

Hanna Pitkänen
LL (väit.), erikoislääkäri
HUS ATeK, Uusi lastensairaala
hanna.pitkanen@hus.fi



Löyhä fibrini – muutokset trombiinin muodostuksessa ja hyytymän pysyvyydessä

Hanna Pitkänen

23.11.2018, Helsingin yliopisto

Vastaväittäjä

Professori László Muszbek, Debrecenin yliopisto

Väitöskirjatyön esitarkastajat

Dosentti Kaj Metsärinne, Turun yliopisto

Dosentti Jaakko Parkkinen, lääketieteellinen johtaja, Pfizer

Kustos

Professori Klaus Olkkola, Helsingin yliopisto

► Veren hyytyminen on elintärkeä ketjureaktio, joka tähtää trombiinin ja myöhemmin fibrini-verkon muodostumiseen. Fibrinolyttinen mekanismi poistaa tarpeettomat hyytymät verisuonista ja osallistuu haavan paranemiseen [1,2]. Verenvuodon hoito antamalla potilaille verituotteita ja erilaisia hyytymistekijäkonsentraatteja tähtää riittävään hemostaasiin ja samalla patologisten hyytymien estämiseen [3]. Virusturvallisuuden parantamiseksi luovuttajilta kerätty plasma altistetaan ns. SD-käsittelylle (solvent/detergent), joka muuttaa sen rasvakoostumusta ja hyytymistekijätasoa [4].

Sekä hemostaasi että fibrinolyysi ovat vahvasti sidoksissa elimistön muuhun toimintaan. Perinnöllisten ja hankinnaisten hyytymishäiriöiden lisäksi muun muassa rasva-aineenvaihdunnan muutokset, munuaisten ja maksan vajaatoiminta ja metaboliset taudit vaikuttavat hyytymisjärjestelmän toimintaan [5–8]. Hyytymistekijä XIII:n (FXIII) vajeessa hyytymä jää rakenteellisesti heikoksi, ja muodostuneet hyytymät hajoavat normaalia herkemmin. FXIII aktivoituu trombiinin vaikutuksesta ja huolehtii fibriniin rakenteen vahvistamisesta. FXIII:n puutteesta kärsiviä potilaita voidaan hoitaa

antamalla heille tekijä XIII-konsentraattia suonensisäisesti [9,10]. Myös suomalaisen tautiperimään kuuluva lysinurinen proteiini-intoleranssi (LPI) aiheuttaa verenvuototaipumusta, jonka mekanismit tunnetaan huonosti [7,11]. LPI on perinnöllinen aineenvaihduntasairaus, joka vaikuttaa laajasti moniin eri elinjärjestelmiin – erityisesti munuaisiin. Tauti johtuu tiettyjen aminohappojen (lysiini, ornitiini ja arginiini) kuljetushäiriöstä, aiheuttaen niiden huonon imeytymisen ruoansulatuskanavassa ja lisääntyneen menetykseen virtsan mukana [12–14]. LPI-potilaat kärsivät usein munuaisten vajaatoiminnasta, ja osa potilaista tarvitsee elinaikanaan munuaiskorvaushoitoja tai munuaissiirteen, jolloin herkkyys verenvuodoille voi muodostua ongelmaksi [14,15].

Tavoitteet

Väitöskirjan yleistavoitteena oli tutkia trombiinin muodostusta ja fibrinolyysiä in vitro ja ex vivo. Lisäksi tutkimuksessa vertailtiin klassisten ja uusien laboratoriomenetelmien antamaa tietoa hyytymisjärjestelmän toimivuudesta. Uusilla, ns. toiminnallisilla menetelmillä, joihin kuuluvat kalibroitu automaattinen trombogrammi (CAT®) ja rotationaalinen tromboelastometria (ROTEM®), >>

Väitöskirja

Alterations and Impact of Thrombin Generation and Clot Formation in Solvent/Detergent Plasma, FXIII Deficiency and Lysinuric Protein Intolerance

