

Testy agregometrii optycznej w diagnostyce trombocytopatii

Daria Malarczyk , Edyta Odnoczko 

Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych
 Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Malarczyk D, Odnoczko E. Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy. *J Transf Med*. DOI: 10.5603/JTM.2023.0006.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Zaburzenia funkcji płytek krwi (PFD) to rzadko występująca, a zarazem heterogenna grupa chorób należących do skaz krwotocznych. Kompleksowa diagnostyka nieprawidłowej funkcji płytek krwi (PLT), tzw. trombocytopatii — wymaga zastosowania specjalistycznych badań. Złotym standardem diagnostyki PFD jest agregometria optyczna oparta na pomiarze światła wiązki (LTA). Do próbki badanego osocza bogatopłytkowego dodawany jest w odpowiednim stężeniu określony agonista agregacji PLT (ADP, kwas arachidonowy, kolagen, rystocetyna, epinefryna). Na skutek interakcji z agonistą dochodzi do aktywacji i następczej agregacji płytek krwi. Powstawaniu agregatów płytkowych towarzyszy proporcjonalny wzrost przepuszczalności światła. W pracy przedstawiono zasadę metody LTA wraz z omówieniem podstawowego panelu agonistów agregacji płytek krwi. Ponadto scharakteryzowano mocne strony metody LTA i ograniczenia oraz porównano ją z pozostałymi alternatywnymi metodami diagnostyki PFD.

Słowa kluczowe: płytki krwi, trombocytopatie, agonista, diagnostyka laboratoryjna, agregometria optyczna, LTA

J. Transf. Med.

Wstęp

Nieprawidłowości dotyczące płytek krwi (PLT, *platelets*) obejmują zarówno zaburzenia ilościowe, jak i nieco rzadziej występujące zaburzenia pełnionej przez PLT funkcji w hemostazie. Trombocytopatie to grupa skaz krwotocznych, których przyczyną są wrodzone lub nabyte defekty płytek krwi upośledzające ich czynność w procesie krzepnięcia krwi. Wrodzone trombocytopatie mogą wynikać zarówno z nieprawidłowości strukturalnych płytek

krwi dotyczących ziarnistości płytkowych oraz receptorów i fosfolipidów błonowych, jak i z nieprawidłowej aktywacji PLT na skutek niewłaściwego przekazywania sygnału. Jednak znacznie częściej są rozpoznawane trombocytopatie nabyte, które są wynikiem stosowania niektórych leków oraz towarzyszą innym przewlekłym stanom chorobowym (np. nowotworom mieloproliferacyjnym, marskości wątroby itp.). Prawidłowe rozpoznanie wrodzonych trombocytopatii nierzadko bywa problematyczne ze względu na znaczną złożoność defektów płytko-

Adres do korespondencji: dr n. med. Edyta Odnoczko, Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02-776 Warszawa, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

Nadesłano: 21.03.2023

Przyjęto do druku: 21.04.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

wych. Dodatkowo diagnostyka tej grupy schorzeń często wiąże się z koniecznością przeprowadzenia szeregu skomplikowanych badań laboratoryjnych, często trudno dostępnych i dostarczających niejednoznacznych informacji [1].

Kompleksowa diagnostyka trombocytopatii — nieprawidłowej funkcji trombocytów, wymaga zastosowania specjalistycznych badań. Panel wykorzystywanych badań laboratoryjnych (zależnie od ich dostępności) obejmuje: ocenę mikroskopową rozmazu krwi obwodowej, pomiar czasu okluzji (CT, *closure time*) w analizatorze do badania funkcji płytek krwi (PFA-100/200, *platelet function analyser*), analizę stopnia agregacji PLT w obecności czynników agregujących, pomiar stężenia białek wewnątrzpłytkowych i ich metabolitów, cytometrię przepływową oceniającą białka (glikoproteiny) na powierzchni płytek krwi, a także coraz częściej wykonywane badania genetyczne [1].

Wśród tych specjalistycznych badań najczęściej wykorzystywane są tak zwane testy agregacji płytek krwi, które są zaliczane do swoistych testów hemostazy pierwotnej. Najpowszechniej stosowaną metodą prowadzenia testów agregacji PLT, a zarazem złotym standardem diagnostyki zaburzeń funkcji płytek krwi (PFD, *platelets function disorder*) jest agregometria optyczna oparta na pomiarze transmisji światła widzialnego (LTA, *light transmission aggregometry*). Po raz pierwszy metoda ta została opisana przez Borna i O'Briena około 50 lat temu, a do dziś jest uznanym narzędziem diagnostycznym dysfunkcji płytek krwi (wrodzonych oraz nabytych) w wielu specjalistycznych laboratoriach hemostazy [2, 3].

Zasada metody transmisji światła widzialnego

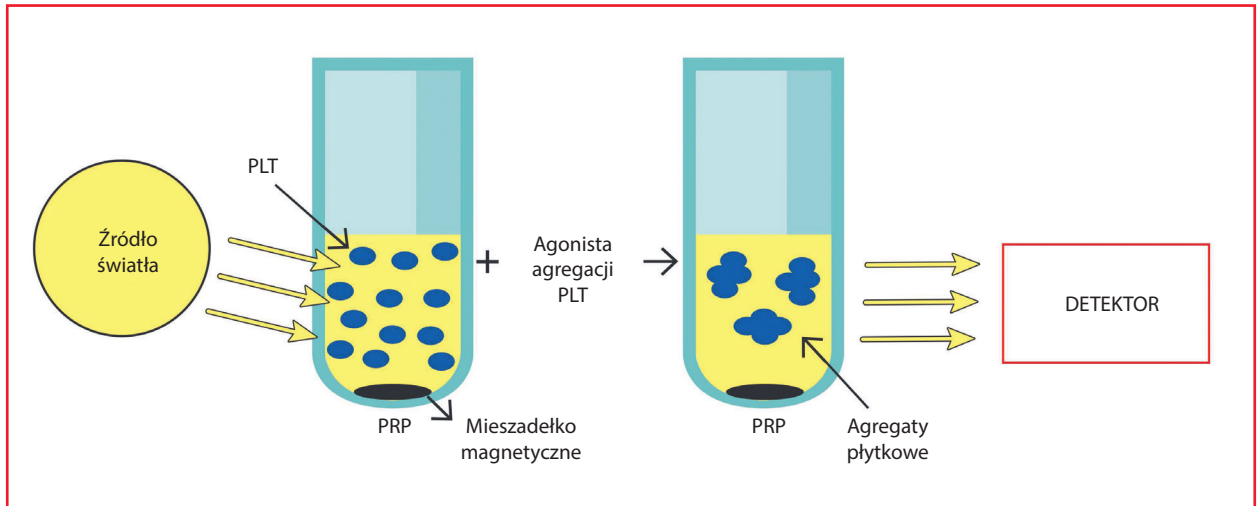
Ogólny mechanizm działania metody LTA opiera się na pomiarze zmian światła przechodzącego (tzw. transmitancji, T) przez dwie kuwety pomiarowe, z których jedna zawiera autologiczne osocze ubogopłytkowe (PPP, *platelet-poor plasma*) pełniące rolę wzorca (100% przepuszczalności światła). W drugiej kuwecie natomiast znajduje się analizowana próbka osocza bogatopłytkowego (PRP, *platelet-rich plasma*), do której dodawany jest agonista (aktywator) płytek krwi w odpowiednim stężeniu (w objętości nie większej niż 10% objętości badanej próbki osocza). Obserwowana agregacja (tworzenie agregatów) płytek krwi wynika z oddziaływania dodanego do PRP agonisty z właściwym, charakterystycznym dla danego związku powierzchniowym receptorem błonowym (GP, glikoproteina) PLT [4].

