

Monitorovanie duálnej protidoštičkovej liečby metódou fosforylácie VASP

MUDr. Marián Fedor¹, MUDr. Matej Samoš², doc. MUDr. Ján Staško, mim. prof.¹,
MUDr. František Kovář, PhD.², MUDr. Lucia Stančiaková¹, prof. MUDr. Marián Mokáč, DrSc., FRCP Edin.²,
prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.¹

¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a UNM, Martin

²1. interná klinika JLF UK a UNM, Martin

Duálna protidoštičková liečba (DPL) klopidogrelom a kyselinou acetylsalicylovou predstavuje štandardný režim v prevencii tromboembolických príhod u pacientov s ischemickou chorobou srdca, ktorí podstúpili perkutánnu koronárnu intervenciu (PKI). Jedným z najväčších úskalí je rozsiahla variabilita v odpovedi na liečbu klopidogrelom medzi jednotlivými pacientmi. Veľké množstvo pacientov nie je schopných primerane reagovať, a preto nie sú „chránení“ pred závažnými nežiaducimi kardiovaskulárnymi príhodami aj napriek podávaniu DPL. Práve táto skupina je vystavená trojnásobne vyššiemu riziku infarktu myokardu, trombózy stentu a srdcovej smrti. Z uvedených dôvodov vznikla nutnosť vykonávania spoľahlivého laboratórneho testu s cieľom detekcie ohrozených jedincov. V ideálnom prípade môže takýto test slúžiť k úprave dávky a vedeniu individuálnej liečby šitej na mieru pacienta.

Kľúčové slová: protidoštičková liečba, VASP, akútny koronárny syndróm, prietoková cytometria.

Monitoring of dual antiplatelet therapy by VASP phosphorylation method

Dual antiplatelet therapy (DAPT) with clopidogrel and acetylsalicylic acid represents cornerstone in the prevention of thromboembolic events in patients with coronary artery disease who undergo percutaneous coronary intervention (PCI). One of the major pitfalls appears in wide interindividual variability in response to clopidogrel. A large number of patients do not respond adequately, and therefore are not „protected“ against major adverse cardiovascular events in spite of receiving DAPT. Non-responders are exposed to three-fold higher risk of myocardial infarction, stent thrombosis and cardiac death. The aforementioned reasons raise the necessity for implementation of reliable laboratory test in order to detect vulnerable individuals. Ideally, such test may serve in management of treatment specifically tailored to individual patients.

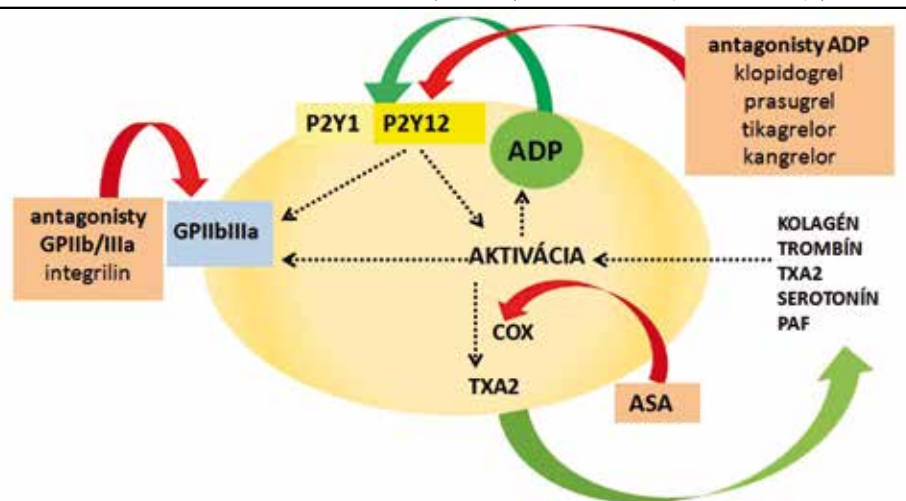
Key words: antiplatelet treatment, VASP, acute coronary syndrome, flow cytometry.

