

# Vývoj metodiky v diagnostice heparinem indukované trombocytopenie

Andelová K.<sup>1,2</sup>, Minář J.<sup>1,3</sup>, Králová S.<sup>4</sup>, Hrabcová R.<sup>5</sup>, Radina M.<sup>1</sup>, Kučerová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie, Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

<sup>2</sup>Ústav klinické biochemie, Jesseniova lékařská fakulta, Univerzita Komenského v Bratislavě, Martin

<sup>3</sup>Ústav potravinářského inženýrství a chemie, Technologická fakulta, Univerzita T. Bati, Zlín

<sup>4</sup>Centrum pro trombózu a hemostázu při Onkologickém centru J. G. Mendela, Nový Jičín

<sup>5</sup>Oddělení hematologie a transfuziologie, Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

## SOUHRN

**Cíl práce:** Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT II) představuje nejzávažnější komplikaci pacientů léčených heparinem, zprostředkovanou autoimunním mechanismem. Objevuje se přibližně u 0,5–5 % nemocných. V laboratorní diagnostice HIT II jsou k dispozici testy s rozdílnou diagnostickou efektivitou k HIT II: <sup>14</sup>C-serotonin release test, imunochemické stanovení protilátek proti komplexu heparin/PF4, agregace trombocytů a průtoková cytometrie. Cílem předkládané práce bylo vyvinout chromatografické stanovení (HPLC) s elektrochemickou detekcí (EC) a ověření klinického využití v diagnostice HIT II.

**Materiál a metody:** Byly vyšetřeny dvě skupiny probandů. První skupina sledovaných pro suspektní podezření na HIT II, druhá skupina kontrolní s léčbou nebo bez léčby heparinem. Uvolněný serotonin byl vyšetřen pomocí nově vyvinuté HPLC-EC metody.

**Výsledky:** Metoda poskytuje uspokojivé analytické charakteristiky s pracovním rozsahem 5–7000 nmol/l a limitem detekce 1 nmol/l. Přesnost v sérii, vyjádřená variačním koeficientem, byla CV = 7,7%, mezi sériemi CV = 12% při koncentraci serotoninu 1460 nmol/l.

**Závěr:** Prezentovaná studie popisuje dostatečně rychlou, neradioaktivní HPLC-EC metodu ke stanovení uvolněného serotoninu pro včasnou diagnózu heparinem indukované trombocytopenie typu II.

**Klíčová slova:** heparinem indukovaná trombocytopenie, uvolnění serotoninu, HPLC, diagnostika.

## SUMMARY

**Andelová K., Minář J., Králová S., Hrabcová R., Radina M., Kučerová M.: The development of methods in the diagnostics of heparin-induced thrombocytopenia**

**Objective:** Heparin-induced thrombocytopenia (HIT II) is an immune-mediated disorder observed in up to 0.5–5% of heparin-treated patients. Laboratory testing for the diagnosis of HIT II includes a <sup>14</sup>C-serotonin release test, PF4/heparin enzyme-immunoassay, platelet aggregation and flow cytometric assay with various specificities or sensitivities for the diagnosis of HIT II. The aim of this work was to develop an HPLC method with electrochemical detection (EC) and prove the possibility of using a non-radioactive serotonin release test for the diagnosis of HIT II.

**Material and Methods:** Two groups were tested. First group of patients suspect for HIT II, and second control group with or without heparin therapy. Serotonin release was analyzed by a newly developed HPLC-EC method.

**Results:** Analytical performance of this method was satisfactory. The method was linear from 5 to 7000 nmol/l with a limit of detection of 1 nmol/l. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.7% and 12%, respectively, for a concentration of serotonin 1460 nmol/l.

**Conclusion:** In the present work we describe rapid, non-radioactive, specific and sensitive HPLC-ED methods to determine serotonin release from the donor platelets.

**Key words:** heparin induced thrombocytopenia, serotonin release, HPLC, diagnostics.

## Úvod

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) představuje jednu z nejzávažnějších komplikací pacientů léčených heparinem. Současná medicína rozlišuje dvě varianty heparinem indukované trombocytopenie, HIT typu I a HIT typu II [1, 2, 3, 9].

HIT typu I nepředstavuje pro pacienty zvýšené klinické riziko. Je charakterizována mírnou trombocytopenií, která se vyskytuje 1.–5. den po zahájení antikoagulační léčby. HIT I lze pozorovat až u 30 % pacientů [1, 2, 3, 6, 9]. Přesný mechanismus není zcela znám, nejpravděpodobněji se jedná o přímý proagregační účinek heparinu.

