

Trombingenerációs vizsgálatok és klinikai alkalmazásuk

Kern Anita^{1, 2} ■ Várnai Katalin dr.¹ ■ Vásárhelyi Barna dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Budapest

²Diagon Kft., Budapest

A trombin a véralvadási kaszkád egyik kulcsenzime, amely mind pro-, mind antikoaguláns funkcióval rendelkezik. Központi szerepe folytán a trombin képződése a véralvadási folyamat egyik legfontosabb lépése, amely az úgynevezett trombingenerációs vizsgálattal jellemezhető. A trombingeneráció globális véralvadási teszt, amely átfogó képet ad a haemostasis állapotáról. Karakterisztikáját egyaránt befolyásolják a pro- és az antikoaguláns folyamatok, ezáltal alkalmas a fokozott trombóziskészség és a vérzékenység kimutatására is. Klinikai vizsgálatok igazolják a trombingeneráció fokozódását vénás és artériás trombózishajlam esetében. Segíthet az antikoaguláns terápia monitorozásában, faktorinhibitorokkal történő antikoaguláns kezelés esetében is. A trombingenerációs vizsgálatok eredményei hemofília esetén jól tükrözik a vérzés súlyosságát, és monitorozható a faktorkészítményekkel történő terápia. Információt adhat azokban az esetekben is, amikor a hemofiliás betegnél inhibitorok jelennek meg, és emiatt speciális kezelésre van szükség. A klinikai gyakorlatban történő alkalmazáshoz elengedhetetlen a módszer standardizálása és a klinikai döntéshozatalhoz szükséges küszöbértékek meghatározása. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(22), 851–857.

Kulcsszavak: véralvadási vizsgálatok, trombózis, vérzékenység, trombin

Thrombin generation assays and their clinical application

Thrombin is a key enzyme of the coagulation system, having both pro- and anticoagulant functions. Thus, the generation of thrombin is one of the most important steps in coagulation. Global haemostasis assay, the so-called thrombin generation test is appropriate for its assessment. Since thrombin generation is sensible for both pro- and anticoagulant processes it can be applied for the general characterisation of the risk of thrombosis and bleeding, too. Clinical studies confirmed augmented thrombin generation in patients with high risk of venous or arterial thrombosis. Anticoagulant therapy (also novel oral anticoagulant treatment) can be monitored by thrombin generation. In case of haemophilia thrombin generation assays reflect bleeding severity. It is applicable for monitoring of both conventional haemophilia treatment and inhibitor-bypassing therapy, which is needed when inhibitors develop in patients. Standardization of thrombin generation methods and determination of cut off values are required before its application in clinical practice.

Keywords: blood coagulation tests, thrombosis, blood coagulation disorders, thrombin

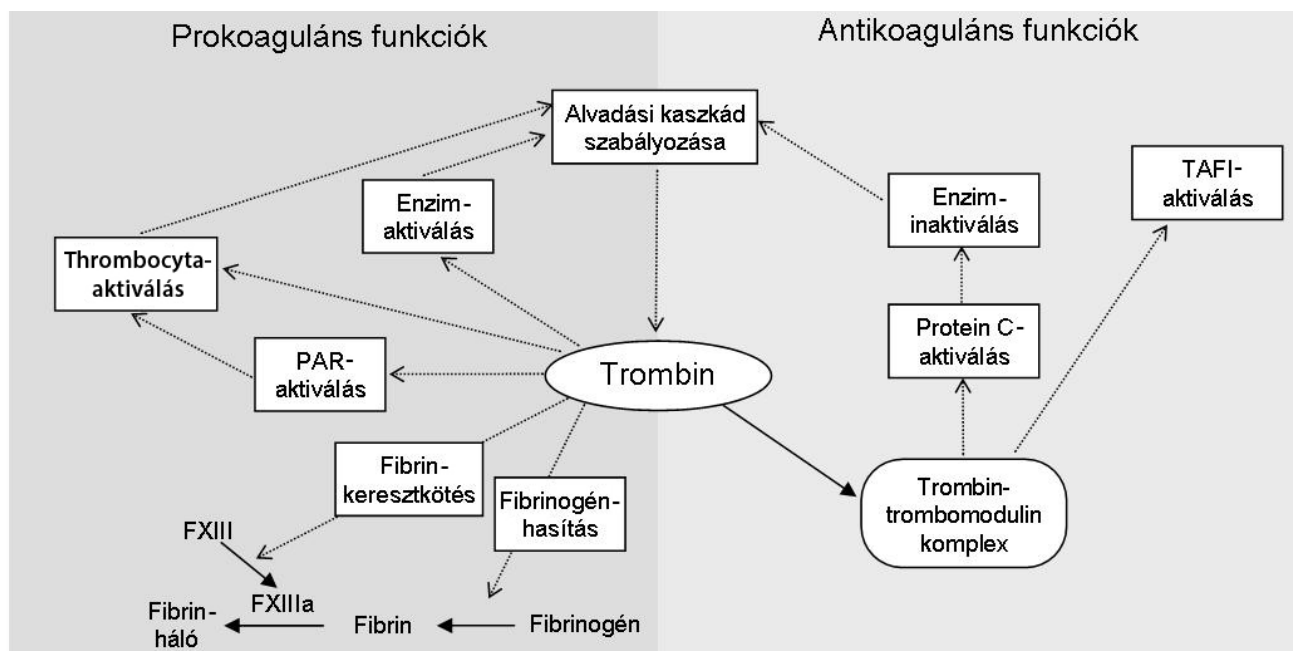
Kern, A., Várnai, K., Vásárhelyi, B. [Thrombin generation assays and their clinical application]. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(22), 851–857.

