

A D-dimer laboratóriumi eredményeinek és klinikai értékelésének elemzése

Jákó János dr.

A fibrinogén-fibrinmolekula enzimatis bontásakor D-dimer is keletkezik, amelynek léte a keringésben kimutatható. A mérések alapján elfogadott határértékek egyben fiziológiásnak is tekinthetők. Létrejöttét alvadás, majd lysis eredményének vélték. Thromboemboliás megbetegedések esetén tapasztalható vérbeli, magas koncentrációjú D-dimer diagnosztikus értékűnek tartott. Azokban az esetekben, amikor magas titer ellenére a thromboembolia kizárható, de mégis óvatosságból heparin- (LMWH-), illetve Clopidogrel-terápiát alkalmaztunk, kiderült, hogy a D-dimer értéke nem változott, magas maradt. Ez a tapasztalat azt jelenti, hogy a D-dimer kialakulásának nem előfeltétele az *in vivo* alvadás. Elemezve az ilyen eseteket, a háttérben májbetegséget, vesemegbetegedést találunk, de a magas kor is szerepet játszhat. Sokszor a D-dimer magas értékei mellett „párhuzamosan” a ferritinszint is emelkedett. Mindezek alapján fel kell tételeznünk egy, „előregedett” fehérjemolekulákra vonatkoztatható enzimatis bontási folyamatot, amely általánosan érvényes.

Orv Hetil. 2017; 158(50): 1971–1976.

Kulcsszavak: D-dimer klinikai jelentősége, fibrinogén (FBG), fibrinbomlástermék (FDP) és eliminációja

Analysis of D-dimer laboratory findings and clinical evaluation

D-dimer is a product of the enzymatic degradation of the fibrinogen-fibrin molecule, and its existence is demonstrable in circulation. The test based limits may be considered as normal values. It was first thought to be a product of coagulation, then a product of lysis. High-concentration D-dimer in blood detected in thromboembolic diseases is considered to be of diagnostic value. In cases where thromboembolism was ruled out despite elevated titres but heparin (LMWH) or CLOPIDOGREL was given as a cautionary measure, we found that D-dimer values remained elevated. This finding means that *in vivo* coagulation is not a precondition to D-dimer formation. Analysis of such cases uncovers liver or kidney disease in the background, but old age may also be a factor. Often elevated ferritin levels were observed 'in parallel' with elevated D-dimer values. These findings lead us to presume an enzymatic degradation process of 'elderly' protein molecules, which is universally applicable.

Keywords: D-dimer, clinical significance of D-dimer, fibrinogen (FBG), fibrin degradation product (FDP) and its elimination

Jákó J. [Analysis of D-dimer laboratory findings and clinical evaluation]. Orv Hetil. 2017; 158(50): 1971–1976.

(Beérkezett: 2017. augusztus 21.; elfogadva: 2017. szeptember 29.)

Az Orvosi Hetilap alapításának 160. évében a Szerkesztőség felkérésére készített tanulmány.

Rövidítések

DIC = diffúz intravasculáris coagulatio; FBG = fibrinogén; FDP = (fibrin degradation product) fibrinbomlástermék; HBV = hepatitis B-vírus; HCV = hepatitis C-vírus; LMWH = (low molecular weight heparin) alacsony molekulatömegű heparin

A Cochrane adatbázis 2016 augusztusában közzétett jelentése a pulmonalis embolisatio igazolásának fontos laboratóriumi módszerévé nyilvánítja a D-dimer meghatározását, illetve diagnosztikus értékűnek tartja annak magas koncentrációját a vérben. Ugyanakkor magának a

laboratóriumi módszernek a szenzitivitását 80–100% közöttire becsüli, specificitását pedig 23–63%-nak tartja. Ebből következően, a negatív D-dimer-teszt-eredményt a tüdőembólia kizárására alkalmasnak véli [1].

Az FBG fibrinenzimek okozta bomlástermékeinek egyike a D-dimer. A véralvadás I. faktora, a fibrinogén egy 340 kDa tömegű fibrilláris szerkezetű glikoprotein [2]. Három polipeptidláncból tevődik össze (α -, β -, γ -lánc). Felépítését és ebből következő tulajdonságait, illetve degradációját végző proteolyticus enzimek támadáspontját krisztallográfián is alapuló technikákkal tárták fel [3].