W czasie agregacji wewnątrz płytek krwi zachodzi szereg zmian zarówno biochemicznych, jak i strukturalnych na skutek pobudzenia różnych szlaków sygnałowych powiązanych z danym receptorem. Ostatecznie, niezależnie od mechanizmu działania agonisty, dochodzi do aktywacji receptora dla fibrynogenu (glikoproteina — GPIIb/IIIa), co powoduje wiązanie przez fibrynogen płytek krwi w sieć. Połączone ze sobą wzajemnie płytki krwi tworzą widoczne w osoczu bogatopłytkowym agregaty płytkowe (ryc. 1). Minimalny czas potrzebny do utworzenia agregatów wynosi około 3 minuty. Ze względu na wieloetapowość tego procesu, czas ten ulega wydłużeniu do 5 minut, a także w niektórych przypadkach do maksymalnie 10 minut. W czasie testu muszą zostać zapewnione określone warunki badania poprzez doprowadzenie badanej próbki osocza cytrynianowego do temperatury 37°C oraz zapewnienie stałych warunków mieszania osocza (umieszczenie mieszadła magnetycznego). Ma to na celu stworzenie odpowiedniego środowiska dla płytek krwi, czyli możliwie najbardziej zbliżonego do warunków panujących w naczyniach krwionośnych [5]. Badanie przeprowadzane jest w sposób półautomatyczny na agregometrach (np. Chrono-log Corporation), bądź też w pełni zautomatyzowanych analizatorach koagulologicznych (np. Atellica COAG 360, Sysmex serii CS, Siemens Healthneers).

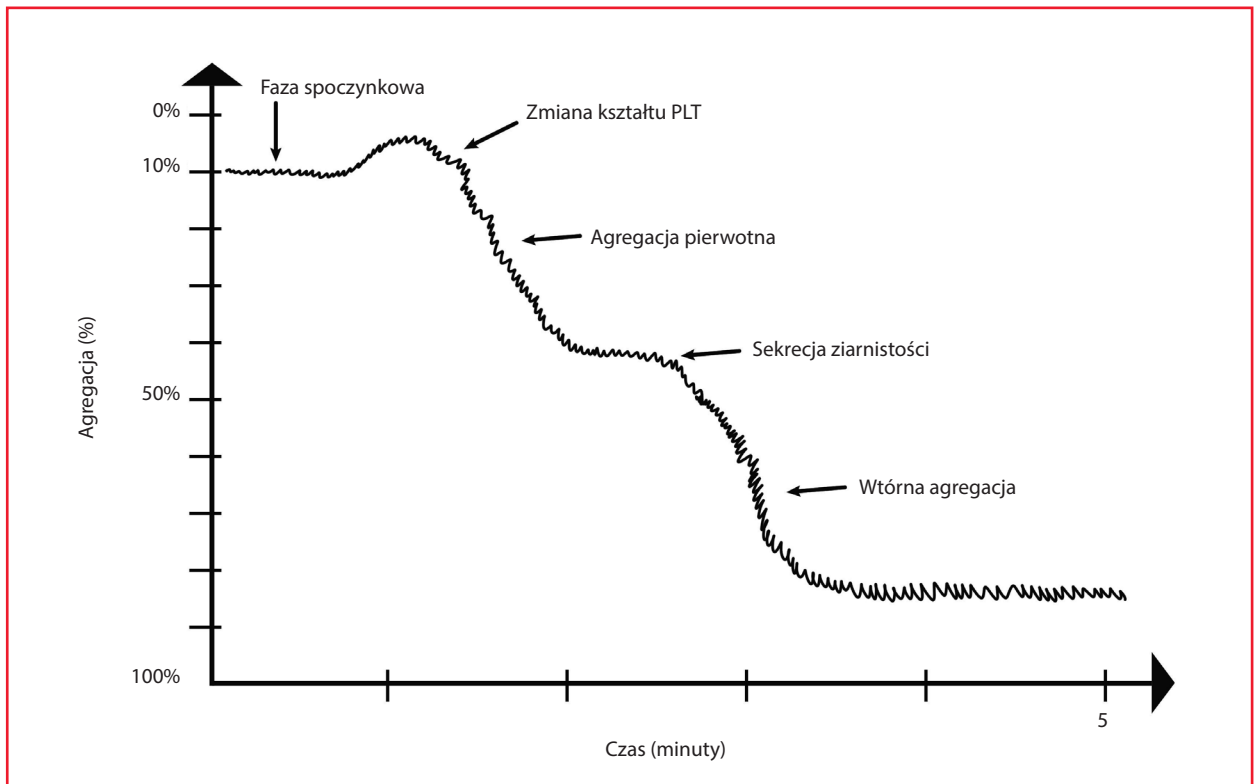
Krzywa agregacji płytek krwi

Powstawaniu agregatów płytkowych towarzyszy wzrost przepuszczalności światła, który jest wynikiem zmniejszenia ilości cząsteczek zdolnych do jego rozproszenia [1]. Zarejestrowany przez detektor sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do stale mierzonej różnicy przepuszczalności światła między analizowaną a wzorcową próbką. Następnie, sygnał ten wyrażany jest jako „procent agregacji [%]” PLT, co przedstawia krzywa zależności intensywności agregacji od czasu prowadzonej reakcji (ryc. 2). Wartości referencyjne zwykle zawierają się w przedziale 60–90% [7]. Krzywa agregacji jest zatem graficzną ilustracją tempa tworzenia i „jakości” agregatów płytkowych.