(Beérkezett: 2014. február 26.; elfogadva: 2014. március 27.)

Rövidítések

APC = aktivált protein C; aPTI = aktivált parciális trombo-
plasztin idő; ETP = endogén trombinpotenciál; INR = (inter-
national normalised ratio) nemzetközi normalizált ráta;
LMWH = (low molecular weight heparin) kis molekulatömegű
heparin; PAR = proteázaktivált receptor; TG = trombingenerá-
ció; TFPI = szöveti faktor út inhibitor; VKA = K-vitamin-anta-
gonista; VTE = vénás thromboembolia

A trombin a véralvadási kaszkád egyik kulcsenzime, amely mind pro-, mind antikoaguláns funkcióval rendelkezik. A haemostasisban többféle szerepet tölt be [1]; elsődleges funkciója a fibrinogén–fibrin átalakulás katalizálása [2], de kontrollált proteolitikus hasítás révén aktívál más véralvadási faktorokat [3], valamint celluláris receptorokkal [4, 5] (trombomodulin, proteázaktivált receptor – PAR) is kölcsönhatásba lép (1. ábra).

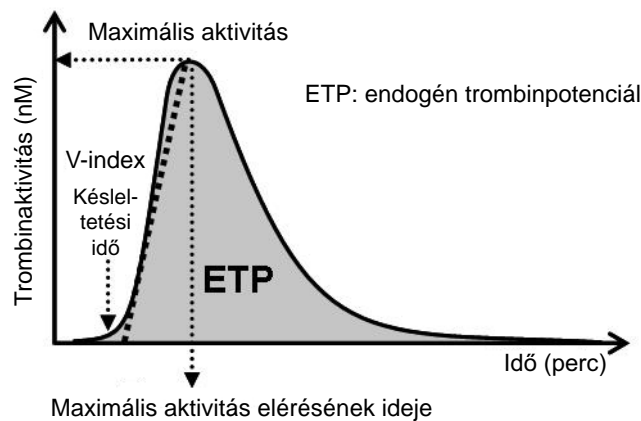


1. ábra | A trombin központi szerepe a véralvadásban
 PAR = proteázaktivált receptor; TAFI = trombinnal aktiválható fibrinolízisinhibitor

Központi szerepe folytán a trombinképződés (-generáció) a véralvadási folyamat egyik legfontosabb lépése. A trombin keletkezésének vizsgálatára szolgáló tesztek két fő csoportra lehet osztani.

Az egyik fő csoport az *in vivo* keletkező trombin mennyiségének vizsgálatán alapul. A plazmában lévő F1+2 fragmens (aktivált X. faktor általi aktiválás hasítási termékei) és a trombin-antitrombin komplex (inaktiválódott trombin) szintek immunoassay-vel történő meghatározása esetén az emelkedett F1+2 és trombin-antitrombin komplex szintek fokozott *in vivo* trombinképződést, vagyis patológiás folyamatot jeleznek [6]. Az eredmények megbízhatóságát rontja az F1+2 fragmens és a trombin-antitrombin komplex rövid fél életideje, valamint az, hogy a plazmakoncentrációjuk függ a vese-funkciótól [7].

A másik lehetőség, amikor az *ex vivo* keletkező trombin mennyiségét vizsgálják úgy, hogy a plazmához kis mennyiségű triggert (általában tromboplasztint) adva alvadást provokálnak, és így határozzák meg a plazma saját (belső) trombinpotenciálját. Ez az úgynevezett trombingenerációs (TG-) teszt a trombin aktiválódási kinetikájának jellemzésére szolgál, így a pro- és antikoaguláns rendszerek funkcionalitásáról, nem pedig a valós, *in vivo* megvalósuló trombinaktiválódásról ad információt. Az első trombingenerációs (TG-) tesztet 1953-ban írta le Biggs és Macfarlane [8], de ez a lassú és munkaigényes módszer nem terjedt el a klinikai gyakorlatban, kizárólag kutatási célokra használták. A mérési módszer módosításának és a technikai fejlődésnek köszönhetően a TG-vizsgálatok elvégzésére ma már többféle automati-