Az FBG-molekula 46 nm hosszú, a két végén a β - és a γ -láncok két-két nodulust alkotnak (β -nodulus, γ -nodulus). A két végből a degradálódásnál egy-egy D-fragmens képződik. A középső molekulaszakaszon négy bütők helyezkedik el. Ezek illeszkednek majd a végnodulusok preformált fészkeibe. Az FBG-molekula negatív töltése biztosítja e fehérje oldatban maradását, de amikor az aktivált trombin kötődik az alfa-lánc C-régiójához, akkor bekövetkezik a lysis és ezzel egy időben elveszik a negatív töltés és az FBG kezd fibrinné alakulni azáltal, hogy megindul az end-to-end és side-to-side kapcsolódás (1. ábra) [4].

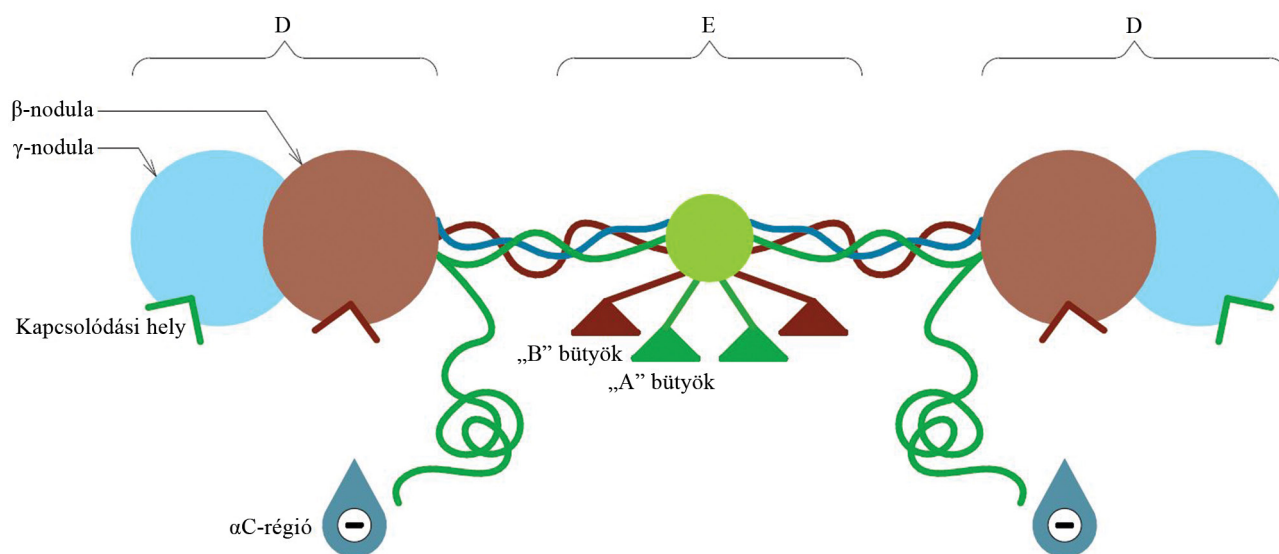
A kialakult fibrinháló plazmin hatására oldódik és úgynevezett D és E fragmentum szabadul fel, majd a D-dimer, amelynek felezési ideje négy-hat óra [5].

A D-dimer meghatározására több módszer ismeretes (1. táblázat).

A felsorolásból érzékelhető [5], hogy az eltérő műveleti megoldások (szoftver, optika), a különböző immunszérumok (ellenanyag-tulajdonságú reagensek) alkalmazása a kapott mennyiségi eredményeket nagymértékben befolyásolják [6].

1. táblázat | A D-dimer-kimutatás módozatai [5]