Naopak incidence HIT II je uváděna u 0,5–5 % pacientů léčených heparinem a je velmi závažnou komplikací této antikoagulační léčby. Patofyziologicky se heparin váže na trombocyty, přičemž dochází k uvolnění proteinu PF4 z trombocytů. Na povrchu desičky se tvoří komplex heparin/PF4, který vyvolává u některých jedinců tvorbu specifických protilátek (nejčastěji IgG, mohou se však tvořit i IgM, respektive IgA) s následnou aktivací trombocytů, které uvolňují produkty s výraznou prokoagulační aktivitou a současně je aktivována i tvorba trombinu [8].

Klinicky dominuje trombocytopenie s možností hyperkoagulačního zvratu, popř. pokles počtu trombocytů o 30–50 % iniciální hodnoty před zahájením léčby. Trom-

bocytopenie je pozorována 5.–12. den po zahájení anti-koagulační léčby, ve výjimečných případech se může manifestovat i několik hodin po aplikaci heparinu [3].

V laboratorní diagnostice jsou k dispozici testy s rozdílnou diagnostickou efektivitou k HIT II, a to funkční testy ( $^{14}\text{C}$ -serotonin release test, agregace trombocytů s heparinem, průtoková cytometrie) a imunochemické stanovení protilátek proti komplexu heparin/PF4 [5, 7, 8, 9].

Cílem předkládané práce bylo vyvinout metodu pro diagnostiku syndromu heparinem indukované trombocytopenie typu II pomocí uvolňování serotoninu z dárcovských trombocytů při *in vitro* reakci s nefrakcionovaným heparinem (UFH), popř. s nízkomolekulárním heparinem (LMWH).

## Materiál a metoda

### Soubor pacientů

Do studie bylo celkem zařazeno 23 pacientů Onkologického centra J. G. Mendela v Novém Jičíně. Průměrný věk vyšetřované skupiny byl  $45,7 \pm 21,6$  let, s extrémy 7 a 74 let, ze které byli do souboru zařazeni 3 pacienti se suspektním podezřením na HIT II. Vstupním kritériem pro zařazení do souboru bylo splnění podmínky poklesu počtu trombocytů suspektní pro HIT II. Kontrolní skupinu tvořilo 20 pacientů s antikoagulační terapií nebo bez ní.

Ve všech vzorcích byl vyšetřen krevní obraz, protilátky proti komplexu heparin/PF4 (DIAMED test) a uvolněný serotonin po *in vitro* inkubaci s dárcovskými trombocyty (funkční vyšetření pomocí HPLC-EC).

Použité postupy byly v souladu s etickými standardy etické komise Onkologického centra J. G. Mendela v Novém Jičíně a s Helsinskou deklarací z roku 1975, ve znění revize z roku 1983.

Pro statistickou analýzu dat byl použit statistický program MedCalc (Belgie).

### Chemikálie

N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethan sulfonová kyselina (HEPES, Sigma), serotonin hydrochlorid (Sigma), Heparin léčiva (Zentiva), Fraxiparine (Glazé Wellcome Production), Triton X-100 (Fuka), NaCl (Lach-Ner), KCl (Fluka),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fluka),  $\text{MgCl}_2$  (RNDr. Jan Kulich),  $\text{NaHCO}_3$  (Lach-Ner), glukóza (Sigma), EDTA (Fluka), acetát sodný (Sigma), metanol (Chromservis), chromatografická voda (Merck), oktansulfonová kyselina (OSA, Sigma).

### Přístroje a výpočetní technika

Kapalinový chromatograf Shimadzu (Japonsko) byl v uspořádání: odplyňovací jednotka DGU-14A, pumpa LC-10AD, centrální jednotka SCL-10A, autoinjektor SIL-10AD s dávkovací smyčkou 100  $\mu\text{l}$  a elektrochemický detektor Procede.

### Zpracování vzorku

Před odběry periferní žilní krve nebylo potřeba dodržet žádné speciální dietní opatření. Krev byla po od-

běru centrifugována 10 minut při 1000 g. Získané sérum bylo uchováno při  $-20^\circ\text{C}$  do provedení analýzy. Před analýzou bylo sérum temperováno na laboratorní teplotu.