Na skutek interakcji z agonistą dochodzi do zmiany kształtu PLT, co obserwuje się w postaci niewielkiego piku na krzywej agregacji. Jeżeli bodziec pobudzający nie jest wystarczająco silny lub dochodzi do hamowania procesu agregacji na skutek obecności leków przeciwplateletowych, płytki krwi ulegają dezagregacji. Stężenie progowe danego agonisty wywołuje zmianę kształtu PLT



Rycina 1. Ogólna zasada metody transmisji światła widzialnego (opis w tekście) [6]; PLT (*platelets*) — płytki krwi, PRP (*platelet-rich plasma*) — osocze bogatopłytkowe



Rycina 2. Schemat krzywej agregacji (opis w tekście) [8]; PLT (*platelets*) — płytki krwi

z dyskoidalnej na kulistą z obecnymi pseudopodiami, czego wynikiem jest początkowe zmniejszenie przepuszczalności światła. Dalsze oddziaływanie agonisty na PLT powoduje, że zaczynają one do siebie przylegać i tworzyć agregaty, w związku z czym więcej światła przechodzi przez próbkę osocza bogatopłytkowego (agregacja pierwotna). Gdy bodziec pobudzający PLT jest wystarczająco

silny, dochodzi do uwolnienia zawartości ziarnistości PLT (odkształcenie krzywej), czego wynikiem jest wzmocnienie pierwotnej agregacji (agregacja wtórna). W przypadku niektórych silnych agonistów (np. kwas arachidonowy, trombina, kolagen) odkształcenie na krzywej nie jest odpowiednio widoczne, w związku z czym uzyskiwana jest tylko jedna faza agregacji [8].

Tabela 1. Optymalne wartości stężeń w zależności od zastosowanego agonisty agregacji płytek krwi [11]

Agonista agregacji płytek krwi	Stężenie optymalne	Zakres stężeń	Receptor płytkowy
Adenozynodifosforan	2–2,5 μM	0,2–20 μM	P2Y1, P2Y12
Kwas arachidonowy	1 mM	0,2–2,0 mM	TXA2
Kolagen	1–2 $\mu\text{g/ml}$	1,0–5,0 $\mu\text{g/ml}$	GPVI
Rystocetyna	1,2 mg/ml 0,5 mg/ml	1,0–1,5 mg/ml 0,5–0,7 mg/ml	GP1b
Epinefryna	5 μM	0,5–10 μM	α2A
Agoniści panelu rozszerzonego			
Peptyd aktywujący receptor trombiny	10 μM	10–100 μM	TXA2
U46619	1 μM	1–5 μM	PAR-1
Peptyd związany z kolagenem	10 ng/ml	10–1000 ng/ml	GPVI

Agoniści agregacji płytek krwi

W warunkach fizjologicznych, aby doszło do aktywacji i następnej adhezji oraz agregacji płytek krwi, niezbędny jest kolagen oraz czynnik von Willebranda (VWF, *von Willebrand factor*), natomiast w warunkach *in vitro* w tym celu można zastosować szereg związków wspólnie określanych mianem agonistów agregacji płytek krwi. Panel najczęściej stosowanych w diagnostyce PFD agonistów agregacji PLT obejmuje pięć związków: adenozynodifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*), kwas arachidonowy (AA, *arachidonic acid*), kolagen, rystocetynę, a także epinefrynę [9]. Każdy z nich charakteryzuje odmienny przebieg procesu agregacji, tak zwany profil agregacji, co jest widoczne na krzywej zależności agregacji od czasu. Niezależnie od wyżej wymienionych substancji, które stanowią podstawowy wyjściowy panel agonistów, możliwe jest także zastosowanie w określonych przypadkach alternatywnych aktywatorów wchodzących w skład rozszerzonego panelu agonistów. Do tej grupy zaliczamy między innymi: peptyd aktywujący receptor trombiny (TRAP, *thrombin receptor activating peptide*), samą trombinę, tromboksan A2 (TXA2), jego odpowiednik U46619 oraz peptyd związany z kolagenem (CRP, *collagen related peptide*) [9]. Bardzo ważnym aspektem przy wyborze agonisty jest również ustalenie dla niego optymalnego stężenia działania (tab. 1), co pozwoli jak najbardziej wyeliminować wpływ zmienności osobniczej na uzyskany wynik badania. Nieprawidłowo dobrane stężenie agonisty prowadzi do zmienności w intensywności agregacji, co z kolei powoduje powstawanie fałszywych profili agregacji [10].

Ogromną zaletą stosowania różnorodnej liczby agonistów jest diagnostyka zróżnicowanych etiologii PFD w jednym badaniu. Interpretacja wyników LTA powinna uwzględniać profil agregacji w odpowiedzi na pojedynczy aktywator, a ponadto całościowe spojrzenie na zastosowany panel agonistów, gdyż wiele szlaków sygnałowych sprzężonych z receptorami na powierzchni PLT jest ze sobą wzajemnie powiązanych. Nieprawidłowa agregacja płytek krwi w odpowiedzi na określonego agonistę może sugerować specyficzne zaburzenia, co przedstawiono w tabeli 2.

