

* Magyar Honvédség, Katonaorvosi Kutató Központ, Sugárbiológiai Kutató
Osztály, Budapest

** Országos Frederic Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató
Intézet, Budapest

KÍSÉRLETES THROMBUS DIAGNOSZTIKA JELZETT VÉRLEMEZKÉKKEL

Horváth Győző orvos alezredes*,
Spett Borbála**,
Jánoki Győző**,
Somosy Zoltán**

Közlésre érkezett: 1993. 11. 11.

Kulcsszavak: Hexametil-propilénamin oxim (HM-PAO) ^{99m}Tc -HM-PAO, trombo-embólia, trombózis, jelzett vérlemezekék, trombocita-aggregáció, vérlemezke funkció, szerotonin-release, szcintigráfia.

Szerzők humán, ill. az állatkísérletekhez a megfelelő fajtól származó vérlemezke szuszpenziót jeleztek ^{99m}Tc -HM-PAO-val. A jelzési hatásfokot befolyásoló tényezők közül kísérleteikben a vérlemezkeszám és az inkubációs közeg pH-jának szerepét tanulmányozták. Legjobb eredményt—70%-os jelzési hatásfok— a pH=6,5-ön nagy vérlemezkeszámú szuszpenzióban végzett jelzéssel érték el. A vérlemezke izolálás, további a ^{99m}Tc -HM-PAO-val végzett jelzés és további mintakezelés során a vérlemezke aktiváció semmilyen jelét nem tapasztalták. Ezt a vérlemezkeszám ellenőrzése mellett fénymikroszkópos és pásztázó elektromikroszkópos vizsgálattal is igazolták. A vérlemezke funkciót trombocita-aggregációs módszerrel tanulmányozták, aggregáló ágensként tromblint, ADP-t, ill. arachidonsavat használtak. Mérték az arachidonsavból az aktiváció során keletkező lipidperoxidációs végtermék, a malondialdehid (MDA) mennyiségét, valamint a trombin hatására kialakuló szerotonin release-t. Kimutatták, hogy a ^{99m}Tc -HM-PAI-val jelzett vérlemezekék aktiválhatósága, a különböző aktiváló ágensként adott válasza megegyezik a kontrolléval, vagyis az alkalmazott izolálási és jelzési módszerrel a kedvező jelzési hatásfok mellett morfológiailag és funkcionálisan is teljes értékű, az in vivo vérrögképződés kimutatására alkalmas vérlemezekék állíthatók elő. A jelzett vérlemezekék funkcionális épségét, további alkalmazhatóságukat a thrombus-diagnosztikában különböző állatfajokban kísérletesen indukált thrombusokon igazolták.

A tromboembóliás megbetegedések súlyos problémát jelentenek a klinikai gyakorlatban, mert hirtelen és az esetek egy részében váratlan fellépésükkel gyakran ka-

tasztrófálissá válnak. Akut veszélyt a tüdőembólia jelent, amely leggyakrabban az alsó végtag mély vénáiban kialakuló trombusok következménye (11, 12). Trombózis min-

den nagyobb sebészeti beavatkozás után felléphet, azonban ortopédiai, ill. traumatológiai beteganyagban a negyven éven felüli betegeknek gyakoriságuk elérheti az 50-70 százalékot is (19). A szülés utáni anyai halálzásban is a pulmonális embólia az egyik leggyakoribb ok. Összességében a statisztikai adatok arra utalnak, hogy a kórházba került betegek 20 százalékánál lehet számolni mélyvénás trombózis kialakulásával, ill. annak veszélyével. A súlyos következmények, elsősorban a tüdőembólia megelőzése érdekében rendkívül fontos a trombózisok minél korábbi felismerése. Klinikai tünetek azonban csak a betegek mintegy egyharmadánál léptek fel, és ezek is félrevezetőek lehetnek. A betegség felismerésére alkalmazott diagnosztikus módszerek (kontaszt venográfia, ultrahang, plethysmográfia, izotópos vizsgálatok) közül egy sem kizárólagos, ill. általánosan elfogadott, azonban a non-invazivitás és ismételtőség kritériumának kielégítésével a radioizotópos eljárás a diagnosztika mellett alkalmasnak tűnik a kezelés eredményességének követésére is.

Napjainkban már többféle izotópos módszer áll rendelkezésre a vérrögképződés korai felismeréséhez (10, 15, 16). Korábban a ^{125}I -fibrinogénnel végzett ún. felvételi teszt terjedt el (13), azonban a ^{125}I sugárfizikai jellemzői miatt a modern gamma kamerás vizsgálatok követelményeinek nem felel meg. A megfelelő jelzett diagnosztikum előállítására a kutatás több irányban is folyik, Goldman és mtsai. ^{111}In -mal jelzett vérlemezkékkel (9), míg Lavender ugyancsak ^{111}In -mal jelzett, a vérlemezke felületi antigénje ellen termelt ellenanyaggal végzett szcintigráfias vizsgálatokat (14). Az indium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mal való helyettesítése igen kívánatos lenne, figyelembe véve a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ optimális sugárfizikai tulajdonságait és azt a tényt, hogy minden izotóp-diagnosztikai laboratóri-

umban rendelkezésre áll. A közvetlen jelzés $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mal nem eredményezett funkcionálótrombocitákat (20, 22), viszont a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM-PAO (hexametil-propilénamin oxim) lipofil komplexe alkalmasnak mutatkozik viabilitásukat megőrző, jelzett tromboticiták előállítására (3, 4, 7). Laboratóriumunkban humán vérlemezkéket szeparáltunk és jeleztünk HM-PAO-val (21). Kísérleteinkben egyrészt in vitro módszerekkel vizsgáltuk a jelzett vérlemezkék morfológiai és funkcionális intaktóságát, másrészt különböző állatfajokban kísérletesen indukált trombusokon tanulmányoztuk alkalmasságukat a vérrögök kimutatására.