Osatyöt

- I Pitkänen H, Jouppila A, Mowinckel MC, Lemponen M, Patiwaal S, Sandset PM, Lassila R, Brinkman HJ. Enhanced thrombin generation and reduced intact protein S in processed solvent detergent plasma. *Thrombosis Research* 2015 Jan;135: 167-74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2185.
- II Pitkänen HH, Jouppila A, Lemponen M, Ilmakunnas M, Ahonen J, Lassila R. Factor XIII deficiency enhances thrombin generation due to impaired fibrin polymerization – An effect corrected by Factor XIII replacement. *Thrombosis Research* 2017 Jan;149: 56-61. doi: 10.1016/j.thromres.2014.10.020.
- III Pitkänen HH, Kärki M, Niinikoski H, Tanner L, Näntö-Salonen K, Pikta M, Kopatz WF, Zuurveld M, Meijers JCM, Brinkman HJ, and Lassila R. Abnormal coagulation and enhanced fibrinolysis due to lysinuric protein intolerance associates with bleeds and renal impairment. *Haemophilia* 2018 Sep;24: e312-e321. doi: 10.1111/hae.13543.



Vastaväittäjä, professori László Muszbek Debrecenin yliopistosta, väittelijä Hanna Pitkänen sekä kustos professori Klaus Olkkola (Helsingin yliopisto). Kuva Heidi Vanhatupa, 2018.

voidaan mitata esimerkiksi syntyvän trombiinin määrää (CAT[®]) ja hyytymän muodostumisnopeutta, kokoa ja herkkyyttä fibrinolyysille (ROTEM[®]). Keskityimme erityisesti tutkimaan trombiinin muodostumista SD-käsitellyssä plasmassa, perinnöllisessä hyytymistekijä XIII:n puutoksessa ja sen korvaushoidossa FXIII-konsentraatilla sekä LPI:ssa, johon liittyy tuntematon vuotohäiriö. Lisäksi tutkimme LPI:n vaikutusta trombiinin ja fibrinin muodostumiseen sekä fibrinolyysiin, ja näiden mahdollista yhteyttä munuaisten vajaatoimintaan.

Potilaat ja menetelmät

Osatyö I oli biokemiallinen ja siinä käytettiin useita ihmisperäisiä plasmavalmisteita. SD-käsitelty plasma (veriryhmät O, A, B ja AB) oli Octapharman tuottamaa (Lachen, Sveitsi). Osatyöhön II rekrytoitiin kolme synnynnäistä FXIII-puutosta sairastavaa aikuista potilasta.

Osatyöhön III puolestaan rekrytoitiin 15 aikuista LPI-potilasta. Kaikissa kolmessa osatyössä tuloksia vertailtiin terveiden vapaaehtoisten luovuttamaan plasmaan. Veren hyytymistä kuvaavina seulontatutkimuksina mitattiin aPTT, TT% ja trombiiniaika. Lisäksi soveltuvin osin mitattiin hyytymistekijät II, V, VII, FVIII, IX, XI, XII, XIII, fibrinogeeni ja protrombiinifragmentit F1+2. Luonnollisista antikoagulanteista tutkittiin antitrombiini (AT3), proteiini C, proteiini S ja tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Fibrinolyysin säätelijöistä mitattiin plasminogeeni, α 2-anti-plasmiini ja thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). Fibrinin hajoamistuotteiden havitsemiseksi selvitettiin D-dimeerin ja plasmiini- α 2-antiplasmiini-kompleksin pitoisuudet. Primaarin hemostaasin toimintaa arvioitiin PFA-100[®] -laitteella (Erlangen, Saksa, Siemens). Trombiinin muodustumista *in vitro* arvioitiin CAT[®]-laitteella (Maastricht,

Hollanti, Stago); ROTEM[®]-laitteella (München, Saksa, Tem International[®]) mitattiin kokoveren viskoelastisia ominaisuuksia.

Tulokset

SD-plasmassa trombiinia muodostuu noin nelinkertaisesti tavalliseen plasmaan verrattuna. Jatkotutkimuksemme perusteella ilmiö on seurausta luonnollisen antikoagulantin, proteiini S:n aktiivisen yksiketjuisen muodon, määrän romahtamisesta. Lisäksi fibrinolyysi on kiihtynyt SD-plasmassa, johtuen mahdollisesti fibrinolyysin estäjän, α 2-antiplasmiinin, vähenemisestä. Fibrinolyysiä voitiin kontrolloida lisäämällä SD-plasmaan traneksaamihappoa [16].