Rystocetyna

Dawniej rystocetyna (rys, *rystocetin*) służyła jako antybiotyk podawany na zakażenia wywołane gronkowcami, natomiast obecnie wykorzystuje się jej zdolność *in vitro* do wywoływania aglutynacji płytek krwi pod warunkiem obecności w osoczu multimerów VWF. Zatem rystocetyna służy do diagnostyki niedoboru zarówno VWF, jak i jego receptora — glikoproteiny GP Ib/IX/V. Agregacja płytek krwi indukowana rystocetyną, czyli tak zwany test RIPA (*ristocetin-induced platelet aggregation*) polega na dodaniu rystocetyny do osocza bogato-płytkowego standardowo w stężeniu **1,2 mg/ml**. Dodatkowo, w celu dokładniejszej diagnostyki przeprowadza się także tak zwany test LD-RIPA (*low dose ristocetin-induced platelet aggregation*), w którym rystocetyna jest używana w niższym stężeniu — **0,5–0,7 mg/ml** [13]. W przypadku osób zdrowych uzyskuje się prawidłową odpowiedź na wyższe stężenie rystocetyny oraz brak agregacji w odpowiedzi na jej niskie stężenie, natomiast nadmierna agregacja po dodaniu rystocetyny w stężeniu niższym do PRP jest obserwowana w dwóch

Tabela 2. Przyczyny nieprawidłowej odpowiedzi płytek krwi w zależności od zastosowanego agonisty [12]

Agonista (panel podstawowy)	Przyczyny nieprawidłowej agregacji PLT
Adenozynodifosforan	<ul style="list-style-type: none"> • Defekt receptora P2Y12 • Zespół szarych płytek • Trombastenia Glanzmana • Zespół mielodysplastyczny, ostra białaczka szpikowa • Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2 • Choroba puli magazynowej
Kwas arachidonowy	<ul style="list-style-type: none"> • Niedobór COX-1 • Defekt receptora tromboksanu • Trombastenia Glanzmana • Defekt receptora P2Y12 • Choroba puli magazynowej • Zespół mielodysplastyczny
Kolagen	<ul style="list-style-type: none"> • Defekt receptora GPVI • Defekt receptora P2Y12 • Choroba puli magazynowej • Trombastenia Glanzmana • Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2
Rystocetyna	<ul style="list-style-type: none"> • Płytkowy typ choroby von Willebranda • Zespół Bernarda-Souliera
Epinefryna	<ul style="list-style-type: none"> • Defekt receptora α2-adrenergicznego • Skaza płytkowa Quebec • Trombastenia Glanzmana • Zespół mielodysplastyczny • Choroba puli magazynowej • Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2

COX-1 (cyclooxygenase 1) — cyklooksigenaza-1

przypadkach, a mianowicie w przypadku choroby von Willebranda (VWD, *von Willebrand disease*) typu 2B oraz typu płytkowego (PT-VWD, *platelet-type von Willebrand disease*). Różnica między tymi jednostkami chorobowymi polega na tym, że w typie 2B VWD defekt dotyczy samego czynnika von Willebranda, w przeciwieństwie do PT-VWD, gdzie nieprawidłowości dotyczą płytkowego receptora GPIb, co powoduje zwiększone powinowactwo PLT do VWF. W diagnostyce różnicowej tych zaburzeń pomocne może być wykonanie testu polegającego na dodaniu do osocza badanego krioprecypitatu, gdyż tylko w przypadku PT-VWD dojdzie do agregacji PLT. Jeżeli chodzi o pozostałe typy VWD (typ 1, 2A, 2N, 2M), rutynowo przeprowadza się test z wyższym stężeniem rystocetyny, a uzyskany wynik może być zarówno obniżony, jak i prawidłowy [14]. Ponadto brak agregacji z rystocetyną lub obniżenie jej wartości jest charakterystycznym parametrem wrodzonego niedoboru kompleksu GP Ib/IX/V, który jest przyczyną zespołu Bernarda-Souliera

(BSS, *Bernard-Soulier syndrome*). W przypadku chorych na trombastenię Glanzmanna nie dochodzi do agregacji PLT pod wpływem rystocetyny, natomiast zachowana jest prawidłowa agregacja z pozostałymi agonistami.

Kolagen

Głównym receptorem na powierzchni płytek krwi dla cząsteczki kolagenu (Col, *collagen*) jest glikoproteina VI (GPVI). Izolowana upośledzona agregacja (całkowity brak lub obniżona) występująca po dodaniu kolagenu w stężeniu 2 μ g/ml do osocza bogatopłytkowego wskazuje na nieprawidłowości działania osi kolagen–receptor płytkowy GPVI. Stopień agregacji pod wpływem kolagenu w przypadku wrodzonego lub nabytego (autoimmunologicznego) niedoboru GPVI zależy od całkowitej liczby pozostałych receptorów na powierzchni PLT. Można również rozszerzyć diagnostykę odpowiedzi PLT na kolagen poprzez zastosowanie alternatywnych agonistów należących do panelu rozszerzonego,

takich jak konwulsyna oraz CRP [4]. Dodatkowo, brak hamowania procesu agregacji po dodaniu do osocza PRP kolagenu w niskim stężeniu jest również wskaźnikiem oporności laboratoryjnej na kwas acetylosalicylowy.

Epinefryna

Aktywacja płytek krwi po dodaniu do osocza bogatopłytkowego epinefryny (EPI, *epinephrine*) w stężeniu 5–10 μM jest wynikiem oddziaływania tej cząsteczki na jej płytkowy receptor adrenergiczny — α2A . Diagnostyka odpowiedzi PLT na epinefrynę bywa kłopotliwa ze względu na fakt, że często u osób zdrowych obserwuje się brak agregacji po stymulacji PLT epinefryną, co wynika ze zmienności osobniczej liczby receptorów płytkowych α2A [15]. Izolowany, nieprawidłowy wynik agregacji PLT po stymulacji epinefryną nie ma znaczenia klinicznego, jeżeli nie towarzyszą mu inne nieprawidłowości lub nie podejrzewa się konkretnej jednostki chorobowej. Przykładem takiego schorzenia, w którym obserwuje się nieprawidłowy profil agregacji z epinefryną, jest skaza płytkowa Quebec (QPD, *Quebec platelet disorder*).