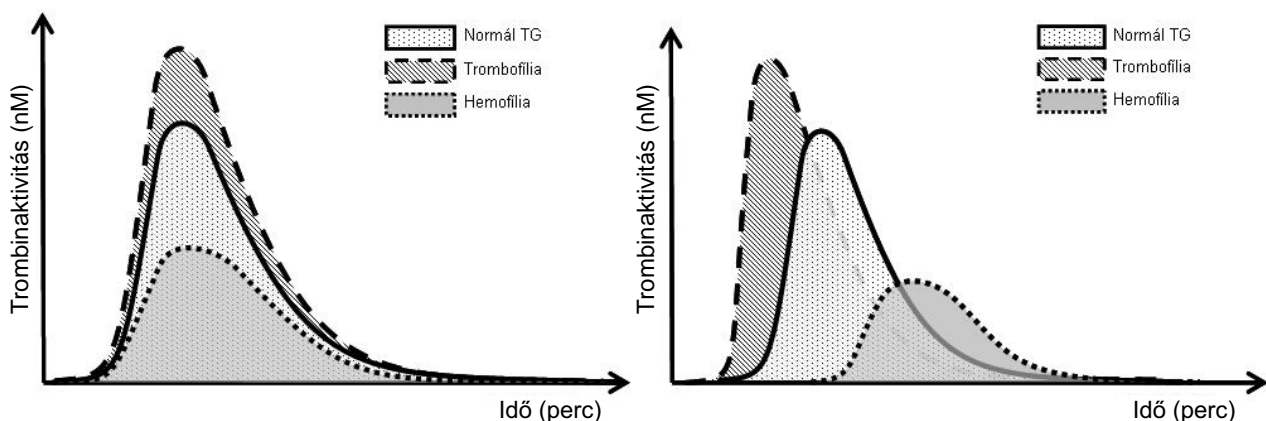


2. ábra | Trombogram

zált rendszer áll a rendelkezésünkre, amelyek egy része kereskedelmi forgalomban is kapható.

A TG-mérési módszert nagymértékben befolyásolja a vizsgálati minta minősége [9] és egyéb preanalitikai tényezők [10]. A pontos eredmény érdekében alapvető a minta megfelelő antikoagulálása [10], a szövetifaktorszennyezés elkerülése [11], a mintavétel és mintakezelés során történő kontakt aktiváció [12] kiküszöbölése, a megfelelő centrifugálás [10] és inkubálás [13].

A vizsgálatokat általában thrombocytaszegény plazmából végzik [14], amely lehetőséget nyújt a minták fagyasztására, gyűjtésére és később egy időben történő mérésére. A metodikák egy része alkalmas thrombocytadús plazma [15], illetve teljes vér [16] mérésére is, de ezek a módszerek nem terjedtek el.



| | ETP | Maximális aktivitás | Késleltetési idő | Maximális aktivitás elérésének ideje | V-index |
|------------------|-----|---------------------|------------------|--------------------------------------|---------|
| Trombóziskészség | + | + | - | - | + |
| Vérzéseshajlam | - | - | + | + | - |

3. ábra | Példák a trombogram változására trombofilia és hemofilia esetében
ETP = endogén trombinpotenciál; + = növekedés; - = csökkenés

A TG-mérések során a trombin aktivitását határozzák meg az idő függvényében – ennek grafikus ábrázolása az úgynevezett trombogram. Annak ellenére, hogy az egyes mérési módszerek nagyban eltérnek egymástól, a mérési körülményektől függetlenül a trombogramok általános alakja megegyezik [14]. A trombogram kezdőpontja az alvadást kiváltó anyag (trigger) hozzáadása, amely után megindul az alvadási folyamat. Az első (iniciációs) szakasz során kis mennyiségű trombin keletkezik, amely aktiválja az V., VIII. és a XI. véralvadási faktorokat és a thrombocytákat, ezáltal előkészíti a rendszert, hogy a következő (propagációs) szakaszban gyorsan, nagy mennyiségű trombin szabadulhasson fel. A trombin keletkezésével egy időben megindul annak inaktíválódása is, amelynek sebessége a trombin koncentrációjával arányosan növekszik. A propagációs szakaszban a trombin keletkezési sebessége meghaladja az inaktíválódás sebességét. Ahol a két sebesség megegyezik, ott a trombogramon csúcsot kapunk. Ezt követően a görbe leszálló szakaszában az inaktíválódás sebessége haladja meg a keletkezés sebességét, a trombinképződés folyamatosan csökken, végül megszűnik (2. ábra).