Tutkimme kolmen perinnöllistä FXIII puutosta sairastavan potilaan natiivitilaa ja vasteita FXIII korvaushoidolle. Potilaiden trombiinin tuotanto kiihtyi matalilla FXIII tasoilla, mutta normalisoitui terveiden verrokkien tasolle korvaushoidolla.

Jatkotutkimuksissa käytimme GPRP-peptidiä estämään fibrini-verkon normaalia muodostusta, jolloin analisisesti FXIII:n puutteelle trombiinin muodostuminen myös kiihtyi. Tulokset viittaavat siihen, että huonolaatuinen fibrini voi myös aktivoida trombiinin tuotantoa, kuten on havaittu osalla dysfibrinogenemia-potilaista [17].

Hyytymisyksikköön tuli pre-operatiivinen konsultaatio koskien LPI-potilaan munuaissirtoa; potilaalla oli ollut vaikeita verenvuotoja ja hyytymistekijöissä oli poikkeavuuksia: matala fibrinogeeni, matala FXIII-pitoisuus ja n. 100-kertainen D-dimeeripitoisuus normaaliarvoi-

Perinteisten ja toiminnallisten hyytymistutkimusten yhdistäminen antaa tarkemman kuvan hyytymisjärjestelmän toiminnasta.

hin verrattuna. Selvitimme 15:n LPI-potilaan hyytymisjärjestelmän toimintaa. LPI lisää vuotoherkkyyttä toimenpiteiden yhteydessä ja potilaat kärsivät munuaisten vajaatoiminnasta. LPI:ssa primaari hemostaasi on heikentynyt ja trombiinin muodostuminen on poikkeavaa. Heikentynyt fibriniin muodostus ja kiihtynyt fibrinolyysi ovat riippuvaisia munuaisten vajaatoiminnan vaikeusasteesta tai päinvastoin. LPI-potilailta tulisi tarkastaa ennen toimenpiteitä verenkuvaa ja primaarin hemostaasin toiminta, ja antaa tarvittaessa verihyväksilä. Lisäksi potilaiden fibrinogeeni- ja FXIII-tasot tulee mitata ja mahdolliset puutokset korvata hyytymistekijävalmisteilla [18].

Toiminnalliset mittausvälineet pystyvät tunnistamaan fibrinolyysin SD-plasmassa, vaikka ilmiö ei ollut todennettavissa perinteisillä

laboratoriomenetelmillä. Toisaalta perinnöllisessä FXIII-puutoksessa fibrinolyysiä ei voitu havaita edes matalilla FXIII-tasoilla klassisilla tai toiminnallisilla menetelmillä. Sen sijaan trombiinin muodostus oli kiihtynyt. LPI:ssa havaitsimme voimakkaan fibrinolyysin sekä perinteisillä että toiminnallisilla menetelmillä. Lisäksi totesimme myös fibriniin muodostumisen olevan heikentynyttä toiminnallisilla menetelmillä [16–18].

Yhteenveto

Perinteisten ja toiminnallisten hyytymistutkimusten yhdistäminen antaa tarkemman kuvan hyytymisjärjestelmän toiminnasta ja auttaa kliinisessä päätöksenteossa. SD-plasman erityispiirteet tulee ottaa huomioon suunniteltaessa verenvuodon hoitoa ja perioperatiivista hoitoa. Kiihtyneen trombiinin muodostuksen vaikutukset matalilla FXIII-tasoilla ovat merkityksellisiä arvioitaessa FXIII hoidon tehoa, annostelua ja turvallisuutta ja iäkkäiden potilaiden tukosriskejä [19]. LPI:n osalta tutkimustuloksemme korostavat veren hyytymishäiriöiden osallisuutta munuaistautien yhteydessä, jota on kuvattu myös yleisesti munuaissairauksissa. Uudet, toiminnalliset veren hyytymistä mittaavat menetelmät antavat lisätietoa hyytymän muodostumisesta ja hajoamisesta, ja niiden yhdistäminen perinteisiin menetelmiin tarjoaa jatkossa tarkemman kokonaiskuvan elimistön hemostaattisesta kapasiteetista ja kliinisestä merkityksestä. Etenkin ROTEM® yleistyvässä käytössä vieritestinä, jolloin sen rajoitukset havaita poikkeava veren hyytyminen erityisryhmillä, kuten esimerkiksi hemofiliaa ja Von Willebrandin tautia sairastavilla, tulee ottaa huomioon [20]. ■

