

Monitorovanie protidoštičkovej liečby

MUDr. Daniela Kotuličová, MUDr. Peter Chudý, PhD., MUDr. Juraj Chudej, PhD., doc. MUDr. Ján Staško, PhD., prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.

Klinika hematológie a transfuziológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice Martin

V mnohých klinických štúdiách bola u pacientov s nedostatočnou inhibíciou doštičkových funkcií sledovaná zvýšená incidencia kardio-vaskulárnych príhod. Identifikovanie pacientov s reziduálnou doštičkovou reaktivitou napriek štandardnej protidoštičkovej liečbe by preto bolo prospešné na predpovedanie rizika aterosklerotického príhody a zlepšenia klinického výstupu. V súčasnosti známe metódy majú špecifické limitácie, ideálna metóda nebola nájdená a účinnosť a bezpečnosť alternatívnej liečby ešte nebola overená, z týchto dôvodov zatiaľ nemožno monitorovanie protidoštičkovej liečby všeobecne odporúčať do klinickej praxe.

Kľúčové slová: protidoštičková liečba, rezistencia, monitorovanie, reziduálna doštičková reaktivita

Monitoring of antiplatelet therapy

Increased incidence of cardiovascular events in patients with the insufficient inhibition of platelet function has been shown in many studies. Therefore identification of patient with high residual platelet reactivity despite standard antiplatelet therapy may be useful to predict their risk of atherosclerotic events and could improve outcomes. Currently known laboratory methods have specific limitations, ideal method have not been found yet and efficacy and safety of alternative antiplatelet therapy have not been verified yet. For this reasons monitoring of antiplatelet therapy can not be generally recommended in clinical practice yet.

Key words: antiplatelet therapy, resistance, monitoring, residual platelet reactivity.

Vask. med., 2011, 3 (1): 21–25

Úvod

Inhibícia krvných doštičiek pomocou antiagregačnej liečby sa stala základným kameňom **prevencie ischemických príhod** u pacientov s kardiovaskulárnym (KVS) ochorením. Od uvedenia kyseliny acetylsalicylovej (ASA) do klinickej praxe bola jej účinnosť v primárnej a sekundárnej prevencii infarktu myokardu (IM), náhlej cievnej mozgovej príhody (NCMP) a KVS smrti klinicky overená miliónmi pacientov. Hoci ASA u pacientov s KVS ochorením s vysokým rizikom vo všeobecnosti znižuje výskyt závažnej artériovej trombotickej príhody o 25 %, zistilo sa, že u 10 – 20 % pacientov dôjde k rozvoju rekurentnej príhody napriek štandardnej prevencii (1). Viaceré klinické štúdie poukázali na **značnú interindividuálnu variabilitu doštičkovej odpovede** na duálnu antiagregačnú liečbu v kombinácii klopido-grel + ASA (2, 3).

Fakt, že niektorí pacienti z protidoštičkovej liečby neprofitujú, zvyšuje potrebu nájsť spôsob, ako ich identifikovať. Ideálny test by mal byť lacný, jednoduchý, presný, dobre reprodukovateľný a dobre štandardizovateľný, aby bolo možné efektivitu liečby monitorovať v rôznych laboratóriách. Hodnotením inhibície doštičkových funkcií počas užívania ASA (4, 5, 6, 7), tienopyridínov (8) alebo inhibítorov GPIIb/IIIa (9) sa zaoberali mnohé klinické štúdie, no ideálna laboratórna metóda monitorovania protidoštičkovej liečby nebola zatiaľ nájdená. Pri sledovaní terapeutickej

odpovede sa dokázala výrazná interindividuálna variabilita výsledkov, a to nielen u pacientov s KVS ochorením, ale aj u zdravých dobrovoľníkov.

Pre klinickú prax je zásadné, či laboratórne identifikovaná nedostatočná odpoveď alebo jej úplné chýbanie dokáže predpovedať rozvoj „klinickej“ rezistencie na protidoštičkovú liečbu spojenú so zvýšeným rizikom vzniku artériovej trombotickej príhody. Klinické štúdie u niektorých laboratórných metód skutočne preukázali, že nimi identifikovaná **zvýšená reziduálna doštičková reaktivita** (RRP) môže byť asociovaná s rizikom rekurencie aterosklerotických príhod (2).

Monitorovať alebo nie?