Vask. med., 2015, 7(1): 15–17

Úvod

DPL predstavuje v súčasnosti štandard v prevencii tromboembólie u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom (AKS) po PKI, ale aj pacientov so stabilným ochorením koronárných tepien, pacientov po cievnej mozgovej príhode a periférnom artériovom ochorení dolných končatín. Podľa súčasných odporúčení (1, 2) je u pacientov so STEMI (infarkt myokardu s eleváciou segmentov ST) a non-STEMI indikovaná duálna liečba prasugrelom a aspirínom. Odporúčanú alternatívu predstavuje kombinácia klopidogrelu a aspirínu. V klinickej praxi je klopidogrel používaný naďalej vo veľkej miere, najmä pre jeho širokú dostupnosť. Navyše, v určitých skupinách pacientov je klopidogrel stále efektívnejší oproti prasugrelu (vek nad 75 rokov, renálna insuficiencia s klírensom kreatinínu pod 60 ml/min, pacienti s rizikom alebo anamnézou intrakraniálneho krvácania). Nevýhodou klopidogrelu je vysoká variabilita jednotlivcov v odpovedi na liečbu, pričom výskyt nedostatočnej odpovede sa vyskytuje u 15 až 40 % pacientov. Navyše, 10 % pacientov je postihnutých opakovanými ischemickými

Obrázok 1. Znáznornenie kaskád aktivácie krvnej doštičky a miest ich terapeutického ovplyvnenia.



Použitie skratky: ADP – adenosín difosfát, ASA – kyselina acetylsalicylová, COX – cyklooxygenáza, GP IIb/IIIa – glykoproteínové receptory IIb/IIIa, TXA2 – tromboxan A2

udalostami aj napriek liečbe (3). Títo pacienti nie sú „chránení“ pred závažnými nežiaducimi kardiovaskulárnymi účinkami, ako sú infarkt myokardu, trombóza stentu po PKI a srdcová smrť. Pri suboptimálnej odpovedi na klopidogrel nie je navodená dostatočná inhibícia doštičiek, čo vedie až k 3-násobnému zvýšeniu rizika trom-

boembolických udalostí (4). V odporúčaníach pre vedenie DPL prevláda prístup „jedna dávka pre všetkých“. V klinických štúdiách sa však preukázal prínos monitorovania liečby s cieľnou úpravou dávky. Vďaka liečbe šitej na mieru došlo v sledovanej skupine pacientov k redukcii výskytu ischemických udalostí (5 – 7).

ADP receptory a ich význam pri aktivácii doštičiek

Účinok adenozín difosfátu (ADP) pri stimulácii doštičiek je sprostredkovaný interakciou medzi ADP a povrchovými receptormi trombocytov P2Y1 a P2Y12. Rozhodujúci vplyv v procese aktivácie krvných doštičiek má receptor P2Y12. Jeho aktivácia je nevyhnutná pre navodenie úplnej agregáčnej odpovede doštičky pri stimulácii ADP, ale aj inými induktormi ako trombín, tromboxan A2 (TXA2), kolagén (obrázok 1). Receptor P2Y12 zohráva kľúčovú úlohu aj v stimulácii vylučovania doštičkových granúl a aktivácie GPIIb/IIIa. Prítomnosť P2Y12 je výlučne obmedzená na krvné doštičky, endotel a bunky hladkej svaloviny. Táto skutočnosť spolu s jeho významom robí z receptora P2Y12 atraktívny farmakologický cieľ pre prevenciu tromboembólie.