Teszt neve	Előállítója	Módszere
D-Di Test	Diagnostica Stago M	Latex Agglutination Slide, semi-quantitative
Acculot™	Sigma Diagnostics M	Latex Agglutination, semi-quantitative
Dimertest® Latex	Dade Behring M	Latex Agglutination, qualitative
Minutex®	Biopool M	Latex Agglutination, qualitative
MDA® D-Dimer	Organon Technica M	Micro-Latex Immunoassay, quantitative
AUTO D-Dimer	Sigma Diagnostics	Automated latex agglutination, quantitative
Liatest D-Dimer	Diagnostica Stago	Micro-latex immunoassay, quantitative
Vidas DD	BioMerieux M	Rapid ELISA, quantitative
Asserachrom®	Diagnostica Stago	ELISA, quantitative
Fibronosticon D-Dimer	Organon Technica	ELISA, quantitative
SimpliRED®	Agen M	RBC Agglutination, qualitative
IL-Test™ D-Dimer	Beckman Coulter M	Immunoturbidimetric, quantitative
Advanced D-Dimer	Dade Behring	Immunoturbidimetric, quantitative
Miniquant	Biopool	Immunoturbidimetric, quantitative
Innovance	Siemens BCS	Immunoturbidimetric
Hemosit HS500	Instrumentation Laboratory	Automated coagulation analyzer



1. ábra | A fibrinogén molekula vázlatos felépítése

A gyakorlat számára viszont szükséges a standardizáció. Általában a Diagon fejlesztette immunoturbidimetriás eljárást alkalmazzák, s a referenciatartományt (normális határértékek) 0–500 ngFEU/ml-ben határozzák meg. A mi vizsgálatainkban segítséget nyújtó Centrum-Lab Kft. Innovance elnevezésű immunoturbidimetriás technikával dolgozik.

A klinikai szakirodalomból – amelyben jól mutatja magát az eredmények biztos támpontként való értékelhetőségének nehézsége – többek között *Gualtiero Palareti* vizsgálatai emelhetők ki. Több készülék, módszer vizsgálata alapján megállapította, hogy thromboemboliák eseteiben a szenzitivitása és negatív prediktív értéke 100%. Ugyanakkor, a magas fals pozitivitása miatt, különösen 65 év felettiéknél, specificitását 23–63% közöttinek véleményezi. Következésképpen a pozitív prediktív értéke alacsony, 16–30% közötti [7].

A hétköznapi gyakorlatban számos olyan eredménnyel találkozunk (találkoztunk), amely kóros vagy extrém kóros volta ellenére sem jelezhetette a thromboembolia létét vagy patológiás alvadási folyamatot, mivel azt az elvégzett részletes, célratörő vizsgálatok teljes bizonyossággal kizárták.

Az alvadás mechanizmusával foglalkozók még ma is megosztottak, vagy elvetik, vagy elfogadják a continuális intravasalis alvadás, illetve az azt követő fibrinolysis lehetőségét.

Az a bizonytalanság, amely a vérben keringő FBG – kis százalékban bár, de – inhomogén voltának jelenlétét kísérte, vizsgálatra ösztönzött [8, 9].

Évek óta több kísérletet tettünk, hogy a vénás thrombosisok háttérmechanizmusában az FBG-inhomogenitást értelmezhesük.

Anyag és módszer

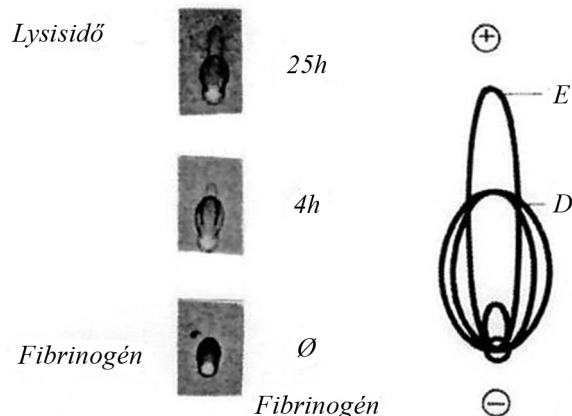
Kidolgoztunk egy olyan összetett módszert, amellyel az FBG, illetve degradációs terméke (FDP) kimutathatóak, továbbá mennyiségileg – ha megközelítőleg is – mérhetőek.

FBG előállítására úgynevezett precipitáló eljárást alkalmaztunk, amelynek segítségével 90–95%-ban koagulálódó 700 mg%-os koncentrációjú tesztoldatot állítottunk elő. A fibrinogén lysisét Actase-zal (Cilag), (0,1 ml Actase 2000 Ortho E), a lysis leállítását Trasylo-lal (Bayer) (0,1 ml Trasylo 500 KLU) végeztük.