### HPLC analýza uvolněného serotoninu – metodický postup

200  $\mu\text{l}$  séra bylo tepelně inaktivováno (30 minut,  $56^\circ\text{C}$ ). Po inkubaci bylo sérum centrifugováno 10 minut při 1000 g. 75  $\mu\text{l}$  dárcovské suspenze plazmy bohaté na trombocyty (koncentrace trombocytů upravena na finální hodnotu  $300 \pm 30 \cdot 10^9/\text{l}$  pomocí HEPES-Tyrodového pufru) byla inkubována v mikrozkumavkách s 20  $\mu\text{l}$  testovaného inaktivovaného séra a 5  $\mu\text{l}$  heparinu (UFH, popř. LMWH) o dvojnásobnou koncentraci při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Reakce byla ukončena přidávkou 27 mmol/l roztoku EDTA. Po centrifugaci bylo ke stanovení uvolněného serotoninu z dárcovských trombocytů použito 30  $\mu\text{l}$  jako nástřikové množství k HPLC analýze.

Pro HPLC analýzu byla použita analytická kolona RP-C18 (150 x 4,6 mm, 7  $\mu\text{m}$ , Chromsystems Německo), pracující izokraticky při teplotě  $22^\circ\text{C}$  s následnou elektrochemickou detekcí (pracovní potenciál + 550 mV). Mobilní fázi tvořil 0,1 mol/l vodný roztok acetátu sodného obsahující 10  $\mu\text{mol/l}$  EDTA, 180  $\mu\text{mol/l}$  OSA a metanol (85:15 v/v, pH 4,2, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min).

## Výsledky

HPLC-EC test uvolněného serotoninu byl hodnocen jako pozitivní, pokud došlo k uvolnění více než 20 % serotoninu z dárcovských trombocytů při použití nízké koncentrace heparinu (0,1 kIU/l) a zároveň méně než 20 % při použití vysoké koncentrace heparinu (100 kIU/l) z jeho celkového množství (přídavek roztoku Tritonu X-100 k dárcovským trombocytům, takto uvolněný serotonin byl označen jako celkový). Všechny ostatní výsledky analýz byly označeny jako negativní.

Ze studie nebylo potřeba vyloučit žádného pacienta. U všech pacientů suspektních pro HIT II ( $n = 3$ ) nebyla diagnóza HIT II potvrzena HPLC-EC testem, taktéž nebyla diagnóza potvrzena DIAMED testem k průkazu protilátek proti komplexu heparin/PF4. U skupiny kontrolních pacientů ( $n = 20$ ) byly výsledky analýz HPLC-EC uvolněného serotoninu negativní.

Metoda poskytla uspokojivé analytické charakteristiky s pracovním rozsahem 5–7000 nmol/l a limitem detekce 1 nmol/l. Přesnost v sérii, vyjádřená variačním koeficientem, byla CV = 7,7 %, mezi sériemi CV = 12 % při koncentraci serotoninu 1460 nmol/l.

## Diskuse

Syndrom HIT II je nejčastěji v literatuře připisován léčbě UFH, výskyt HIT II u pacientů léčených LMWH je signifikantně nižší (kratší řetězec než UFH, menší vazba na PF4 a menší pravděpodobnost tvorby imunologické odpovědi). Ojedinele lze syndrom HIT II poz-

rovat také po zahájení léčby LMWH [4]. Laboratorní diagnostika HIT II je založena jednak na funkčních testech, sloužících k průkazu aktivace trombocytů v přítomnosti heparinu, a jednak na antigenních testech ke stanovení specifických protilátek [1, 5, 8, 9]. Často diskutovanou otázkou je diagnostická efektivita jednotlivých testů, která se podle různých autorů velmi liší [7]. Je proto důležité provést oba typy testů a při hodnocení vycházet především z klinické diagnostiky.

Předkládaná studie měla ambice potvrdit literární údaje o vysoké diagnostické efektivitě HPLC-EC stanovení uvolněného serotoninu oproti imunochemickému stanovení protilátek proti komplexu heparin/PF4, s jejími výhodami i zápory [5, 7]. Užití <sup>14</sup>C-serotonin release testu je pokládáno za zlatý standard ve funkční diagnostice HIT II. Recentní práce hovoří o chromatografickém stanovení uvolněného serotoninu bez radiační zátěže jako o imitaci <sup>14</sup>C-serotonin release testu [5, 7, 8]. Nutno konstatovat, že naše očekávání nově vyvinuté HPLC-EC metody v diagnostice HIT II byla podpořena uspokojivými analytickými charakteristikami metody. Přesto se nelze vyhnout otázce možné standardizace metodiky (trombocyty dárců se mohou lišit v reaktivitě na vzorky sér pacientů), taktéž interní kontrola kvality analytického postupu má řadu nedořešených problémů (funkční vyšetření při *in vitro* podmínkách).