A TG számszerűen a trombogram görbeparamétereivel jellemezhető. Klinikai szempontból releváns paraméterek: *lag time* (perc) (késleltetési idő), *endogén trombinpotenciál* (ETP) (nM×perc) (görbe alatti terület), *peak thrombin* (nM) (maximális trombinaktivitás), *time to peak* (perc) (maximális trombinaktivitás elérésének ideje) és a *sebességindex* (nM/perc) (a felszálló ág meredeksége). A fokozott TG (emelkedett ETP, peak thrombin, sebességindex, csökkent lag time, time to peak) fokozott trombóziskészségre, míg a csökkent TG (csökkent ETP, peak thrombin, sebességindex, emelkedett lag time, time to peak) vérzékenységre utal (3. ábra).

A TG-vizsgálat klinikai elterjedését gátolja, hogy egyelőre nincs egységes referenciamódszer. A különböző TG-tesztekben a gyártók eltérő minőségű és koncentrációjú triggert és puffert alkalmaznak, így a mért TG-kinetika is eltérést mutat. Emellett a trombinaktiválódás kimutatásához használt eltérő specificitású és kinetikai tulajdonságú szubsztrátok alkalmazása is tovább növeli a tesztek közötti varianciát. A standardizáció hiánya miatt a különböző helyeken és a különböző mérőrendszerekkel meghatározott eredmények nagy eltérést mutatnak. Több kutatóhelyen saját összeállítású TG-rendszert alkalmaznak, vagy adalékanyagokkal módosítják a gyári tesztet, hogy érzékenyebbé tegyék a mérési módszert a vizsgált véralvadási rendellenességre, ezzel azonban tovább nehezítik a kapott eredmények összevetését más kutatóhelyek vizsgálataival. A laboratóriumok közötti variabilitás referenciaplazmával történő standardizálással jelentősen csökkenthető lenne [17]. Ettől függetlenül azonban az egy helyen, állandó feltételek mellett végzett vizsgálatok reprodukálhatóak, és több megfigyelés szerint alkalmasak a klinikai állapot (trombóziskészség vagy vérzéses kockázat) monitorozására.

Trombingenerációs vizsgálatok alkalmazása vénás trombózis vizsgálatokor

A trombingenerációs mérésekből, vagyis a trombinképződés potenciáljának vizsgálatából a trombózis (jellemzően vénás thromboembolia – VTE) előfordulásának rizikójára következtethetünk trombogén körülmények (műtét, tumor) között.

Számos vizsgálat [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27] igazolja a TG és VTE kockázata közötti kapcsolatot

1. táblázat | A trombingeneráció vénás thromboemboliával kapcsolatos klinikai alkalmazásairól megjelent legfontosabb cikkek

| TG-módszer | Gyártó | Szerző/publikáció éve | N | Eredmény |
|-----------------------------|---------------|---|-----|--|
| Technothrombin TGA | Technoclone | Hron, G., <i>et al.</i> [18], 2006 | 914 | Kapcsolat a <i>peak thrombin</i> érték és a VTE ismételt előfordulása között |
| ETP | Dade Behring* | Eichinger, S., <i>et al.</i> [19], 2008 | 861 | Az ETP és a D-dimer-szint egymástól független prediktorai a VTE ismételt előfordulásának |
| CAT (TM hozzáadása) | Stago/Synapse | Tripodi, A., <i>et al.</i> [20], 2008 | 254 | Kapcsolat a fokozott TG és a VTE ismételt előfordulása között, TM hozzáadása esetén a rizikócsoporthoz jobban elkülöníthetők |
| HemosIL Thrombopath | IL | Ferroni, P., <i>et al.</i> [23], 2011 | 108 | Nem metasztatizáló tumoros betegek kemoterápia előtt mért emelkedett TG-értékei magas VTE-kockázatot jeleznek |
| CAT (APC hozzáadása) | Stago/Synapse | Marchetti, M., <i>et al.</i> [25], 2008 | 149 | Fokozott TG-t, szerzett aktivált protein C-rezisztenciát mutattak ki PV és ET esetében |
| Saját készítésű CAT alapján | – | Altman, R., <i>et al.</i> [29], 2007 | 337 | Összefüggés az INR-értékek és a TG-paraméterek között |
| Saját készítésű CAT alapján | – | Gerotziakas G. T., <i>et al.</i> [30], 2009 | 153 | VKA és LMWH együttes alkalmazása során is alkalmas az antikoaguláció mértékének meghatározására |
| Technothrombin TGA | Technoclone | Gouya, G., <i>et al.</i> [32], 2012 | 31 | LMWH (enoxaparin) hatása monitorozható TG-vizsgálattal |
| Saját készítésű CAT alapján | – | Graff, J., <i>et al.</i> [35], 2007 | 12 | ETP alkalmas faktorinhibitor (rivaroxaban) monitorozására |

*A céget megvásárolták, a reagenst jelenleg a Siemens AG gyártja.