Kwas arachidonowy

Działanie kwasu arachidonowego (AA, *arachidonic acid*) na płytki krwi jest związane z jego przekształceniem przez cyklooksygenazę 1 (COX-1) do między innymi tromboksanu A₂ — związku należącego do grupy prostanoidów. To właśnie ten metabolit AA wykazuje działanie proagregacyjne w wyniku aktywacji płytkowych receptorów TP α i TP β (receptory sprzężone z białkiem G). Dodatkowo, aktywacja płytek krwi poprzez stymulację niskimi stężeniami kolagenu czy ADP wiąże się z uwolnieniem endogennego kwasu arachidonowego w wyniku działania enzymu — fosfolipazy A, który podlega metabolizmowi przez COX-1 do TXA₂. Inhibitorem tego szlaku przemian jest kwas acetylosalicylowy, trwale hamujący działanie enzymu COX-1 [16]. Nieodwracalność tego procesu wynika z faktu, że płytki krwi nie zawierają jądra komórkowego i nie są w stanie wytworzyć nowej, poprawnie działającej cyklooksygenazy-1. Poza kwasem arachidonowym, który wchodzi w skład podstawowego panelu agonistów agregacji PLT, możliwe jest także zastosowanie innych alternatywnych związków (U46619 lub STA₂) w przypadku trudności diagnostycznych. Brak agregacji pod wpływem tych związków wskazuje na defekt TXA₂, natomiast prawidłowa agregacja przy braku odpowiedzi płytek na sam kwas arachidonowy świadczy o defekcie aspirynowym [1]. Upośledzona agregacja

po stymulacji kwasem arachidonowym może być związana z zaburzeniem przekształcania AA do TXA₂. W tym właśnie przypadku pomocne staje się zastosowanie agonistów panelu rozszerzonego. Ponadto brak agregacji PLT może być wynikiem mutacji w genie kodującym receptor TP α .

Adenozynodifosforan

Adenozynodifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*) ADP jest naturalnym agonistą agregacji płytek krwi i aktywuje je poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami purynergicznymi — P₂Y₁ oraz P₂Y₁₂ [17]. Stymulacja płytek krwi za pomocą ADP (poprzez receptor P₂Y₁) początkowo prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia (Ca²⁺) w cytoplazmie, czemu towarzyszy zahamowanie czynności cykazy adenylowej (AC, *adenyl cyclase*). W związku z powyższym nie dochodzi do syntezy inhibitora procesu agregacji — cyklicznego monofosforanu adenozyny (cAMP, *cyclic-adenosine-mono-phosphate*). Za wewnątrzkomórkowy wzrost Ca²⁺ wywołany stymulacją ADP odpowiada aktywacja błonowych kanałów wapniowych (ich rolę pełni purynergiczny receptor P₂X₁) i napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego do cytoplazmy PLT. Jeżeli chodzi o odbiegające od normy wyniki agregacji po stymulacji ADP, to mogą one z jednej strony wynikać z wrodzonych wad receptorów purynergicznymi, a z drugiej — z zaburzeń przekazywania sygnałów wewnątrz płytek krwi. Ze względu na fakt, że ADP jest magazynowany w ziarnistościach gęstych PLT, w wyniku ich aktywacji dochodzi do uwolnienia zawartości ziarnistości (w tym ADP), które wzmacniają agregację i powodują powstanie drugiej fazy krzywej agregacji. Zaburzenia szlaku aktywacji PLT przez ADP powodują zatem nieprawidłową odpowiedź na pozostałych agonistów.

Mocne strony i ograniczenia agregometrii optycznej

Agregometria optyczna stanowi uznaną przez specjalistów narzędzie diagnostyczne dysfunkcji płytek krwi. Wynika to głównie z możliwości stosowania zróżnicowanych grup agonistów agregacji, stymulujących odmienne mechanizmy prowadzące do nieprawidłowej aktywacji PLT, które mogą zostać wykryte w jednym badaniu. Dodatkowo, oprócz diagnostyki PFD, metoda LTA znalazła także zastosowanie w monitorowaniu efektu leczenia przeciwplateletowego, niemniej jednak wymaga to dalszych analiz, aby mogła być zastosowana w innych celach niż naukowe (brak dokładnej współzależności pomiędzy obrazem

klinicznym a wynikami badań). Mimo że metoda LTA jest uznawana za złoty standard diagnostyki PFD, posiada również wiele ograniczeń. Zasadniczą wadą metody LTA jest brak odpowiedniej standaryzacji procedury oraz trudności w kontroli jakości prowadzonych badań [18]. Ze względu na złożoność etapu przedanalizy metody LTA, bardzo ważne jest prawidłowe przygotowanie zarówno próbek do badania, jak i samego pacjenta [5]. Ujednolicenie warunków technicznych ma na celu uzyskiwanie jak najbardziej powtarzalnych i wiarygodnych wyników oraz eliminację czynników wpływających na aktywację płytek krwi. Kolejnym istotnym ograniczeniem agregometrii optycznej jest czasochłonność procedury, zwłaszcza jeśli chodzi o właściwe przygotowanie próbek osocza bogato- oraz ubogopłytkowego, lecz należy podkreślić, że zautomatyzowanie tej metody w analizatorach koagulologicznych znacznie usprawnia procedurę jej wykonania. Ponadto zaleca się, aby próbki krwi oraz PRP odstały do maksymalnie 30 minut przed rozpoczęciem odpowiednio wirowania i badania interakcji PLT z agonistą [19, 20]. Znacznie wydłuża to całość procedury badania LTA, przy czym całkowity czas badania nie powinien przekraczać 4 godzin (od momentu pobrania krwi) lub 2 godziny (od momentu przygotowania osocza). Zbyt długi czas trwania badania LTA prowadzi do uzyskiwania nieprawidłowych wyników — fałszywie zaniżonej agregacji, co wynika ze spadku aktywności PLT wraz z upływem czasu. Do przeprowadzania badania LTA wymagana jest odpowiednia ilość osocza, co wiąże się z pobraniem znacznej ilości krwi od pacjenta (nawet 20–25 ml) [7]. Dodatkowo wymagane są świeże próbki krwi, bez śladów hemolizy czy lipemii [19]. Nie zawsze jest możliwe uzyskanie tak dużej ilości próbek krwi, zwłaszcza w przypadku dzieci. Ważnym aspektem metody LTA jest także ilość PLT w osoczu bogatopłytkowym. Określenie liczby płytek krwi w próbce PRP zarówno badanego pacjenta, jak i osocza prawidłowego jest niezbędnym elementem badania LTA i stanowi wewnętrzną kontrolę warunków testu. Nie zaleca się wykonywania badania agregacji PLT, gdy ich liczba jest mniejsza niż 150 g/l. Wyklucza to możliwość zastosowania metody LTA do diagnostyki dysfunkcji płytek krwi z towarzyszącą małopłytkowością. Natomiast dyskusyjna pozostaje kwestia zbyt dużej liczby PLT. Rozcieńczanie PRP przy użyciu autologicznego PPP do pożądanego wartości stanowi wewnętrzną kontrolę warunków testu. Standaryzacja liczby PLT do pożądanego wartości 200–300 g/l może powodować nieprawidłową odpowiedź płytek krwi na zastosowanego agonistę i nie jest obecnie

