

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

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

Tézis

Készítette:

Dr. Halmay Dóra

2007

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Prof. Dr. Sótónyi 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

1. Bevezetés	1
2. Anyag és módszer	5
3. Eredmények	8
3. 1. Kvantitatív vizsgálatok	8
3. 2. Morfológiai vizsgálatok	8
3. 3. Optikai aggregometria	10
3. 4. Mechanikus aggregometria	11
4. Megbeszélés, következtetések	12
5. Új tudományos eredmények	18
6. Összefoglalás	19
7. Irodalomjegyzék	21
9. Publikációk	30

1. Bevezetés

A vérlemezkék kis méretük ellenére komplex feladatokat ellátó alakos elemek a vérben. Részt vesznek a hemosztázis fenntartásában, a kapilláris-endothel szerkezeti integritásának megőrzésében, a gyulladáshoz és a szöveti regenerációs folyamatokban, a thrombusképzésben, a tumormetasztázisban és baktericid tulajdonsággal is bírnak. Számos olyan kórkép ismert, amelyben számbeli eltérések tapasztalhatók: gyakrabban thrombocytopenia, ritkábban thrombocytosis figyelhető meg. Viszonylag kevés publikáció foglalkozik a kutyák thrombocytáinak morfológiai vizsgálatával, és kissé ellentmondásosak a funkciójukat leíró tanulmányok is.

Munkám első részében két éves periódus alatt a laboratóriumban előforduló, thrombocytaszám-eltérést mutató vérmintákat gyűjtöttük össze, betegségek szerint csoportosítva a thrombocytopenia vagy thrombocytosis leggyakoribb okait. Ilyen jellegű tanulmány Magyarországon még nem készült. Vizsgálatunkat tájékoztató jellegű felmérésnek szántuk, statisztikai következményt nem kívántunk levonni belőle.

Munkám második részében a thrombocyták alaki eltéréseit tanulmányoztuk egészséges és beteg kutyákban. A vérlemezkék a legkisebb vérsejtek, szerkezeti felépítésük egyszerű, így fénymikroszkópos vizsgálatuk a hagyományos festési eljárásokkal készült vérkenetekben (pl. May-Grünwald, Pappenheim, Giemsa, Diff-quick) nehézkes. Sajnos a hematológiai diagnosztikából jól ismert citokémiai festési technikák is kevés többlet információt nyújtanak (Jain 1993). A felsoroltak közül a Giemsa-festés a legalkalmasabb arra, hogy a sejtek finom struktúráját láthatóvá tegyük, ezért munkánk során ezt a módszert alkalmaztuk. Egészséges kutyák vérlemezkéi az így festett kenetekben 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 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 csoportosulva vagy diffúzan elszórva (Bessis 1972, Jain 1993, Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997, McConnell 2000). Az idősebb vérlemezkék kisebbek és halványabbak, mint a fiatalabbak (Bessis 1972, Bush 1991, Hoffbrand és Pettit 1997). Élettani viszonyok között nem vakuolizáltak (Bessis 1972). Még helyes mintakezelés és kenetkészítés

mellett is előfordulhat a vérlemezkék összecsapódása, vagyis kisfokú aggregálódása (Bessis 1972, Hoffbrand és Pettit 1997).

Olyan festési eljárást is szerettünk volna alkalmazni, amely a thrombocyták valamely jellegzetes szerkezeti elemét mutatja ki. Ilyen pl. a PAS-festés, ami a vérlemezkék glükogén-granulumait teszi láthatóvá. A glükogén a vérlemezkék fő energia forrása, a citoplazmában diffúzan helyeződik. 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. Éppen ezért igen kevés leírással találkozhatunk. Emberekben szabálytalan alakúak, gyakran nagyobb csoportokat, csomókat képeznek (Bessis 1972). A vérlemezkék glikogéntartalmának változásait eddig főként elektronmikroszkóppal követték nyomon, és azt is csak emberben (Bessis 1972).