Klopidogrel, tienopyridínové deriváty

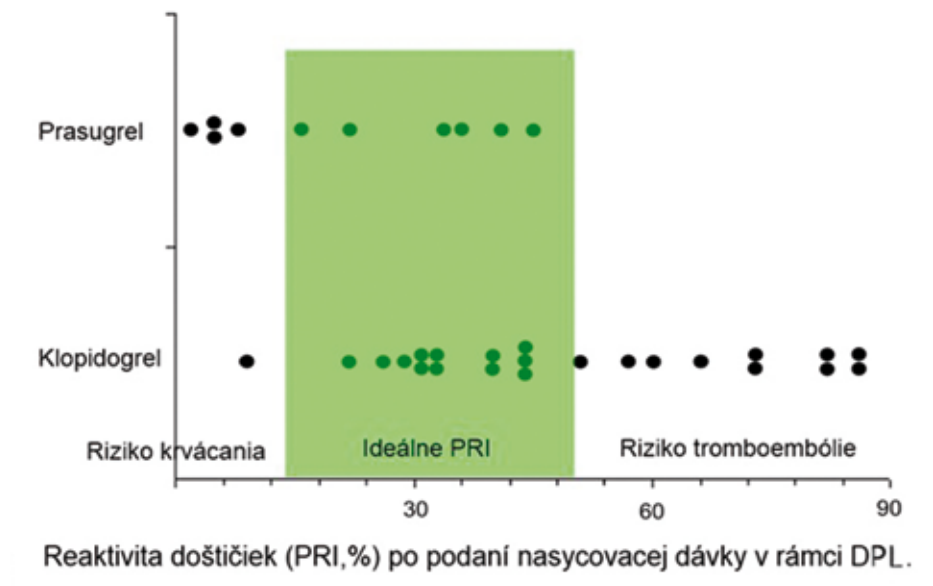
Mechanizmus účinku tienopyridínov, ako sú tiklopidín a klopidogrel, je založený na väzbe na doštičkový receptor pre ADP. Tienopyridínové zlúčeniny sú prekurzory liečiv a na dosiahnutie terapeutického účinku je potrebná ich metabolická aktivácia v pečeni (CYP450). Klopidogrel ako zástupca 2. generácie tienopyridínov nahradil tiklopidín vďaka lepšiemu profilu bezpečnosti a znášanlivosti. Po absorpcii je 85 % proliečiva štiepených plazmatickými esterázami, pričom iba 15 % dosahuje pečeň, kde podlieha transformácii na aktívny metabolit. Premena zahŕňa dvojestupňový proces regulovaný izoformami cytochrómu P450. Aktívny metabolit sa potom ireverzibilne viaže na receptor P2Y12, čím bráni väzbe ADP a následnej aktivácii doštičiek.

Prasugrel, ADP-antagonista 3. generácie, navodzuje silnejšiu inhibíciu doštičiek a jeho metabolizmus v pečeni zahŕňa na rozdiel od klopidogrelu len jeden krok. Nižšia odpoveď na prasugrel sa v klinickej praxi takmer nevyskytuje, naopak rizikový je vyšší výskyt krvávacích prejavov (8). Zástupcovia najnovšej generácie tienopyridínov, kangrelor, tikagrelor a elinogrel, pôsobia ako priame inhibítory, čiže nevyžadujú metabolickú aktiváciu. Účinok tikagreloru je navyše reverzibilný, čo umožňuje v prípade potreby (operačný zákrok, krvácanie) rýchlejšie obnovenie agregácie doštičiek.

Príčiny nedostatočnej odpovede na DPL

Genetická podstata rezistencie predstavuje komplexnú a zároveň kontroverznú tému. Vplyv polymorfizmov CYP na účinok liečiva bol potvrdený, avšak nebol dokázaný vplyv na sledované klinické výstupy. Riadenie liečby podľa genetických charakteristík zatiaľ v realizovaných štúdiách nepreukázalo očakávaný efekt na zní-

Obrázok 2. Pacienti s AKS (STEMI) po PCI liečení duálnou protidoštičkovou liečbou (DPL) na 1. internej klinike JLF UNM. Pacientom boli podané antagonisy ADP v dávkach: Klopidogrel 600 mg nasycovacia dávka (ND), s následnou udržiavacou dávkou (UD) 75 mg denne, respektíve Prasugrel 60 mg ND, s následnou UD 10 mg denne. Reaktivita doštičiek (PRI) bola meraná pomocou metodiky VASP (16)



ženie nežiaducich účinkov. Úlohu v rezistencii môžu zohrávať tiež polymorfizmy samotných doštičkových receptorov, avšak táto teória je momentálne neprebádaná.

Klinické príčiny. Diskutovanou témou sú interakcie klopidogrelu s niektorými liečivami, ako napríklad inhibítory protónovej pumpy (konkrétne omeprazol), statíny (atorvastatín), benzodiazepíny a blokátory kalciového kanála. Medzi klinické príčiny nedostatočnej odpovede na klopidogrel patrí tiež renálna insuficiencia pri diabetes mellitus, vysoký vek a BMI. Interakcia klopidogrelu a omeprazolu bola sledovaná v rozsiahlej štúdií COGENT, v ktorej bol sledovaný výskyt krvácania z gastrointestinálneho traktu (GIT) a ischemických príhod v skupine 3 873 pacientov. Pacienti boli rovnomerne rozdelení na skupinu liečenú klopidogrelom, aspirínom a placebom a skupinu liečenú klopidogrelom, aspirínom a omeprazolom. V skupine pacientov liečených súčasne DPL a omeprazolom bol zaznamenaný významne nižší výskyt krvácania do GITu (1,1 % verus 2,9 %, $p < 0,001$) a dokonca aj nižší (aj keď nie štatisticky významne) počet ischemických príhod (4,9 % verus 5,7 %, $p = 0,96$). Napriek tomu autori vplyv interakcie jednoznačne nevylúčili (9). V praxi je pomerne častým postupom nahradenie omeprazolu pantoprazolom. Ďalšou dôležitou príčinou je nedostatočná spolupráca pacientov, ktorá sa podľa odhadov podieľa až na 20 % prípadov nedostatočnej liečby. Naopak, zvýšená odpoveď bola zaznamenaná u fajčiarov, pravdepodobne cestou stimulácie aktivity CYP1A2 (10).