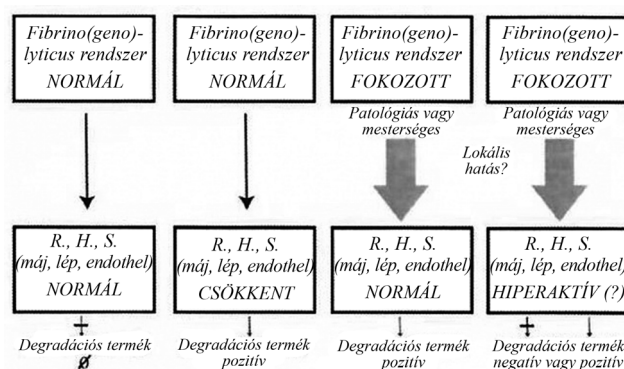
Az így előállított oldatokat (FBG, FDP) elektroszinerézissel tettük láthatóvá (2. ábra).

A D és E fragmentum FBG-ellenes ellenanyag-tartalmú gélben elektroforézis (elektroszinerézis) segítségével választható szét, mennyisége denzitometriásan mérhető. Kérdés, hogy mi a szerepe ezeknek a fragmentumoknak, illetve a sorsa.

Abban az esetben, ha feltételezzük, hogy a valószínűsített alvadás – fibrinolysis *in vivo* – „fiziológias”, akkor lennie kell egy olyan clearingaktivitásnak is, amely a képződő degradációs termékeket kiszűri (3. ábra) [10].



2. ábra | Az FBG és FDP kimutathatósága elektroszinerézissel



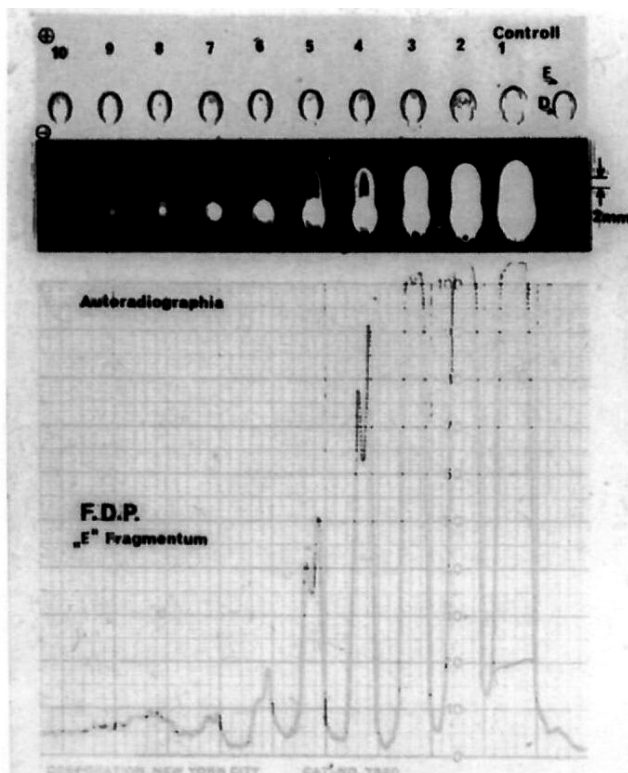
3. ábra | Fibrino(geno)-lyticus rendszer aktiválódása és az FDP megjelenése, illetve sorsa a szervezetben

Az eliminációs út igazolására először ¹²⁵J-dal jelöltünk FBG-t és *in vitro* előállított fibrin degradációs termékeket, majd hígítási sorban az alapot jelentő azonos mennyiségű jelöletlen FBG-re és FDP-re rétegeztük és elektroszinerézist végeztünk (4. ábra).

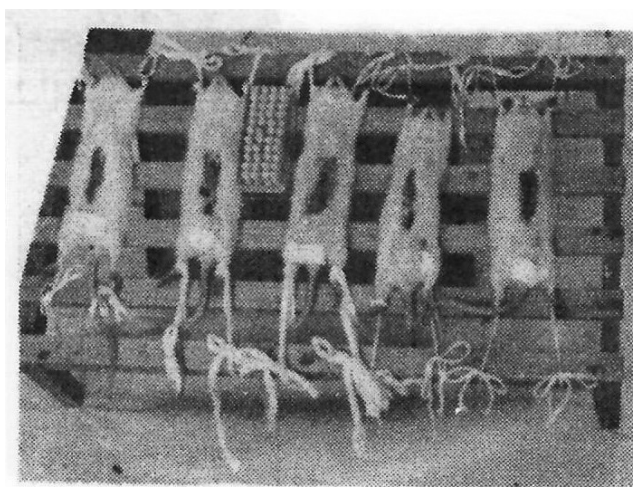
A reprodukálható technika birtokában sikerült a két fő komponens – a D és E fragmentumok – lysisidőtől függő változásának vizualizálása is [11, 12].