zalecane. Jednak od lat standaryzowanie liczby płytek krwi było powszechnie wykonywaną procedurą podczas badania LTA [20, 21]. Diagnostyka PFD za pomocą metody LTA wymaga również właściwego przygotowania pacjenta do badania, tak aby wyeliminować wszystkie czynniki mogące wpływać na aktywność płytek krwi [19, 20]. Do czynników tych zaliczamy: aktywność fizyczną, używki, leki czy posiłek, a także rodzaj spożywanych pokarmów lub stosowanych używek [22]. Uważa się, że etap przedanalizy metody LTA jest najbardziej podatny na błędy. Z związku z powyższym tylko prawidłowe przygotowanie pacjenta do badania oraz właściwe obchodzenie się z pobranym materiałem pozwoli możliwie maksymalnie wyeliminować wpływ zmiennych przedanalizy na otrzymany wynik badania LTA. Interpretacja wyników testów agregacji płytek krwi może sprawiać wiele trudności, dlatego niezbędne jest doświadczenie osoby analizującej krzywe agregacyjne [7].

Pozostałe metody diagnostyki dysfunkcji płytek krwi

Ze względu na liczne ograniczenia LTA bardzo ważne jest zastosowanie uzupełniających technik diagnostycznych służących ocenie funkcji płytek krwi. Wybór odpowiedniej metody pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie postawionej diagnozy w jak najkrótszym czasie, co odpowiednio umożliwi wdrożenie właściwego dla danej jednostki chorobowej leczenia, lub ukierunkuje dalszy proces diagnostyczny.

Szczególnie popularną oraz przesiewową metodą wykorzystywaną do oceny zaburzeń hemostazy pierwotnej jest badanie czasu okluzji (CT) w aparacie PFA-100 lub PFA-200. Zasada metody PFA polega na ocenie czynności PLT w krwi pełnej, która przepływa przez otwór w błonie pokrytej odpowiednim agonistą agregacji (kolagenem i epinefryną lub kolagenem i ADP). Agoniści wywołują aktywację i agregację płytek, co powoduje zamknięcie otworu i prowadzi do ustania przepływu krwi. Ocenia się czas potrzebny do zamknięcia otworu błony poprzez tworzące się agregaty płytkowe. Badanie to jest bardzo użyteczne do diagnostyki ciężkich dysfunkcji płytek krwi (trombastenia Glanzmana czy zespół Bernarda-Souliera), natomiast wykazuje ograniczoną użyteczność w przypadku łagodniejszych trombocytopenii. Prawidłowy wynik badania PFA pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć poważne, wrodzone dysfunkcje PLT [23].

Tabela 3. Porównanie metod oceny zdolności płytek krwi do agregacji [6]

Metoda	Zasada metody	Agonista agregacji PLT	Badany materiał	Czas badania
LTA	Pomiar turbidymetryczny	AA, ADP, kolagen, epinefryna, ristocetyna (dodatkowo agoniści panelu rozszerzonego)	PRP	1–2 godz.
PFA-100/200	Pomiar czasu CT	ADP, kolagen, epinefryna	Krew pełna	5–10 min
MEA	Pomiar impedancyjny	AA, kolagen, ADP, TRAP	Krew pełna	5–7 min

AA (*arachidonic acid*) — kwas arachidonowy, ADP (*adenosine diphosphate*) — adenozyndifosforan, CT (*closure time*) — czas zamknięcia, LTA (*light transmission aggregometry*) — agregometria oparta na transmisji światła widzialnego, MEA (*multi-electrode aggregometry*) — wieloelektrodowa agregometria, PFA-100/200 (*platelet function analyzer 100/200*) — analizator funkcji płytek krwi 100/200, PRP (*platelet-rich plasma*) — osocze bogatopłytkowe, TRAP (*thrombin receptor activating peptide*) — peptyd aktywujący receptor trombiny

Nieustanny postęp technologiczny diagnostyki dysfunkcji płytek krwi przyczynił się także do opracowania przyłóżkowych (POCT, *point-of-care testing*) metod oceny agregacji PLT. Zaliczamy do nich agregometrię opartą na zjawisku impedancji elektrycznej we krwi pełnej (MEA, *multiple electrode aggregometry*). Na zanurzonych w badanej próbce krwi elektrodach dochodzi do agregacji PLT na skutek interakcji z agonistą. Mierzona zmiana oporu elektrycznego (impedancji) jest wprost proporcjonalna do stopnia agregacji płytek krwi [24]. Do stymulacji krwinek płytkowych wykorzystuje się podstawowy panel czynników agregujących, choć w odmiennych stężeniach [7]. Warto podkreślić, że odpowiedź płytek krwi na te związki w przypadku LTA i agregometrii impedancyjnej jest różna, zwłaszcza w obecności ADP i epinefryny. Wynik pomiaru wyrażony w omach (Ω) może być konwertowany na arbitralne jednostki agregacji. W przeciwieństwie do metody LTA agregometria impedancyjna nie wymaga tak pracochłonnego przygotowania próbek, gdyż wykorzystuje próbkę krwi pełnej, co zdecydowanie znacznie skraca czas potrzebny do uzyskania wyniku oraz zmniejsza ryzyko aktywacji PLT przed przystąpieniem do badania. Wymagana jest także mniejsza ilość krwi w porównaniu z metodą LTA. Natomiast ograniczeniem agregometrii impedancyjnej jest jej zależność od liczby płytek krwi oraz wartości hematokrytu. Badanie agregacji PLT we krwi pełnej bardziej odzwierciedla warunki panujące *in vivo* w naczyniach krwionośnych, ze względu na obecność subpopulacji PLT oraz pozostałych elementów morfotycznych krwi. Jednakże badanie to nie uwzględnia wpływu śródbłonna naczyniowego oraz sił ścinających na aktywność płytek krwi. Porównanie powyższych metod oceny zdolności płytek krwi do agregacji w odpowiedzi na stymulacje odpowiednim aktywatorem przedstawiono w tabeli 3. Metoda impedancyjna jest rzadziej stosowana w laboratoriach

hemostazy niż LTA. W piśmiennictwie brakuje szerzej zakrojonych badań porównawczych z LTA oraz doświadczeń klinicznych opisujących jej dokładną przydatność w diagnostyce zaburzeń funkcji płytek krwi [7].