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

Munkám harmadik részében a thrombocytá-aggregáció jellemzőit vizsgáltuk kutyákban. A vérlemezkék a primer hemosztázis következő folyamataiban vesznek részt: adhézió, aggregáció, release-reakció és a prokoaguláns felszín kialakulása (McConnell 2000). Ezek közül bármelyik károsodhat, leggyakrabban mégis az aggregáció zavarait tapasztaljuk. A folyamat alapvetően a foszfolipid- és az eikozanoid (arachidonsav)-reakciót foglalja magában. 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). 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 funkció-károsodás kimutatására számos módszer ismert az egyszerűbbektől (pl. mikroszkópos: Sinakos 1967, Frojmovic et al. 1989) a bonyolultabbakig (optikai, teljes vér impedancia, mechanikai: Born 1962, Kurata 1995, Soloviev 1997). A legtöbb vizsgálat ezek közül nem tartozik a rutin diagnosztikai eljárások közé, speciális laboratóriumi felszereltséget és mintakezelést igényel. Munkáik során a napjainkban általánosan elterjedt optikai módszert alkalmaztunk. Ennek a során teljes, citrátos vér alacsony fordulatszámon történő centrifugálásával nyert mintát (thrombocytadús plazma: PRP) használjuk. A minta vérlemezke-számát a teljes vér magas fordulatszámon történő továbbcentrifugálásával nyert plazmával (thrombocytaszegény plazma, PPP) állítjuk be. A mintához különböző aggregációs

reagenst adva a vérlemezkék összecsapódnak, 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 sűrűségét 0%-nak, fényáteresztő-képességét pedig 100%-nak (az aggregáció mértéke elméletileg 100%). Az agonista hozzáadása után az aggregátumok képződésével egyidejűleg az oldat fényáteresztő-képessége folyamatosan nő, optikai sűrűsége pedig csökken, 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 szekunder fázis a már aggregálódott vérlemezkék granulumaiból kiürülő ADP és az egyéb faktorok további aggregációt kiváltó hatását mutatja (Jones 1979, Hoffbrand és Pettit 1997). 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 szétválnak, diszaggregálódnak, és irreverzibilis, amikor együtt maradnak (Avram et al. 2001).

Munkánk célja a következő volt:

- Kutyák ADP- EPI-és risztomicin-indukálta thrombocytá-aggregációjának vizsgálata 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 thrombocytá-aggregációra, a változás jellegének leírása.
- Vizsgáltuk azt is, hogy két ismert NSAID, a ketoprofén (ketoprofen) és a karprofén (carprofen) hosszú távú alkalmazása során befolyásolja-e az ADP- és EPI-indukálta thrombocytá-aggregációt.

A thrombocytafunkciót vizsgáló tesztek, ahogy az előbbiekből kiderül, speciális felszereltséget és mintakezelést igényelnek. Az igény az aggregometriában is megvan egyszerű, de mégis megbízható mérési technikák és mérőműszerek kifejlesztésére. Ilyen készüléknek ígérkezik a viszonylag új, az állatorvosi medicinában még alig használatos PFA-100 thrombocytá-funkció analízátor (Dade-Behring Inc., USA). A PFA-100 egy elsőként a humánorvosi gyakorlatban alkalmazott "point-of-

care” készülék (Kundu et al. 1997), amely teljes mértékben alkalmas mind a veleszületett, mind a szerzett thrombocyta-funkció károsodásának gyors és egyszerű vizsgálatára (Callan és Giger 2001). A műszer képes a vérlemezke adhéziójának és aggregációjának in vitro meghatározására. A vizsgálat teljes vérből történik, egyszer használatos patronokkal. Méréskor a szervezet fiziológias környezeti viszonyait igyekeznek létrehozni (Kottke-Marchant et al. 1999). A korábbi, emberi vérmintákkal elvégzett vizsgálatok szerint a PFA-100 eredményei szoros korrelációt mutatnak a teljes vérből vagy thrombocyta 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), azóta többen is tesztelték (Mischke és Keidel 2002, Callan és Giger 2001). Vizsgálatunk során a karprofén és a ketoprofén hosszú távú, terápiás dózisú alkalmazásának thrombocyta-funkcióra gyakorolt hatását PFA-100 thrombocyta-funkció analizátorral is vizsgáltuk.