Később két, 25-25 patkányból álló csoportot vizsgáltunk. Az egyik csoport ¹²⁵J-izotóppal jelzett FBG-t kapott, a másik csoport 25 órás lysisel bontott FBG-t, ugyancsak ¹²⁵J-dal jelzettet. A patkányokat 5-ös csoportban narkózisban laparatomizáltuk, és a közös epevezetékét kiperparálva 10 percenként gyűjtöttük az epét (5. ábra). A kicsörgő epe aktivitását mértük, majd szinerézis után a szárított preparátumot egy hétig autoradiografáltuk.

Kiderült, hogy az izotóppal jelzett FBG-t inicializálva (iv.) az állatok plazmája mutat csak aktivitást, és sem a vizeletben, sem az epében a kísérlet 2,5 órás időtartama alatt jelzett anyag nem jelent meg, ellentétben a jelölt FDP beadásánál észleltekkel. A számított és a mért aktivitási értékek nagyon pontosan egyeztek és biológiai kísérletben jónak mondhatóak (6. és 7. ábra).



4. ábra | Elektrozínerezis és autoradiográfia

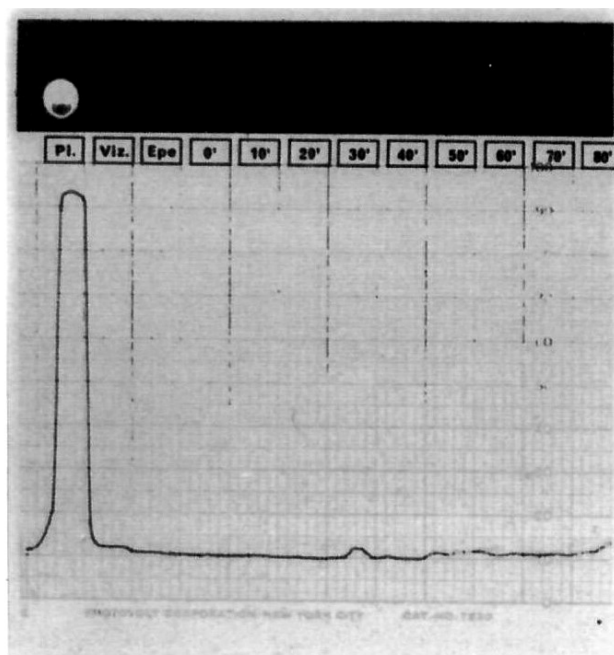


5. ábra | A patkányok epéjének gyűjtése

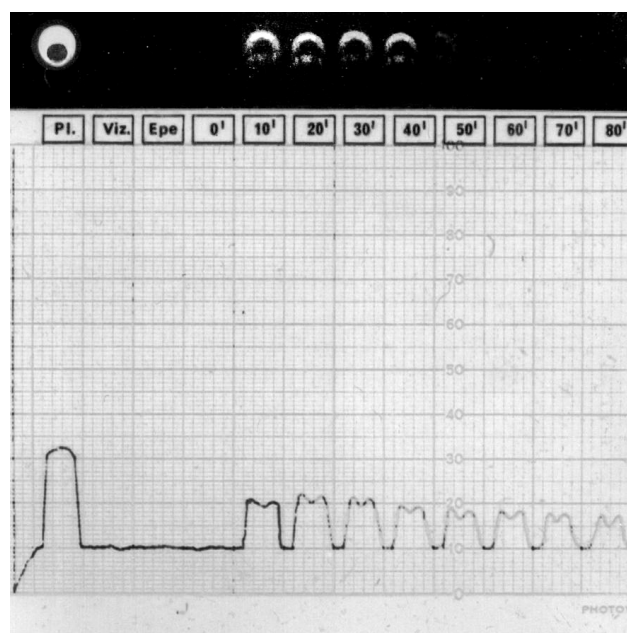
	Állatok száma	Beadott anyag	Dozírozás
I.	25	Iv 93 μCi FBG ^{125}J	1 ml/állat
II.	25	Iv 93 μCi FBG ^{125}J	1 ml/állat

A patkányok súlyából számított plazmamennyiség általában $\sim 11,016$ ml, $3 \mu\text{l}$ aktivitása $8,75 \times 10^{-4} \mu\text{Ci}$, plazma-összaktivitása $3,21 \mu\text{Ci}$. Az epében kiválasztott összaktivitás $69,19 \mu\text{Ci}$.