ASA a klopido-grel sú v súčasnosti široko používané **protidoštičkové lieky s relatívne bezpečným profilom a overenou účinnosťou**. Vznik trombotickej príhody napriek protidoštičkovej liečbe, či už v monoterapii alebo v kombinovanej liečbe, sa u pacientov so stabilným KVS ochorením, podobne ako aj u pacientov podstupujúcich intervenčný zákrok na koronárnych cievach, spája s „rezistenciou“ na protidoštičkovú liečbu (3). Príčinou však nemusí byť chýbanie farmakologického účinku na liečbu, definujúce rezistenciu. Patogenéza aterosklerózy je multifaktoriálna a rozvoj trombotickej príhody často reflektuje skôr zlyhanie liečby.

Predmetom diskusií odbornej verejnosti preto stále zostáva **skutočný cieľ monitorovania**

protidoštičkovej liečby. Je prínosnejšie identifikovať pacientov laboratórne rezistentných na protidoštičkový liek, alebo pacientov s vysokou reziduálnou RRP nezávislou od odpovede na protidoštičkovú liečbu, ktorí majú jednoznačne dokázané vyššie riziko aterosklerotického príhody? V súčasnosti existujú viaceré laboratórne metódy, ktoré sú schopné identifikovať pacientov, ktorí nedosiahnu plnú farmakologickú odpoveď na protidoštičkovú liečbu, a u ktorých by perspektívne bolo možné „rezistenciu“ preklenúť alternatívnou liečbou (10). Napriek tomu nie je známe, či by prístupy intenzívnejšej supresie doštičkových funkcií mohli byť aplikované v stavoch spojených so zvýšeným rizikom krvácania alebo iných špecifických stavoch (srdcové zlyhávanie, chronické zápalové ochorenia a i.) (3). Podľa metaanalýz klinických štúdií bola navyše za najčastejšiu príčinu „aspirínovej rezistencie“ označená non-compliance pacientov k protidoštičkovej liečbe, z čoho vyplýva otázka, či by nebolo výhodnejšie objektivizovať compliance pacienta k liečbe ako monitorovať inhibíciu farmakologického cieľa danej protidoštičkovej liečby (11). V súčasnosti sa monitorovanie protidoštičkovej liečby ako štandardná diagnostická stratégia u všetkých pacientov nastavených na túto liečbu neodporúča, a to z dôvodu, že dosiaľ nie je jasne preukázaná existencia skutočnej rezistencie na protidoštičkovú liečbu, spôsob jej merania a interpretácie. Výnimkou

zostáva skupina pacientov so syndrómom lepi-vých doštičiek (SPS), u ktorých sa po nastavení na liečbu ASA štandardne realizuje agregometrické vyšetrenie s cieľom hodnotenia poklesu hyperreaktivity krvných doštičiek (12).

Manažment laboratórne identifikovaného chýbania odpovede na protidoštičkovú liečbu

V súčasnosti neexistujú odporúčania definujúce algoritmus úpravy protidoštičkovej liečby v prípade laboratórne dokázaného chýbania odpovede na protidoštičkovú liečbu. Keďže nie je známa štandardná metóda monitorovania, nemožno s istotou potvrdiť, že je pacient voči liečbe rezistentný. Taktiež nevieme presne určiť, ktorá z foriem predpokladanej „rezistencie“ môže viesť ku klinickej trombotickej príhode. Môžeme iba predpokladať, že by pacienti so spoľahlivo potvrdenou rezistenciou štandardne akceptovaným testom mohli profitovať z alternatívnej alebo prídavnej protidoštičkovej liečby. Z farmakoterapeutických možností sa ponúka zvýšenie dávky ASA, pridanie tienopyridínu alebo zámena ASA za tienopyridín, prípadne novšie, účinnejšie antiagreganciá (napr. prasugrel) (13). Ani jednu z týchto možností však nemožno odporúčať do klinickej praxe, pokiaľ nebudú známe výsledky klinických štúdií hodnotiacich účinnosť a predovšetkým bezpečnosť týchto postupov v skupine pacientov s laboratórne definovanou rezistenciou na protidoštičkovú liečbu. V súčasnosti neexistuje dôkaz, že by táto skupina pacientov lepšie odpovedala na alternatívne liečebné režimy. Výnimkou je špecifická skupina pacientov s SPS, u ktorých pri kontrolnom vyšetrení agregácie po nastavení na liečbu pretrvávajú doštičková hyperagregabilita. V tejto špecifickú skupine je algoritmus eskalácie dávky ASA a zmeny protidoštičkovej liečby presne definovaný (12).

