83. MCNIEL E.A. et al.: Platelet hyperfunction in dogs with malignancies. *J Vet Intern Med.* 1997, 3: p. 178-182.
  84. MEHTA P. et al.: Effects of thromboxane A<sub>2</sub> inhibition on osteogenic sarcoma cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res.* 1986, 46: p. 5061-5063.
  85. MENDE S. et al.: Spurious thrombocytopenia caused by granulocyte platelet rosettes. *Klin Wch.* 1975, 53: p. 343-345.
  86. MEYERS K.M. et al.: Regulation of canine platelet function II. Catecholamines. *Am J Physiol.* 1983, 245: p. 100-109.
  87. MILLER J.: Blood platelets. In: Henry J. ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods.* 20<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001, p. 623-641.
  88. MISCHKE R., KEIDEL A.: Präklinische Untersuchungen zur Anwendung des Plättchenfunctionsanalysengerätes PFA-100 mit der Kollagen/ADP-Messzelle beim Hund. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 2002, 100: p. 235-238.
  89. MISCHKE R., SCHULZE U.: Studies on platelet aggregation using the Born-method in normal and uraemic dogs. *Vet J.* 2004; 168: p. 270-275.
  90. MITCHELL J.A. et al.: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci.* 1993, 90: p. 11693-11697.
  91. MOROFF G., HOLME S.: Concepts about current conditions for the preparation and storage of platelets. *Transfus Med Rev.* 1991, 5: p. 48-59.
  92. NOLTE I., MISCHKE R.: Investigation of platelet aggregation and platelet count from stored canine whole blood. *Res Vet Sci.* 1995, 58: p. 190-192.
  93. NOWAK G., GLUSA E.: Pharmacological investigation on the adrenalin-thrombin-induced



- platelet aggregation in dogs. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* 1989, 116: p. 831-839.
94. PETERSON P. et al.: The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg.* 1998, 133: p. 134–139.
  95. PFLIEGLER G. et al.: Aggristin (ristomycin) precipitation test: a new tool for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1985, 112: p. 629-635.
  96. POWERS L.W. et al.: Diagnostic Haematology. Clinical and Technical Principles. St. Louis: Mosby, 1989.
  97. R Development Core Team. The R Foundation for statistical computing. Manuals. Available at: <http://www.cran.r-project.org/manuals.html> Accessed 2005.
  98. RAVERA D. et al.: Platelet function in the dog. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1981, 57: p. 698-704.
  99. REAGAN W.J. et al.: Veterinary Haematology Atlas of Common Domestic Species. Iowa: Iowa State University Press, 1998, p. 47-48.
  100. RICKETTS A.P. et al.: Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 and 2 by carprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Vet Res.* 1998, 59: p. 1441-1446.
  101. RODGERS R.P., LEVIN J.: A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost.* 1990, 16: p. 1–20.
  102. SAGEL J. et al.: Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 1975, 6: p. 733-738.
  103. SCHAFER A.I.: Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol.* 1995, 35: p. 209–219.
  104. SINAKOS Z., CAEN J.P.: Platelet aggregation in mammals (human, rat, rabbit, guinea-pig, horse, dog). A comparative study. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1967, 17: p. 99-111.
  105. SINAKOS Z., CAEN J.P.: Aggregation capacity of the platelets of various animal species (Microscopic and photometric study). *Nouv Rev Fr Hematol.* 1967, 7: p. 120-124.
  106. SINK C.A.: Canine platelet concentrates: an in vitro study to effectively provide a source of functional platelets. *Thesis*, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002.
  107. SOLOVIEV M.V. et al.: Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J Surg Res.* 1997, 82: p. 180-187.
  108. SOSLAU G. et al.: Aggregation of human and canine platelets: modulation by purine nucleotids. *Thromb Res.* 1993, 72: p. 127-137.