Módszerek

Vérlemezke izolálás jelzés és reszuszpéndálás:

A vizsgálatokhoz olyan fiatal egészséges donoroktól vett vénás vért használtunk, akik a vérvételt megelőzően legalább két hétig semmiféle gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A vérlemezkék izolálását Becker és mtsai által javasolt módszer szerint végeztük (3, 4), 34 ml vért vettünk 8 ml ACD-A (citromsav-citrát-dextróz) antikoagulánst tartalmazó műanyag fecskendőbe. A vérlemezke aktiváció megelőzése érdekében a további izolálási lépésekhez is kizárólag műanyag, steril eszközöket használtunk. A vérminták kíméletes összekeverése után szobahőmérsékleten centrifugáltuk 180 g-vel 15 percre, majd a vérlemezkékben gazdag plazmát (PRP) azonos feltételekkel újra centrifugáltuk a szennyező vöröses és fehérvérsejtek eltávolítására. A megtisztított vérlemezkékben dús plazma pH-jának 6,5-ös értékre történt beállítását követően a vérlemezkéket újabb centrifugálással (1000 g, 10 perc) ülepitettük ki. A trombotocitamentes felüliszót leszívtuk és később felhasználásig 4°C -on tartottuk. A fenti izolálási módszerrel a lecentrifugált üledék a

kiindulási vérlemezkeszámtól függően $2-2,3 \times 10^9$ vérlemezket tartalmazott.

A vérlemezkéket tartalmazó pelletet 0,5ml mennyiségű, laboratóriumunkban előállított 0,18 mg/300 MBq ^{99m}Tc -HM-PAO-val (LEUCOSCINT Tc-JCK-16) felszuszpendáltuk, és szobahőmérsékleten 30 percig indukáltuk. Ezt követően a szuszpenzióba két ml vérlemezke mentes plazmát (PPP) mértünk, majd 1000g-n 10 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a vérlemezke pelletet mért aktivitása alapján meghatároztuk a jelzési határfokot, amely az általunk alkalmazott izolálási és jelzési körülmények között elérte a 70%-ot. Vizsgálataink szerint a jelzési határfokot alapvetően két tényező, a vérlemezkeszám és a jelző közeg pH-ja határozza meg. Alacsonyabb vérlemezkeszám, ill. pH emelkedése egyaránt a jelzési határfok csökkentését eredményezi. Összehasonlító vizsgálatok céljából előállítottunk csak HM-PAO-val kezelt, illetve csak ^{99m}Tc -mal jelzett vérlemezkéket is. A kontroll mintákat azonos protokoll szerint fiziológiás konyhasóban inkubáltuk.

A jelzett, ill. fenti módon kezelt vérlemezkéket a további vizsgálatok követelményeinek megfelelően vérlemezke mentes plazmában (PPP, pH=7,4), illetve 2 mg/ml borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó Tyrode-Hepes (pH=7,4) pufferben reszuszpendáltuk, majd Laborscale (Medicor) részecske számlálóval történt számolást követően a vérlemezke számot $3,2-4 \times 10^8$ /ml-es értékre állítottuk be.

A vérlemezke-aggregáció vizsgálata:

A vizsgálatokat két Chronolog M 300-as típusú aggregométerrel végeztük a Born által leírt módszer szerint (6). A módszer a kevert vérlemezke szuszpenzióban aktíváló (aggregáló) ágensek hatására bekövetkező fényáteresztő-képesség változás idő-

beni követésén alapul. A vérlemezkek összecsapódásának (aggregációjának) eredményeként ugyanis az egyébként kevésbé fényáteresztő (turbulens) PRP, ill. vérlemezke szuszpenzió feltisztul, ezáltal az idő függvényében egyre közelít a vérlemezkéket nem tartalmazó, de egyéb paramétereket tekintve azonos minta optikai tulajdonságaihoz. Kísérleteinkben aggregáló ágensként trombin, adenozin-difoszfát (ADP) és arachidonsav emelkedő koncentrációit alkalmaztuk. Eredményeinket dózis-hatás görbékben mutatjuk be, melyeken a fényáteresztőképesség százalékos változása mellett az aggregációs folyamat egyéb jellemző paramétereit, az un. kapcsolási, vagy késleltetési időt és az aggregációs görbe leszálló szakaszának meredekségét (iránytangensét) is feltüntettük.

A vérlemezkek szerotonin tartalmának meghatározása:

A vérlemezke aktiváció harmadik szakasza az un. tárolási szemcsék tartalmának (szerotonin, ADP, trombin, stb...) kiürítése (release-reakció), amelyek a vérlemezkek irreverzibilis összecsapódását eredményezik. A folyamat vizsgálatának egyik elfogadott módszere az aktivációt követően a vérlemezkekben visszamaradt szerotonin meghatározásán alapul. Kísérleteinkben a *Beaumont és munkatársai* által leírt módszer általunk módosított változatát alkalmaztuk a vérlemezkek szerotonin tartalmának meghatározására (2). A trombinnal végzett vérlemezke aktivációt követően öt perccel a szuszpenzióhoz 0°C-os EDTA-t adtunk, ezt követően 0°C-on rövid ideig nagy fordulatszámmal lecentrifugáltuk (ependorf). A felülúszó eltávolítása után a vérlemezkéket, (ill. a vérlemezke aggregátumokat) tartalmazó üledéket további feldolgozásig -20°C-on tároltuk. A mérés előtt a vérlemezkéket 5%-os aszkorbinsavban reszuszpendáltuk, majd ismét -20°C-ra lefa-

gyasztottuk. A hűtést és kiolvasztást követően még kétszer megismételtük. Az így módon kezelt vérlemezkéket 1 : 2 arányban abszolút etanollal hígítottuk, centrifugáltuk, és végül a felülúszó ismételt etanolos hígítását követően a szerotonin tartalmát Perkin-Elmer MPF 44B spektrofluoriméterrel határoztuk meg 310 nm gerjesztési és 330 nm emissziós hullámhossz mellett.