V súčasnosti sa teda ako jediné vhodné riešenie u všetkých skupín pacientov javí **vylúčiť non-compliance pacienta, pátrať po inej novej príčine zlyhania liečby** (súčasné užívanie interferujúcich liekov – NSAID pri liečbe ASA, liekov metabolizovaných cez hepatálny CYP450 pri liečbe klopidogrelom; hypercholesterolémia, nedostatočná kontrola glykémie u pacientov s DM, fajčenie a pod.) **a snažiť sa o jej odstránenie.**

Možnosti monitorovania protidoštičkovej liečby

Laboratórne metódy využívané na hodnotenie odpovede krvných doštičiek na pro-

tidoštičkovú liečbu sú **zamerané na sledovanie stupňa RRP**. Doštičková aktivita môže byť kvantifikovaná na základe hodnotenia tendencie k agregácii, imunofenotypovým vyšetrením expresie špecifických povrchových štruktúr alebo meraním koncentrácie markerov alebo metabolitov v plazme, v plnej krvi alebo v moči pacienta. Laboratórne metódy možno vo všeobecnosti rozdeliť na dve kategórie, podľa toho, či sa hodnotí aktivita krvných doštičiek *in vivo* alebo *ex vivo* (14). Význam rozdelenia spočíva v tom, že *in vivo* testy zohľadňujú komplexné pôsobenie faktorov v cievi a umožňujú lepšie posúdiť zvýšené riziko ischemickej príhody u jednotlivca (15), na rozdiel od *ex vivo* testov, ktoré aktivitu doštičiek hodnotia v arteficiálnom prostredí a častejšie podliehajú vplyvom nezávislým od doštičiek.

Testy hodnotiace *ex vivo* aktivitu krvných doštičiek

Svetelná transmisná agregometria (LTA)

Za historický zlatý štandard pre hodnotenie schopnosti krvných doštičiek odpovedať na protidoštičkovú liečbu je považovaná **svetelná transmisná agregometria LTA** (16). Princípom je meranie vzostupu transmisie svetla prechádzajúceho cez suspenziu krvných doštičiek v citrátovej plazme bohatej na krvné doštičky (PRP), ktoré po pridaní induktora vytvárajú agregáty (15). Zo získaných agregáčnych kriviek sa vyhodnocuje maximálna amplitúda vyjadrená v % rozdielu transmisie PRP-PPP, rýchlosť agregácie a strmosť agregáčnej krivky. Pre klinickú prax je pri hodnotení dôležité predovšetkým posúdenie, či je agregáčna odpoveď v norme, znížená alebo úplne chýba. Znížená agregáčna odpoveď po induktore svedčí pre zníženú doštičkovú agregabilitu (17) a potvrdzuje efektívnosť antiagregáčnej liečby, zatiaľ čo chýbanie jej poklesu svedčí pre pretrvávajúce RRP, ktorá je podľa výsledkov mnohých klinických štúdií spojená so zvýšeným rizikom ischemickej príhody. Ako induktor agregácie sa môže použiť adenosín difosfát (ADP), kolagén, trombín, adrenalín alebo kyselina arachidónová (AA), ktorá je najvhodnejšou pre hodnotenie liečby ASA. Ako substrát pre tvorbu TXA2 najlepšie odráža aktivitu COX-1 (18) a pri porovnávaní s inými vykazuje najnižšiu interindividuálnu variabilitu výsledkov (18). Na hodnotenie účinnosti klopidogrelu je možné ako induktor využiť ADP (19, 20).

Napriek tomu, že LTA spĺňa všeobecné kritériá pre hodnotenie farmakologickej rezistencie lieku, nemožno ju považovať za ideálnu metódu,