Súčasná možnosť monitorovania protidoštičkovej liečby

Svetelná agregometria (light transmission aggregometry, LTA) predstavuje už od roku 1969 „zlatý štandard“ v testovaní funkcie krvných doštičiek. Princíp metódy spočíva v meraní priepustnosti svetla v pripravenej doštičkovej suspenzii. LTA meria zvýšenie priepustnosti svetla, ktoré nastane, keď sa krvné doštičky začnú zhluokovať po stimulácii pridanými agonistami (ADP, kolagén, epinefrín, kyselina arachidonová). Pomocou LTA bola zachytená nedostatočná odpoveď u 4 % až 30 % pacientov liečených klopidogrelom. Tiež bola dokázaná korelácia nedostatočnej odpovede meranej LTA so zvýšeným rizikom nežiaducich kardiovaskulárnych príhod (11). Hoci je LTA bežne používanou metódou na testovanie funkcie krvných doštičiek, nie je zameraná primárne na P2Y12 kaskádu; vyžaduje značné veľké množstvo krvi, pričom odobratá vzorka musí byť spracovaná v laboratóriu najneskôr do dvoch hodín! Okrem stanovenia odpovede na antiagregačnú liečbu má LTA význam v diagnostike trombofilných stavov (napríklad syndrómu lepivých doštičiek), a tiež krvávacích ochorení (von Willebrandova choroba, afibrinogenémia).

Testy pri lôžku chorého (angl. point-of-care, bed-side tests) sú realizované v blízkosti pacienta (napríklad jednotky intenzívnej starostlivosti). Výhody spočívajú v ich dostupnosti, rýchlosti a efektívite práce, a tiež nízkych nákladoch. Na druhej strane, ich citlivosť, špecifita a prediktívna hodnota je diskutabilná v porovnaní so štandardnými laboratórnymi metódami. Napríklad systém

VerifyNow patriaci medzi najrozšírenejšie „testy pri lôžku“ má podľa klinických štúdií pri predikcii klinických výstupov senzitivitu 81 % a špecificitu 53 %. Okrem VerifyNow do tejto skupiny patria aj testy PFA100/200 a multielektrodová agregometria (MEA). Základnou dilemou pri rozhodovaní medzi bed-side a laboratórnym testom je rozhodovanie medzi rýchlosťou a presnosťou.