A kontroll vérlemezkéken ellenőrzésként elvégzett citoplazma-marker LDH-aktivitás, valamint a tárolási szemcséket jellemző szerotonin meghatározás eredményei nem különböztek az ultrahanggal homogenizált (szonikált) vérlemezkék megfelelő értékeitől. Ez arra utal, hogy a három ciklusban végzett fagyasztás és kiolvasztás a vérlemezke membránok integritásának teljes mérvű károsodását eredményezve alkalmas az egyébként relatíve stabil szubcelluláris organelumok tartalmának vizsgálatára, esetünkben a szerotonin kvantitív meghatározására.

Malondialdehyd meghatározása vérlemezkékből

Ismert, hogy vérlemezkékben az arachidonsav metabolizmus cilo-oxienáz útjának biológiai jelentőségét tekintve fő terméke a tromboxán-A₂ (TxA₂), mely ciklikus prosztaglandin endopeoxidokból (PGG₂ és PGH₂) tromboxán szintetáz hatására képződik. A tromboxán szintetáz azonban képes a prosztaglandin endoperoxidok ettől eltérő átalakítására is, melynek eredménye ekvimoláris mennyiségű 12-hidroxi-heptadecatriénsav (HHT) és malondialdehyd (MDA) keletkezése (1, 8). Panse és munkatársal az MDA meghatározás jól ismert tiobarbitursavas módszerének olyan módosított változatát fejlesztettük ki, amellyel igazolták arachidonsavval aktivált vérlemezkékben a TxA₂ és MDA ekvimoláris keletkezését (17). Az MDA meghatározás ez esetben tehát a TxA₂ képződés megbízható indikátorának tekinthető.

Kísérleteinkben a vérlemezkékben arachidonsavból keletkező MDA-t Panse és munkatársal módszerével mértük. Az arachidonsav emelkedő koncentrációval végzett stimulálás után öt perccel a vérlemezke szuszpenzióhoz 0,5ml-éhez ónkloridot tartalmazó 20%-os TCA-t adtunk (0,4ml). 30 perc szobahőmérsékleten történt pihentetés után a mintákhoz 0,1ml TBA reagenst mérünk. A mintákat 30 percre 70°C-os vízfürdőbe helyeztük, időnként felráztuk, majd az inkubáció után lehűtöttük és 0,5ml NaCl-dal telített 10%-os HCl-t adását követően lecentrifugáltuk. A színintenzitást 532mm-es hullámhosszon spektrofotometrián mérjük.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok:

A kontroll, ill. ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzett vérlemezkéket 2,5%-os glutáraldehyd tartalmazó 0,1M-os pH=7,3-as foszfát pufferben előfixáltuk, majd 0,22mm pórusméretű filterre rétegeztük. 1%-os ozmiumtetroxidoxos fixálás után alkohollal víztelenítettünk, majd levegőn szárítottunk. A mikroszkópos vizsgálat előtt a mintákat aranyfüsttel vontuk be. A vizsgálat JSM 50A scanning elektromikroszkóppal történt.

In vivo vizsgálatok kísérletes trombus modelleken

Kísérleteinkben három állatfajban (patkány, nyúl, kutya) indukáltunk vérrögképződést különböző módon, majd a ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzett vérlemezke szuszpenzió adását követő meghatározott időközönként szcintigráfiai vizsgálatot végeztünk.

a) *Patkányban:* Pentobarbitállal altatott, 100g-os Wistar hím patkányoknak 2mg kappa-Carrageenin-t (Serva) adtunk intravénásan. Az állat bal hátsó végtagjára gumigyűrűt helyezve részleges stasist (pangást) indukáltunk. Ezt 2 óra múlva követte 0,2ml, 37MBq aktiválású ^{99m}Tc-HM-PAO-

val jelzett vérlemezke szuszpenzió ugyan-csak intravénás injektlása. Az állatokat a jelzett vérlemezkék adása után **Berthold-féle** kisállat scannerrel vizsgáltuk. A kísérlet végén a trombózt boncolással igazoltuk.

Megjegyzés: irodalmi adatok szerint kappa-Carrageenin vénás adását követően az alkalmazott állatfajtától is függően farkvéna trombózis és következményes nekrosis alakul ki (5). Mivel kísérleteinkben ezt nem tapasztaltuk, ezért volt szükség a Carrageenan kezelés és vértagle-szorítás kombinált alkalmazására.

b) *Nyúlban:* 3,5kg-os hím Újzélandi nyulak véna femoralisában formalin applikációs módszerrel indukáltunk trombuszt (18). A thrombus-indukció után három órával a fülvenében injektláltuk a ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett nyúl vérlemezkéket