pretože je zaťažená pomerne veľkým množstvom preanalytických a analytických faktorov (tabuľka 1), ktoré môžu významne ovplyvniť výsledok. Agregáčna odpoveď je výrazne závislá od použitého induktora a jeho koncentrácie a je iba čiastočne a variabilne modulovaná množstvom TXA2 vytvoreného z AA (15) alebo ADP uvoľneného z doštičkových granúl. Viaceré štúdie tiež preukázali, že inhibičný účinok ASA na doštičkovú agregáciu po indukcii AA je nelineárny a môže odrážať uvoľnenie sekundárnych induktorov, ktoré pôsobia synergisticky s TXA2 (21), čo by mohlo vysvetľovať, že u pacientov so stabilnou ICHS (18) bola pozorovaná iba slabá korelácia medzi sérovým TXB2 a LTA po AA, hoci aktivácia krvných doštičiek AA *ex vivo* korelovala s bazálnou aktivitou *in vivo* (18). Výsledok získaný LTA ovplyvňuje aj typ použitého protizrážavého činidla. Krvné doštičky uskladnené v PPACK vykazovali signifikantne vyššiu agregabilitu ako krvné doštičky uskladnené v citráte (22). Pri sledovaní odpovede na ADP bolo pri použití citrátu zaznamenané signifikantné zvýšenie inhibície P2Y12, expresie P-selektínu a väzby PAC-1. Citrátom indukovaná chelácia Ca²⁺ vedie až k 20-násobnému poklesu iónov Ca²⁺ a môže tak významne nadhodnotiť inhibíciu krvných doštičiek (23). Mnoho autorov pri LTA kritizuje „nefyziologické podmienky“ *ex vivo* hodnotenia doštičkových funkcií. Tým, že je PRP zbavená ostatných krvných elementov, ktoré s krvnými doštičkami *in vivo* interagujú, LTA nemôže demonštrovať skutočnú schopnosť krvných doštičiek tvoriť agregáty a dostatočne reflektovať inhibičný účinok protidoštičkových liekov (2).

Point-of-care metódy (POC)

Vo viacerých veľkých epidemiologických štúdiách boli na hodnotenie protidoštičkovej liečby zvolené tzv. **point-of-care metódy**, analyzujúce doštičkové funkcie z plnej krvi (24, 25, 26). Tieto jednoduché a rýchle metódy testovania boli považované za vhodnejšie ako LTA predovšetkým pre schopnosť lepšie reflektovať aktivitu krvných doštičiek *in vivo*. Využitím plnej krvi totiž nedochádza k odstráneniu iných buniek (erytrocytov, monocytov a i.), ktoré sa môžu podieľať na ovplyvnení celkovej odpovede cirkulujúcich krvných doštičiek.

PFA-100 System patrí medzi globálne testy kvantitatívne hodnotiace procesy primárnej hemostázy v citrátovej plnej krvi. Princípom metódy je sledovanie tvorby doštičkového trombu v podmienkach arteficiálnej cievy v podobe biologickej aktívnej membrány s centrálnym otvorom pokrytým kolagénom a ADP (C-ADP) alebo

Tabuľka 1. Prehľad laboratórnych metód monitorovania odpovede na protidoštičkovú liečbu.

Názov metódy	Hodnotenie	Monitorovanie liečby			Výhody	Nevýhody
		ASA	Tienopyridíny	Inhibitory GPIIb/IIIa		
Svetelná agregometria (LTA)	<i>ex vivo</i> agregácia po pridaní induktora	+	+	+	Historický zlatý štandard Najviac skúseností	↑ objem vzoriek ↑ časová náročnosť ↓ reprodukovateľnosť Špecializované laboratórium Úprava podľa počtu trombocytov Chýbanie štandardizácie Agregačná odpoveď je závislá od: – typu induktora a jeho koncentrácie – protizrážavého činidla
PFA-100	<i>ex vivo</i> globálny test primárnej hemostázy	+	–	–	↓ objem vzorky Z plnej krvi Rýchla	↓ špecifita Silná závislosť od iných faktorov: – koncentrácie vWF – hematokritu – počtu trombocytov
Verify Now System	<i>ex vivo</i> adhézia a agregácia	+	+	+	↓ objem vzorky Z plnej krvi Jednoduchá Rýchla	Závislosť od – hematokritu – počtu trombocytov
Multiplate IPA	<i>ex vivo</i> agregácia po pridaní induktora	+	+	+	Z plnej krvi ↓ preanalytických chýb Rýchlejšia ako LTA	↑ objem vzoriek ↑ časová náročnosť ↓ reprodukovateľnosť
FC analýza P-selektínu, expresie GPIIb/IIIa	<i>in vivo</i> expresia povrchových štruktúr	+	+	+	Z plnej krvi ↓ objem vzorky	Náročné spracovanie Špecializované laboratórium Finančne náročná
VASP	<i>in vivo</i> fosforylačný status VASP	–	+	–	↑ špecifita pre tienopyridíny ↓ objem vzorky Z plnej krvi	Náročné spracovanie Špecializované laboratórium Finančne náročná Nejasný vplyv komorbitnej liečby
TXB2 v sére	<i>in vivo</i> metabolit v sére	+	–	–	↑ špecifita pre ASA	Riziko falošnej pozitivity pri <i>ex vivo</i> aktivácii trombocytov počas odberu a spracovania vzoriek
11-dhTXB2 v moči	<i>in vivo</i> metabolit v moči	+	–	–	↑ špecifita pre ASA	Nepriame meranie ↓ špecifita pre doštičkovú syntézu TXA2 Závislosť od renálnych funkcií