Kolejną ważną dla diagnostyki PFD jest cytometria przepływowa (FCM, *flow cytometry*). Badanie to jest przede wszystkim wykonywane w celu ilościowej oceny (ekspresji) receptorów glikoproteinowych, których niedobory są przyczyną wrodzonych trombocytopatii [1]. Niewątpliwą zaletą tej metody jest możliwość kompleksowej oceny czynności płytek krwi, także wśród pacjentów z małopłytkowością. Dodatkowo, wymagana jest niewielka objętość krwi do badania [25]. Badanie cytometryczne GP płytkowych wykonuje się u pacjentów z odchyleniami w wynikach testów agregacji i/lub istotnym wywiadem klinicznym wskazującym na trombocytopatię. Dlatego FCM odgrywa ważną rolę w diagnostyce między innymi trombastenii Glanzmanna (niedobór lub brak GPIIb/IIIa) i zespołu Bernarda-Souliera (deficyt GPIb/IX/V) [7].

Coraz bardziej popularnym narzędziem diagnostycznym PFD stają się także badania molekularne. Zastosowanie technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) pozwala na kompleksową analizę genów zaangażowanych w rozwój dysfunkcji płytek krwi. Dotychczas poznano ponad 80 genów, których mutacje odpowiadają za wystąpienie płytkowych skaz krwotocznych oraz skorelowano dany wariant patologiczny z prezentowanym fenotypem. Identyfikacja mutacji sprawczej pozwala na potwierdzenie postawionej diagnozy. Jednak ze względu na złożony charakter trombocytopatii wykrycie wariantu patogennego odpowiedzialnego za rozwój choroby staje się niekiedy problematyczne. Dodatkowo istnieje także możliwość wykrycia licznych wariantów o nieznannej etiologii (VUS, *variants of uncertain clinical*

significance). Ze względu na złożony charakter płytkowych skaz krwotocznych takie warianty wymagają dalszej analizy oraz ciągłej aktualizacji powszechnie używanych baz danych mutacji, aby mogły zostać uznane za łagodne lub patogenne [26]. Nieliczne laboratoria wykonują badania genetyczne w kierunku dysfunkcji płytek krwi, co stanowi znaczne ograniczenie tej metody w diagnostyce skaz krwotocznych. Mając na uwadze fakt, że płytkowe skazy krwotoczne to bardzo heterogenna grupa schorzeń, badania molekularne są głównie wykonywane w przypadku dobrze poznanych skaz płytkowych, takich jak: trombostenia Glanzmanna, zespół Bernarda-Souliera czy płytkowy typ choroby von Willebranda. Diagnostyka molekularna PFD nie jest zalecana jako badanie pierwszego wyboru, natomiast wyjątek stanowią niektóre rzadkie zaburzenia, które trudno zdiagnozować w inny sposób (jak np. QPD), a także stany w przypadku których istnieje kliniczne podejrzenie określonej PFD [27]. W takich sytuacjach wstępna analiza DNA może znacznie zaoszczędzić czas w uzyskaniu właściwego rozpoznania. Dlatego NGS stanowi skuteczne narzędzie diagnostyczne PFD, niemniej jednak niezbędne jest dokładne poznanie podłoża molekularnego płytkowych skaz krwotocznych, aby metoda ta mogła być rutynowo stosowana [28].

Podsumowanie

Badanie LTA stanowi uznane przez specjalistów narzędzie diagnostyczne w ocenie dysfunkcji płytek krwi. Jednak brak standaryzacji procedury wykonania badania, pracochłonność i czasochłonność metody LTA czynią tę technikę dość podatną na błędy przedanalizacyjne, analityczne i interpretacyjne. Pomimo wielu podjętych prób standaryzacji procedury procesy analityczne nadal różnią się między laboratoriami, a interpretacja danych wymaga specjalistycznej wiedzy. Istotnym problemem w diagnostyce PFD jest ograniczenie dostępności LTA tylko do wysokospecjalistycznych laboratoriów hemostazy. Podjęte w ciągu ostatnich kilku lat i zakończone sukcesem próby automatyzacji LTA z wykorzystaniem analizatorów koagulologicznych (Siemens, Sysmex serii CS, Atellica) stanowią zatem przełom w dostępności tych testów i upraszczają wykonywanie w laboratorium i zlecanie testów LTA przez klinicystów [29]. Jak wykazały badania porównawcze tych analizatorów ze standardowym agregometrem, metoda zautomatyzowana charakteryzuje się wysoką powtarzalnością oraz zdecydowanie krótszym czasem przetwarzania próbek. Potrzebne są także dalsze badania wyżej