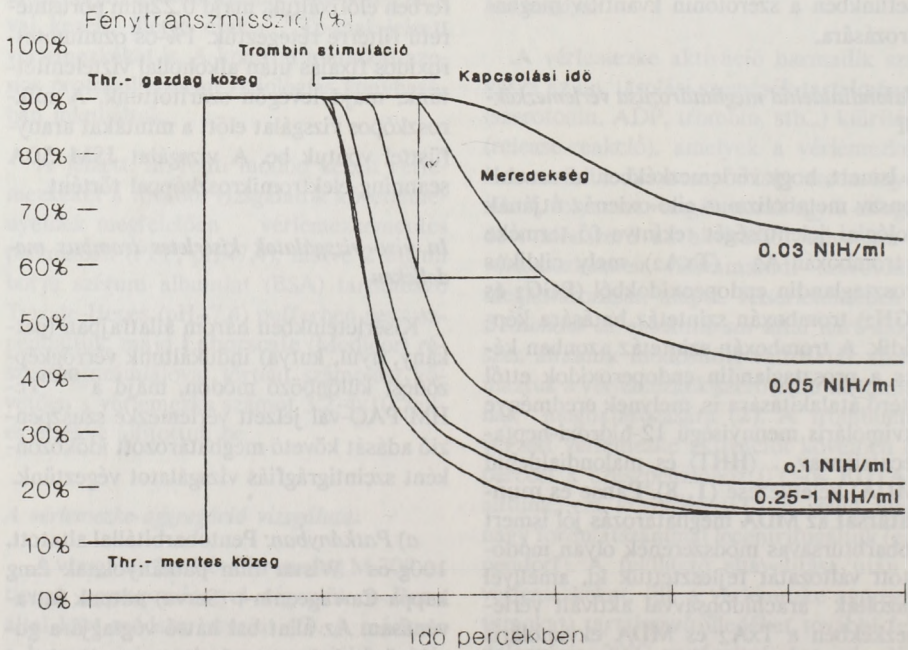
(150MBq/1ml), majd 20 óra múlva elvégeztük a szcintigráfias vizsgálatot gamma kamera segítségével.

c) *Kutyában:* 20kg-os hím korcs véna femoralisában embolizációs spirállal (MWCE-38-2-3 Cook) indukáltunk trombuszt. Az indukciót követő 26 óra múlva 600MBq/2ml ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett hűmán vérlemezke szuszpenziót injektláltunk. A szcintigráfias vizsgálatot az injektlást követő három és fél, négy, hat és 27 óra múlva gamma kamerával végeztük.

Eredmények

I. Az izolált és jelzett vérlemezkék morfológiai és funkcionális vizsgálata in vitro:

A kontroll, valamint a HM-PAO-val kezelt, ill. ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett vére-



1. ábra:
Trombin indukált vérlemezke aggregációs görbe jellemző paramétereinek feltüntetésével

mezke szuszpenzióknál a mintakezelés során a vérlemezke aktiváció semmilyen jelét nem tapasztaltuk. Az egyes munkafázisok után a minták fénymikroszkópos, továbbá pásztázó elektromikroszkópos vizsgálatával is sikerült igazolni a vérlemezkék morfológiai és mikromorfológiai épségét. Ezzel szemben a csak ^{99m}Tc -mal inkubált minták egy részében már az inkubáció, ill. az azt követő mintakezelés (centrifugálás és mosás) során a vérlemezkék aktiválódásra utaló jeleket észleltünk. Az esetek egy részében már a centrifugálással kiülepített trombociták reszuszpendálása sem eredményezett teljesen homogén szuszpenziót, és az ellenőrző fénymikroszkópos vizsgálat is kisebb-nagyobb aggregátumok jelenlétét igazolta. Ezek a minták az aggregáló ágens hozzáadására, vagy egyáltalán nem reagáltak, vagy csak jóval gyengébb aggregációs választ adtak. Ez a megfigyelésünk megfelel a vonatkozó szakirodalomban közölt adatoknak, miszerint az egyszer már részlegesen, illetve reverzibilisen aktiválódott vérlemezkék —látszólagos morfológiai intaktságukat ellenére— újabb stimulussal szemben érzéketlenné válnak (22).

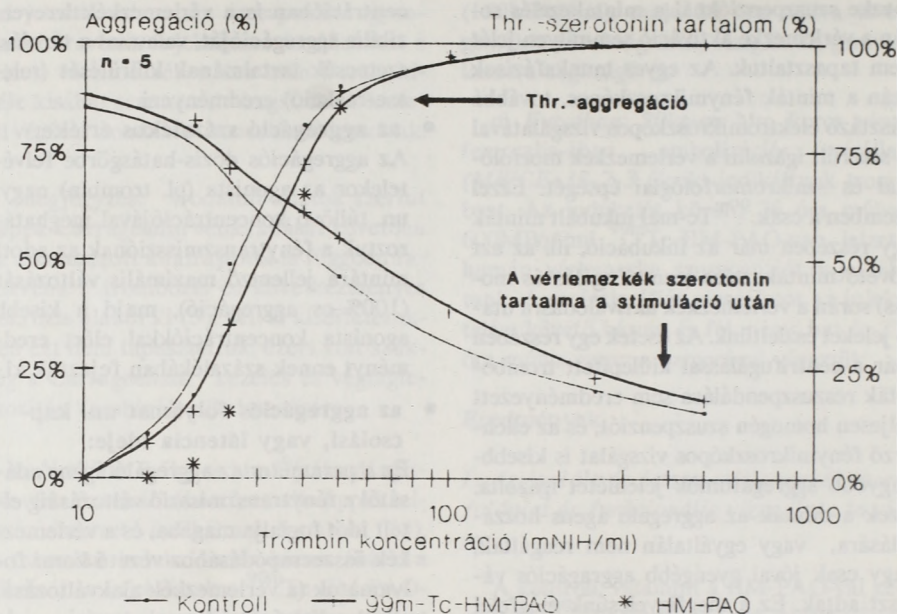
Az 1. ábrán a trombin emelkedő koncentrációi által kiváltott vérlemezke aktiváción (aggregáció) keresztül demonstráljuk, hogy az aggregációs görbék elemzésekor milyen jellemző paramétereket érteltünk:

- **az aggregációs folyamat reverzibilitása:**
Amennyiben az aggregáló ágens hatására bekövetkező vérlemezke aggregáció reverzibilis, úgy a szuszpenzióban a fénytranszmisszió gyors növekedését (aggregációs fázis) az optikai denzitás különböző mértékű és ütemű növekedése követi, indikálva a vérlemezke aggregátumok szétválását (deaggregációs fázis). A trombin, mint az egyik legerősebb fiziológiás aggregáló ágens, már kis kon-

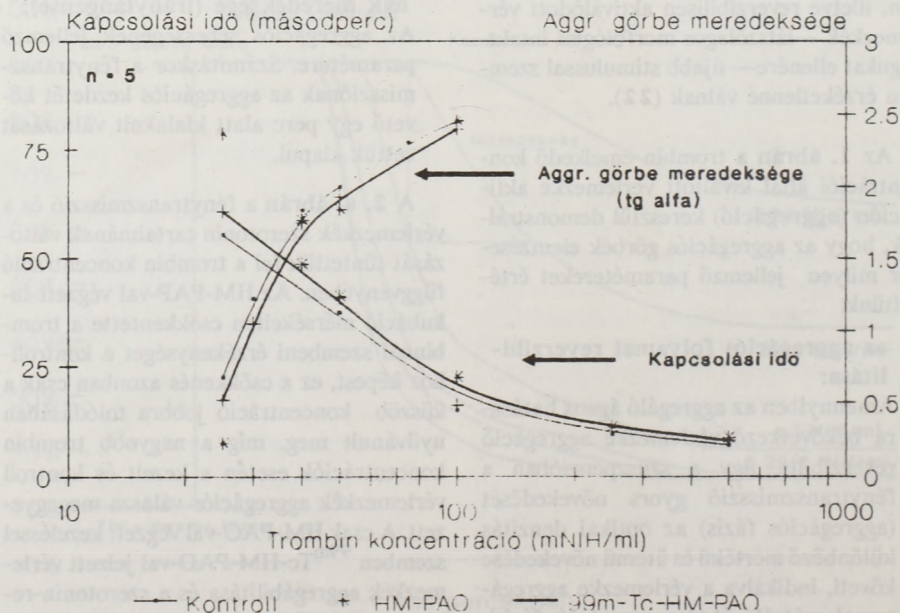
centrációban is a vérlemezkék irreverzibilis aggregációját, valamint a tárolási szemcsék tartalmának kiürülését (release-reakció) eredményezi.

- **az aggregáció százalékos értéke:**
Az aggregációs dózis-hatásgörbe felvételek az agonista (pl. trombin) nagy, un. túllövő koncentrációjával meghatároztuk a fénytranszmisszióknak az adott mintára jellemző maximális változását (100%-os aggregáció), majd a kisebb agonista koncentrációkkal elért eredményt ennek százalékában fejeztük ki.
- **az aggregációs folyamat un. kapcsolási, vagy látencia ideje:**
Ez a paraméter az aggregáló ágens adásától a fénytranszmisszió változásáig eltelt időt foglalja magába, és a vérlemezkék összecsapódásához vezető korai folyamatok (a vérlemezkék alakváltozása, stb...) sebességét jellemzi.
- **az aggregációs görbe leszálló szárának meredeksége (iránytangense):**
Az aggregációs sebességének jellemző paramétere. Számításkor a fénytranszmisszióknak az aggregációs kezdetét követő egy perc alatt kialakult változását vettük alapul.

A 2. a. ábrán a fénytranszmisszió és a vérlemezkék szerotonin tartalmának változását tüntettük fel a trombin koncentráció függvényében. Az HM-PAP-val végzett inkubáció mérsékelten csökkentette a trombinnal szembeni érzékenységet a kontrollhoz képest, ez a csökkenés azonban csak a küszöb koncentráció jobbra tolódásában nyilvánult meg, míg a nagyobb trombin koncentrációk esetén a kezelt és kontroll vérlemezkék aggregációs válasza megegyezett. A csak HM-PAO-val végzett kezeléssel szemben ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett vérlemezkék aggregabilitása és a szerotonin-release nem különbözött a kontrolltól. A fentiekkel megegyezően alakult a kapcsolási időnek és az aggregáció sebességének kon-

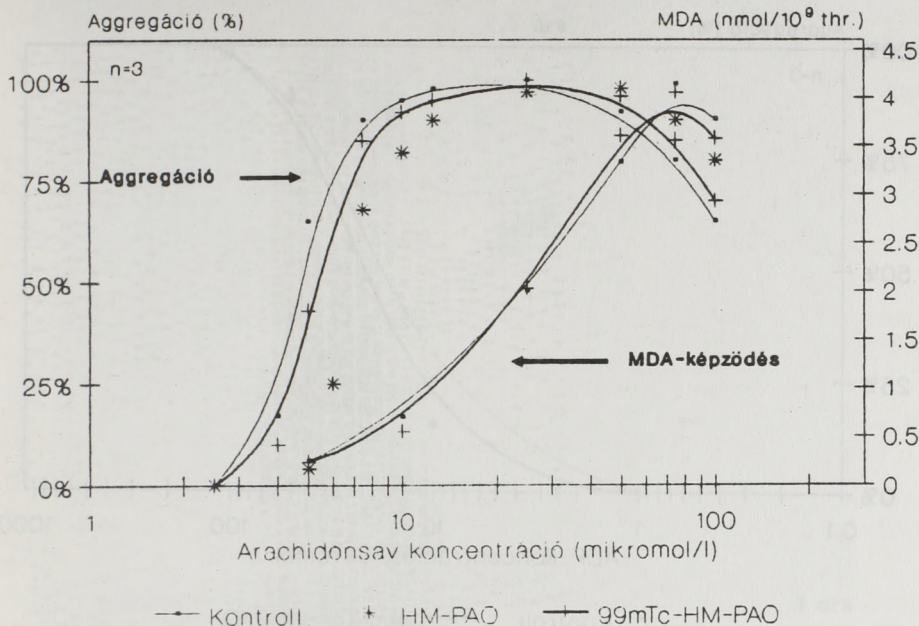


2. a.: Vérlemezke aggregáció és szerotonin release



2. b.: A vérlemezke aggregáció kapcsolási ideje és a görbe meredeksége

2. ábra: A trombin indukált vérlemezke válasz dózis-hatás összefüggése kontroll, HM-PAO-val kezelt, ill. ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzett humán vérlemezekén.