Vysvetlivky: AA – kyselina arachidónová; ADP – adenosín difosfát; ASA – kyselina acetylsalicylová; FC analýza – analýza prietokovou cytometriou; TRAP – aktivátor trombových receptora; TXA2 – tromboxán A2; TXB2 – tromboxán B2; 11-dh-TXB2 – 11-dehydrotromboxán B2, + metodu je možné použiť na hodnotenie; – metódika nie je vhodná na hodnotenie.

kolagénom a adrenalínom (C-EPI). S tvorbou trombu sa postupne uzatvára otvor imitujúci poranenie cievy, čím klesá prietok. Čas, ktorý ubehne, kým sa prietok úplne zastaví, je zaznamenávaný ako tzv. *closure time* (Ct). Pri sledovaní antiagregačnej liečby má význam predĺženie Ct v dôsledku terapeutického účinku (17).

PFA-100 je často prirovnávaný k meraniu „času krvácania *in vitro*“, a podobne ako on závisí od mnohých faktorov, ako je počet trombocytov a erytrocytov, koncentrácia von Willebrandovho faktora (vWF) v plazme (u pacientov s KVS alebo cerebrovaskulárnym ochorením pomerne častá) a pod., na ktoré protidoštičkové lieky nemajú vplyv (15). V klinických štúdiách bolo identifikované pomerne vysoké percento pacientov, u ktorých bol zistený skráteneý Ct napriek užívaniu ASA (18), ako určujúci faktor bola potvrdená interakcia vWF s GPIIb a GPIIb/IIIa, zatiaľ čo ostatné doštičkové receptory a mechanizmy vedúce

k agregácii krvných doštičiek nedosahovali väčší význam (15). Vzhľadom na to, nemožno PFA-100 považovať za adekvátnu metódu na posudzovanie účinku ASA alebo tienopyridínov na krvné doštičky (15). Klinické štúdie, v ktorých bolo sledované rovnaké zníženie produkcie TXB2 (svedčiace pre dostatočný inhibičný účinok ASA) u pacientov so skráteneým Ct („rezistentných na ASA“) ako u pacientov s predĺženeým Ct, tento záver iba potvrdzujú (27).

The Ultegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA – Verify Now assay system) je turbidimetrická optická metóda, pomocou ktorej je tiež možné hodnotiť agregáciu krvných doštičiek na základe merania aglutinácie guľčiek potiahnutých vrstvou fibrinogénu a krvných doštičiek po stimulácii induktorom v citrátovej plnej krvi. Prvotne bola vyvinutá na hodnotenie účinnosti inhibítorov GPIIb/IIIa, neskôr bola modifikovaná na hodnotenie citlivosti najviac

používaných protidoštičkových liekov v podobe RPFA-Verify Now ASA pre monitorovanie ASA a RPFA-Verify Now P2Y12 pre monitorovanie tienopyridínov (22). RPFA-Verify Now P2Y12 preukazuje pri monitorovaní liečby klopidogrelom vyššiu špecifitu v porovnaní s LTA po ADP (19). Pacienti, ktorí boli touto metódou identifikovaní ako „rezistentní“ voči účinku ASA, preukázali signifikantne vyššie riziko myonekrózy pri akútnej koronárnej intervencii, a to aj pri náležitej kombinácii s klopidogrelom (20).

Multiplate IPA – agregácia trombocytov v plnej krvi

Multiplate IPA predstavuje metódu využívajúcu princípy impedančnej agregometrie, ktorá umožňuje merať agregáciu krvných doštičiek v plnej krvi, čím zachováva čo najprirodzenejšie prostredie krvných doštičiek (28). Analyzátor pozostáva z piatich kanálov na súčasné stanovenie

vzoriek a testovacích komôrok s dvomi nezávislými senzormi. Princíp metodiky spočíva v tom, že po adhézii a agregácii krvných doštičiek na povrch senzora po pridaní induktora dochádza ku zvýšeniu impedancie medzi elektródami senzora, ktoré sa transformuje do agregačných jednotiek (AU) (1 ohm = 8 AU). Inhibičný účinok ASA je možné hodnotiť po pridaní AA ako induktora, odpoveď na klopidogrel pri použití ADP a odpoveď na inhibitory GPIIb/IIIa po pridaní TRAP-6. V klinických štúdiách bola Multiplate IPA schopná detekovať získanú poruchu hemostázy po CABG a pred kardiochirurgickým zákrokom a po ňom identifikovať pacientov so zvýšeným rizikom krvácania (28). Pri porovnaní s LTA boli pozorované signifikantné korelácie medzi výsledkami agregácie odpovede krvných doštičiek po ADP, AA a kolagéne. Signifikantné korelácie boli pozorované aj pri porovnaní agregácie odpovede po ADP s PFA-100 G-ADP Ct, po AA s PFA-100 G-EPI Ct, a po kolagéne s PFA-100 G-EPI Ct. Pri porovnávaní metodík bola miera nepresnosti detekcie RRP pri Multiplate IPA podobná s LTA (24). Multiplate IPA má v porovnaní s LTA viacero výhod (tabuľka 1).