2. Anyag és módszer

Kvantitatív vizsgálatok

A felmérésbe 301 olyan különböző fajtájú, korú és ivarú kutyát vontunk be, amelyekben a thrombocytaszám eltért az élettanitól. Ezeket thrombocytopenia (n=212): thrombocytosis (n=89) szerint két csoportra osztottuk, majd minden egyes csoportban megvizsgáltuk, hogy milyen alapbetegséghez vagy kórképhez társul a mennyiségi eltérés. A gyakoriságokat százalékokban adtuk meg. Statisztikai elemzést nem végeztünk.

Morfológiai vizsgálatok

A vizsgálatokban 201 különböző fajtájú, korú és ivarú kutya vérmintáját használtuk, amelyek a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Belgyógyászati Tanszékének beteganyagából és egészséges állatokból származtak. A végső diagnózisra alapozva két fő csoportot hoztunk létre:

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

A vizsgálatokhoz 3,8%-os nátrium-citrát oldatot tartalmazó gyári vacutainer csőbe vettünk vért. Állatonként két vérkenetet készítettünk és Giemsa-szerint megfestettük (Bessis 1972). A vérkenetet először 400x-os nagyítással vizsgáltuk, hogy észlelhessük az esetleges aggregátum képződést. 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 megoszlás,
- polymorphismus jelenléte,
- aktivált és nem aktivált vérlemezkék jelenléte,
- patológiás granuláltság,
- citoplazma vakuolizáció megjelenése,
- egyéb morfológiai eltérések.

A PAS-festéshez K-EDTA tartalmú gyári vérvételi csőbe gyűjtöttünk vérmintákat, majd ezekből a mintavétel után azonnal vékony keneteket készítettünk és perjódsvavas Schiff-reagenssel megfestettük őket (Bessis 1972, Szász et al. 1981). A festéshez használt reagenseket a SIGMA-

Aldrich Kft.-től szereztük be. 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 szórtan 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.

Optikai aggregometria

A vizsgálatba 115 különféle fajtájú, korú és ivarú kutyát vontunk be, amelyekből a következő csoportokat hoztuk létre:

- Kontrollcsoport (n=43): egészséges kutyák, amelyek a megelőző 2 hétben gyógyszeres kezelésben nem részesültek,
- Beteg csoport (n=47): normál hemosztázisú állatok; a betegségek listáját a 6. táblázatban tüntettük fel,
- 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.

Minden állattól legalább 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 fordulatszámom (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). A következő műszereket használtuk: TX4 négy csatornás optikai aggregométer (Carat Kft.), M-200 két csatornás optikai aggregométer (Omker), Servintern Seisystem Labo Centrifuga, Abacus Junior Vet Haemocytometer. 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 4-10 percig végeztük (Zhou és Schmaier 2005, Bennet 1990, Sink 2002). A rendelkezésre álló vérminta mennyiségétől függően 1:9 arányban adtuk a reagenst a thrombocytadús plazmához. A kapott aggregációs görbéket a következők szerint elemeztük:

- van-e az adott reagensre aggregációs válasz,
- van-e lagfázis,
- van-e alakváltozás,
- aggregációs maximum (%),
- primer és szekunder fázis jelenléte,
- az aggregáció reverzibilitása vagy irreverzibilitása.