3. ábra: Arachidonsav indukált vérlemezke aggregáció és malondialdehid képződés kontroll és ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzett humán vérlemezkékben

centráció-függése is. Ez utóbbi paraméterek változását a 2. b. ábra szemlélteti.

A 3. ábrán a vérlemezkék aggregációja mellett az arachidonsavból képződött MDA koncentráció-függését ábrázoltuk. Az aggregációs dózis-hatásgörbe a jellemző harang alakú képet mutatja, ami azzal magyarázható, hogy a vérlemezkékben a ciklo-oxigenáz úton keletkező aggregáló ágens, a TxA₂ mellett nagyobb arachidonsav koncentrációk esetén az aggregációt gátló lipogénáz termékek (12-HPETE, 12-HETE) is keletkeznek. A TxA₂ szintézist reprezentáló MDA- és aggregációs dózis-hatás-görbéket egymásra vetítve erre utal kísérleteinkben az a kísérletes tény, hogy az aggregabilitás csökkenése az MDA-szint további emelkedése mellett következett be. Az egyes vizsgálati csoportok viselkedése az trombin esetében tapasztaltaknak megfelelően alakult, vagyis a HM-PAO-val kezelt minták érzékenysége mérsékelten csök-

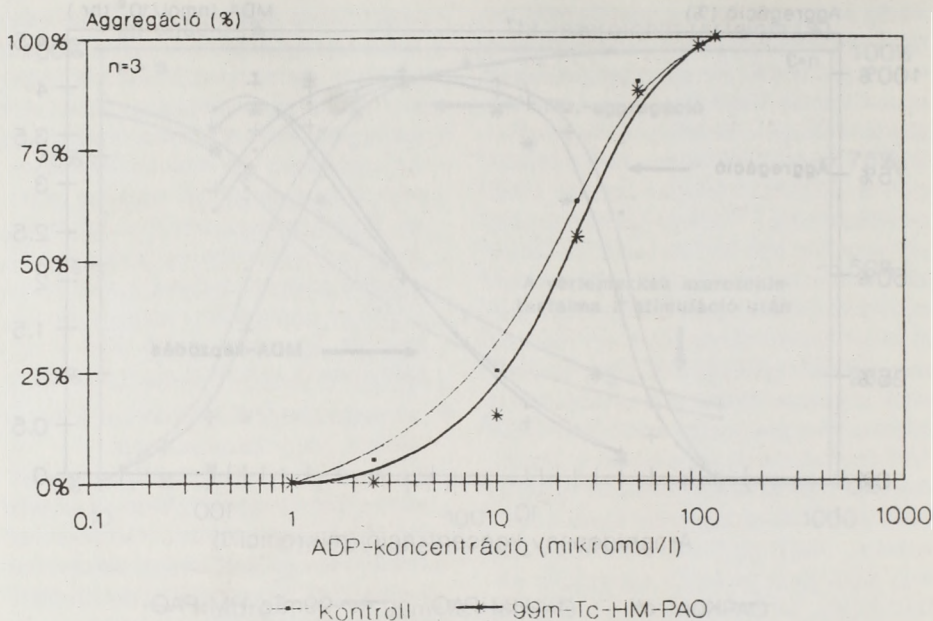
kent, míg a ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzettké a kontrollal megegyezett. Amint a 4. ábrán látható, hasonló eredményt kaptunk ADP aggregáló ágens alkalmazása esetén is. Ez esetben a vérlemezkéket az inkubációt, illetve jelzést követően fiziológiás pH-jú, vérlemezkékben szegény plazmában (PPP) reszuszpendáltuk.

2. In vivo kísérletek:

Az 5. ábra kappa-Carrageenin-nal kezelt és végtagleszorított patkányokról BERTHOLD-féle kisállat scanner-rel felvett szcintigrammot mutatja két és fél, illetve három órával a jelzett vérlemezkék adása után. Ez utóbbi időpontban a hátsó végtagban kialakult thrombus jól kirajzolódik.

A 6. ábra a nyúl véna femoralis-ban indukált thrombus kirajzolódását mutatja az izotóppal jelzett vérlemezkék injektálása után 20 órával.

A 7. ábrán a kutyán végzett kísérlet ered-



4. ábra: ADP indukált vérlemezke aggregáció kontroll és ^{99m}Tc-HM-PAO-val jelzett humán vérlemezkékben

ménye látható a vérlemezkék injektálása követő különböző időpontokban. A thrombotizált véna femoralis terület gamma kamerás felvételén jól követhető az izotóp dúsulás.