APC = aktivált protein C; CAT = calibrated automated thrombogram; ET = essentialis thrombocythaemia; ETP = endogén trombinpotenciál; INR = nemzetközi normalizált ráta; N = esetszám; LMWH = alacsony molekulatömegű heparin; PV = polycythaemia vera; TG = trombingeneráció; TM = trombomodulin; VKA = K-vitamin-antagonista; VTE = vénás thromboembolia.

(1. táblázat). Elsőként Hron és munkatársai [18] első spontán VTE-n átesett betegek (n = 914) esetében vizsgálták a K-vitamin-antagonista (VKA) terápia abbahagyása utáni ismételt előfordulás kockázatát. A *peak thrombin* értékek alapján sikerült elkülöníteniük az alacsony rizikójú csoportba tartozó betegeket. Egy másik vizsgálatban [19] a kutatócsoport összefüggést talált az ETP-emelkedés és az ismételt VTE előfordulása között. 861 beteg állapotának követése alapján megállapították, hogy az ETP és a D-dimer-szint egymástól függetlenül előre jelezte a VTE újbóli előfordulását, így a két paraméter együttes meghatározásával javítható a rizikóbecslés hatékonysága. Tripodi és munkatársai [20] szintén összefüggést találtak a TG emelkedése és a VTE újbóli előfordulása között. A különböző rizikócsoporthoz jobban elkülönültek, ha a TG-vizsgálatot trombomodulin hozzáadása mellett végezték. A keletkező trombin-trombomodulin komplex a protein C aktiválásán keresztül bizonyos alvadási faktorok inaktiválását okozza, tehát a módosított TG-teszt az antikoaguláns funkciók eltéréseit mutatja ki. A kutatócsoport hasonló eredményt kapott [21], ha a szintén a protein C-utat jellemző 'protac-induced coagulation inhibition' (PICI) teszttel vizsgálta a TG-t. Van Hylekama Vlieg és munkatársai [22] ezzel szemben csak a TG-paraméterek és a VTE első előfordulása között találtak kapcsolatot, az ő vizsgálataikban az ismételt előfordulással nem függött össze a TG. Az eltérő eredmény magyarázata lehet, hogy a mérések során

nagy szövetifaktor-koncentrációjú tromboplasztint használtak triggerként, ráadásul a mintákat a mérések elvégzése előtt több évig tárolták fagyaszttva.

Ferroni és munkatársai [23] nem metasztatizáló tumoros betegek kemoterápia előtt mért emelkedett TG-értékei és az első VTE között találtak kapcsolatot. Újabb vizsgálatukkal [24] igazolták, hogy az első és a második kemoterápiás ciklus előtt mért TG-értékek változása alapján elkülöníthetők az alacsony és a magas VTE-kockázatú betegek (hazard arány 0,21; 95%-os CI 0,05–0,30; p<0,0001).

Marchetti és munkatársai [25] myeloproliferatív betegségeknél vizsgálták a trombózishajlam fokozódásában részt vevő mechanizmusokat. A TG-vizsgálat alapján szerzett aktivált protein C- (APC-) rezisztenciát mutattak ki essentialis thrombocythaemia és polycythaemia vera esetében, amely a klasszikus aPTT-alapú APC-rezisztencia-vizsgálattal nem volt kimutatható. Az eltérés magyarázata lehet, hogy az aPTT-alapú APC-rezisztencia-vizsgálat elsősorban a protrombin és a VIII. faktor szintjének emelkedésére érzékeny, míg a TG-alapú vizsgálat a szabad protein S és a szöveti faktor út inhibitor (TFPI) csökkenésére is. Az APC-rezisztencia összefüggött az alacsony szabad protein S szintjével. A csökkenés feltehetően az emelkedett mennyiségben kimutatott neutrofilelasztáz okozta degradációval magyarázható. Az APC-rezisztencia nagyobb mértékű volt a JAK2^{V617F}-mutáció hordozóinál, legnagyobb mértékű a homozigót

ták esetében. Polycythaemia vera és essentialis thrombocythaemia esetében thrombocytadús plazma vizsgálatával is kimutatták [26] a fokozott TG-t, vagyis a magas VTE-rizikót. Az emelkedett TG ennél a mintatípusnál is összefüggést mutatott a JAK2^{V617F}-mutációval. Microparticuladús, -szegény és -mentes plazma-TG vizsgálatával igazolták az essentialis thrombocythaemia esetében a microparticula-TG-növelő, vagyis trombogén hatását [27].

A különböző mintatípusok TG-elemzése tehát lehetőséget ad a sejtes elemek prokoaguláns aktivitásának vizsgálatára. Ezáltal a TG-analízisek segítséget nyújtanak abban, hogy a trombózis kialakulásában szerepet játszó celluláris és plazmaeltérések globális hatását elemezni lehessen.