wymienionych analizatorów koagulologicznych w szerszym zakresie użyteczności, na przykład z użyciem alternatywnych agonistów agregacji płytek krwi lub u pacjentów z rzadkimi wrodzonymi zaburzeniami funkcji PLT, by w pełni ocenić ich wydajność i przydatność [30]. Warto również podkreślić, że ścisła współpraca klinicysty/hematologa z personelem laboratorium jest niezbędnym elementem we właściwej interpretacji wyników LTA i rozpoznaniu tak trudnych chorób hematologicznych, jakimi są trombocytopatie.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Z hemostazą na „Ty”. Wyd. Bio-Ksel, Grudziądz 2016; 75-90.
- Paniccia R, Priora R, Liotta AA, et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015; 11: 133–148, doi: [10.2147/VHRM.S44469](https://doi.org/10.2147/VHRM.S44469), indexed in Pubmed: [25733843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25733843/).
- Le Blanc J, Mullier F, Wayne C, et al. Advances in platelet function testing—light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med.* 2020; 9(8), doi: [10.3390/jcm9082636](https://doi.org/10.3390/jcm9082636), indexed in Pubmed: [32823782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32823782/).
- Alessi MC, Sié P, Payrastre B. Strengths and weaknesses of light transmission aggregometry in diagnosing hereditary platelet function disorders. *J Clin Med.* 2020; 9(3), doi: [10.3390/jcm9030763](https://doi.org/10.3390/jcm9030763), indexed in Pubmed: [32178287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178287/).
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013 [Epub ahead of print], doi: [10.1111/jth.12231](https://doi.org/10.1111/jth.12231), indexed in Pubmed: [23574625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23574625/).
- Grove EL, Storey RF, Würtz M. Platelet function testing in atherothrombotic disease. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(33): 5379–5391, doi: [10.2174/138161212803251862](https://doi.org/10.2174/138161212803251862), indexed in Pubmed: [22724414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22724414/).
- Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Zasady rozpoznawania skaz krwotocznych ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki laboratoryjnej. *Hematologia.* 2017; 7(4): 303–311, doi: [10.5603/hem.2016.0029](https://doi.org/10.5603/hem.2016.0029).
- Frontroth JP. Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013; 992: 227–240, doi: [10.1007/978-1-62703-339-8_17](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_17), indexed in Pubmed: [23546717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23546717/).
- Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, et al. High-dose epinephrine enhances platelet aggregation at the expense of procoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2021; 121(10): 1337–1344, doi: [10.1055/a-1420-7630](https://doi.org/10.1055/a-1420-7630), indexed in Pubmed: [33690868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690868/).
- Hvas AM, Favalaro EJ. Platelet function analyzed by light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 321–331, doi: [10.1007/978-1-4939-7196-1_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_25), indexed in Pubmed: [28804839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28804839/).
- Israels SJ. Laboratory testing for platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37 Suppl 1: 18–24, doi: [10.1111/ijlh.12346](https://doi.org/10.1111/ijlh.12346), indexed in Pubmed: [25976956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976956/).
- Gresele P. Subcommittee on platelet physiology of the international society on thrombosis and hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J*

- Thromb Haemost. 2015; 13(2): 314–322, doi: [10.1111/jth.12792](https://doi.org/10.1111/jth.12792), indexed in Pubmed: [25403439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403439/).
13. Frontrouth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 473–494, doi: [10.1007/978-1-4939-7196-1_35](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_35), indexed in Pubmed: [28804849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28804849/).
 14. Odnoczko E. Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda. *J Transf Med* 2012; 5(3): 103–107.
 15. Lin TM, Lin JS, Tseng JY, et al. Impaired responsiveness of platelets to epinephrine due to α 2A adrenoreceptor deficiency in Male Chinese. *Platelets.* 2016; 27(2): 149–154, doi: [10.3109/09537104.2015.1049137](https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1049137), indexed in Pubmed: [26083800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26083800/).
 16. Kubica J, Koziński M, Grzešek G. Mechanizmy działania leków przeciwplateletowych. *Folia Cardiologica Excerpta* 2009; 4; 1: 10–17.
 17. Abe H, Endo K, Shiba M, et al. Correlation between platelet thrombus formation on collagen-coated beads and platelet aggregation induced by ADP. *Transfus Apher Sci.* 2020; 59(1): 102560, doi: [10.1016/j.transci.2019.06.001](https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.06.001), indexed in Pubmed: [31204292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31204292/).
 18. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, et al. THROMKID-Plus Studiengruppe der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost.* 2019; 119(7): 1154–1161, doi: [10.1055/s-0039-1688791](https://doi.org/10.1055/s-0039-1688791), indexed in Pubmed: [31154663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31154663/).
 19. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J.* 2016; 14: 49, doi: [10.1186/s12959-016-0123-z](https://doi.org/10.1186/s12959-016-0123-z), indexed in Pubmed: [27999475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27999475/).
 20. Favaloro EJ. More on preanalytical variables affecting platelet function testing using light transmittance aggregometry. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(4): 737–739, doi: [10.1515/CCLM.2011.112](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.112), indexed in Pubmed: [21275810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21275810/).
 21. Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets.* 2017; 28(7): 712–719, doi: [10.1080/09537104.2016.1265923](https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265923), indexed in Pubmed: [28150526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28150526/).
 22. Brennan Y, Levade M, Ward CM. Acquired platelet function disorders. *Thromb Res.* 2020; 196: 561–568, doi: [10.1016/j.thromres.2019.06.009](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.06.009), indexed in Pubmed: [31229273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31229273/).
 23. Lassila R. Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42(3): 185–190, doi: [10.1055/s-0036-1571307](https://doi.org/10.1055/s-0036-1571307), indexed in Pubmed: [26886396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26886396/).
 24. Pluta J, Nicińska B, Trzebicki J. Multiple electrode aggregometry as a method for platelet function assessment according to the European guidelines. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2018; 50(3): 230–233, doi: [10.5603/AIT.a2018.0024](https://doi.org/10.5603/AIT.a2018.0024), indexed in Pubmed: [30001456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30001456/).
 25. Navred K, Martin M, Ekdahl L, et al. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders—A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. *PLoS One.* 2019; 14(1): e0211130, doi: [10.1371/journal.pone.0211130](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211130), indexed in Pubmed: [30673773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30673773/).
 26. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(8): 1839–1845, doi: [10.1111/jth.14945](https://doi.org/10.1111/jth.14945), indexed in Pubmed: [32521110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32521110/).
 27. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022; 59(6): 405–444, doi: [10.1080/10408363.2022.2049199](https://doi.org/10.1080/10408363.2022.2049199), indexed in Pubmed: [35341454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35341454/).
 28. Nurden P, Stritt S, Favier R, et al. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica.* 2021; 106(2): 337–350, doi: [10.3324/haematol.2020.248153](https://doi.org/10.3324/haematol.2020.248153), indexed in Pubmed: [33147934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147934/).
 29. Platton S, McCormick Á, Bukht M, et al. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers—preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018; 2(4): 778–789, doi: [10.1002/rth2.12140](https://doi.org/10.1002/rth2.12140), indexed in Pubmed: [30349897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30349897/).
 30. Stratmann J, Karmal L, Zwinge B, et al. Platelet aggregation testing on a routine coagulation analyzer: a method comparison study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25: 1076029619885184, doi: [10.1177/1076029619885184](https://doi.org/10.1177/1076029619885184), indexed in Pubmed: [31773967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31773967/).