109. Special Roundtable organised by Dade Behring. *PFA-100®: A new standard for exploring primary hemostasis*. Dade Behring Diagnostic. 2002.
110. STOBBL H.: Hämatologischer atlas. Berlin: Akademie-Verlag, 1959.
111. STOKOL T.: Disorders of platelet function. In: DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. eds.: *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 1<sup>st</sup> ed. Gloucester: BSAVA, 2000, p. 197-208.
112. SZÁSZ I. et al.: Morfológiai vizsgálatok. In: SZÁSZ I. ed. *Hematológiai Laboratóriumi Vizsgálómódszerek*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 1981, p. 43-47.
113. TABLIN F.: Platelet Structure and Function. In: FELDMAN B.F., ZINKL J.G., JAIN N.C. eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company, 2000, p. 448-452.
114. TABLIN F. et al.: Ultrastructural analysis of platelets and megakaryocytes from a dog with probable essential thrombocythemia. *Vet Path*. 1989, 26: p. 289-293.
115. TANAKA R., YAMANE Y.: Platelet aggregation in dogs with mitral valve regurgitation. *Am J Vet Res*. 2000, 61: p. 1248-1251.
116. THOMAS J.S., ROGERS K.S.: Platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in dogs with untreated multicentric lymphoma. *J Vet Int Med*. 1999, 13: p. 319-322.
117. TORRANCE A.: Overview of Haematological Diagnostic Techniques. In: DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. eds.: *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 1<sup>st</sup> ed. Gloucester: BSAVA, 2000, p. 3-17.
118. VERBEECK R.K.: Pharmacokinetic drug interactions with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1990, 19: p. 44-66.
119. VON VOSS H. et al: Standardization of ADP-induced thrombocyte aggregation. 1976; 33: p. 89-96.
120. WALKOWIAK B. et al.: Concentration of RGDS-containing degradation products in uremic plasma is correlated with progression in renal failure. *Thromb Res*. 1994, 76: p. 133.
121. WARDROP K.J. et al.: Altered hemostasis in dog with chronic renal failure. *J Am Animal Hosp Assoc*. 1989, 25: p. 325-329.
122. WEISS D.J.: Platelet Production Defects. In: FELDMAN B.F., ZINKL J.G., JAIN N.C. eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company, 2000, p. 469-471.
123. WILLIAMS H.D. et al.: The effect of low dose aspirin on bleeding time. *Anaesthesia*. 1993, 48: p. 331-333.
124. WILNER G.D. et al.: Aggregation of platelets by collagen. *J Clin Invest*. 1968, 47: p. 2616-2621.

125. WOLF R.F. et al.: Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. *Thromb Haemost.* 1997, 78: p. 1505-1509.
126. YAMAMOTO K. et al.: Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost.* 1984, 52: p. 292-296.
127. YAMASHIRO S. et al.: Rapid method for examination of platelet morphology. *Res.Vet. Sci.* 1983, 34: p. 367-369.
128. ZHOU L., SCHMAIER A.H.: Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Path.* 2005, 123: p. 172-183.
129. ZIMMERMAN K.: Drug-induced thrombocytopenias. In: FELDMAN B., ZINKL J., JAIN N.C. eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 472-477.
130. ZWAAL R.F.A. et al: Platelets and coagulation. In: ZWAAL R.F.A, HEMKER H.C. eds. *Blood Coagulation*. Amsterdam: Elsevier science publishers, 1986, p. 141-168.

## 10. Publikációk

### Referált tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) dolgozatok:

#### Magyar nyelvű, hazai folyóiratok:

- **Halmay D**, Gaál T, Kótai I. (2002): A thrombocytaszám-változással járó kórképek okai és jelentősége kutyában és macskában. Irodalmi áttekintés. 1. rész. Thrombocytopenia. Magy. Áo. Lapja (Hung. Vet. J.). 124. 419-422.
- **Halmay D**, Gaál T, Kótai I. (2002): A thrombocytaszám-változással járó kórképek okai és jelentősége kutyában és macskában. Irodalmi áttekintés. 2. rész. Thrombocytosis. Magy. Áo. Lapja (Hung. Vet. J.). 124. 423-430.
- **Halmay D**, Gaál T, Kótai I. (2002): A thrombocytaaggregatio vizsgálatának jelentősége és lehetőségei kutyákban. Irodalmi áttekintés. Magy. Áo. Lapja (Hung. Vet. J.). 124. 542-552.

#### Hazai idegen nyelvű tudományos folyóiratok:

- **Halmay D**, Sótonyi P, Vajdovich P, Gaál T (2005): Morphological evaluation of canine platelets on Giemsa- and PAS-stained blood smears. Acta Vet Hung. 53(3):337-50.
- Gaál T, **Halmay D**, Kocsis R, Abonyi-Tóth Zs (2007): Evaluation of the effect of ketoprofen and carprofen on platelet function in dogs studied by PFA-100 point-of-care analyzer. Acta Vet Hung. Közlésre elfogadva.

#### Külföldön kiadott (nemzeti vagy nemzetközi) tudományos folyóiratokban, idegen nyelven:

- **Halmay D**, Gaál T, Kocsis R (2007): Influencing factors of ADP-, epinephrine- and ristomycin-induced platelet aggregation in dogs. Blood Coagulation and Fibrinolysis. Közlésre elfogadva.

#### Előadás- és poszterkivonatok:

- **Halmay D**, Gaál T: Az ADP és a ristomycin indukálta thrombocyta-aggregáció vizsgálata kutyában. Abstract. 51th Congress of the Hungarian Society of Clinical Pathology. 28-31 August 2002, Gyula, Hungary. Clinical and experimental laboratory medicine (J. Hung. Soc. Clin. Path.) 29. 40.
- **Halmay D**, Kocsis R, Gaál T: Evaluation of PFA-100 platelet function analyzer in dogs. Abstract. ISACB XI. Congress (Valdivia, Chile, 2004. 04. 14-17). Proceedings of the Congress. p. 68.