A VTE prevenciója és terápiája történhet egyes alvadási faktorok (köztük a protrombin) K-vitamin-függő posztranszlációs módosulásának gátlásán keresztül (K-vitamin-antagonista kezelés), az antitrombin aktivitásának fokozásával (heparinkészítmények) vagy az alvadási faktorok gátlásán keresztül (direkt és reverzibilis trombin és aktivált X. faktor inhibitorok). Mindhárom esetben a trombóziskészség csökkenése együtt jár a TG csökkenésével, így a TG jelzi az antikoaguláció mértékét.

K-vitamin-antagonistákkal (VKA) történő kezelés során a kromogén [28] és a fluorogén [29] szubsztrát alkalmazásával meghatározott TG-csökkenés is összefügg az INR-értékekkel. A TG a VKA-terápia kezdeti szakaszában az alacsony molekulatömegű heparinnal történő együttes alkalmazás során is alkalmas az antikoaguláció monitorozására [30]. A TG nemcsak a heparin- [31] és alacsony molekulatömegű heparin- [32] terápia monitorozására alkalmas, hanem a heparinhatás közömbösítésére alkalmazott készítmények hatásának az ellenőrzésére is [33]. Az új típusú orális antikoaguláns szerek [34], azaz a direkt és reverzibilis alvadási faktor inhibitorok antikoagulációs hatása is jellemezhető a TG-paraméterek alapján [35]. Ezen készítmények a TG-paraméterek közül az ETP-t befolyásolják a legkevésbé, a készítmények hatását TG-görbe lefutásának a változása tükrözi [36].

Vizsgálatok artériás érrendszeri megbetegedésekkel kapcsolatban

Az artériás trombotikus események kialakulásában elsősorban a thrombocyták játszanak szerepet, a vénás trombózisokhoz képest a plazma trombingenerációs potenciáljának szerepe kevésbé egyértelmű. A plazma és az érfalkompartmentek közötti kapcsolat is sokkal összetettebb. Mivel a klinikai vizsgálatok többségénél thrombocytamentes plazmával, sejtes elemek hiányában történik a TG-teszt, a TG által adott klinikai információ kapcsolata az artériás keringési rendellenességeknél kevésbé egyértelmű.

Igazolt, hogy az atherosclerosis egyes rizikófaktoraival (dohányzás, magas vérnyomás, illetve elhízás, diabetes), valamint krónikus gyulladásozó betegségek (rheumatoid

arthritis) befolyásolják a trombin képződését. Egyes vizsgálatok összefüggést találtak a TG és az atherosclerosis súlyossága között [37]. Időseknél összefüggést találtak az emelkedett TG és az akut ischaemiás stroke előfordulása között, de a myocardialis infarctus esetében nem [38].

A várakozások szerint az artériás trombotikus eseményeknél a TG-vizsgálatok klinikai értéke a thrombocytadús plazmát és a teljes vért alkalmazó módszerek elterjedésével fog kiderülni. Utóbbiak jelentőségét jelzi, hogy ischaemiás stroke-on átesett fiatal betegek esetében thrombocytadús plazmát vizsgálva fokozott TG-szintet mértek a kontrollcsoporthoz képest, míg az azonos időpontban vett thrombocytamentes plazmák TG-vizsgálatakor az emelkedés nem volt szignifikáns [39].

Vérzeshajlammal járó betegségekkel kapcsolatos vizsgálatok

Öröklött véralvadási faktor-hiányok esetében az alvadási szűrőtesztek eredményei, a plazmafaktorszintek, a vérzéses események gyakorisága és súlyossága közötti kapcsolat függ a betegség típusától, bár ez egyénekenként is változó lehet [40]. Ezért a vérzékenység súlyossága és a mért faktorszintek között gyakran nincs kapcsolat [41], míg a TG-paraméterek nemcsak a véralvadási faktorok koncentrációjával [42], hanem a klinikai képpel [43] is szorosan összefüggnek, így alkalmasak a VIII. faktor és IX. faktor készítményekkel történő terápia monitorozására és a szükséges dózis meghatározására [44]. A TG-vel, mint globális teszttel, vizsgálható az inhibitor-képződés esetén alkalmazott speciális, úgynevezett inhibitorbypassing terápia hatásossága [45, 46]. A TG-mérés alkalmas fokozott vérzéskockázat esetén a betegek perioperatív monitorozására. Erre a célra eddig a tromboelasztográfiát alkalmazták, amely főként a fibrinogénszint változására érzékeny. Kimutatták, hogy transzfúziót igénylő nagy műtétek esetében hatékonyan segítheti a klinikai döntéshozatalt, amennyiben a tromboelasztográfiás vizsgálatot a trombinképződésre érzékeny TG-vel egészítik ki.