Metóda vyšetovania fosforylácie VASP-P. Princíp metódy je založený na detekcii doštičkového fosfoproteínu VASP (vazodilatátorom stimulovaný fosfoproteín), ktorý je súčasťou signálnej dráhy pri aktivácii receptora P2Y₁₂. Pri inhibícii P2Y₁₂ je VASP prítomný vo fosforylovanom stave (VASP-P). Tento stav poukazuje na navodenie inhibície doštičky, ktoré je cieľom úspešnej DPL. Vyšetovaným materiálom je vzorka venóznej krvi pacienta odobratá do skúmavky s citrátom. Následne je jedna časť vzorky inkubovaná s PGE₁ (prostaglandín E₁) a druhá v skúmavke s PGE₁ a ADP. Význam PGE₁ spočíva v prevencii aktivácie doštičiek ADP-nezávislými kaskádami, ktoré by mohli skresliť výsledok vyšetrenia. Po premytí permeabilizačným roztokom je VASP-P označený monoklonovou protilátkou (fluoresceín izotiokyanát, 16C2, FITC). Analýza dvojfarebnou prietokovou cytometriou potom umožní porovnanie vzoriek (PGE₁ verus PGE₁ + ADP). V nasledujúcom kroku je vypočítaný kľúčový parameter, podľa ktorého riadi liečbu ošetrojúci lekár – index reaktivity doštičiek (**platelet reactivity index, PRI**). PRI je vypočítaný na základe rozdielu fluorescenčných intenzít medzi vzorkou s PGE₁ (doštičky v pokoji) a PGE₁ + ADP (aktívované doštičky). PRI *de facto* predstavuje pomer odpočívajúcich/aktívovaných doštičiek. Výsledná hodnota je vyjadrená v percentách reaktivity doštičiek na ADP. Pri sledovaní pacientov liečených klopido-grelom po obdobie viac ako 7 dní dokázali Aleil et al. (10) výraznú variabilitu PRI v rozsahu od 6,6 – 85,8 %. Hodnoty PRI nad 50 % predstavujú nedostatočnú odpoveď (inhibíciu) doštičiek na protidoštičkovú liečbu a u pacientov po PKI boli spojené so zvýšeným rizikom infarktu, trombózy stentu a srdcovej smrti. Takéto hodnoty boli namerané až u 30 % liečených pacientov. Vysoká reaktivita doštičiek (high platelet on-treatment reactivity, HPTR) na liečbe klopido-grelom bola tiež spojená so zvýšeným výskytom myonekrózy pri PKI (4). Efektivitu liečby klopido-grelom šitej na mieru na základe výsledkov VASP-P indexu prvýkrát sledovali Bonello et al. (7). Štúdia porovnávala dve kontrolné skupiny s demograficky podobným zložením. Pacientom s nedostatočnou odpoveďou podľa VASP-P (nad 50 %) bola upravená dávka klopido-grelu. Autori zaznamenali štatisticky vý-

znamný pokles **nežiaducich kardiovaskulárnych príhod** 0 % verus 10 % ($p = 0,007$) pri štatisticky nevýznamnom náraste krvácajúcich komplikácií 5 % verus 4 % ($p = 1$). Na druhej strane, 8 % pacientov nereagovalo ani na zvýšenú dávku klopido-grelu. Štúdia načrtla predpoklad, že zvýšením dávky klopido-grelu alebo prechodom na prasugrel, ktorý navodzuje silnejšiu inhibíciu doštičiek (obrázok 2), je možné predísť aterotrombotickým príhodám. Stratégia zvýšenia dávky u non-responderov sa však v rozsiahlejších štúdiách, ako napríklad GRAVITAS, nepreukázala ako prínosná. V štúdiu bolo zaradených 5 429 pacientov liečených klopido-grelom, pričom až u 41 % ($n = 2 214$) bola laboratórne zachytená nedostatočná odpoveď. U polovice non-responderov bola následne zvýšená udržiavacia dávka klopido-grelu zo štandardných 75 mg na 150 mg denne. Po 6-mesačnom sledovaní bol výskyt srdcovej smrti, infarktu myokardu a trombózy stentu zhodný v oboch skupinách (2,3 %) (12). Naopak, stratégia prechodu na liečbu prasugrelom (v nasycovacej/udržiavacej dávke) 60/10 mg (13) alebo tikagrelomom 180 mg/90 mg 2-krát denne (14) sa na rozdiel od zvýšenia dávky klopido-grelu preukázala ako účinná pri navodení dostatočnej inhibície doštičiek a znížení výskytu nežiaducich ischemických ťažkostí.

Prietoková cytometria (VASP-P) sa v súčasnosti javí ako najperspektívnejšia a najviac citlivá metóda na detekciu pacientov s nedostatočnou odpoveďou na liečbu antagonistami ADP receptorov. Metóda silne koreluje s inhibíciou ADP-navodenej agregácie doštičiek pri in vitro špecifickej blokáde P2Y₁₂ ($r = 0,72$, $p < 0,0001$). Nevýhodou predstavujú finančné náklady, dostupnosť a chýbajúca možnosť kontroly odpovede na ASA. V porovnaní so svetelnou agregometriou je VASP-P test cennejší, pretože odráža špecificky aktivitu P2Y₁₂ receptora. VASP-P test takisto poskytuje stabilné výsledky pri spracovaní vzorky do 24 hodín po odbere krvi (na rozdiel od 2 hodín pri LTAI). VASP-P je považovaný za najcitlivejšiu metódu vyšetrenia funkcie krvných doštičiek a často je používaný ako referenčná metóda na validáciu nových testov. Hodnota VASP-P indexu väčšia alebo rovná 50 PRI preukázala 100 % citlivosť v predpovedaní trombózy stentu pri vysokorizikových PKI (15). V nedávnej štúdiu bolo tiež potvrdené, že hodnota VASP indexu < 16 % po ADP nasycovacej dávke ADP inhibítora bola prediktívne pre non CABG-súvisiace klinicky významné krvácanie (16).