A beadott $93 \mu\text{Ci}$ és a beadás utáni plazma-, illetve epeaktivitás összesen $72,4 \mu\text{Ci}$, amely differencia elfo-



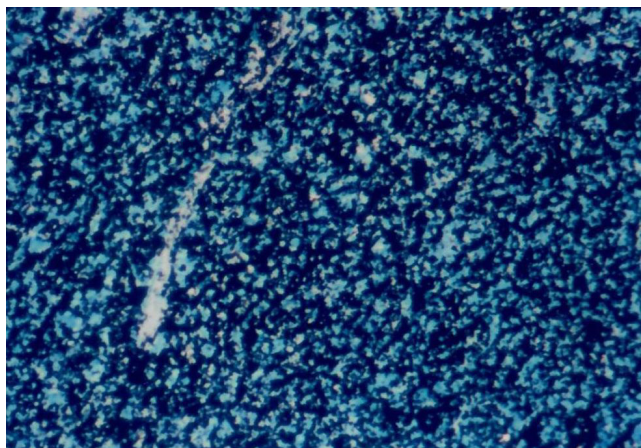
6. ábra | A ^{125}J -FBG kimutatása a plazmában.
A vizelet és az epe a ^{125}J -FBG-t nem tartalmazza
Számított aktivitás 0,003 ml-ben $\sim 2,43 \cdot 10^{-2} \mu\text{Ci}$
Mért aktivitás 0,003 ml-ben $\sim 2,43 \cdot 10^{-2} \mu\text{Ci}$



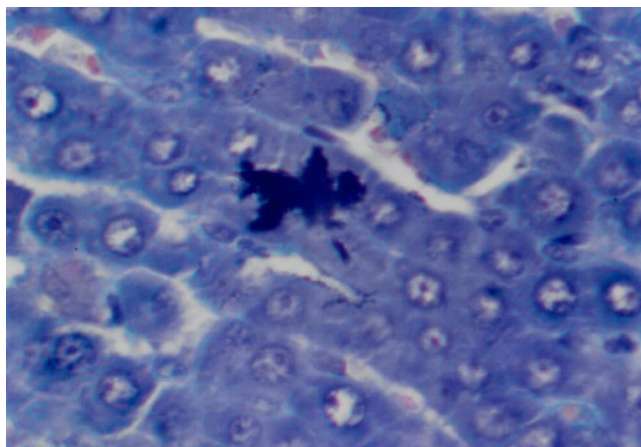
7. ábra | A ^{125}J -FDP megjelenése az epében, de közvetlenül az inicializálás után a plazmában is kimutatható, de a vizeletben nem

gadható, ha a macrophagokban és Kupfer-sejtekben lévő anyag mennyiségét figyelembe vehetjük.

A szövettani metszetek autoradiográfiája is egyértelműen bizonyította az eloszlás és az elimináció tényét (8. és 9. ábra) [13].



8. ábra | A ¹²⁵J-dal jelzett FBG-t kapott patkány mája, mutatva a homogén eloszlást



9. ábra | A ¹²⁵J-dal jelzett FBG-vel kezelt patkány májában csak a Kupfer-sejtben van aktivitás

Eredmények

Az említett vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy az FBG-ből származó, a keringésben kimutatható D-dimer molekula a bélcsatornába távozik s másodlagos digestiónak esik áldozatul.

Felvetődött azonban a kérdés, hogy ha klinikailag az intravasalis alvadás biztonsággal kizárható, tehát a thromboembolia nem vetődik fel, akkor honnan kerül a keringésbe a laboratóriumilag kétséget kizáróan igazolható D-dimer-molekula. A kérdés fontossága annál is inkább nyugtalanító, mivel számos olyan beteget észleltünk, akinek D-dimer-értéke a normális felső határ 2–3-szorosa.