Mechanikus aggregometria

Ennek során 96 különböző fajtájú, korú és ivarú kutyát vontunk be a vizsgálatba. A kontrollcsoportot 58 egészséges állat alkotta, amelyek hemosztázisa élettani volt, a kezelt csoportba pedig 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 mérés során 800 μl teljes, citrátos vért fecskendezünk az egyszer használatos patronba, aminek kollagénnel bevont kapillárisa induktorként ADP-t vagy epinefrint tartalmaz. Az analizátor azt az időt méri, ami ahhoz szükséges, hogy a patron vékony kapillárisában a reagens hatására thrombocyta-aggregátum jöjjön létre. Ez az ún. „záródási idő” (closure time, CT), amelyet a műszer másodpercben jelez ki. A gyári beállítás szerint maximum 300 másodperc lehet.

Kutyánként kb. 5 ml vért gyűjtöttünk gyári, Na-citrát tartalmú (1:9 v/v) vacutainer csőbe (PFA-100 vizsgálat) és K-EDTA csőbe (hematológiai vizsgálat). A készülék alkalmazása során a gyári instrukciókat vettük figyelembe. Az eredményeket átlag \pm szórás és tartomány értékekben fejeztük ki. Az egészséges és kezelt csoport értékeit az ADP esetében ANOVA-teszttel hasonlítottuk össze, EPI esetében a Kruskal-Wallis „rank sum tesztet” alkalmaztuk. Utóbbira azért volt szükség, mert a záródási idő értéke nem egyszer meghaladta a műszer cut-off pontját (>300 sec).

3. Eredmények

3. 1. Kvantitatív vizsgálatok

A thrombocytopeniák leggyakoribb okai a következők voltak: hemolitikus kórképek, myeloproliferatív megbetegedések, nephro- és hepatopathia, pancreatitis, coagulopathia, DIC és lép haemangiosarcoma. Thrombocytosis leggyakrabban hemolízist követően, gastrointestinalis megbetegedések esetén, lép-haemangiosarcomában és hepatopathiában jelent meg. Megállapítottuk, hogy egyes kórképek esetén a vérlemezkeszám megfogyása és növekedése egyaránt előfordulhat.

3. 2. Morfológiai vizsgálatok

Giemsza-festés

Festődésbeli sajátosságok

A kontrollcsoport vérlemezkei halványkék festődésűek voltak, általában jól elkülönülő granulomer (centromer) és hialomer zónával. Polychromasia eltérő gyakoriságban fordult elő a beteg állatokban. Vérzéssel (pl. thymus apoplexia) és hemolízissel (pl. immunhaemolyticus anaemia) 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 vérlemezkek fordultak elő, néhány macrocyta társaságában. Anisocytosis minden betegségcsoportban előfordult, kivéve az immunhaemolyticus anaemiát. Legszembetűnőbben hyperadrenocorticismusban és diabetes mellitusban volt tapasztalható. A microcyták vagy óriás vérlemezkek dominanciája nagyon ritkán volt megfigyelhető. Nephropathiában, májdaganat során, hyperadrenocorticismusban és diabetes mellitusban a számuk meghaladta az egyéb méretű vérlemezkékéét. Az óriás alakok nagyszámú megjelenése leginkább a vérzéssel és hemolízissel járó kórképekre volt jellemző, előfordultak még hepatopathiában, lép haemangioma, pancreatitis és hypoadrenocorticismus során.

Alaki eltérések

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

Aktivált és nemaktivált vérlemezkék

A „kórosan aktivált” vagy „nemaktivált” vérlemezkék definiálására a szakirodalomban nincs megfelelő megjelölés. Vizsgálataink során ezért önkényesen 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 igen nagy aránya volt megfigyelhető thymus apoplexiában, kisebb arányban nephropathiában és néhány egyéb betegségben.

A fiziológiástól eltérő, vaskos citoplazma nyúlványok megjelenését tapasztaltuk néhány haemolyticus kórkép során (pl. IHA, babesiosis), illetve hepatopathiában, lép-haemangiómában és szepszisben.