Testy hodnotiace *in vivo* aktivitu krvných doštičiek

Prietoková cytometria (FC analýza)

Funkcie trombocytov v podobe konformačných zmien membránových glykoproteínov, adhézie, degranulácie a agregácie je možné monitorovať **prietokovým cytometrom**. FC analýza umožňuje hodnotiť doštičkovú aktiváciu *in vivo* (stav aktivácie pri odbere), ako aj *in vitro* (schopnosť aktivácie po pridaní induktora). Na dôkaz aktivácie doštičiek využíva detekciu expresie membránových štruktúr, ktorá je od aktivácie závislá: aktívovaného komplexu GPIIb/IIIa, P-selektínu (CD62P), GP53 (CD63), zvýšenej expresie GPIV (CD36) alebo zníženej expresie komplexu Ib/IX/V (CD42). Kvantitatívne sa intenzita expresie jednotlivých markerov stanovuje v absolútnych arbitrážnych jednotkách ABC (*antibody binding capacity*) alebo MESF (*molecules equivalent soluble fluorochrome*) (29). Po svetelnej agregometrii je FC analýza druhou najčastejšie využívanou metódou.

Vasodilatator Stimulated Phosphoprotein (VASP)

VASP je intracelulárny doštičkový proteín, ktorého fosforylácia koreluje s inhibíciou receptora P2Y₁₂ a tak umožňuje *ex vivo* monitorovanie účinku antagonistov ADP receptora. V krvných doštičkách je receptor P2Y₁₂ spojený s Gi-proteínom,

ktorý po aktivácii sprostredkúva inhibíciu adenylylcyklázy. Následne dochádza k poklesu aktivity cAMP-dependentnej proteinkinázy, čo vedie k poklesu fosforylácie substrátov vrátane VASP. Spočiatku sa na stanovenie fosforylačného statusu využívala metóda Western blot, v súčasnosti je nielen pre jednoduchšie a presnejšie stanovenie z plnej krvi preferovaná FC analýza využívajúca fosfo-špecifické protilátky namierené proti fosforylovanému VASP. Osvedčila sa aj v klinických štúdiách, v ktorých sa táto metóda použila na monitorovanie individuálnej odpovede na klopidogrel u pacientov podstupujúcich implantáciu stentu (3). Viaceré štúdie preukázali, že fosforylácia VASP nie je ovplyvnená ASA, umožňuje preto posúdiť inhibíciu receptora P2Y₁₂, s vyššou špecifitou aj pri kombinovanej liečbe ako LTA (3). Obmedzením tejto metodiky je zatiaľ nedostatočne preskúmaný vplyv konkomitantnej liečby a/alebo prítomnosti pre-aktivovaných krvných doštičiek pri niektorých komplexných klinických stavoch. Lieky, ktoré zasahujú do metabolických dráh sprostredkovaných NO/cGMP alebo cAMP, by potenciálne mohli ovplyvniť výsledky. Zodpovedanie otázky, do akej miery menia fosforyláciu VASP, je predmetom súčasne prebiehajúcich klinických štúdií. Perspektívne klinické využitie metódy P-VASP pri hodnotení účinku tienopyridínov na krvné doštičky sa zdá byť veľmi sľubným, najmä pre vyššiu špecifitu, možnosť kvantitatívneho a spoľahlivejšieho stanovenia ako pri predchádzajúcich metódach (3).

Stanovenie solubilného P-selektínu v plazme

P-selektín predstavuje adhezívny proteín, ktorý sa počas aktivácie a degranulácie trombocytov exprimuje a transportuje do ich plazmatickej membrány (14). Okrem zvýšenej expresie na povrchu doštičiek, možno P-selektín stanoviť aj v plazme pomocou ELISA metódy. Zvýšené plazmatické koncentrácie P-selektínu svedčia pre zvýšenú aktivitu krvných doštičiek (14, 15). P-selektín je stabilný a dobre koreluje s výskytom klinických príhod, preto bol opakovane použitý vo veľkých epidemiologických štúdiách (30).