Viiitteet

1. R. Al Dieri, B. de Laat, H.C. Hemker, Thrombin generation: what have we learned?, *Blood Rev.* 26 (2012) 197–203.
2. K. Kolev, C. Longstaff, Bleeding related to disturbed fibrinolysis., *Br. J. Haematol.* 175 (2016) 12–23.
3. S.A. Kozek-Langenecker, A.B. Ahmed, A. Afshari, et al., Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016, *Eur J Anaesthesiol.* 34 (2017) 332–395.

4. P. Hellstern, B.G. Solheim, The Use of Solvent/Detergent Treatment in Pathogen Reduction of Plasma., *Transfus. Med. Hemother.* 38 (2011) 65–70.
5. A. Blasi, Coagulopathy in liver disease: Lack of an assessment tool., *World J. Gastroenterol.* 21 (2015) 10062–71.
6. T. Hiraga, M. Shimada, T. Tsukada, T. Murase, Hypertriglyceridemia, but not hypercholesterolemia, is associated with the alterations of fibrinolytic system, *Horm Metab Res.* 28 (1996) 603–606.
7. Y. Kawanoki, S. Kawata, E. Yamasaki, et al., Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation, *Metabolism.* 48 (1999) 1136–1140.
8. T. Madhusudhan, B.A. Kerlin, B. Isermann, The emerging role of coagulation proteases in kidney disease., *Nat. Rev. Nephrol.* 12 (2016) 94–109.
9. L. Muszbek, Z. Bereczky, Z. Bagoly, I. Komáromi, É. Katona, Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions., *Physiol. Rev.* 91 (2011) 931–72.
10. R. Lassila, Clinical Use of Factor XIII Concentrates., *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 440–4.
11. L. Tanner, K. Nanto-Salonen, H. Niinikoski, et al., Hazards associated with pregnancies and deliveries in lysinuric protein intolerance, *Metabolism.* 55 (2006) 224–231.
12. J. Perheentupa, J.K. Visakorpi, Protein intolerance with deficient transport of basic aminoacids. Another inborn error of metabolism, *Lancet.* 2 (1965) 813–816.
13. J. Rajantie, O. Simell, J. Perheentupa, Lysinuric protein intolerance. Basolateral transport defect in renal tubuli, *J Clin Invest.* 67 (1981) 1078–1082.
14. L.M. Tanner, K. Nanto-Salonen, H. Niinikoski, et al., Nephropathy advancing to end-stage renal disease: a novel complication of lysinuric protein intolerance, *J Pediatr.* 150 (2007) 631–4, 634.e1.
15. M. Karki, K. Nanto-Salonen, H. Niinikoski, L.M. Tanner, Urine Beta2-Microglobulin Is an Early Marker of Renal Involvement in LPI, *JIMD Rep.* 25 (2016) 47–55.
16. H. Pitkänen, A. Jouppila, M.-C. Mowinckel, et al., Enhanced thrombin generation and reduced intact protein S in processed solvent detergent plasma., *Thromb. Res.* 135 (2015) 167–74.
17. H.H. Pitkänen, A. Jouppila, M. Lemponen, et al., Factor XIII deficiency enhances thrombin generation due to impaired fibrin polymerization - An effect corrected by Factor XIII replacement., *Thromb. Res.* 149 (2017) 56–61.
18. H.H. Pitkänen, M. Karki, H. Niinikoski, et al., Abnormal coagulation and enhanced fibrinolysis due to lysinuric protein intolerance associates with bleeds and renal impairment., *Haemophilia.* 24 (2018) e312–e321.
19. T. Szántó, B. Salmela, A. Mäkiperna, E. Armstrong, R. Lassila, Management of acute myocardial infarction in a patient with factor XIII deficiency using prophylactic factor replacement therapy, *Haemophilia.*
20. J. Ahonen, L. Joutsu-Korhonen, R. Lassila, Tromboelastometria kliinisessä työssä, *Duodecim.* 133 (2017) 2125–36.