Kóros granuláció

Egészséges kutyák vérlemezkéinek citoplazmájában finom, diffúz, azurophil granulumokat lehetett megfigyelni. A beteg csoportban a kóros granulációnak kétféle formájával találkoztunk:

- A „magszerű elrendeződés” során a durva granulumok a sejt közepén csoportosultak, ezáltal a vérlemezke magvas sejt benyomását keltette („pseudonuclearis” elrendeződés).
- A „perifériás elrendeződés” folyamán a sejt széléhez közel, excentrikusan, egy vagy több nagy, jól festődő granulum volt megfigyelhető.

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. 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.

Vakuolizáció

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.

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, ami az érintett egyedek vérlemezkéinek nem több mint 1%-ában fordult elő.

PAS-festés

A PAS-szerint festett vérkenetekben a PAS-negatív és –pozitív (glükogén-szemcséket tartalmazó) vérlemezkék aránya csoportonként és betegségenként eltért egymástól. A PAS-pozitív granulomok lokálisan (a sejt perifériáján közel a sejtmembránhoz, vagy a citoplazmában) esetleg diffúzan (számos finom vagy durvább szemcséként szétterülve, erős acidophil festődést adva a vérlemezkének). Egészséges állatokban a vérlemezkék nagyobb hányada (62%-a) PAS-negatívan festődött. A PAS-pozitív sejtek között többségben voltak a perifériás vagy excentrikus granulomot tartalmazó alakok, és a granuláció egyszer sem volt erőteljes. Azokban a betegekben, amelyekben hematológiai eltérés volt tapasztalható, a PAS-pozitív vérlemezkék aránya megnőtt (>65%). A vérzéssel vagy hemolízissel járó kórképekben kifejezett, excentrikus PAS-pozitív granulom megjelenése volt tapasztalható. ITP-ben a pozitív granulomok eloszlása diffúz volt. Pyometra és diabetes mellitus esetén majdnem minden vérlemezke PAS-pozitívan festődött. Arányuk szintén magasabb volt szepszisben, nephropathiában és a daganatos betegségekben. Nephropathiában a granulomok főleg a sejt perifériáján mutatkoztak, pyometra és szepszis esetén pedig inkább excentrikusan.

3. 3. Optikai aggregometria

Egészséges kutyákban csak az ADP indukált aggregációt minden állatban, EPI és risztomicin 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.

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 (pl. mitralis insufficientia, DCMP, Lyme-borreliosis) 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. 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 kismértékben 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), lymphomában pedig fokozott aggregációs készség jelentkezett ADP-re, de csökkent EPI-re). Egyes betegségek meglehetősen (pl. gastroenteritis, hepatopathia, cystitis, prostatitis) egyáltalán nem befolyásolta az aggregáció mértékét.

A karprofén 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. Mechanikus aggregometria

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).

4. Megbeszélés

Morfológiai vizsgálatok

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 előregedett, 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). Érdekesség, 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 tapasztaltunk. Véleményünk szerint a kórképek során kialakuló vasmetabolizmus-zavar és a következményes másodlagos vashiány lehet a jelenség magyarázata. 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). Számos bizarr thrombocytá sejtalakot (pl. csillag-, vessző-, szivar-, pillangó- stb. forma) ismertet a szakirodalom (Bessis 1972, Hoffbrand és Pettit 1997). Feltűnésük jó indikátorai a csontvelő megbetegedésének és a károsodott thrombocytá-funkciónak (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 igen 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 thrombocytá-aktiváció jele (Hoffbrand és Pettit 1997, Cowell et al. 1999). Ezek a sejtek a vérvétel során is aktiválódhattak (Jain 1993). Célszerű ezért a lehető legkörültekintőbben végezni a vérvételt. Nehézséget okoz különbséget tenni a vérvétel során aktívvá vált és a „hiperaggregábilisebb”, azaz funkciójukat tekintve eleve aktívabb vérlemezkék között (Stokol 2000). A vizsgálataink 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 granulomok 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 granulumoszlás is dysthrombopoiesisre, illetve erőltetett csontvelői képzésre utalhat, ami nem megfelelő citoplazmaérésben és granulumoszlásban nyilvánulhat meg. Nem ismert, hogy a granulomok miért csoportosulnak egyik esetben a periférián, más esetben a sejt belsejében, excentrikusan. A granulomok hiányát is megfigyelték már, elsősorban disszeminált intravasalis coagulopathia (DIC) esetén volt tapasztalható (Bush 1991). A citoplazma vakuolizációt is csak DIC-ben írták le eddig (Bush 1991). Mi 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.