Stanovenie TXB₂ v sére

TXB₂ je stabilným metabolitom, ktorý vzniká neenzymatickou hydrolyzou TXA₂, hlavného miesta zásahu ASA. Vzhľadom na to, že ASAnecitlivým mechanizmom (cez COX-2 v polymorfonukleárných leukocytoch alebo mladých formách krvných doštičiek, a i.) sa tvorí relatívne malé a nevýznamné množstvo TXA₂, hodnota sérového TXB₂ by mala odrážať maximálnu kapacitu aktivovaných krvných doštičiek synteti-

zovať TXA₂, vďaka tomu má najvyššiu špecifitu pre meranie farmakologického účinku ASA, čo potvrdili aj výsledky klinických štúdií (16, 30). Je však potrebné podotknúť, že si vyžaduje dôsledne preanalytické spracovanie vzoriek, ktoré by zabránilo falošne pozitívnym výsledkom v dôsledku neúmyselnej *ex vivo* aktivácie krvných doštičiek počas odboru a spracovania vzoriek (18).

Stanovenie 11-dehydroTXB₂ (11-dh-TXB₂) v moči

11-dh-TXB₂ predstavuje jeden z koncových metabolitov TXB₂, ktorý je vylučovaný do moča. Na rozdiel od TXA₂ je stabilnou molekulou s relatívne dlhým biologickým polčasom (45 min). Hoci reflektuje celkovú syntézu TXA₂ *in vivo* (vrátane mimodoštičkových zdrojov) a teoreticky má nižšiu špecifitu, práve táto metodika dobre koreluje s klinickým výstupom. Štúdia HOPE sledujúca 970 pacientov užívajúcich ASA počas piatich rokov potvrdila, že pacienti s hodnotami 11-dh-TXB₂ v najvyššom kvartile majú signifikantne vyššie riziko vzniku IM, NCMP alebo KVS smrti oproti pacientom v najnižšom kvartile hodnôt (3). V štúdiu CHARISMA bolo pozorované, že vyšší vek, ženské pohlavie, anamnéza ICHDK, fajčenie, užívanie PAD alebo ACE inhibítora pôsobia ako faktory zvyšujúce hladinu metabolitu v moči, pričom sú navzájom nezávislé, zatiaľ čo užívanie ASA v dávke \geq 150 mg denne, NSAID a liečba statínmi sú spojené s poklesom metabolitu v moči. Zvýšená koncentrácia 11-dh-TXB₂ bola u pacientov liečených ASA označená za potenciálne modifikovateľný rizikový faktor pre rozvoj NCMP, IM alebo smrti z KVS príčin (30). Pri porovnaní 11-dh-TXB₂ s LTA po AA a po ADP, s *Verify Now Assay System* bol pri liečbe ASA pozorovaný signifikantný pokles pri všetkých metódach, výsledky však vzájomne nekorelovali, čo potvrdzuje variabilitu a svedčí pre odlišné faktory uplatňujúce sa u týchto metodík.

Záver

Fakt, že niektorí pacienti nedostatočne odpovedajú na farmakologické účinky ASA, klopidogrelu alebo inej protidoštičkovej liečby, zvyšuje potrebu laboratórneho monitorovania tejto liečby. Ani jedna zo spomínaných laboratórnych metód schopných preukázať RRP nie je dostatočne špecifická, ani senzitivná na kvantitatívne posúdenie odpovede doštičiek na protidoštičkovú liečbu. Hoci boli pri niektorých laboratórnych testoch zaznamenané sľubné výsledky, je nutné ich zatiaľ považovať za predbežné. Je potrebné vynaložiť ďalšie úsilie na ich

štandardizáciu a prostredníctvom prospektívnych štúdií so súčasnou kvantifikáciou markerov zápalu a oxidačného stresu, KVS rizikových faktorov a sledovaním výskytu trombotických príhod, dôsledne vyhodnotiť vzájomné prepojenie laboratórne a klinicky definovanej rezistencie na protidoštičkovú liečbu. Zároveň je žiaduce zodpovedať otázku, či protidoštičkovú liečbu monitorovať iba u vysoko rizikových pacientov, u ktorých došlo k rozvoju rekurentnej ischemickej príhody napriek prevencii alebo u všetkých pacientov nastavených na liečbu. Ideálne by bolo nájsť metódu s minimálnou intra- a interindividuálnou variabilitou, ktorá by bola schopná spoľahlivo identifikovať „skutočnú“ rezistenciu na protidoštičkovú liečbu, a to nielen vo výskumnej, ale aj klinickej praxi. Či bude táto metóda v klinickej praxi naozaj rutinne využívaná alebo nie, závisí predovšetkým od možnosti ďalšieho terapeutického ovplyvnenia zistenej rezistencie. Je preto potrebné čo najskôr objasniť presný mechanizmus rezistencie na protidoštičkovú liečbu a nájsť najefektívnejšiu liečebnú modalitu.