Megbeszélés

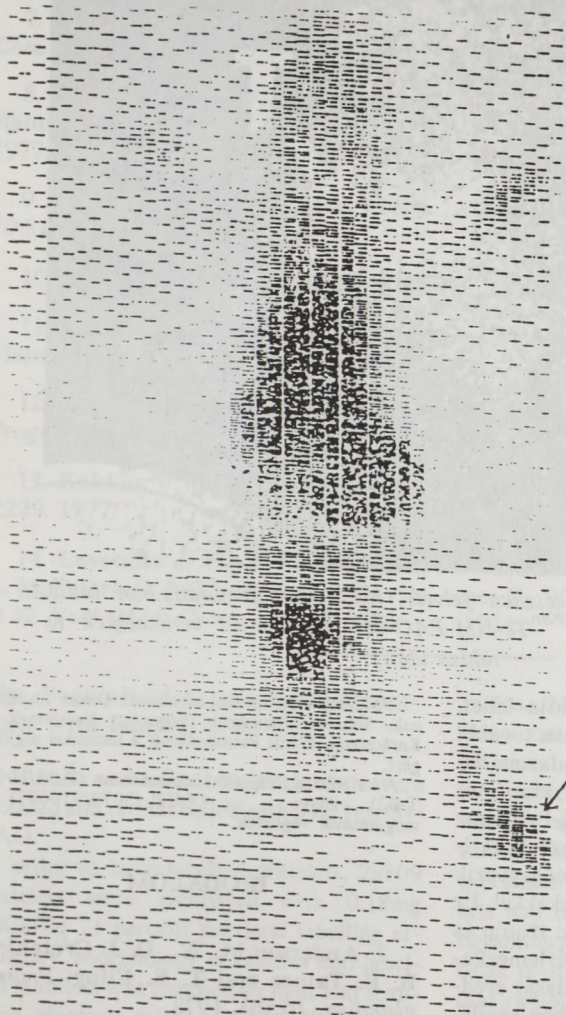
Kísérleteiben humán, ill. az állatkísérletekhez a megfelelő fajból származó vérlemezke szuszpenziót készítettünk és jeleztük a laboratóriumunkban előállított ^{99m}Tc-HM-PAO-val.

A szakirodalomban közölt adatok szerint a vérlemezkék izolálása és jelzése során alkalmazott körülmények erősen befolyásolják a jelzés hatékonyságát. A jelzési határfokot befolyásoló tényezők közül kísérleteinkben a vérlemezkeszám és a minta pH-jának szerepét tanulmányoztuk. A legjobb eredményt a pH=6,5-ös közegben nagy vérlemezkeszám (tömény szuszpenzió) mellett végzett jelzés biztosította, mely kísérlete-

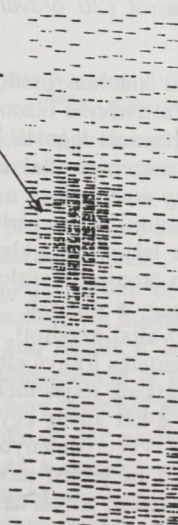
inkben elérte a 70 százalékot. A vérlemezke izolálása, ill. a HM-PAO-val, vagy ^{99m}Tc-HM-PAO-val végzett inkubáció és a további mintakezelés lépések során a vérlemezke aktiváció semmilyen jelét nem tapasztaltuk. Ezt a vérlemezkeszám (un. singlet platelet count) ellenőrzése mellett fénymikroszkópos és pásztázó elektromikroszkópos vizsgálattal is igazoltuk. Ugyanakkor a csak ^{99m}Tc-mal inkubált minták esetén az alacsony (mindössze néhány százalékos) jelzési határfok mellett a részleges, vagy teljes terjedelmű vérlemezke aktiváció jelei gyakran kialakultak már az inkubáció alatt, vagy azt követően.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a HM-PAO önmagában mérsékelten csökkenti a vérlemezkék különféle aggregáló ágensekkel szembeni érzékenységét. Ennek egy lehetséges oka a vérlemezke aktivációs folyamatokban központi szerepet játszó

2,5 óra



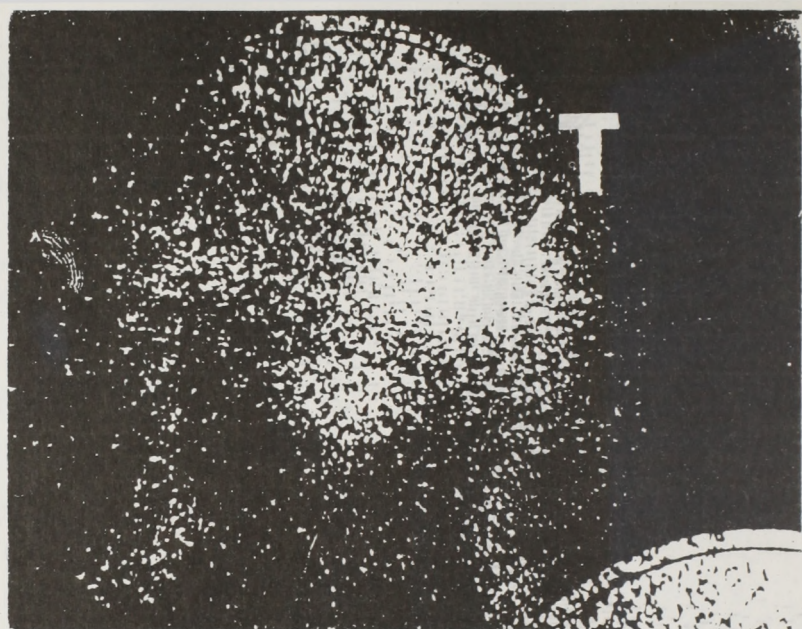
3 óra



Wistar patkányról kisállat scannerrel készült felvétel ^{99m}Tc -HM-PAO-trombocita i.v. injektálást követő 2,5 óra múlva (37 MBq/0,2 ml).

3 órás felvétel a trombotizált hátsó végtagról.