Következtetések

A TG globális véralvadási vizsgálat, amely átfogó képet ad a haemostasis állapotáról. A napjainkban terjedő, kereskedelmi forgalomban kapható, automatizált mérések alkalmazásával lehetővé válik nagyszámú vizsgálat hatékony elvégzése, és a módszer klinikai teljesítőképességének meghatározása. Az eddigi eredmények alapján a TG-vizsgálatok számos betegcsoport esetében alkalmasak mind a fokozott trombóziskészség, mind a vérzékenység súlyosságának kimutatására és ezáltal az eddig alkalmazott teszteken túl további klinikai információ biztosítására. Előnyeik lehetnek a klasszikus alvadási szűrőtesztekkel és a faktorszint-meghatározásokkal szemben az

antikoaguláns és a hemofiliaterápia monitorozása során. Fokozott tromboziskészség és vérzékenység esetében is alkalmasak mind a szerzett, mind az öröklött rizikó tényezők, mind a több gyógyszerrel történő terápiás kezelés során a kombinált hatás jellemzésére.

A biztató vizsgálati eredményeken túl a TG-vizsgálat rutin klinikai alkalmazásához még számos feltételnek kell teljesülnie. Egyik legfontosabb lépés a mérési körülmények standardizálása, az egységes nemzetközi normáltartományok meghatározása. A laboratóriumok közötti eltérést csökkentené az egységes referenciaplazma alkalmazása is. Ezt követően, a már összehasonlítható eredményeket figyelembe véve, kell meghatározni azon küszöbértékeket, amelyek alapján klinikai döntés hozható az egyes páciensek esetében.

Anyagi támogatás: A cikk megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: K. A.: Az irodalomkutatás elvégzése, a kézirat elkészítése; V. K.: A kézirat klinikai vonatkozásainak szakmai véleményezése; V. B.: A kézirat lektorálása, szakmai véleményezése metodikai szempontból. A cikk végleges változatát valamennyi szerző látta, és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] *Crawley, J. T., Zanardelli, S., Chion, C. K., et al.*: The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, 5(Suppl. 1), 95–101.
- [2] *Mosesson, M. W.*: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3(8), 1894–1904.
- [3] *Mann, K. G.*: Thrombin formation. *Chest*, 2003, 124(3 Suppl.), 4S–10S.
- [4] *Esmon, C. T.*: Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb. Haemost.*, 1993, 70(1), 29–35.
- [5] *Coughlin, S. R.*: Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3(8), 1800–1814.
- [6] *Ten Cate, H.*: Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb. Res.*, 2012, 129(3), 367–370.
- [7] *Bauer, K. A.*: Activation markers of coagulation. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 1999, 12(3), 387–406.
- [8] *Biggs, R., Macfarlane, R. G.*: Human blood coagulation and its disorders. Blackwell, Oxford, 1953.
- [9] *Berntorp, E., Salvagno, G. L.*: Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2008, 34(7), 670–682.
- [10] *Loeffen, R., Kleinegris, M. C., Loubele, S. T., et al.*: Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J. Thromb. Haemost.*, 2012, 10(12), 2544–2554.
- [11] *Béguin, S., Lindhout, T., Hemker, H. C.*: The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb. Haemost.*, 1989, 61(1), 25–29.
- [12] *Luddington, R., Baglin, T.*: Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J. Thromb. Haemost.*, 2004, 2(11), 1954–1959.
- [13] *De Smedt, E., Hemker, H. C.*: Thrombin generation is extremely sensitive to preheating conditions. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, 9(1), 233–234.
- [14] *Hemker, H. C., Wiolders, S., Kessels, H., et al.*: Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb. Haemost.*, 1993, 70(4), 617–624.
- [15] *Hemker, H. C., Giesen, P. L., Ramjee, M., et al.*: The thrombogram: Monitoring thrombin generation in platelet rich plasma. *Thromb. Haemost.*, 2000, 83(4), 589–591.
- [16] *Ninivaggi, M., Apitz-Castro, R., Dargaud, Y., et al.*: Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin. Chem.*, 2012, 58(8), 1252–1259.
- [17] *Dargaud, Y., Luddington, R., Gray, E., et al.*: Standardisation of thrombin generation test – which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb. Res.*, 2010, 125(4), 353–356.
- [18] *Hron, G., Kollars, M., Binder, B. R., et al.*: Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*, 2006, 296(4), 397–402.
- [19] *Eichinger, S., Hron, G., Kollars, M., et al.*: Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin. Chem.*, 2008, 54(12), 2042–2048.
- [20] *Tripodi, A., Legnani, C., Chantarangkul, V., et al.*: High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, 6(8), 1327–1333.
- [21] *Tripodi, A., Legnani, C., Lemma, L., et al.*: Abnormal Protac-induced coagulation inhibition chromogenic assay results are associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2010, 30(2), 215–219.
- [22] *Van Hylckama Vlieg, A., Christiansen, S. C., Luddington, R., et al.*: Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Brit. J. Haematol.*, 2007, 138(6), 769–774.
- [23] *Ferroni, P., Martini, F., Portarena, I., et al.*: An activated protein C-dependent thrombin generation assay predicts chemotherapy-associated venous thromboembolism in cancer patients. *Thromb. Haemost.*, 2011, 105(5), 931–932.
- [24] *Ferroni, P., Martini, F., Portarena, I., et al.*: Early changes of a novel APC-dependent thrombin generation assay during chemotherapy independently predict venous thromboembolism in cancer patients – a pilot study. *Support Care Cancer*, 2012, 20(11), 2713–2720.
- [25] *Marchetti, M., Castoldi, E., Spronk, H. M., et al.*: Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 2008, 112(10), 4061–4068.
- [26] *Panova-Noeva, M., Marchetti, M., Spronk, H. M., et al.*: Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am. J. Hematol.*, 2011, 86(4), 337–342.
- [27] *Trappenburg, M. C., van Schilfgaarde, M., Marchetti, M., et al.*: Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*, 2009, 94(7), 911–918.
- [28] *Brocal, I., Marco, P., Lucas, J., et al.*: Thrombin generation test in patients under anticoagulant therapy with vitamin K antagonists. *Thromb. Haemost.*, 2009, 101(3), 594–595.
- [29] *Altman, R., Scazziotto, A., Herrera, L., et al.*: Relationship between thrombin generation and international normalized ratio in patients receiving oral vitamin K antagonist therapy. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, 5(7), 1552–1569.