- **Halmay D**, Gaál T, Kocsis R: Studies on platelet function in healthy dogs by optical and mechanical aggregometers (ESVCP Utrecht, 2005.)
- **Halmay D**, Kocsis R, Gaál T: Az adenzin-difoszfát és az epinefrin hatása kutyák thrombocytá aggregációjára (VIII. MTHT Konferencia, Alsópáhok, 2005.)
- Gaál T, **Halmay D**, Kocsis R: Experiences on the investigation of ADP- and ristomycin-induced aggregation in dogs. (ISACB, Isztambul, 2005)
- **Halmay D**, Gaál T: Comparison of manual and Cell-Dyn 3500<sup>®</sup> reticulocyte assays in healthy dogs and cats (ESVCP Cambridge, 2006)
- Vajdovich P, Szécsényi D, **Halmay D**: Present of *Dilofilaria repens* larvae in cytologic specimens. (ESVCP Cambridge, 2006)
- **Halmay D**, Gaál T, Kocsis R: Tapasztalatok kutyák ADP-, epinefrin és ristomycin indukálta aggregációjának vizsgálata során. (MLDT Szeged, 2006)

### **Kongresszusokon elhangzott előadások, bemutatott poszterek:**

- **Halmay D**, Szabó Z, Vajdovich P: T-sejtes lymphoma vadászgörényben. Esetbemutató. (MÁOT 2006, Kerekegyháza)
- **Halmay D**: Vérzékenységgel járó állapotok – mire figyeljünk műtét előtt? (HSAVA Konferencia Budapest, 2007)

### **Egyéb periodikákban megjelent (tudományos ismeretterjesztés jellegű) népszerűsítő közlemények:**

- Kótai I, **Halmay D** (1997): Vérkenetek elemzése III. A kutya és a macska kóros vörösvérsejtjei 1. A vörösvérsejtek nagyságbeli, festődési és alaki eltérései. Kisállatorvoslás, 4 (6), 302-305.
- Kótai I, **Halmay D** (1998): Vérkenetek elemzése V. A kutya és a macska kóros vörösvérsejtjei 3/1. Az anaemiák egyes típusainak elkülönítése. Kisállatorvoslás, 5 (3), 161-164.
- Kótai I, **Halmay D** (2000): Fehérvérsejtek vizsgálata vérkenetekben I. Neutrophilia. Kisállatpraxis, 2000/5, 20-23.
- **Halmay D** (2000): A DIC kóroktana, patogenezise, klinikuma és gyógykezelése. Kisállatpraxis, 2000/6, 12-15.
- **Halmay D** (2001): A vérzéssel járó betegségek elkülönítő kórjelzése. Kisállatpraxis, 2001/2, 14-21.
- Kótai I, **Halmay D** (2001): Fehérvérsejtek vizsgálata vérkenetekben II. A neutrophil granulocyták mennyiségi viszonyainak változása. Kisállatpraxis, 2001/3, 6-8.

### **Akadémiai beszámolók:**

- **Halmay D**, Gaál T: Az ADP és ristomycin-indukálta thrombocytá-aggregáció jellemzői kutyák babesiosisában (2002)
- **Halmay D**, Kocsis R: A thrombocytá-aggregáció vizsgálatának jelentősége és optikai aggregometriás módszere kutyákban (2003)
- **Halmay D**, Kocsis R, Gaál T: A PFA-100<sup>®</sup> thrombocytá funkció-analizáló műszer értékelése kutyákban (2004)
- **Halmay D**: Kutyák vérlemezkéinek morfológiai vizsgálata Giemsa- és PAS-szerint festett vérkenetekben (2005)
- **Halmay D**, Kollár Eszter, Kovács Eszter: Az ozmotikus rezisztencia vizsgálata macskák vörösvérsejtjeiben (2006)

### **Szakkolgozati munkák és TDK dolgozat témavezetése:**

- Kocsis Róbert (2002): Az egészséges kutya thrombocytáinak aggregációs vizsgálata ADP és ristomycin reagensekkel (Társtémavezető: Dr.Kótai István, SZIE ÁOTK Anatómiai és Szövetani Tanszék)
- Kollár Eszter (2006-): Új vizsgálati lehetőségek a kutyák és a macskák anaemiáinak diagnosztikájában (társtémavezető: Dr Tuboly Tamás, SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném tiszteletteljes köszönetnyilvánításomat kifejezni témavezetőimnek, Dr. Sótonyi Péternek és Dr. Gaál Tibornak. Dr. Kótai Istvánnak, Dr. Vajdovich Péternek, Szabados Tamásnak (Carat Kft), Varga József Ákosnak (Dade Behring), a DIATRON Kft.-nek, Dr. Kocsis Róbertnek a sok-sok szakmai és emberi segítséget köszönöm.

Külön köszönet illeti Dr. Holdas Sándort (Triovet Állatorvosi Rendelő), aki számos kutya vérmintával segítette a munkámat. A Belgyógyászati Laboratórium munkatársainak (Dr Ribiczey Péternének, Jaksics Katalinnal, Hajdú Katának és Leiner Ildikónak), akik a hematológiai mérések elvégzésében segítettek, ugyancsak köszönettel tartozom.

Szeretném megköszönni a családomnak (szüleimnek, húgomnak és férjének) és Dr. Hegedüs Lászlónak a biztatásukat, támogatásukat és a kitartásra való ösztönzésüket.