Klinikai vizsgálatok

2016. januártól 2017 márciusáig 120 D-dimer-meghatározásra szóló igény érkezett a laboratóriumba. Ezek közül 67 esetben igazolódott 500 ngFEU/ml feletti érték (2. táblázat).

2. táblázat | A válogatás nélküli beteganyag D-dimer-vizsgálati eredményeinek megoszlása

D-dimer (ngFEU/ml)	Esetek száma	Életkor (év)	
		átlag	tartomány
500–1000	25	64,6	27–86
1000–1500	23	66,3	27–87
1500–2000	10	72,4	42–83
2500–3000	6	72,8	36–70
>3000	3	73,3	69–77

A részletes vizsgálatok 66 betegnél a vénás thrombosis lehetőségét elvetették. Alvadásra utaló tünet 53 negatív (normális) esetben sem volt kóros.

A D-dimer kóros titerű jelenlétét a keringésben a következőkben foglalták össze [14]:

- DIC,
- fibrinolyticus kezelés után,
- thromboembolia kíséretében,
- pulmonalis embolia, embolisatio esetében,
- mélyvénás thrombosisnál,
- akut myocardialis infarctus (24–48 óra között),
- praeclampsia klinikai állapotában,
- nagyobb fizikai megterhelés, stressz,
- májbetegség,
- akut végtagschaemia,
- akut cardiovascularis történet,
- akut és krónikus vesekárosodás (glomerulonephritis),
- szepszis, sokk,
- posztoperatív állapot,
- extenzív szövetkárosodás (politraumatizáció).

Azok közül a betegek közül, akik a felsorolt – irodalomban található – lehetőségek egyikébe sem voltak besorolhatók, de ugyanakkor felvetődött a thrombusképződés esetlegessége, öt beteget kiválasztottunk és 80–100 napig LMWH-val, illetve Clopidogrellel kezeltük (3. táblázat).

3. táblázat | Az antikoagulánsok D-dimer koncentrációjára kifejtett hatásának bemutatása

Alvadásgátló	Vérvétel ideje	D-dimer (ngFEU/ml)
Clexane 4000 NE/nap	2015. 04. 22	963
	2015. 04. 27	1432
	2015. 05. 04	806
~80 nap	2015. 06. 17	1244
Clopidogrel 75 mg/nap	2015. 09. 02	1169
	2015. 10. 07	1206
	2015. 11. 11	1362
~100 nap	2015. 12. 16	962

Az előzőekben tapasztalt magas D-dimer-titer azonban gyakorlatilag az alvadásgátlók hatására sem változott, jelezve azt, hogy az intravasalis FDP létrejöttét a legnagyobb valószínűséggel nem előzi meg alvadás, ha-

nem valószínűleg intracellulárisan proteolyticus enzimek hatására következik be az „előregedett”(?) FBG-molekulák bontása.

Megbeszélés

Nyilvánvaló, hogy az irodalomban található felsorolás nem egységes körleányt takar, hiszen a kóros (DIC) vagy mesterséges fibrinolysis következménye nem sorolható a thromboemboliák okozta megbetegedésekhez. A szövetkárosodással járó állapotok (posztoperatív státusz vagy traumatizáció) sem hasonlíthatók a máj- vagy vesebetegségekhez, annak ellenére sem, hogy az utóbbiaknál is van szövetkárosodás, sőt elhalás is, de a mértékek nem azonosak. Tény azonban, hogy a thromboemboliák nyomon követése, helyesebben gyógyítása esetén a D-dimer koncentrációja csökkenő tendenciát mutat és normalizálódik. (Különösen thromboemboliás fiatalabb betegek gyógyulásánál látjuk ezt törvényszerűen.) Fontos még egyszer annak hangsúlyozása, hogy normális D-dimer-érték a thromboembolia létét szinte biztonsággal kizárja [15, 16].

Következtetés

Vizsgálataink szerint a legnagyobb valószínűséggel fiziológias körülmények között intravasalis alvadás nincsen. Az FDP jelenléte nem csak alvadás utáni fibrinolysis eredménye. A hétköznapi gyakorlatban intravasalis alvadás (thromboembolia) nélküli magas D-dimer-értéket észlelünk májbetegségek (HBV-, HCV-vírus-hordozóknál), idült vesebetegségek esetén [17, 18]. Következésképpen felvetődik itt annak a lehetősége, hogy a degradálódott molekulák eltávolítása is akadályba ütközhet a máj ilyen irányú működésének csökkenése miatt. Tapasztaltuk továbbá, hogy a magas D-dimer-titer többször, negatív májfunkciós próbák mellett magas ferritinértékhez is csatlakozhat. Közlebebről vizsgálva a ferritin és D-dimer összefüggését – ha van egyáltalán –, ma még enigma [16]. Bár ismert az a tapasztalat, hogy az alkoholizmusban is emelkedett lehet a ferritin és a D-dimer is [19].