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 intracelluláris 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 (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 igen aktív, PAS-pozitív vérlemezke tűnik fel a perifériás vérben. Thrombocytosisban és thrombocytamiában szintén a glükogénszemcsék számának növekedését figyelték meg (Bessis 1972). Ha a glükogénszemcsék a vérlemezkék több mint 10%-ban durva, nagy rögöket képeznek, károsodott

thrombopoiesisre gondolhatunk (Bessis 1972). Hogy mi okozza a glükogéngranulomok 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 (retikulocytaszám-meghatározás a regeneráció fokának elbírálására) thrombocytopeniát követően a csontvelő thrombopoeticus aktivitásának megítélésére adhatnak jó támpontot. Összefoglalva az is megállapítható, hogy a vérlemezkék morfológiai elváltozásai nem jellemeznék kizárólagosan egy betegséget sem.

Optikai aggregometria

A Carat TX4 optikai aggregométer, éppúgy, mint a régebbi típusú M-200, hasznos és alkalmas eszköz kutyák vérlemezke-aggregációjának vizsgálatára.

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). 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál minden esetben bifázisos görbét kaptunk, és az aggregáció többnyire reverzibilis volt. Az EPI-re adott aggregációs válaszok emlődökben nagyon változatosak. Ennek oka, hogy az epinefrin a thrombocyták α - és β -receptorain keresztül fejt 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 (Soloviev et al. 1997). Soloviev et al. (1999) azt is leírták, hogy a kutyák thrombocytái képesek aggregálódni EPI hatására, míg Sinakos és Caen (1967) ugyanezt korábban nem észlelték. Mischke és Schulze (2004) EPI hatására változatos válaszokat kapott, köztük olyan esetek is előfordultak, amikor az EPI egyáltalán nem tudott kiváltani aggregációt. Több szerző (Meyers et al. 1983, Nowak és Glusa 1989, Koeiman és Hsu 1991, Jain 1993, Hikasa et al. 1999) azt állítja, hogy az epinefrin önmagában nem képes az aggregáció kiváltására kutyában. 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 helyettesítheti őt (Howard és Firkin 1971, Pflieger et al. 1985). Korábban antibiotikumként használták. Eredményeink azt mutatták, hogy az egészséges kutyák kicsit kevesebb, mint a fele (46%) reagál a risztomicinre. A szakirodalom megoszlík a kutyára jellemző risztocetin-indukálta aggregáció tekintetében (Leis et al. 1980, Johnstone 1980). A

legtöbb referencia 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. Soloviev et al. (1999) teljes vérből történő, impedancián alapuló aggregációs vizsgálatuk során 19 kutyából 7 esetben (36,8%) mutattak ki aggregációs választ. Hasonlóan az irodalmi utalásokhoz (Clemmons és Meyers 1984), eredményeink szerint az ADP esetében mindig alakváltozás előzte meg az aggregációt. Risztomicin esetében is hasonló tapasztaltunk, ami eltér a Zhou és Schmaier által említett humán adatoktól (2005). 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. Egészséges kutyák thrombocytáinak risztomicinre adott aggregációs válaszában lagfázis nem jelent meg.