- [30] *Gerotziakas, G. T., Dupont, C., Spyropoulos, A. C., et al.*: Differential inhibition of thrombin generation by vitamin K antagonists alone and associated with low-molecular-weight heparin. *Thromb. Haemost.*, 2009, *102*(1), 42–48.
- [31] *Al Dieri, R., Alban, S., Béguin, S., et al.*: Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J. Thromb. Haemost.*, 2004, *2*(8), 1395–1401.
- [32] *Gouya, G., Palkovits, S., Kapiotis, S., et al.*: Bioactivity of enoxaparin in critically ill patients with normal renal function. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2012, *74*(5), 806–814.
- [33] *Gatt, A., van Veen, J. J., Woolley, A. M., et al.*: Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. *Thromb. Haemost.*, 2008, *100*(2), 350–355.
- [34] *Keltai, M., Keltai, K.*: New anticoagulants in the prevention and treatment of venous thromboembolism. [Új antikoagulánsok a vénás thromboembolia megelőzésében.] *Orv. Hetil.*, 2011, *152*(25), 983–992. [Hungarian]
- [35] *Graff, J., von Hentig, N., Misselwitz, F., et al.*: Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on platelet-induced thrombin generation and prothrombinase activity. *J. Clin. Pharmacol.*, 2007, *47*(11), 1398–1407.
- [36] *Wong, P. C., White, A., Luetzgen, J.*: Inhibitory effect of apixaban compared with rivaroxaban and dabigatran on thrombin generation assay. *Hosp. Pract.*, 2013, *41*(1), 19–25.
- [37] *Borissoff, J. I., Joosen, I. A. P. G., Versteilen, M. O., et al.*: Enhanced endogenous thrombin potential is associated with the severity of coronary atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, *9*(Suppl. 2), 746.
- [38] *Carcaillon, L., Albenc-Gelas, M., Bejot, Y., et al.*: Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly. The three-city cohort study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, *31*(6), 1445–1451.
- [39] *Faber, C. G., Lodder, J., Kessels, F., et al.*: Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2003, *33*(1), 52–58.
- [40] *Peyvandi, F., Mannucci, P. M.*: Rare coagulation disorders. *Thromb. Haemost.*, 1999, *82*(4), 1207–1214.
- [41] *Van den Berg, H. M., De Groot, P. H., Fischer, K.*: Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, *5*(Suppl. 1), 151–156.
- [42] *Duchemin, J., Pan-Petesch, B., Arnaud, B., et al.*: Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb. Haemost.*, 2008, *99*(4), 767–773.
- [43] *Shima, M., Matsumoto, T., Ogiwara, K.*: New assays for monitoring haemophilia treatment. *Haemophilia*, 2008, *14*(Suppl. 3), 83–92.
- [44] *Keularts, I. M., Hamulyak, K., Hemker, H. C., et al.*: The effect of DDAVP infusion on thrombin generation in platelet-rich plasma of von Willebrand type 1 and in mild haemophilia A patients. *Thromb. Haemost.*, 2000, *84*(4), 638–642.
- [45] *Váradi, K., Negrier, C., Berntorp, E., et al.*: Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, *1*(11), 2374–2380.
- [46] *Schols, S. E., Lancé, M. D., Feijge, M. A., et al.*: Impaired thrombin generation and fibrin clot formation in patients with dilutional coagulopathy during major surgery. *Thromb. Haemost.*, 2010, *103*(2), 318–328.

(Kern Anita,
Budapest, Baross u. 48–52., 1047
e-mail: kern.anita1@gmail.com)