Záver

Hoci monitorovanie protidoštičkovej liečby nie je v súčasnosti odporúčané ako štandardný postup, jeho význam pri liečbe klopido-grelom

a aspirínom je nespochybniteľný. Môže významne pomôcť identifikovať pacientov s nedostatočnou antiagregačnou odpoveďou na liečbu klopido-grelom. U týchto pacientov prináša benefit následný prechod na nové inhibítory ADP receptorov (prasugrel, tikagrelor), ktoré sú však naďalej spojené s určitými indikačnými obmedzeniami. Na druhej strane, laboratórne monitorovanie môže napomôcť identifikovať aj pacientov so zvýšeným rizikom krvácania. Otázne je využitie pri liečbe novými antagonistami ADP receptorov, pri ktorých je podiel non-responderov minimálny. Význam môžeme predpokladať pri ambulantnom sledovaní pacientov na dlhodobú duálnu protidoštičkovú liečbu, keď môžeme zachytiť jedincov, u ktorých nie je dostatočná spolupráca. Rutinné monitorovanie protidoštičkovej liečby má tiež prínos u vybraných pacientov (napríklad u pacientov s AKS), preto si v súčasnej klinickej praxi zaslúži pozornosť.

Projekt prebieha s grantovou podporou agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV) – APVV 022–11 a s podporou Európskeho rozvojového fondu v projekte Centrum excelencie pre perinatologický výskum: (CEPV II) – ITMS: 26220120036“ a (CEVPET) – ITMS: 26220120053“

Literatúra

- Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: the task force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European society of cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011;32(23):2999–3054.
- Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33(20):2569–2619.
- Sambu N, Curzen, N. Monitoring the effectiveness of anti-platelet therapy: opportunities and limitations. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(4):683–696.
- Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:2312–7.
- Wang X, Zhang D, Zhuang S, Lai Y. Modifying Clopidogrel Maintenance Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Index Improves Clinical Outcome in Patients With Clopidogrel Resistance. *Clin Cardiol*. 2011;34(5):332–338.
- Cattaneo M. Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution? *J Thromb Haemost*. 2012;10:327–36.
- Bonello L, Camoin-Jau L, Armero S, et al. Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103:5–10.
- Samoš M, Fedor M. Monitoring of Antiplatelet Therapy in Clinical Practice: Is it Necessary or Not? *J Hematol Thromb Dis*. 2014;2:(1).
- Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, et al. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(20):1909–1917.

10. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3:85–92.
11. Campo G, Miccoli M, Tebaldi M, et al. Genetic determinants of on-clopidogrel high platelet reactivity. *Platelets*. 2011;22(6):399–407.
12. Price Matthew J, et al. Standard-vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *Jama*. 2011;305(11):1097–1105.
13. Trenk D, Stone GW, Gawaz M, et al. A Randomized Trial of Prasugrel Versus Clopidogrel in Patients With High Platelet Reactivity on Clopidogrel After Elective Percutaneous Coronary Intervention With Implantation of Drug-Eluting Stents Results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) Study. *JACC*. 2012;24:2159–2164.
14. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, et al. Response to Ticagrelor in Clopidogrel Nonresponders and Responders and Effect of Switching Therapies The RESPOND Study. *Circulation*. 2010;121:1188–1199.
15. Campo G, Fileti L, Valgimigli M, et al. Poor response to clopidogrel: current and future options for its management. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;30(3):319–331.
16. Laine M, Toesca R, Berbis J, Frere C, Barnay P, et al. Platelet reactivity evaluated with the VASP assay following ticagrelor loading dose in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Throm Res*. 2013;132:15–18.
17. Fedor M, Samoš M, Šimonová R, Kubisz P, Mokáň M, et al. Monitoring the Efficacy of ADP Inhibitor Treatment in Patients With Acute STEMI Post-PCI by VASP-P Flow Cytometry Assay. *Clin Appl Throm Hemost*, 2014+1076029614540036.

MUDr. Marián Fedor

Národné centrum hemostázy a trombózy
Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK
Univerzitná Nemocnica Martin
Kollárova 2, 036 52 Martin
marianfedor25@gmail.com