A beteg állatok között számos kórforma aggregációra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Mivel a csoporton belül egy-egy betegség típust kisszámú egyed képviselt, célunk csupán annak megállapítása volt, hogy az adott kórkép befolyásolja-e a vizsgált reagensre adott aggregációs választ. 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). Cushing-kórban kifejezett hiperreaktivitás jelentkezett ADP hatására. Az aggregációs készség fokozódása, többek között risztocetin esetén, ismert funkciózavar embereknél (Casonato et al. 1999). Elsőként írtuk le az aggregáció fokozódását ADP hatására kutyák pancreas-fibrosisában (egyidejűleg a risztomicin-indukálta aggregáció csökkenése jelentkezett). Luttenberger et al. (2000), megállapították, hogy a vérlemezkék fibrinogén mediátorai révén közreműködnek a pancreas-fibrosis kórfejlődésében. 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). Hypoalbuminaemia fennállásakor megemelkedik a plazmában a szabad arachidonsav mennyisége, így a thrombocytában nő a tromboxán produkció, ami az aggregáció fokozódásához vezet. Mischke és Schulz (2004) 10 µmol/l ADP-t használva hipoaggregabilitást figyeltek meg. Ugyancsak csökkent aggregációs hajlamról számolnak be tanulmányukban Wardrop et al. (1989). Mások arról számoltak be, hogy a kontrollcsoportokéhoz képest a vérlemezkék aggregációs készsége nem változott, azonban az adhéziós folyamatok zavart szenvedtek (Brassard et al. 1994, Forsythe et al. 1989). Lymphoproliferatív

kórképeknél a Boudreaux által leírtakhoz hasonlóan (2000) ADP-re megnövekedett aggregációs maximumot tapasztaltunk, azonban EPI és risztomicin hatására az aggregációs készség csökkent. Thomas és Rogers (1999) kezeletlen lymphomás kutyákban szintén az ADP-re adott válasz fokozódását tapasztalta. Megállapították, hogy a hiperaktív vérlemezkék jelentős szerepet játszanak a tumormetasztázisban. 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. 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 redukációjával talákoztunk. Dilatációs cardiomyopathiában elsőként észleltük a vérlemezkék ADP-re és risztomicinre adott csökkent válaszát. Erre eddigi vizsgálataink alapján egyelőre nem tudunk magyarázatot adni.

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).

ADP-indukálta aggregációban nem jelent meg lagfázis. Az epinefrin által stimulált aggregációt tekintve gyakran talákoztunk 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 esetén.

A görbék lefutásának jellege nem változott a beteg 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 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 redukálja az ADP- és EPI-indukálta aggregációt. Ezt a hatást mi írtuk le először. A karprofén COX-2 szelektivitásával függ össze, hogy eredményeink szerint még hosszú távú adagoláskor sem okozott vérlemezke-aggregáció károsodást.

Az aggregometria állatorvosi standardizálása, amire véleményünk szerint igen nagy szükség van, a jövő feladata.

Mechanikus aggregometria

A kontrollcsoport eredményei hasonlóan adódtak a Keidel és Mischke, illetve Callan és Giger által kutyákban találtakhoz. 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 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 vérlemezké-funkciót. Ez felveti annak szükségességét, hogy az alapvetően humán célokra kifejlesztett PFA-100 készülék gyárilag beállított cut-off pontját kutyák EPI-CT mérése esetén ki kellene tolni. A NSAID-ok közismerten hatnak a vérlemezke funkcióra. A legismertebb ilyen hatóanyag, az aszpirin a ciklo-oxigenázt irreverzibilisen, a "nemaszpirin" NSAID-ok pedig reverzibilisen inaktíválják (Boudreaux, 2000). A rövid ideig terápiais, 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. A leggyakrabban tanulmányozott 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). Keidel és Mischke (1998) azt tapasztalta, hogy kutyáknál 20 mg/ttkg acetilszalicil-sav adása az ADP-CT 1,3-szoros megnyúlását okozta. 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, amelyek egyike sem bizonyult szignifikánsnak. A ketoprofén az ADP-CT-t nem befolyásolta, az EPI-CT-ben 1,37-szeres eltérést okozott, ami szintén nem volt szignifikáns. Mindezek arra engednek következtetni, hogy terápiais dózisban sem a karprofén, sem a ketoprofén nem károsítja a vérlemezké-funkciót még hosszú távon adva sem.