5. ábra: Patkány hátsó végtagon indukált trombus kimutatása ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett vérlemezkékkel (Berthold-féle kisállat scannerrel készített szcintigráfias felvétel)



6. ábra:Gamma-kamerával készített felvétel nyúl vena femoralis-ban indukált trombusról (20 órával a ^{99m}Tc -HM-PAO-val jelzett nyúl vérlemezkék iv. adása után)

sejten belüli kalcium modulációja lehet, azonban e feltételezés bizonyítása további kísérletek végzését igényli. Mindazonáltal a kalcium szerepére utal az a kísérletes tény is, hogy amennyiben a HM-PAO-hoz ^{99m}Tc -t kötünk, úgy a vérlemezkék aktíválhatósága teljes mértékben megegyezik a kezeletlen (kontroll) vérlemezkékkel. Ez arra utal, hogy a sugárzó ^{99m}Tc izotóp és a HM-PAO által kiváltott, a vérlemezke-reakció ellentétes irányú eltolódását eredményező hatások teljes mértékben semlegesítődnek a két anyag együttes alkalmazása esetén. Végeredményben az ismertett izolálási és jelzési módszer alkalmazásával a kedvező jelzési hatások mellett morfológiailag és funkcionálisan is teljes értékű, az in vivo vérrögképződés kimutatása alkalmas vérlemezkék állíthatók elő. A jelzett vérlemezkék funkcionális épségét, további alkalmazhatóságukat a thrombusdiagnosztikában különböző állatfajokban kísérletesen indukált thrombusokon igazoltuk.

A szerzők köszönetet mondanak Dirner Lajosnak, Suhajda Zsuzsának, Fogaras Katalinnak és Karácsonné Bohus Petronellának a technikai segítségért.

A kutatást a Népjóléti Minisztérium (T-38/1990 T-03), illetve az OMF (3079/910607) támogatásával végeztük.

IRODALOM

1. Anderson M. W., D. J. Crutchley, B. E. Tainer and T. E. Eling: *Prostaglandins*, 16:563. 1978.
2. Bauomont D. O., K. W. Whlitten, R. G. Mock, Ch. W. Slatters: *Thromb. Res.* 53:109. 1989.
3. Becker W., W. Börner, U. Borst: *Nucl. Med. Comm.* 10:831. 1988.
4. Becker W., U. Borst, T. Krohe, W. Börner: *Eur. J. Nucl. Med.* 15-296. 1989.
5. Bekemeier H., R. Hirschelman, A. J. Gessler: *Agents and Actios*, 16:5. 1965.

6. Born G. V. R.: *Nature*, 194:927. 1962.
7. Danpure H. J., S. Osman: *Nucl. Med. Com.* 9:267. 1988.
8. Dichfalusy U., P. Palardeau, S. Hammartröm: *FEBS Letters*, 84:271. 1977.
9. Goldman M. D.: *Nucl. Med. Comm.* 10:817. 1988.
10. Grossman Z.: *Radiology*, 1989. oct.
11. Kakkar V. V., C. T. Howe, C. Flanc, W. D. Clark: *Lancet*, 230. 1969.
12. Kakkar V. V., T. P. Corrigan: *Progr. Cardiovasc. Dis.* 17:207. 1974.
13. Kakkar V. V.: *Semin. Nucl. Med.* 7:229. 1977.
14. Lavender J. P., A. W. Stutelm, A. M. Peters, C. J. O'Donnell, G. J. Davies et al: *Nucl. Med. Comm.* 10:817. 1988.
15. Moser K. M., P. F. Fedullo: *Seminars in Nuclear Medicine*, 14(3):188. 1984.
16. Moser K. M.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:235. 1990.
17. Panse M., H-U. Block, W. Förster, H-J. Mest: *Prostaglandins*, 30:1031. 1981.
18. Rosemberg N. et al: *Surgery*, 1959. october, 764.
19. Dr. Sándor Tamás: A postoperatív vénás thromboembóliák diagnosztikája és profilaxisa *Kandidátusi disszertáció*, 1988.
20. Schroth, H. I., E. Oberhausen, R. Berberich: *J. Nucl. Med.* 6:469. 1981.
21. Spett B., Horváth Gy., Jánoki Gy., Somosy Z.: *Izotóptechnika, Diagnosztika*, 35-97. 1992.
22. Uchida T. K. Tasunaga, S. Karlyone, G. Wakisaka: *J. Nucl. Med.* 15:801. 1974.

The diagnosis of experimental thrombosis with labelled platelets

Human and animal blood platelets were isolated and radiolabelled with ^{99m}Tc -HM-PAO.

In order to have labelled platelets, 2×10^9 platelets were incubated with 0.18mg 300MBq 71 percent maximal labelling efficiency. Morphology of control and labelled platelets was checked by light and scanning electron microscopy, while platelet aggregation induced by various aggregating agents, serotonin release reaction as well as malondialdehyde (MDA) formation from arachidonic acid served as in vivo measures of platelet functionality. No signs of activation had developed as a consequence of either platelet isolation or labelling procedures used. Furthermore, in contrast to HM-PAO alone that caused a very moderate decrease in platelet functionality and the ^{99m}Tc caused incomplete platelet acti-

vation, there was not any difference between control and ^{99m}Tc -HM-PAO-labelled platelets considering their morphology and responsiveness challenged by different aggregating agents during these experiments. Radiolabelled platelets were also tested on experimental thrombus models in rats, rabbits and dogs. Appropriate detailed scintigrams are enclosed in the paper. On the basis of data and results it is concluded that radiolabelling method of blood platelets described here does not alter platelet function involved in the coagulation mechanism, and as a consequence, labelled platelets seem to be very useful tools in the future for the diagnosis of thrombo-embolic disorders.

Dr. Horváth Győző

1221 Budapest, Pentz K. tér

Orsz. „Juliot Curie” Sugárbiológiai és Sugárvédő Kutató Intézet