Negativní výsledky, především ve skupině suspektních pacientů, lze vysvětlit složitostí problematiky diagnostiky a diferenciální diagnostiky, neboť syndrom HIT II lze pozorovat u polymorbidních pacientů, u kterých nalézáme trombocytopenie z mnoha dalších příčin [9]. Z tohoto důvodu je doporučováno potvrdit diagnózu HIT II testy *in vitro*. Nesmíme opomenout fakt, že výsledky laboratorních testů musí být interpretovány odborníky se znalostí problematiky klinické hematologie. Vzhledem k vývoji nových antikoagulancií, která minimalizují riziko HIT II, lze v budoucnosti očekávat stagnaci funkčních vyšetření při podezření na HIT II. Do té doby je nutné optimalizovat diagnostický přístup, tento, ne zcela vzácný syndrom, si to jistě zaslouží.

## Závěr

Závěrem lze konstatovat, že syndrom HIT II představuje život ohrožující komplikaci léčby heparinem, která je doprovázena zvýšeným rizikem vzniku a rozvoje trombózy. Význam laboratorních testů k potvrzení klinické diagnostiky není nutné zdůrazňovat. Při volbě laboratorních metod je třeba pečlivě zvážit jejich specifitu a senzitivitu. Pokud se tedy pokusíme odpovědět na otázku při úvodu tohoto sdělení, tedy na možnost vývoje nové metodiky k potvrzení diagnózy HIT, pak je nutné konstatovat, že byla vyvinuta dostatečně rychlá, funkční a neradioaktivní metoda ke stanovení

uvolněného serotoninu z dárcovských trombocytů pro včasnou diagnostiku HIT II, která disponuje velmi uspokojivými analytickými charakteristikami. Chybí však dostatečné klinické zhodnocení, které vyžaduje rozšíření skupiny probandů s klinicky prokázanou HIT II. Autoři si tedy kladou za cíl do budoucna aktualizovat data s příslibem následné publikace nově dosažených výsledků.

## Literatura

1. **Novotný, J., Konvičková, L.** Heparinem indukovaná trombocytopenie. *Vnitř. Lék.*, 1998, 44, 5, s. 282–287.
2. **Malý, J.** Heparinem indukovaná trombocytopenie – editorial. *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, 2, s. 145–147.
3. **Novotný, J.** Heparinem indukovaná trombocytopenie – editorial. *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, 2, s. 148–152.
4. **Hirmerová, J.** Heparinem indukovaná trombocytopenie u pacientky se stenózou kmene levé věnčité tepny. *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, 2, s. 231–237.
5. **Koch, S., Harenberg, J., Odel, M., Schmidt-Gayk, H., Valch, S., Budde, U.** Development of a High-Pressure Liquid Chromatography Method for Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2002, 117, 6, p. 900–904.
6. **Stehlíková, M., Bolcková, H., Kořínková, P., Mášová, L., Suttnar, J.** Laboratorní diagnostika heparinem indukované trombocytopenie. *Transfuz. Hemat. dnes*, 2002, 8, 2, s. 59–62.
7. **Fouassier, M., Bourgerette, E., Libert, F., Pouplard, C., Marques-Verdier, A.** Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [<sup>14</sup>C]-serotonin release assay. *J. Tromb. Haemost.*, 2006, 4, 5, p. 1136–1139.
8. **Kelton, J., Smith, J., Warkentin, T., Hayward, C., Denomme, G., Horsewood, P.** Immunoglobulin G From Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia Binds To a Complex of Heparin and Platelet Factor 4. *Blood*, 1994, 83, 11, p. 3232–3239.
9. **Králová, S., Klodová, D., Gumulec, J. et al.** Heparinem indukovaná trombocytopenie. In Sborník XII. Pařízkovy dny, Nový Jičín 2006, s. 98.

Prezentace práce byla podpořena cestovním grantem ČSKB.

Do redakce došlo 3. 5. 2007.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Kateřina Andelová

Oddělení klinické biochemie

Onkologické centrum J. G. Mendela

Máchova 30

741 01 Nový Jičín

e-mail: katerina.andelova@onkologickecentrum.cz