További vizsgálatokra és szorgos megfigyelésre van szükség, hogy az említett tapasztalatok igazolást nyerjenek.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

A cikk végleges változatát a szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőnek nincsenek érdekltségei.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki együttműködéséért a Centrum-Lab Laboratóriumi Diagnosztikai Kft.-nek.

Irodalom

- [1] Crawford F, Andras A, Welch K, et al. D-dimer test for excluding the diagnosis of pulmonary embolism. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; (8): CD010864.
- [2] Lord ST. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14: 236–241.
- [3] Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, et al. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 2009; 48: 3877–3886.
- [4] Tsurupa G, Pechik I, Litvinov RI, et al. On the mechanism of α C polymer formation in fibrin. *Biochemistry* 2012; 51: 2526–2538.
- [5] Schreiber DH. The role of D-dimer in the diagnosis of venous thromboembolism. *Lab Med.* 2002; 33: 136–141.
- [6] Legnani C, Cini M, Scarvelis D, et al. Multicenter evaluation of a new quantitative highly sensitive D-dimer assay, the Hemosil® D-dimer HS 500, in patients with clinically suspected venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2010; 125: 398–401.
- [7] Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003; 108: 313–318.
- [8] Fiam B, Jákó J. Immuno-electrophoresis examination of fibrinogen and labile fibrinogen. [A fibrinogen és labilis fibrinogen immunoelektrophoresis vizsgálata.] *Honvéddorvos* 1966; 18: 298–303. [Hungarian]
- [9] Jákó J, Sas G, Pádár J. Assay of fibrinogen by gel diffusion. [A fibrinogen mennyiségi meghatározása géldiffúziós módszerrel.] *Rheumatológia, Balneológia, Allergológia* 1968; 9: 165–172. [Hungarian]
- [10] Jákó J, Sas G. Das Fibrinogen, die Fibrindeggradationsprodukte und ihr chemischer Nachweis. *Haematologia* 1970; (Suppl 1): 105–113.
- [11] Sas G, Jákó J, Domán J, et al. A rapid method for the semiquantitative determination of fibrinogen and fibrinogen degradation products (FDP) in defibrination syndrome. *Thromb Diath Haemorrh.* 1971; 25: 555–565.
- [12] Sas G, Blaskó G, Jákó J, et al. Inhibitory effect of “late” type fibrinogen degradation products (FDP), upon the ethanol gelation of plasma. *Haematologia* 1973; 7: 369–374.
- [13] Jákó J, Sebők J. Experimentelle Angaben über den Eliminationssweg der Degradationsprodukte von Fibrinogen/Fibrin. *Immunhaematologie* 1979; 6: 225–228.
- [14] Authors’ names not included. Fibrinogen: split products. *N Engl J Med.* 1968; 278: 793–794.
- [15] Van der Graaf F, van den Borne H, van der Kolk M, et al. Exclusion of deep venous thrombosis with D-dimer testing comparison of 13 D-dimer methods in 99 outpatients suspected of deep venous thrombosis using venography as reference standard. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 191–198.
- [16] Reber G, de Moerloose P. D-dimer assays for the exclusion of venous thromboembolism. *Sem Thromb Hemost.* 2000; 26: 619–624.
- [17] Dhanunjaya Y, Usha Anand, Anand CV. A study of plasma D-dimer levels in various stages of liver disease. *J Liver* 2013; 2: 119. doi: 10.4172/2167-0889.1000119
- [18] Gordge MP, Faint RW, Rylance PB, et al. Plasma D-dimer: a useful marker of fibrin breakdown in renal failure. *Thromb Haemost.* 1989; 61: 522–525.
- [19] Wang W, Knovich MA, Coffman LG, et al. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 760–769.

(Jákó János dr.,
Budapest, Oltvány u. 28., 1112
e-mail: dr.jako.janos@gmail.com)