Článok vznikol v rámci projektu ESF ITMS 26110230031.

Literatúra

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analyses of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71–86.
2. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R et al. Monitoring of Clopidogrel Action: Comparison of Methods. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 957–965.
3. Gasparyan AY. Aspirin and clopidogrel resistance: methodological challenges and opportunities. *Vascular Health and Risk Management* 2010; 6: 109–112.
4. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, et al. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infar-

tion, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650–1655.

5. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 961–965.
6. Chen WH, Lee PY, Ng W, et al. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1122–1126.
7. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, et al. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol* 2003; 250: 63–66.
8. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171–3175.
9. Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, et al. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AUAssessing Ultegra) multicenter study. *Circulation* 2001; 103: 2572–2578.
10. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. TRITON-TIMI 38 Investigators. Intensive oral antiplatelet therapy for reduction of ischaemic events including stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention and stenting in the TRITON-TIMI 38 trial: a subanalysis of a randomised trial. *Lancet* 2008; 371: 1353–1363.
11. Michelson AD. Platelet Function Testing in Cardiovascular Diseases. *Circulation* 2004; 110: 489–493.
12. Bartošová L, Dobrotová M, Holly P et al. Syndróm lepiacich doštičiek – jeho diagnostika a liečba. *Lek Obz* 2008; 7–8: 512–513.
13. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345: 494–502.
14. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 2001; 22: 1561–1571.
15. Cattaneo M. Aspirin and Clopidogrel: Efficacy, Safety, and the Issue of Drug Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980–1987.
16. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients with high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650–1655.
17. Penka M., Buliková A a spol. Neonkologická hematologie. 2. vydanie, Grada 2009: 201–203.
18. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable Platelet Response to Aspirin and Clopidogrel in Atherothrombotic Disease. *Circulation* 2007; 115: 2196–2207.

19. Gurbel P, Bliden K, Hiatt B, O'Connor C. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908–2913.

20. Muller I, Besta F, Schulz C et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783–787.
21. Frelinger AL, Furman MI, Linden MD et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate dependent but cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 independent pathway: a 700 patients study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113: 2888–2896.
22. Papanthasiou A, Goudevenos J, Tselepis AD. Resistance to Aspirin and Clopidogrel: Possible Mechanisms, Laboratory Investigations, and Clinical Significance. *Hellenic J Cardiol* 2007; 48: 352–363.
23. Patel P, Gonzales R, Dokainish H et al. Impact of adenosine diphosphate and calcium chelation on platelet aggregation testing in patient receiving clopidogrel therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 464–465.
24. Harrison P, Frelinger AL, Furman MI, et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 2007; 120: 323–336.
25. Harrison P, Segal H, Blasbery K, et al. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke* 2005; 36: 1001–1005.
26. Harrison P, Segal H, Silver L, et al. Lack of reproducibility of assessment of aspirin responsiveness by optical aggregometry and two platelet function tests. *Platelets* 2008; 19: 119–124.
27. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F. In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol* 2004; 124: 80–85.
28. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N et al. Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 834–842.
29. Marínov I. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2. vydanie, Triton, Praha 2008: 111–114.
30. Cataneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 230–237.

MUDr. Daniela Kotuličová

Klinika hematologie a transfuziologie
Jesseniovej lekárskej fakulty UK a UN
Martin

Kollárova 2, 036 59 Martin
kotulicova@jfm.uniba.sk



Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s.
Pracovná skupina periférnej cirkulácie
Slovenskej kardiologickej spoločnosti
Slovenská angiologická spoločnosť



IV. angiologický deň

Národného ústavu srdcových
a cievnych chorôb, a.s.

27. máj 2011

NÚSCH, a.s., Pod Krásnou hôrkou 1, Bratislava

Organizátori a kontakty:

MUDr. Juraj Maďarič, PhD. (jurmad@hotmail.com; 02/59320489)

MUDr. Augustín Mistrík (mistrík@nusch.sk; 02/59320632)