Összefoglalva megállapítható, hogy a PFA-100 véleményünk szerint 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.

5. Új tudományos eredmények

Giemsa-szerint festett vérkenetekben:

A polychromasia és a nagyméretű vérlemezkék 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. Az aktiváció extrém formájának tekintve írtuk le a vastos állábak megjelenése a vérlemezkék felszínén több kórképben is. Azt tapasztaltuk, hogy a vérlemezkék granulumoszlása változó, ebből kétféle: a „magszerű” és a „perifériás” elrendeződést mi közöltük elsőként. Megfigyeltünk egy eddig még nem említett, fiziológiásnak tekinthető morfológiai jegyet, a perifériásan helyeződő citoplazmagyűrűt.

PAS-szerint festett vérkenetekben:

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

Optikai aggregometria:

A kutyák esetében általunk elsőként kipróbált Carat TX4 optikai aggregométert alkalmasnak találtuk a thrombocytá-aggregáció vizsgálatára, ennek során az ADP bizonyult a legalkalmasabb és legmegbízhatóbb aggregációs reagensnek kutyák esetében. 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. Elsőként írtuk le egyes kórképek aggregációt érintő hatását.

A nemszteroid-gyulladáscsökkentővel kezelt állatok esetében megfigyeltük, hogy a ketoprofén szignifikáns csökkenést idéz elő az ADP- és az EPI-indukálta aggregációban.

A PFA-100 thrombocytá-funkció analízátor 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.

6. Összefoglalás

Munkánk 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 további csoportokra osztottuk: 84 kutya vérbécsőszervi megbetegedésben szenvedett, 97 kutya 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.

Második munkánkban a vérlemezkék funkcióját ADP-, epinefrin- és riztomicin-reagensekkel 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, kontrollcsoportot az egészséges kutyák (n=43), a másodikat a normál hemosztázisú, 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 harmadik tanulmányban egy, az állatorvosi diagnosztikában még újnak számító készülék, a PFA-100 thrombocytafunkció-analizátor segítségével vizsgáltuk a thrombocyták működését. A karprofén és ketoprofén terápiás dózisu, 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 ketoprofén és a karprofén 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.

7. 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.* 4th 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., UDWARDY M. eds. *Klinikai haemostaseologia.* Budapest: Springer Orvosi Kiadó, 1999, p. 19-27.
7. BODA Z.: Haemorrágiák. In: BODA Z., RÁK K., UDWARDY 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.* 5th 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. 2nd 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 26th 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 (PGI₂) 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. 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.* 5th 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.* 3rd 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*. 1st 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*. 1st 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*. 1st 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 A₂ 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*. 20th 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*. 1st 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*. 5th 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*. 1st 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*. 5th 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*. 5th 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.

8. 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 thrombocytáaggregatio 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 thrombocytá-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 adenozin-difoszfát és az epinefrin hatása kutyák thrombocyta 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[®] 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 thrombocyta-aggregáció jellemzői kutyák babesioszában (2002)
- **Halmay D**, Kocsis R: A thrombocyta-aggregáció vizsgálatának jelentősége és optikai aggregometriás módszere kutyákban (2003)
- **Halmay D**, Kocsis R, Gaál T: A PFA-100[®] thrombocyta 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)

Szakkolozati 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 Szövettani Tanszék)
- Kollár Eszter (2006-): Új vizsgálati lehetőségek a kutyák és a macskák anaemiáinak diagnosztikájában (társtémavezető: Dr Tuboly Tamás, SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék)